

IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導機構の解明

奥西勝秀

群馬大学生体調節研究所 遺伝生化学分野

【研究の背景】

アレルゲンが体内に取り込まれると、各種細胞の相互作用の結果、抗原特異的な Th2 細胞が誘導され、更にそのうちの数パーセントがメモリーTh2 細胞として体内で長期間生存することで、抗原感作が成立する。そして、その個体が再度抗原に暴露された際に、より迅速かつ強力に細胞増殖・Th2 サイトカイン産生が行われ、標的臓器においてアレルギー性炎症が惹起される。アレルギー炎症の病態形成上、IL-5/IL-13 が特に重要で、実際、IL-5 や IL-13 受容体の中和抗体は重症喘息患者の治療で使用されている。これまでは、メモリーTh2 と呼ばれる 1 細胞集団から全ての Th2 型サイトカインが一律に産生されると考えられていた。ところが、近年、マウス脾臓 CD4⁺ Th 細胞において、CD44^{hi} のメモリーTh 細胞を CXCR3 と CD62L の発現レベルで 4 群に分けると、IL-4 は複数の細胞群から産生されるのに対して、IL-5 と IL-13 は、CXCR3^{lo}CD62L^{lo} の発現パターンを示す細胞群のみから選択的に産生されることが明らかにされ、この細胞群は病原性 Th2 細胞 (pathogenic Th2 cells; Tpath2) と命名された。そして、申請者はごく最近、この Tpath2 の中でも、IL-33 受容体を発現する(IL-33R⁺)ごく僅かの細胞集団(Tpath2 の僅か 2~4%程度)が、抗原刺激時に(IL-33 非存在下でも)IL-5/IL-13 を特異的に高産生する、真の病原性 Th2 細胞であることを見出した¹⁾。そして、小胞輸送制御蛋白質である Rab27 と結合して各種小胞の輸送を制御している Rab27 エフェクター蛋白質の一つ Exophilin-5 が、血球系細胞の中ではこの IL-33R⁺ Tpath2 に高発現しており、NADPH oxidase NOX2 の細胞内輸送の制御を介して、この細胞からの過剰な IL-5/IL-13 産生を抑制していることを明らかにした。一方で、抗原感作が成立し抗原特異的な IL-33R⁺ IL-5/IL-13 高産生性 Tpath2 が分化誘導される機構の詳細は、この機構における Exophilin-5 以外の Rab27 エフェクター分子の役割を含め、まだほとんど解明されておらず、それらを明らかにすることを目的に、本研究を行った。

【目 的】

本研究では、アレルギー反応の病態を形成する上で極めて重要な役割を果たすと考えられるメモリーTh2 細胞の、その中でも IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 に焦点をあてながら、その分化誘導機構を解明することを目的に、各種解析を行った。

【方 法】

1. Ex vivo での検討:マウス脾臓から CD4⁺ Th 細胞を単離し、①まず、抗 CD3ε抗体および抗 CD28 抗体で 2 日間刺激し(リンパ節での樹状細胞との相互作用の状況の再現)、②次に、抗 CD3ε抗体・抗 CD28 抗体非存在下で 3~4 日間培養し(炎症局所の状況の再現)、③その後、リンパ節間質細胞から産生される IL-7 の有・無で 1~2 日培養してから(リンパ節での状況の再現)、上清中のサイトカイン濃度を ELISA で、細胞表面 IL-33R の発現レベルを FACS で、細胞内 IL-33R mRNA レベルを real-time RT-PCR で検討した。

2. Rab27 エフェクター分子の役割の検討:Exophilin-5 以外の Rab27 エフェクター分子に関して、その遺伝子改変マウス、および、代表的な Th2 型疾患である喘息のマウスモデルを用いて、各分子が抗原特異的 Th2 応答において果たす役割を検証した。

【結 果】

1. Ex vivo での検討: 前述の①および②の期間に、a) 外因性サイトカインを添加しない群、b) T細胞活性化サイトカイン IL-2のみを添加した群、および、c) Ex vivo での Th2細胞誘導条件として良く用いられる IL-2/IL-4/抗 IFN- γ 中和抗体を添加した群の3群を用意し、最後の③の期間は IL-7無しで培養した際に、IL-5高産生性 IL-33R⁺ Tpath2細胞がどの程度誘導されるかを、3群間で比較検討した。その結果、最後の c) Th2誘導条件で培養した細胞群で、他の2群と比較して、IL-5産生および IL-33R 発現の亢進を認めた。同様の系で、c)の条件から抗 IFN- γ 中和抗体を除いて IL-2/IL-4のみで培養した群(d)群と c)群とで比較を行うと、d)群において IL-33R の発現低下を認めており、IFN- γ は、IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導に抑制的に作用していることが示唆された。一方で、IL-4 または IL-13 いずれかの単独投与や、IL-4/IL-13 両方の投与では、IL-5 産生や IL-33R 発現が増加することは無く、Th2 サイトカイン単独では IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の誘導に不十分であることが示唆された。更に、③の期間に IL-7 を添加すると、a)以外の b)-d)の群で、IL-7 が無い場合と比較して、IL-5 産生や IL-33R 発現の顕著な増加を認めた。

2. Rab27 エフェクター分子に関する結果: Exophilin-5 以外の Rab27 エフェクター分子の遺伝子改変マウスの喘息モデルの表現型を検討し、2分子に関して、次のような興味深い知見を得た。すなわち、Rab27 エフェクター分子のうちのある分子の欠損で、抗原特異的な IL-5/IL-13 産生および喘息様アレルギー性気道炎症の増悪を認めた。そして、骨髄キメラマウス、各種細胞共培養の系や、細胞移入の系の解析結果から、樹状細胞におけるこの分子の欠損がこれらの表現型表出に重要な役割を果たしていることが示唆された。すなわち、この分子は、Th2細胞の分化誘導の初期過程で作用することで、その後の IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導を抑制している可能性が考えられた。他方の分子は逆に、その欠損により、抗原特異的な IL-5/IL-13 産生および喘息様アレルギー性気道炎症が著明に減少した。この分子は、調べた範囲では血球系免疫細胞に発現を認めず、また、骨髄キメラマウスを用いた検討で、レシピエントがこの遺伝子の欠損マウスである場合に喘息様アレルギー性気道炎症が減弱した。すなわち、この分子は、非血球系の臓器構造細胞で作用することで、IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導を正に制御している可能性が示唆された。

【考 察】

以上の結果から、抗原感作期に Th2細胞に分化する際、より強く活性化された細胞が、更に、リンパ節等において間質細胞性サイトカイン IL-7 の供給を受けることで、IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 が誘導される可能性が示唆された。また、異なる Rab27 エフェクター分子は、異なる細胞や phase で精巧に作用しながら、IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導機構において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の結果を踏まえ、今後も検討を継続することで、そこでの Rab27 エフェクター分子の役割も含めて、IL-5/IL-13 高産生性 IL-33R⁺ Tpath2 の分化誘導機構の分子基盤の詳細が明らかにされ、将来的に、この機構を標的とした、アレルギー疾患のより根治的な新奇治療法の開発に繋がることが期待される。

【参考・引用文献】

1. Okunishi K*, Wang H, Suzukawa M, Ishizaki R, Kobayashi E, Kihara M, Abe T, Miyazaki JI, Horie M, Saito A, Saito H, Nakae S, Izumi T*. Exophilin-5 regulates allergic airway inflammation by controlling IL-33-mediated Th2 responses. *J. Clin. Invest.* 130:3919-3935. 2020. doi: 10.1172/JCI127839. (*, corresponding authors)