

IL-22-キチナーゼ経路による喘息抑制機構の解明

中島裕史

千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学

【研究の背景】

これまで喘息の誘引となる環境アレルゲンに共通して含まれ、Th2 型免疫応答を惹起する物質は不明であった。しかし近年、チリダニ、真菌を始めとする多くのアレルゲンに含まれるポリサッカライドであるキチンの吸入によりアレルギー性炎症が惹起されることが報告された¹⁾。哺乳類はキチン分解酵素キチナーゼ (Chia1) を恒常的に気道上皮細胞に発現し、アレルギー性炎症を抑制していることも報告された²⁾。キチン濃度が高い環境下で働くヒトに喘息が多いことも示されている。これらの報告は、環境アレルゲンに広く含まれるキチンがアレルギー性気道炎症を惹起し、一方肺に発現するキチナーゼがそれを抑制していることを示唆するが、キチナーゼの発現調節機構は依然不明である。

他方、本研究者は IL-22 が気道上皮細胞に作用しアレルギー性気道炎症を抑制することを示した^{3,4)}。そしてその抑制機構の解明を目的に、気道上皮細胞において IL-22 により発現制御される遺伝子を網羅的に解析したところ、Chia1 の発現が IL-22 欠損マウスにおいて有意に低下することを見出した。これらの結果は IL-22 がキチナーゼの発現誘導を介してアレルギー性気道炎症を抑制している可能性を示唆しているが、その分子メカニズムは不明である。

【目 的】

近年、本研究者は IL-22 が気道上皮細胞に作用しアレルギー性気道炎症を抑制する分子メカニズムの解明を目的に、気道上皮細胞において IL-22 により発現制御される遺伝子を RNA-シーケンス法にて網羅的に解析したところ、Chia1 の発現が IL-22 欠損マウスにおいて有意に低下することを見出した。そこで本研究では、IL-22 によるキチナーゼ発現誘導機構、及び IL-22-キチナーゼ経路のアレルギー性気道炎症における役割を解明することを目的とした。

【方 法】

研究計画 1 アレルギー性気道炎症におけるキチナーゼ発現制御機構の解明

1. IL-22 によるキチナーゼ発現制御機構の解析

- 1) 野生型 (WT) マウスと IL-22 欠損 (IL-22^{-/-}) マウスにチリダニ抗原 (HDM) を経気道投与しアレルギー性気道炎症を惹起する。肺組織の免疫染色、および肺胞洗浄液を用いた ELISA によりキチナーゼの局在・産生を評価する。
- 2) キチナーゼ発現を誘導する IL-22 産生細胞の同定
 - (a) WT マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し、肺、および縦隔リンパ節の細胞を細胞内サイトカイン染色法により解析し IL-22 産生細胞を同定する。
 - (b) Rag2 欠損マウス、Rag2- γ c ダブル欠損マウス、ROR γ t 欠損マウス、 γ δ T 細胞欠損マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し IL-22 産生細胞の有無、および気道上皮細胞におけるキチナーゼの産生を評価する。

研究計画 2 アレルギー性気道炎症におけるキチナーゼの役割の解明

WT マウス、及び Chia1 欠損マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し、下記 1)-4)を評価する。

- 1) アレルギー性気道炎症の強度及びその性質を炎症細胞浸潤、気道過敏性、サイトカイン産生により評価する。
- 2) 縦隔リンパ節 CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生プロファイルを細胞内サイトカイン染色法により評価する。
- 3) 気道上皮由来サイトカイン(IL-25、IL-33、TSLP、GM-CSF)の発現を qPCR 法により評価する。
- 4) 各自然リンパ球分画の浸潤を FACS により評価する。

研究計画 3 気道上皮細胞におけるキチナーゼの役割の解明

HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起した WT マウス、及び Chia1 欠損マウスの気道上皮細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、キチナーゼの作用機構を解析する。

- 1) WT マウス、Chia1 欠損マウスに HDM 誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し、各マウスの肺から FACS により気道上皮細胞(CD45-EpCAM+細胞)を単離する。
- 2) RNA シークエンス法により発現遺伝子を網羅的に比較する。
- 3) 有意に発現変動が生じた遺伝子をパスウェイ解析、エンリッチメント解析を用いて解析することにより、キチナーゼが気道上皮細胞の如何なる経路に関与するかを明らかにする。
- 4) 同定された経路の機能を HDM 誘発性アレルギー性気道炎症モデルを用いて解析する。

【結 果】

(1)アレルギー性気道炎症におけるキチナーゼ発現制御機構

- ① IL-22 によるアレルギー性気道炎症の抑制機構を明らかにするために、野生型マウスおよび IL-22 欠損マウスに HDM 誘導性アレルギー性気道炎症を惹起し、肺で発現誘導される遺伝子を RNA シークエンス法により網羅的に解析した。その結果、IL-22 により有意に発現誘導される遺伝子として 12 遺伝子が同定され、その中にキチナーゼ(遺伝子名:Chia1)および、キチナーゼファミリー分子 YM-1(遺伝子名:Chi3l3)、YM-2(遺伝子名:Chi3l4)が含まれていた。
- ② 気道上皮細胞、および肺に存在する各血球系細胞におけるキチナーゼと YM-1 の発現を qPCR 法で確認したところ、キチナーゼと YM-1 は気道上皮細胞に特異的に発現し、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞等の血球系細胞には発現しないことが明らかとなった。

(2)アレルギー性気道炎症におけるキチナーゼの役割

Chia1 欠損マウスのコロニー拡大に時間を要するため、野生型マウスに抗 YM-1 抗体を投与し、YM-1 の機能を中和した際の影響を検討し、アレルギー性気道炎症におけるキチナーゼファミリー分子の機能を解析した。その結果、抗 YM-1 抗体投与群ではコントロール抗体投与群に比べ気管支肺胞洗浄液中の好酸球数と CD4 陽性 T 細胞数が有意に低下することが明らかとなった。

【考 察】

近年キチナーゼ様蛋白の一つである YKL-40 に関して、ヒト血清 YKL-40 レベルが喘息の重症度と正の相関を示し、呼吸機能と逆相関することが示された⁵⁾。本研究においても IL-22 下流においてキチナーゼに加え、キチナーゼ様蛋白の発現が上昇していることが明らかとなっており、IL-22 の喘息抑制機構にキチナーゼファミリー蛋白が関与することが示唆される。しかし、本研究で行った抗 YM-1 抗体を使用した実験では YM-1 が喘息を増悪させる可能性が示唆されており、キチナーゼ様蛋白は気管支喘息の病態形成に様々な形で寄与していると考えられる。本実験を発展させキチナーゼ様蛋白が喘息に寄与するメカニズムを解析することにより、今まで解明されていなかったキチナーゼ様蛋白の新しい機能を発見できると考える。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により喘息の病型と IL-22-キチナーゼ経路の関連性が明らかになれば、喘息に対する新たな治療戦略の開発に結びつく可能性があり、臨床への貢献度は大きいと考える。

【参考・引用文献】

- 1) Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, Locksley RM. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*. 2007;447(7140):92-6.
- 2) Van Dyken SJ, Mohapatra A, Nussbaum JC, Molofsky AB, Thornton EE, Ziegler SF, McKenzie AN, Krummel MF, Liang HE, Locksley RM. Chitin activates parallel immune modules that direct distinct inflammatory responses via innate lymphoid type 2 and $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. 2014;40(3):414-24.
- 3) Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, Tokoyoda K, Renauld JC, Iwamoto I, Nakayama T, Nakajima H. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):1067-76.e1-6.
- 4) Ito T, Hirose K, Saku A, Kono K, Takatori H, Tamachi T, Goto Y, Renauld JC, Kiyono H, Nakajima H. IL-22 induces Reg3 γ and inhibits allergic inflammation in house dust mite-induced asthma models. *J Exp Med*. 2017;214(10):3037-3050.
- 5) Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2016-27.