

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

中西 憲司

(兵庫医科大学 教授)

「IL-18を標的とした自然型アトピー症の治療戦略」

1. 研究実施概要

従来の定説では、アレルギー性応答にはアレルゲンとアレルゲン特異的なIgEが必須であり、アレルゲンとアレルゲンに特異的なIgEがマスト細胞或いは好塩基球を活性化してアレルギー応答の効果分子を遊離することでアレルギー応答が完結すると考えられてきた。従って、アレルゲンあるいはアレルゲンに特異的なIgEの産生に照準を合わせた治療方法の確立が模索されてきた。しかし、臨床現場に目を転ずると、IgEが高値でないアレルギー疾患の患者、あるいはIgEのアレルゲンが特定できない患者が少なからず存在する。当該研究では、このような獲得免疫応答を介さずにアレルギー応答が展開する可能性とその細胞・分子機構を明らかにし、さらに、その機序に基づいた治療方法を確立するものである。

IL-18はマスト細胞や好塩基球に直接作用してアレルギー応答の効果分子であるヒスタミンなどの化学伝達物質の遊離やアレルギー応答に関連するサイトカインであるIL-4やIL-13の産生を誘導する。また、IL-18はT細胞に作用してIL-4やIL-13の産生やCD40リガンドの発現を促し、その結果B細胞からのIgEの分泌を促進する。このIgEは、抗原・アレルゲンによる感作がなくても上昇することから、多クローン性のIgEと考えられる。事実、高濃度のIL-18が皮膚局所に集積するように遺伝子操作したマウスは、アレルゲン感作が無くても血清IgE値が上昇し、アトピー性皮膚炎を自然発症する。ところで、このようなIL-18の生理活性は、IL-12が共存すると相殺される。従って、IL-12を産生誘導することなくIL-18の分泌を惹起する刺激とその分泌メカニズムの解明が必要となる。当該研究期間では、高濃度のIL-18が皮膚局所集積するように遺伝子操作したマウスに観られるアトピー性皮膚炎の発症がIL-18依存性であり、かつIgEに依存しないことを個体レベルで証明した。また、野生型マウスに微生物成分を負荷して、局所における選択的なIL-18分泌を誘導することによる「感染を契機とした自然型アレルギー応答マウスモデル」の作製を試みた。

2. 研究実施内容

IgE非依存性に発症するアトピー性皮膚炎

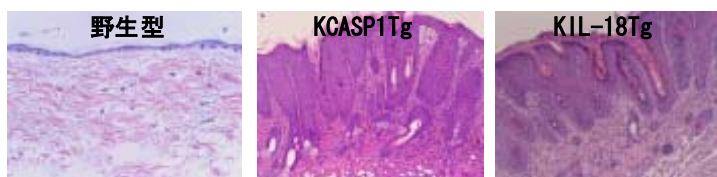
〔目的〕皮膚を構成するケラチノサイトは生理活性のないIL-1 β 前駆体並びにIL-18前駆体を恒常的に発現している。そこで、これらの前駆体を活性型に転換する細胞内酵素であるcaspase-1をケラチノサイト特異的に強制発現することで、高濃度のIL-18或いはIL-1 β が皮膚局所に集積するcaspase-1 transgenic mouse (KCASP1Tg)を既に作製し、アトピー性皮膚炎用の皮膚病変を自然発症することを報告した。今回は、このKCASP1Tgに観られるアトピー性皮膚炎の発症が、IL-18依存性であり、かつIgEに依存しないことを証明するため、IL-18を欠損したKCASP1TgあるいはIgEの産生に必須のIL-4転写因子であるSTAT6を欠損したKCASP1Tgを作製し、これらの効果を個体レベルで検討した。

〔方法〕KCASP1TgとIL-18欠損マウスを交配して、IL-18欠損KCASP1Tgを樹立した。KCASP1TgとSTAT6欠損マウスを交配して、STAT6欠損KCASP1Tgを作製した。さらに、KCASP1TgとIL-1欠損マウスを交配して、IL-1欠損KCASP1Tgを作製した。また、ケラチノサイト特異的に活性型のIL-18が高濃度に発現するように遺伝子操作した、IL-18 transgenic mice (KIL-18Tg)を作製した。

〔結果〕

(1) 活性型IL-18を皮膚に 図1：IgEを介さずにIL-18依存性に発症するアトピー性皮膚炎

強制発現したKIL-18TgはKCASP1Tgに比べると、同程度のアトピー性皮膚炎（図1）を遅れて発症した。



(2) 血清IgEが検出できないSTAT6欠損KCASP1TgはKCASP1Tgと同程度のアトピー性皮膚炎（図1）を同時期に自然発症した。



(3) IL-18欠損KCASP1Tgはアトピー性皮膚炎を発症しなかった（図1）。

(4) IL-1欠損KCASP1TgはKCASP1Tgと同程度ではある（図1）が遅れてアトピー性皮膚炎を発症した。その遅延度は、KIL-18Tgのそれと同程度であった。

〔考察〕以上の結果から、皮膚局所にIL-18が集積すると、内因性のIgEに関係なくアトピー性皮膚炎用の慢性皮膚炎が誘導され、IL-1 β はそれを加速することが明らかとなった。ブドウ球菌成分はケラチノサイトからの選択的なIL-18分泌を誘導する

〔目的〕皮膚局所からのIL-18の遊離をもたらす自然産物を明らかにするために、ケラチノサイトを種々の微生物成分と共に培養して、活性型IL-18の分離を検討した。既に報告しているように、マクロファージからIL-18の分離を誘導する刺激としては、グラム陰性

菌の細胞壁を構成するエンドトキシン(LPS)、あるいはアポトーシスを誘導するFasリガンドなどが知られている。ところで、細菌感染、特にブドウ球菌感染はアトピー性皮膚炎の誘導あるいは増悪因子であることが临床上よく知られている。そこで、ブドウ球菌成分に焦点を合わせて検討した。

〔方法〕野生型マウスの皮膚からケラチノサイトを分離し、LPS、Fasリガンドあるいは、種々のブドウ球菌株、或いはその成分として、ペプチドグリカン、プロテインAなどを加えて培養し、培養上清中のIL-18を測定して、IL-18が産生・分泌されるかを検討した。また、マウスのケラチノサイトの細胞株であるPAM212細胞を用いて同様に検討した。

〔結果〕

- (1) 野生型のブドウ球菌やエンテロトキシン産生ブドウ球菌株の死菌を添加してもIL-18の分泌は観察されなかった。
- (2) LPSやFasリガンド刺激によってもIL-18の分泌は認められなかった。
- (3) プロテインAを産生する株であるCowan I株死菌或いは精製プロテインAはケラチノサイトからの活性型のIL-18の分泌を誘導した。しかし、IL-12の産生は誘導しなかった。
- (4) プロテインAをマウスの耳介に塗布すると、マウスの血清IL-18並びに、IgE値は上昇した。

〔考察〕以上の結果から、ブドウ球菌感染、特にその成分のうちのプロテインAがケラチノサイトからのIL-18分泌を誘導し、このIL-18がアトピー性皮膚炎の引き金を引く可能性が示唆された。

3. 研究実施体制

中西グループ：

- ①研究分担グループ長：中西憲司（兵庫医科大学、教授）
- ②研究項目：自然型皮膚炎モデルの作製と解析

水谷グループ：

- ①研究分担グループ長：水谷仁（三重大学医学部、教授）
- ②研究項目：皮膚炎モデルの作製と解析

岡村グループ：

- ①研究分担グループ長：岡村春樹（兵庫医科大学、教授）
- ②研究項目：自然型気管支喘息モデルの作製と解析

杉村グループ：

- ①研究分担グループ長：杉村和久（鹿児島大学工学部、教授）
- ②研究項目：ヒト一本鎖抗体ライブラリーを用いた、ヒトIL-18並びにヒトIL-18受容体に対する抗体の単離

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Shimoda, K., Tsutsui, H., Aoki, K., Kato, K., Matsuda, T., Numata, A., Takase, K., Yamamoto, T., Nukina, H., Hoshino, T., Asano, Y., Gondo, H., Okamura, T., Okamura, S., Nakayama, K., Nakanishi, K., Hiho, Y., and Harada, M. Partial impairment of IL-12 and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. *Blood*. 99, 2094-2099. 2002.
- Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Nakano, H., Yamanaka, K., Yumikura-Futatsugi, S., Tanaka, M., Iwakura, Y., Fuchs, E. V., Okamura, H., Suzuki, N., Nakanishi, K. and Mizutani, H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 11340-11345. 2002.
- Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, M. N., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Critical roles of MyD88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol*. 169, 3863-3868. 2002.
- Nakamoto, Y., Kaneko, S., Fan, H., Momoi, T., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Kobayashi, K. and Suda, T. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J. Exp. Med*. 196, 1105-1111. 2002.
- Fujimoto, M., Tsutsui, H., Yumikura-Futatsugi, S., Ueda, H., Xingshou, O., Abe, T., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto, T. and Naka, T. A regulatory role for SOCS-1 in T helper polarization in vivo. *Int. Immunol*. 14, 1343-1350. 2002.
- Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Yamanishi, K., Kawase, I., Nakanishi, K. and Kishimoto, T. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*. 17, 677-687. 2002.

(2) 特許出願

1件