

「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

当該研究は、非IgE/Th2型アレルギー疾患のメカニズムを解明し、原因因子を標的とする新規治療方法を確立することを目的とする。そのために、「Th1型気管支喘息」並びに「炎症型アトピー性皮膚炎」マウスモデルを確立した。今年度は、それぞれの疾患モデルにおける免疫学的病態を解析するとともに、予防・治療方法を検討した。その結果、両疾患に対して、IFN- γ あるいはIL-18を標的とした予防の有用性が判明した。また、アトピー性皮膚炎患者の血清IL-18は有意に高値であることが判明した。さらに、臨床応用可能な、ヒト抗ヒトIL-18抗体の作製に成功した。今後は、非IgE/Th2型のヒト気管支喘息並びにアトピー性皮膚炎患者に対するIL-18標的療法の確立に向け、研究を加速する予定です。

2. 研究実施内容

① 「Th1型気管支喘息」

気管支喘息は気道感染を契機に増悪することが、臨床経験上よく知られている。一方、IL-18は微生物産物の刺激により気道上皮細胞から分泌される。これらの事実に立脚して、以下の仮説を構築した。すなわち、従来、気管支喘息を誘起しないと考えられてきたTh1細胞は、抗原とIL-18に遭遇すると、強力な炎症応答を惹起して気管支喘息を惹起するのではないかと考えた。この仮説の一端を昨年度実証し報告した。in vitroで作製したOVAに特異的なTh1メモリー細胞をナイーブマウスに移入す

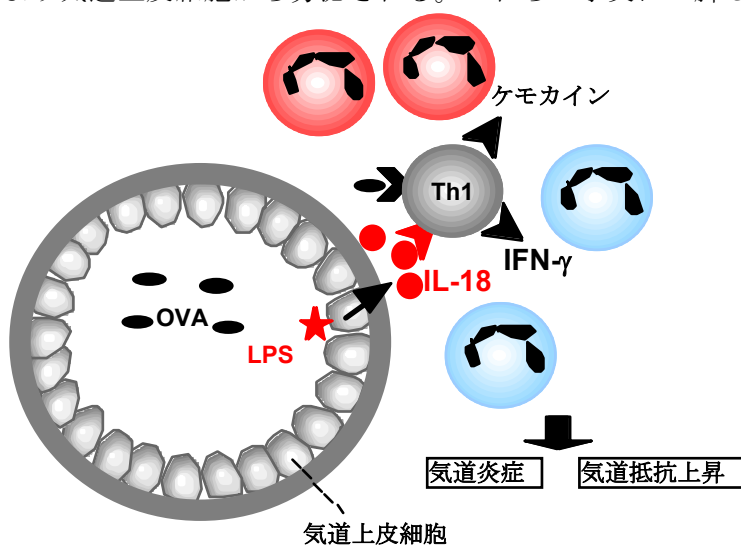


図1 Th1型気管支喘息

ると、OVAを点鼻するだけでは気管支喘息様症状を呈さないが、OVAとIL-18を同時に点鼻すると気管支喘息に陥り、メサコリン刺激による気道抵抗の上昇や、好中球と好酸球を主体とする気道炎症が観察される。そこで、当該研究期間では、より自然なTh1型気管支喘息モデルを作製し、その免疫学的機序と予防方法を検討した。そのために、あらかじめCFAに懸濁したOVAでマウスを感作し、OVA特異的なTh1細胞を内包するマウスを作製した。このOVA-Th1マウスに、OVAとLPSを同時に点鼻すると、OVA単独点鼻時には観察されない、気道抵抗の上昇と好酸球・好中球性の気道炎症が惹起された（図1）。この「Th1型気管支喘息」は、IL-18中和抗体あるいはIFN- γ 中和抗体の投与により、強く抑制されることが明らかとなった。一方、Th2型気管支喘息の重要な病因因子であるIL-13を阻害しても、「Th1型気管支喘息」は抑制されなかった。以上の結果から、「Th1型気管支喘息」に対しては、IL-18とIFN- γ を標的とした治療法が有用であることが示唆された。

②「炎症型アトピー性皮膚炎」

アトピー性皮膚炎局所には黄色ブドウ球菌感染が高頻度に観察され、その程度は病勢に比例することが臨床経験上よく知られている。このことから、黄色ブドウ球菌がアトピー性皮膚炎の重篤化因子であると考えられてきた。一方、既に報告しているように、選択的に表皮細胞から大量のIL-18を分泌するように遺伝子改変されたマウスは、Th2/IgEに依存せずに、アトピー性皮膚炎を惹起する。また、昨年度に報告したように、黄色ブドウ球菌成分のなかでも、protein A (SpA)は表皮細胞を刺激して、IL-18分泌を誘導する。これらの事実に立脚して、SpAを皮膚に塗布することで、アトピー性皮膚炎が惹起されるという仮説を構築した。当該研究期間では、SpA誘導性アトピー性皮膚炎マウスモデルを作製し、その免疫学的機序と治療方法を解明した。マウスに表皮バリア破壊剤でもあるSDSを投与し、継いでSpAを1日1回塗布し、経時的に皮膚変化を観察した。その結果、2週目から明らかなアトピー性皮膚炎様の掻痒性皮膚炎を呈し、血漿ヒスタミン値も上昇した。病変局所には、上皮の肥厚と、好酸球、好中球、肥満細胞、T細胞などを主体とする真皮白血球浸潤が観られた。T細胞は、Th1細胞を凌駕する能力を持つsuper Th1細胞に分化していた。この掻痒性慢性皮膚炎を「炎症型アトピー性皮膚炎」と提唱した（図2）。「炎症型アトピー性皮膚炎」も、IL-18中和抗体あるいはIFN- γ 中和抗体の投与により、強く抑制された。しかし、IL-

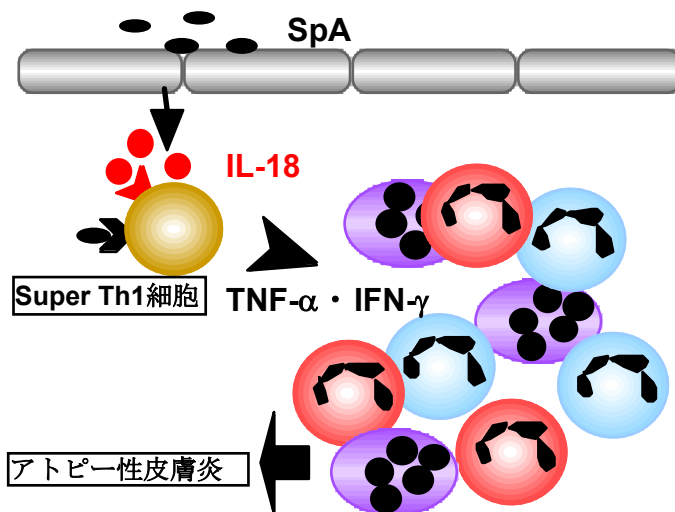


図2 炎症型アトピー性皮膚炎

13のシグナルを阻止しても皮膚炎は軽減しなかった。以上の結果から、「炎症型アトピー性皮膚炎」に対しては、IL-18やIFN- γ を標的とした治療法が有用であることが示唆された。

③ヒト抗ヒトIL-18抗体の作製

ヒト一本鎖抗体ライブラリーを組み込んだベクターを作製し、ヒトIL-18に対して高親和性の結合能を示すクローンを複数個単離した。これらのヒト一本鎖抗体が中和活性を示すことを、bioassayで確認した。

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：自然型気管支喘息モデルと自然型アトピー性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：自然型アトピー性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

山西グループ：

①研究分担グループ長：山西清文（兵庫医科大学、教授）

②研究項目：ヒト臨床材料を用いた、IL-18相関性アトピー性皮膚炎の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Adachi, K, Tsutsui, H., Seki, E., Nakano, H., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer L. and Nakanishi, K. Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5⁺ NKT cells to liver injury in Plasmodium berghei-parasitized erythrocyte-injected mice. Int. Immunol., 16, 787-798. 2004.
- Okamoto, T., Yamada, N., Tsujimura, T., Sugihara, A., Nishizawa, Y.,

- Ueda, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Futani, H., Maruo, S., Okamura, H., Terada, N. (2004) Inhibition by interleukin-18 of the growth of Dunn osteosarcoma cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 24, 161-167. 2004.
- Itoi, H., Fujimori, Y., Tsutsui, H., Matsui, K., Hada, T., Kakishita, E., Okamura, H., Hara, H. and Nakanishi, K. Differential upregulation of interleukin-18 receptor alpha chain between CD4(+) and CD8(+) T cells during acute Graft-Versus-Host Disease in mice. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24, 291-296. 2004.
- Saiki, O., Uda, H., Nishimoto, N., Miwa, T., Mima, T., Ogawara, T., Azuma, N., Katada, Y., Sawaki, J., Tsutsui, H., Matsui, K., Maeda, A. and Nakanishi, K. Adult Still's disease reflects a Th2 rather than a Th1 cytokine profile. *Clin Immunol.*, 112, 120-125. 2004.
- Yamamoto, M., Yaginuma, K., Tsutsui, H., Sagaral, J., Guan, X., Seki, E., Yasuda, K., Yamamoto, M., Akira, S., Nakanishi, K., Noda, T. and Taniguchi, S. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells.*, 9, 1055-1067. 2004.
- Itoi, H., Fujimori, Y., Tsutsui, H., Matsui, K., Sugihara, A., Terada, N., Hada, T., Kakishita, E., Okamura, H., Hara, H. and Nakanishi, K. Involvement of interleukin-18 in acute graft-versus-host disease in mice. *Transplantation*, 78, 1245-1250. 2004.
- Hata, H., Yoshimoto, T., Hayashi, N., Hada, T. and Nakanishi, K. IL-18 together with anti-CD3 antibody induces human Th1 cells to produce Th1- and Th2-cytokines and IL-8. *Int Immunol.* 16, 1733-1739. 2004.
- Oh, K., Iimuro, Y., Takeuchi, M., Kaneda, Y., Iwasaki, T., Terada, N., Matsumoto, T., Nakanishi, K. and Fujimoto, J. Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 288, G729-35. 2004.
- Mizutani, H., Nishiguchi, T. and Murakami, T. Animal model of atopic dermatitis. *JAMA J.* 47, 501-507, 2004.
- Oku, H., Tsuji, Y., Kashiwamura, S.I., Adachi, S., Kubota, A., Okamura, H. and Koyama, K. Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Hum. Reprod.*, 19, 709-714. 2004.
- Kanno, T., Nagata, T., Yamamoto, S., Okamura, H. and Nishizaki, T. Interleukin-18 stimulates synaptically released glutamate and enhances postsynaptic AMPA receptor responses in the CA1 region of mouse hippocampal slices., *Brain Res.*, 25, 190-193. 2004.

- Matsumoto, R., Fujino, K., Nagata, Y., Hashiguchi, S., Ito, Y., Aihara, Y., Takahashi, Y., Maeda, K. and Sugimura, K. Molecular characterization of a 10-kDa buckwheat molecule reactive to allergic patient's IgE, *Allergy*, 59, 533-538, 2004.
- Tanaka, K., Miyazaki, A., Yoshinaga, K., Hashiguchi, S. Ito, Y., Yoshizaki, K. and Sugimura, K. Affinity maturation of IL-6 mimic peptide IL-6/37 isolated from phage library, *Peptide Science 2003*, The Japanese Peptide Society, 347-350, 2004.
- Ito, Y., Yamashita, S., Tomichi, A., Maeda, M., Hashiguchi, S., Sakamoto, K., Torikai, M., Nakashima T. and Sugimura, K. Blockade of Costimulatory signal and immuno-suppression by anti-human B7RP-1 scFv Antibodies from naïve human antibody phage library, *IMMUNOLOGY 2004*, MEDIAMOND S.r.l, 467-470, 2004.
- Hashiguchi, S., Hayashi, T., Ito, Y., Sugimura, K. Bindnig Epitope of Human Anti-FcεR1 α-chain Receptor Antibody, RE51, with the Blocking Activity on IgE-mediated Histamine Release, *IMMUNOLOGY 2004*, MEDIAMOND S.r.l, 541-544, 2004.
- Hamasaki, T., Hashiguchi, S., Kato, Z., Ito, Y., Nakanishi, K. and Sugimura, K. Human antibody recognizing the epitope of Interleukin-18 Binding Site III for IL-18 receptor, *IMMUNOLOGY 2004*, MEDIAMOND S.r.l, 381-384, 2004
- Imai, Y., Habe, K., Imada, M., Hakamada, A., Isoda, K., Yamanishi, K., Uchida, A. and Mizutani, H. A case of a large dermatofibrosarcoma protuberans successfully treated with radiofrequency ablation and transcatheter arterial embolization. *J. Dermatol.*, 31(1), 42-46, 2004.
- Mori, H., Yamanaka, K., Kaketa, M., Tamada, K., Hakamada, A., Isoda, K., Yamanishi, K. and Mizutani, H. Drug eruption caused by azathoprine: value of using the drug-induced lymphocytes stimulation test for diagnosis. *J. Dermatol.*, 31 (9), 731-736, 2004.
- 山西清文 *Dyskeratosis congenita-多彩な臨床症状と分子的基盤-*. 皮膚科の臨床 46 (8), 1153-1158, 2004.
- 山西清文 乾癬の生物学的治療. 日本皮膚科学会雑誌 114(11), 1755-1761, 2004.
- Seki, E., Tsutsui, H., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Akira, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K. and Fujimoto, J. Contribution of Toll-like receptor/Myeloid differentiation factor 88 signalling to liver regeneration. *Hepatology*, 41, 443-450. 2005.

- Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, EP., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, DV., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M. and Kikutani, H. Roles of Sema4A in the Immune System: Defective T Cell Priming and Th1/Th2 Regulation in Sema4A-Deficient Mice. *Immunity*. 22, 305-16. 2005.
- Suzuki, T., Nakanishi, K., Tsutsui, H., Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nunez, G. and Sasakawa C. A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *J. Biol. Chem.* 280, 14042-14050. 2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：国内 2件、 PCT出願 2件（CREST研究期間累積件数：9件）