

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

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. 研究実施の概要

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。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IgE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。対象疾患は、アトピー性皮膚炎と気管支喘息である。

アトピー性皮膚炎や気管支喘息は、微生物感染を契機に発症・増悪することは周知である。ところで、微生物あるいはその成分はシグナル受容体であるTLRsを介したシグナル経路を活性化し、IL-18を分泌する。また、同時にIL-12を産生し、選択的にTh1細胞分化が誘導される。これらの事実に着目し、IL-18が過剰に皮膚、あるいは気管支に曝露することで、Th2細胞分化を必要としないアレルギー応答が惹起されるのではないかと考えた。

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。実際、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、頻回の皮膚搔爬行動を伴う慢性皮膚炎を自然発症する。病変皮膚局所には、マスト細胞の異常集積が観察される。このアトピー性皮膚炎は、従来型のTh2型アレルギー応答に必須のIgE/stat6を必要としない。また、IL-18を欠損した当該遺伝子改変マウスは皮膚炎を回避することから、皮膚局所からの多量のIL-18遊離が、本アトピー性皮膚炎の本質であることが明らかとなった。

当該研究期間では、「感染を契機とした自然型アトピー性皮膚炎マウスモデル」の作製を試みた。さらに、感染を契機にIL-12とIL-18の両者が産生・分泌されることを考慮して、「Th1細胞による気管支喘息モデル」の作製と解析を行った。

## 2. 研究実施内容

### IL-18とTh1細胞で誘導されるマウス気管支喘息

[目的]気管支喘息は、気道抵抗の増加、気道周囲の好酸球を中心とする炎症性細胞浸潤、気道ムチンの過剰産生などを特徴とする、気道病変である。種々のサイトカインやケモカインが病態を決定する。特に、IL-13は気道平滑筋の収縮を促すとともにムチン産生も促進することが知られている。実際、マウスをTh2アジュバントと抗原で前もって感作し、経鼻的に抗原をチャレンジすると、気道抵抗が増強し、気道周囲に好酸球を中心とした強度な炎症が展開する。この病変はIL-13の作用を中和することで阻止される。これはTh2型の気管支喘息マウスモデルである。ところで、Th2応答はTh1応答による抑制されることはよく知られている。しかし、Th1細胞とTh2細胞が混在するマウス気管支喘息は、Th2細胞により惹起される気管支喘息と同程度かより強度であることが最近の研究で明らかになってきた。ところで、気管支上皮はIL-18前駆体を恒常的に発現し、IL-18を分泌する能力を持つ。また、Th1細胞は選択的にIL-18受容体を発現する。そこで、Th1細胞がIL-18と抗原により活性化される環境下で、気管支喘息が誘導されるかを検討した。

[方法]マウスに前もって、抗原特異的なメモリーTh1細胞を移入し、静止期のメモリーTh1細胞になるまで放置する。静止期メモリーTh1細胞移入マウスに抗原あるいは抗原とIL-18を経鼻的に投与し、気道抵抗と気道の炎症所見を検討した。

[結果]

- (1) Th1細胞を抗原で刺激すると、IFN $\gamma$ やTNF $\alpha$ などのTh1サイトカインを産生するが、抗原とIL-18で刺激をすると、これらのサイトカインを大量に産生するだけでなく、GM-CSF並びにTh2サイトカインであるIL-13やRANTES、eotaxinといったケモカインも産生するように変化する。
- (2) 抗原特異的なメモリーTh1細胞をマウスに移入し、一定期間後に経鼻的に抗原とIL-18を投与すると、マウスの気道抵抗は増強した。その程度は、Th2細胞を移入して、抗原曝露で誘導される通常型の気管支喘息と同等であった。また、内因性のIL-13の作用を減弱しても気道抵抗に変化は認められなかった。なお、Th1細胞移入マウスに抗原を曝露するだけでは、気道抵抗は増強しなかった。
- (3) Th1細胞移入マウスに観られる気管支喘息は、気道周囲の好酸球を伴う強い炎症所見が認められた。なお、Th1細胞移入マウスに抗原を曝露するだけでは好酸球の浸潤は観察されなかった。

[考察]以上の結果から、IL-18はTh1細胞による気管支喘息を誘起することが判明した。今後、気管支喘息症例を用いて、ヒト疾病でも同様の機序が作用するかを検討する。

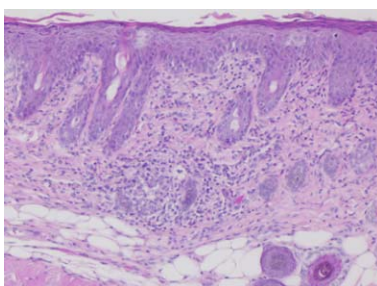
### ブドウ球菌産物によるアトピー性皮膚炎の誘導

[目的]昨年度の研究で、微生物成分刺激でケラチノサイトからIL-18が分泌されることが明らかとなった。そこで、皮膚に同成分を塗布してアトピー性皮膚炎が惹起されるかを検討した。

[方法] マウスの背面皮膚に、界面活性剤と微生物成分を連日塗布し、掻痒性皮膚炎が惹起されるか否かを、マウスの行動、皮膚視診、並びに病理組織学的に検討した。

[結果]

(1) 4週間連日塗布により、図のような皮膚炎が観察された。また、マウスは病変部位を頻回に作歌することから掻痒性が高いことが示唆された。



(2) 4週間後の組織所見では、表皮の肥厚、真皮へのマスト細胞をはじめとした炎症性細胞の集積、血漿ヒスタミンの上昇が観察された。

[考察] 界面活性剤と微生物成分を皮膚に塗布することで、慢性掻痒性皮膚炎が誘導され、これを、「感染を契機とするアトピー性皮膚炎モデル」と考え、細胞・分子機構を今後検討する。

#### IL-18シグナルのアンタゴニストの開発

[目的] IL-18が関与するヒト疾病の治療薬および診断薬の開発をおこなう。

[方法] ヒト抗体を提示したファージディスプレイライブラリーを用いてバイオパンニング法によりヒトIL-18に特異的なヒト一本鎖抗体、h18-108を単離した。この抗体は一本鎖抗体でありながらIL-18シグナリングを阻害する。平成15年度は、このh18-108抗体の認識エピトープの決定を行った。すなわち、3種類のペプチドファージライブラリーを用いてh18-108のエピトープマッピングを行った。IL-18シグナルの実験系は、ヒト骨髄系細胞株、KG-1をIL-18で刺激するとIFN- $\gamma$ が産生される培養系とヒトTh 1細胞をIL-18で刺激し、そのIFN- $\gamma$ およびIL-13の産生が誘導される実験系を用いた。

[考察] IL-18シグナルを阻害するh18-108は、IL-18がIL-18リセプター $\beta$ 鎖との結合に関与すると推定されるbinding IIIに結合する。この成果から、h18-108抗体自身が抗体医薬として利用できる可能性が示唆される。また、IL-18のシグナルを阻止する低分子量アンタゴニストの開発の可能性を示唆するものとする。

### 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

- Hayashi, H., Inoue, Y., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K. and Onozaki, K. TGF beta down-regulates IFN-gamma production in IL-18 treated NK cell line LNK5E6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 980-985. 2003.
- Suzuki, N., Chen, N-J., Millar, D. G., Suzuki, S., Horacek, T., Hara, H., Bouchard, D., Nakanishi, K., Penninger, J. M., Ohashi, P. S. and Yeh, W-C. IRAK-4 is essential for Interleukin-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses. *J. Immunol.* 170, 4031-4035. 2003.
- Yoshimoto, T., Min, B., Sugimoto, T., Hayashi, N., Ishikawa, Y., Sasaki, Y., Hata, H., Takeda, K., Okumura, K., Kaer, L. V., Paul, W. E. and Nakanishi, K. Non-redundant roles for CD1d-restricted NKT cells and conventional CD4<sup>+</sup> T cells in the induction of IgE antibodies in response to IL-18 treatment of mice. *J. Exp. Med.* 197, 997-1005. 2003.
- Nakano, H., Tsutsui, H., Terada, M., Yasuda, K., Matsui, K., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Mizutani, H. Yamamura, T. and Nakanishi, K. Persistent secretion of IL-18 in the skin contributes to systemic IgE response in mice. *Int. Immunol.* 15, 611-621. 2003.
- Ogushi, I., Iimuro, Y., Seki, E., Sonm G., Hirano, T., Hada, T., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Morishita, R., Kaneda, Y. and Fujimoto, J. Nuclear factor  $\kappa$  B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model. *Hepatology* 38, 335-344. 2003.
- Nagamine, Y., Hayano, M., Kashiwamura, S-I., Okamura, H., Nakanishi, K., Krudsod, S., Wilairatana, P., Looareesuwan, S. and Kojima, S. Involvement

of interleukin-18 in severe *Plasmodium falciparum* malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 97, 236-241. 2003.

- Kaizu, M., Ami, Y., Nakasone, T., Sasaki, Y., Izumi, Y., Sato, H., Takahashi, E., Sakai, K., Shinohara, K., Nakanishi, K. and Honda, M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. Virology, 313, 8-12. 2003.
- Sugimoto, T., Ishikawa, Y., Yoshimoto, T., Hayashi, N., Fujimoto, J. and Nakanishi, K. Interleukin 18 acts on memory T helper cells type 1 to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naive host mouse. J. Exp. Med., 199, 535-45. 2004.
- Tsuji, N.M., Tsutsui, H., Seki, E., Kuida, K., Okamura, H., Nakanishi, K. and Flavell, R.A. Roles of caspase-1 in Listeria infection in mice. Int. Immunol., 16, 335-343. 2004.
- Kojima, S., Nagamine, Y., Hayano, M., Looareesuwan, S. and Nakanishi, K. A potential role of interleukin 18 in severe falciparum malaria. Acta Trop., 89, 279-84. 2004.
- Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? Gene Ther. doi:10.1038/sj.gt.3302240. 2004.
- Fujimoto, M., Tsutsui, H., Xinshou, O., Tokumoto, M., Watanabe, D., Shima, Y., Yoshimoto, T., Hirakata, H., Kawase, I., Nakanishi, K., Kishimoto, T. and Naka, T. Inadequate induction of suppressor of cytokine signaling-1 causes systemic autoimmune diseases. Int. Immunol. 16, 303-314. 2004.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：4件（研究期間累積件数：5件）