

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20790697

研究課題名（和文） 新規サイトカイン IL-17F の気道リモデリングへの関与

研究課題名（英文） Involvement of a novel cytokine IL-17F in airway remodeling

研究代表者

川口 未央（KAWAGUCHI MIO）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50365748

研究成果の概要（和文）：

2001年に我々が報告した IL-17F は喘息との関与が示唆されているがその詳細な役割は不詳である。一方、吸入ステロイド薬は最も強力な喘息の長期管理薬であるが、重症喘息では抗喘息薬の効果は決して高くなく、今後の喘息治療の大きな課題である。重症喘息の原因の一つとして気道リモデリングが挙げられる。気道リモデリングの形成には IL-11 と IGF-I を含むサイトカインネットワークが深く関与している。重症喘息の病態、特に気道リモデリングの形成メカニズムを解明するために IL-17F による気道上皮細胞からの IL-11 と IGF-I の発現について検討した。その結果、IL-17F は IL-11 と IGF-I を有意に産生し、その発現メカニズムは Raf1-MEK1/2-ERK1/2 を上流とした p90RSK-CREB および MSK1-CREB の2つの下流シグナル伝達経路が重要であることが明らかになった。以上から IL-17F やそのシグナル伝達経路が喘息、特に重症喘息の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We discovered IL-17F gene in 2001, and have reported its function in asthma. However, the role of IL-17F in asthma has not been fully elucidated. Although inhaled corticosteroids are the most potent medicines for long-term control of asthma, anti-asthma medicines including inhaled corticosteroids are generally not so effective for severe asthma. To this end, treating severe asthma is future serious problem in the world. Airway remodeling is deeply involved in the pathogenesis of severe asthma. Airway remodeling is caused by, at least partially, a complicated network of cytokines, including IL-11 and insulin-like growth factor-I (IGF-I). To clarify the pathogenesis of airway remodeling in asthma, we investigated the induction of IL-11 and IGF-I by IL-17F in bronchial epithelial cells. IL-17F is able to induce IL-11 and IGF-I via Raf1-MEK1/2-ERK1/2-MSK1/p90RSK-CREB signaling pathway in bronchial epithelial cells. Hence, the IL-17F/IGF-I axis may be involved in airway inflammation and remodeling. Therefore, IL-17F and its signaling pathway may be a valuable therapeutic target for severe asthma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	400,000	120,000	520,000
2010 年度	300,000	90,000	390,000
2011 年度	0	0	0
年度			
総 計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：呼吸器系・アレルギー学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息、IL-17F、気道リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の長期管理は吸入ステロイド薬の使用により容易となってきた。吸入ステロイド薬は喘息の重症化を防ぎ、その結果として喘息死の患者数を減少させた。しかしながら吸入ステロイド薬を含む抗喘息薬の効果が乏しい難治症例は未だに存在する。その原因の一つとして気道リモデリングが重要である。この気道リモデリングのメカニズムに関しては不明な点が多い。気管支喘息の病態には複雑なサイトカインネットワークが関与している。気道リモデリングも同様に IL-11 や IGF-I のような様々なサイトカインや成長因子が関係している。しかしながら既存のサイトカインネットワークだけでは気道リモデリングの全てを説明できない。この問題を解決する有力な方法の一つとして新しいサイトカインの発見やそのサイトカインネットワークを解明することが挙げられる。

## 2. 研究の目的

2001 年、我々は新しいサイトカインである IL-17F(ML-1)を発見した(Kawaguchi et. al. J. Immunol. 2001)。IL-17F の産生細胞は活性型好塩基球、CD4 陽性 T 細胞、肥満細胞などである。これらの細胞はアレルギー性炎症で重要な役割を担っていることから IL-17F がアレルギー性気道炎症に深く関与するサイトカインといえる。その生物学的機能は多彩であり、様々なサイトカイン、ケモカイン、接着分子を気道上皮細胞、血管内皮細胞から誘導する。さらに気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中で IL-17F 遺伝子の発現が亢進しており、IL-17F 遺伝子のアミノ酸変異を伴う一塩基多型 7488T/C の頻度は気管支喘息と有意な相関を認め、喘息の発症や重症化に関与する。このことから IL-17F が喘息の病態形成に深く関与していると考えられる。そこで本研究では新規サイトカイン IL-17F が気道リモデリングの形成に関与するという仮説を立て、IL-17F による気道リモデリングと関係が深い IL-11 と IGF-I の発現について in vitro で検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト正常気道上皮細胞及びヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞を IL-17F で 2~48 時間刺激した。IL-11 と IGF-I の mRNA の発現をリアルタイム PCR で、上清中の IL-11 及び IGF-I の蛋白濃度を ELISA にて検討した。次に IL-4、IL-13 単独もしくは IL-17F と共刺激し、24 時間後に上清を回収し、IL-11 及び IGF-I の蛋白濃度を ELISA で測定した。次に各種阻害剤の抑制効果を検討した。MEK

阻害剤(PD98059, U0126)、Raf1 kinase 阻害剤 (Raf1 kinase inhibitor I)、p38 MAPK 阻害剤 (SB202190)、JNK 阻害剤 (SP600125)、MSK1 阻害剤 (H89, Ro-31-8220)、DMSO で前処理後に IL-17F で刺激し、24 時間後の上清中の IL-11 及び IGF-I の蛋白濃度を ELISA にて測定した。次に IL-17F による MSK1 のリン酸化の検討を Western blotting を行った。さらに PD98059 による MSK1 のリン酸化に与える影響を同様に検討した。次に MSK1、CREB、control の siRNA を BEAS-2B 細胞に移入し、IL-17F による IL-11 および IGF-I の産生に対する抑制効果を ELISA で検討した。最後に MSK1 の siRNA を移入した細胞を IL-17F で刺激し、CREB への影響を Western blotting にて検討した。統計学的有意差は ANOVA with Scheffé F-test にて検討し、P value 0.05 以下の相違をもって有意とした。

## 4. 研究成果

IL-17F は 2 種類の気道上皮細胞 (ヒト正常気道上皮細胞及びヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞) から IL-11 と IGF-I の発現は 24 時間をピークに有意に誘導された (図 1, 2)。

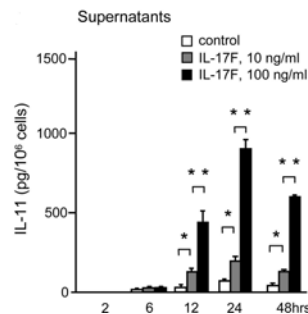
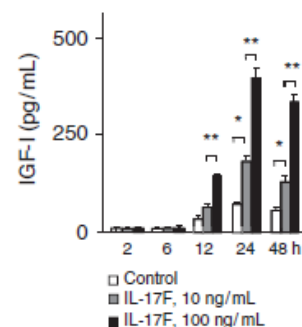


図 1. BEAS-2B 細胞上清中の IL-11 濃度

図 2. BEAS-2B 細胞上清中の IGF-I 濃度



IL-11 と IGF-I の発現の誘導能に 2 種類の気道上皮細胞群で違いはなかった。さらに図 3 に示すように Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) 単独刺激では IL-11 の発現を誘導しなかったが共刺激にてその発現は有意に増強した。IGF-I でも同様な結果が得られた。このことから Th2 サイトカインが豊富にある喘息の気道では IL-17F による IL-11 や IGF-I の発現が

増強し、気道リモデリングが促進すると推測される。

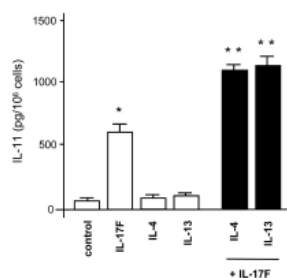


図3 Th2 サイトカインによる IL-17F の IL-11 発現に与える影響

次に発現メカニズムとして IL-17F のシグナル伝達経路の同定を行った。Western blotting による検討で IL-17F による Raf1、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK、MSK1、CREB のリン酸化を認めた。図4では IL-17F による MSK1 のリン酸化を示す。MSK1 のリン酸化は IL-17F の刺激後5分で認め、20分でピークに達し、刺激後120分でベースラインに戻った。

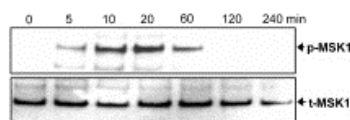


図4. IL-17F による MSK1 のリン酸化

次に各種シグナル伝達経路阻害剤を用いた抑制実験では図5のように Raf1-MEK1/2-ERK1/2 経路の阻害剤は有意に IL-17F による IL-11 の産生を抑えた。これに対し、p38MAPK や JNK 阻害剤は抑制効果を示さなかった。また、IGF-I 産生に関しても同様な結果が得られた。

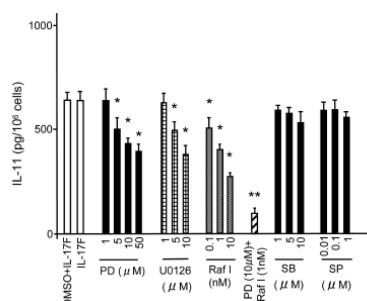


図5. 各種阻害剤による IL-17F による IL-11 産生への影響

siRNA を用いた抑制実験では MSK1、p90RSK、CREB の siRNA を BEAS-2B 細胞に移入する

と図6のように IL-17F による IGF-I の産生は有意に抑制された。また、IL-11 産生に関しても同様な結果が得られた。

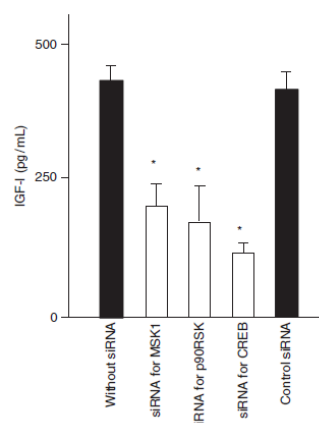


図6. 各種 siRNA による IL-17F による IGF-I 産生への影響

以上から Raf1-MEK1/2-ERK1/2 を上流とした p90RSK-CREB および MSK1-CREB の2つの下流のシグナル伝達経路が IL-17F による IL-11 および IGF-I の発現に対し重要であることが判明した。IL-11 や IGF-I は喘息患者の気道で発現が亢進しており、気道リモデリングの病理学的特徴である繊維化や気道壁の肥厚と関与する。これらの所見から喘息の難治化の原因の一つである気道リモデリングと関係が深いサイトカインである。しかしながらこれまで IL-11 および IGF-I の誘導因子は不明であった。本研究から喘息の発症や重症化と関係が深い IL-17F が強力な誘導因子であることが初めて同定された。よって、IL-17F の発現や機能を制御できるようになれば重症喘息の治療につながるものが期待される。IL-17F やそのシグナル伝達経路が喘息、特に難治性の重症喘息の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

① Kawaguchi M, Fujita J, Kokubu F, Ohara G, Huang SK, Matsukura S, Ishii Y, Adachi M, Satoh H, Hizawa N. Induction of insulin-like growth factor-I by interleukin -17F in bronchial epithelial cells. Clin Exp Allergy. 40,1036-1043, 2010, 査読有

② Kawaguchi M, Fujita J, Kokubu F, Huang SK, Homma T, Matsukura S, Adachi M, Hizawa N. IL-17F-induced IL-11 release in bronchial epithelial cells via MSK1-CREB pathway. Am J

Physiol Lung Cell Mol Physiol. 296, L804-810, 2009, 査読有

③ Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, Huang SK, Hizawa N. Role of interleukin-17F in asthma. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 8, 383-389, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、増子裕典、大原元、阿野哲士、山鳥忠宏、谷下田雄一、森島祐子、石井幸雄、Shau-ku Hunag、坂本透、足立満、檜澤伸之、Induction of IL-11 and IGF-I by IL-17F in bronchial epithelial cells. 106th International Conference of American Thoracic Society, 2010 年 5 月 16 日、米国(ニューオーリンズ)
- ② 藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、IL-17F の新たなシグナル伝達経路: MSK1-CREB, 日本呼吸器学会学術講演会、2009 年 6 月 13 日、東京
- ③ 川口未央、アレルギーと IL-17・Th17 細胞臨床領域から、日本アレルギー学会春季臨床大会、2009 年 6 月 4 日、岐阜
- ④ 藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、IL-17F のシグナル伝達経路: MSK1-CREB の関与、日本アレルギー学会春季臨床大会、2009 年 6 月 4 日、岐阜
- ⑤ 藤田純一、川口未央、國分二三男、本間哲也、鈴木慎太郎、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、Shau-ku Hunag、足立満、檜澤伸之、A novel cytokine, IL-17F induces IL-11 in bronchial epithelial cells. 105th International Conference of American Thoracic Society, 2009 年 5 月 18 日、米国(サンディエゴ)
- ⑥ 藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、IL-17F による気道上皮細胞からの IL-11 の誘導、第 19 回国際喘息学会、2009 年 7 月 5 日、東京
- ⑦ 藤田純一、川口未央、國分二三男、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、IL-17F による気道上皮細胞からの IL-11 の誘導、第 17 回臨床喘息研究会、2009 年 10 月 3 日、京都
- ⑧ 藤田純一、川口未央、國分二三男、本間哲也、松倉聡、森島祐子、石井幸雄、坂本透、足立満、檜澤伸之、IL-17F による気道上皮細胞からの IL-11 と IGF-I の発現、第 12 回アレルギー・気道上皮細胞研究会、2008 年 12 月 6 日、東京
- ⑨ 川口未央、IL-17F の役割、16<sup>th</sup> Symposium of Asthma in Tokyo, 2008 年 12 月 20 日、東京
- ⑩ 川口未央、気管支喘息における IL-17F の臨床的意義、第 5 回北関東信越呼吸器フォー

ラム、2008 年 7 月 5 日、東京

⑪ 川口未央、國分二三男、本間哲也、尾高美保、鈴木慎太郎、渡辺伸、松倉聡、黒川真嗣、Shau-ku Hunag、足立満、A new cytokine, IL-17F induces IGF-I in bronchial epithelial cells, 104th American Thoracic Society International Conference, 2008 年 5 月 13 日、カナダ(トロント)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 未央 (KAWAGUCHI MIO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号: 5 0 3 6 5 7 4 8

### (2) 連携研究者

檜澤 伸之 (HIZAWA NOBUYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 2 1 3 9 0 2 5 4

國分 二三男 (KOKUBU FUMIO)

昭和大学・藤が丘病院呼吸器内科・准教授

研究者番号: 2 1 3 9 0 2 5 4

松倉 聡 (MATSUKURA SATOSHI)

昭和大学・呼吸器アレルギー内科・講師

研究者番号: 1 0 3 8 4 2 3 1