

[総説] Th2 型免疫応答における IL-25 の役割

中 島 裕 史

(2005年9月30日受付)

1. はじめに

気管支喘息の本態であるアレルギー性気道炎症の病態形成には、Th2細胞が中心的な役割を果たしている。Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-13などのTh2サイトカインを産生し、IL-4によりTh2細胞の分化増殖とB細胞からのIgE産生、IL-5により好酸球の分化、成熟および活性化、IL-13により杯細胞分化と内皮細胞上の接着分子の発現を誘導する。そして近年、新たなTh2サイトカインとしてIL-17ファミリーに属するIL-25 (IL-17E) が同定された[1-4]。IL-25は、未同定の非T非B細胞からIL-4, IL-5, IL-13などTh2サイトカインの産生を誘導しTh2型免疫応答を惹起することが示されている[1-3]。本稿では、Th2型免疫応答におけるIL-25の役割について、我々の研究成果を中心に概説する。

2. IL-25の構造

IL-25は、IL-17およびそのファミリー分子をもとにしたコンピューター検索により同定された新規IL-17ファミリーサイトカインである[1-4]。IL-17ファミリーには、現在IL-17 (IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-25 (IL-17E), IL-17Fの計6種類が見出されているが、IL-25はIL-17ファミリーの中でIL-17とアミノ酸レベルでの相同性が最も低く、他のIL-17ファミリーサイトカインとはやや離れた進化をたどった分子であることが推測される (図1A)。しかしIL-25を含め、IL-17

ファミリーのいずれにおいてもシステインノット構造の維持に重要な6個のシステイン残基は保存されており (図1B)、高次構造的にはIL-25と他のIL-17ファミリーサイトカインは類似していると推測されている。

3. IL-25産生細胞

IL-25の産生細胞は、これまでTh2細胞のみであると報告されていたが、組織レベルにおけるIL-25 mRNAの発現は、消化管、子宮、肺等、多くの臓器に認められており、Th2細胞以外にもIL-25産生細胞が存在する可能性が示唆されていた[1,3]。そこで我々は、多くの臓器に存在し、既にIL-4をはじめいくつかのTh2サイトカインを産生することが示されている肥満細胞がIL-25を産生するか否か検討した[5]。その結果、マウス骨髄由来肥満細胞 (BMMCs) をIgE架橋刺激するとIL-25 mRNAの発現が認められ、その発現量は抗CD3抗体で刺激したTh2細胞とほぼ同等であることを明らかにした (図1C)。さらにIL-25 mRNAの発現は、肥満細胞株 (CFTL-15細胞) をカルシウムイオノファー (A23187) で刺激しても認められること (図1C)、BMMCsにおけるIL-25の産生は蛋白レベルでも検出されることを明らかにした (図1D)。これらの結果より、Th2細胞に加え、肥満細胞も活性化によりIL-25を産生する事が明らかとなった。

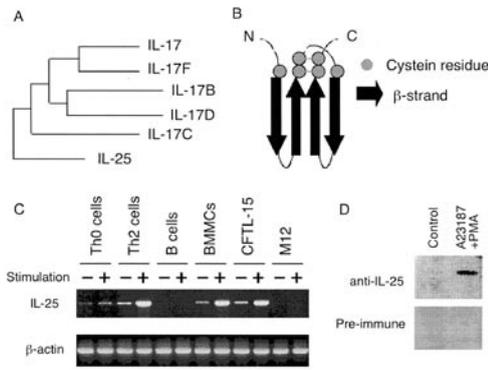


図1 肥満細胞はIL-25を産生する

- (A) IL-17ファミリーサイトカインの樹形図
 (B) IL-17ファミリーサイトカインの構造

IL-17Fの結晶構造解析よりIL-17ファミリーサイトカインは、システインノット構造をとることが示唆されている。この構造形成に重要な6個のシステイン残基はIL-25を含め、IL-17ファミリーサイトカイン内で保存されている。

(C) Th0細胞及びTh2細胞に対し抗CD3抗体刺激、B細胞及びB細胞株(M12.4.5細胞)に対しLPS刺激、BMDMsに対しIgE架橋刺激、及び肥満細胞株(CFTL-15細胞)に対しカルシウムイオノファー(A23187)刺激を行なった後、RNAを調整し、RT-PCR法にてIL-25 mRNAの発現を解析した。Th2細胞に加え、BMDMsとCFTL-15細胞においても活性化に伴いIL-25 mRNAの発現が認められた。(文献(5)より引用)

(D) BMDMsをA23187+PMAで3時間刺激後、培養上清を濃縮し、IL-25に対するウサギ抗血清を用いてウェスタンブロットを施行した。刺激後の培養上清でIL-25蛋白が検出された。(文献(5)より引用)

4. アレルギー性気道炎症におけるIL-25の役割

IL-25の生物学的特性は、他のIL-17ファミリーサイトカインとは大きく異なる事が、リコンビナントIL-25をマウスに投与する研究、IL-25発現アデノウイルスを用いた研究、或いはIL-25を全身的に発現するトランスジェニックマウスを用いた研究にて明らかにされた[1-3]。すなわちIL-17ファミリーサイトカインの多くがproinflammatory cytokineとして機能するのに対して、IL-25は、未だ同定されていない非T非B細胞からIL-4、IL-5、IL-13などTh2サイトカインの産生を誘導し、Th2サイトカインとして機能することが示された。

我々は、アレルギー性気道炎症の制御にIL-25が関与しているのか否かを明らかにするため、ま

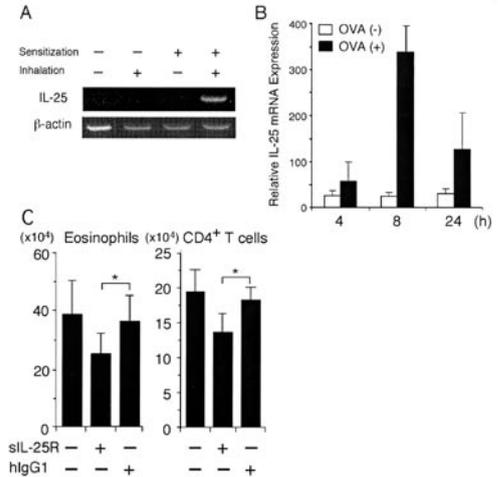


図2 喘息モデルマウスにおけるIL-25の役割

(A-B) OVA/Alumで腹腔内感作したBALB/cマウスにOVAの吸入投与を行なった後、肺組織を採取しIL-25 mRNAの発現を検討した。OVA感作マウスにOVAを吸入投与すると肺組織においてIL-25 mRNAの発現がRT-PCR法 (A) 及びReal-time PCR法にて (B) 検出された。

(C) OVA/Alumで腹腔内感作したBALB/cマウスにsIL-25R或いはhuman IgG1を腹腔内投与し、その後OVAを吸入投与した。OVA吸入による肺胞洗浄液 (BALF) 中への好酸球とCD4陽性T細胞の浸潤は、sIL-25R投与により有意に抑制された。 $*p<0.05$ (Tamachi et al., 投稿中)。

ずマウス喘息モデルの肺におけるIL-25 mRNA産生の有無を検討した。卵白アルブミン (OVA) 感作マウスにOVAを吸入投与し、肺組織におけるIL-25 mRNAの発現をRT-PCR法 (図2 A) およびreal-time PCR法 (図2 B) にて検討したところ、抗原吸入後8時間をピークとするIL-25 mRNAの発現が認められた。

次に我々は、内在性に産生されるIL-25の役割を明らかにするため、IL-25に対し中和活性を有する可溶性IL-25レセプター (sIL-25R) を作成し、アレルギー性気道炎症に対するsIL-25R投与の効果を検討した。その結果、sIL-25Rの投与は、肺胞洗浄液 (BALF) 中への好酸球とCD4陽性T細胞の浸潤を抑制すること (図2 C) を明らかにし、IL-25がアレルギー性炎症の惹起に関与していることを示唆した。

次にIL-25によるアレルギー性気道炎症増強のメカニズムを明らかにするため、CC10プロモ-

ターの制御下で肺特異的にIL-25を発現するトランスジェニックマウス (CC10 IL-25マウス) を作製した。CC10 IL-25マウスでは、いずれのライン (Tg1, Tg2) においても肺特異的なIL-25 mRNAの発現が認められ (図3A), BALFを用いたELISAで蛋白レベルでのIL-25の発現も確認された (図3B)。そこでCC10 IL-25マウスを用いて気道におけるIL-25の発現がアレルギー性気道炎症を増強するか否かを検討した。CC10 IL-25マウスおよび野生型 (WT) マウスをOVAで腹腔内

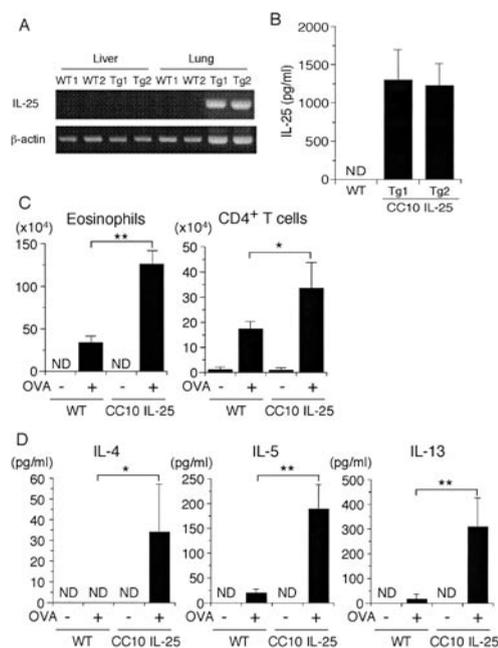


図3 肺特異的CC10 IL-25マウスにおける抗原誘発性気道炎症の増強

(A) CC10 IL-25マウス及び野生型 (WT) マウスの肝および肺組織でのIL-25 mRNAの発現をRT-PCR法にて検討した。Tg1, Tg2いずれのラインにおいても肺特異的にIL-25 mRNAの発現が確認された。

(B) CC10 IL-25マウス及びWTマウスのBALF中におけるIL-25蛋白の発現をELISAにて検討した。CC10 IL-25マウスでは、いずれのラインにおいてもIL-25蛋白の発現が確認された。

(C-D) OVA/Alumで腹腔内感作したCC10 IL-25マウス及びWTマウスに、OVA或は生理食塩水の吸入を行いBALF中の好酸球とCD4陽性T細胞の総数とサイトカインレベルを検討した。OVA吸入を行ったCC10 IL-25マウスではWTマウスに比して好酸球とCD4陽性T細胞の浸潤とTh2サイトカインの産生が有意に増加していた。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ (Tamachi et al., 投稿中)。

感作し、OVA吸入後のBALF中への細胞浸潤およびサイトカイン産生を検討したところ、CC10 IL-25マウスでは好酸球およびCD4陽性T細胞の浸潤 (図3C) とTh2サイトカインの産生 (図3D) がWTマウスに比して強く認められた。

これまでIL-25過剰投与によるTh2サイトカインの産生誘導にはCD4陽性T細胞は、必須でないことが示されている[1,2]。我々は、肺特異的IL-25発現によるアレルギー性気道炎症の増強にCD4陽性T細胞が関与しているのか否かを明らかにするため、CD4陽性T細胞除去の効果を検討した (図4)。その結果、興味深いことに、抗CD4抗体を投与しCD4陽性T細胞を除去するとIL-25によるアレルギー性炎症の増強作用が完全に解除されることが明らかとなった。すなわち、肺特異的なIL-25発現によるアレルギー性気道炎症の増強には、CD4陽性T細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

このように実験系の違いによりIL-25依存的なアレルギー性炎症の惹起におけるCD4陽性T細胞の必要性に違いがもたらされた原因は今なお不明であるが、我々はIL-25の発現レベルが関与しているのではないかと考えている。すなわち、IL-25の発現が非常に強い状況下では、IL-25は、直接未同定の非T非B細胞に作用し、Th2サイ

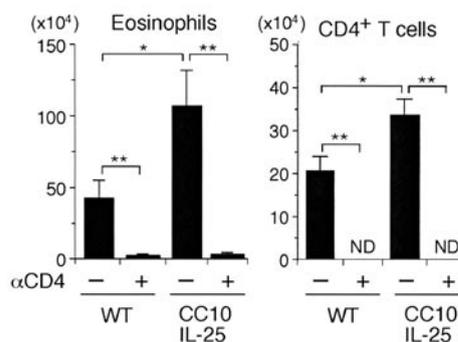


図4 CC10 IL-25マウスにおける抗原誘発性気道炎症に対するCD4陽性T細胞除去の効果

OVA/Alumで腹腔内感作したCC10 IL-25マウス及びWTマウスに、抗CD4抗体あるいはコントロール抗体を投与し、その後、OVAの吸入を行いBALF中の好酸球とCD4陽性T細胞の総数を検討した。CC10 IL-25マウスで認められる好酸球とCD4陽性T細胞の浸潤増強は抗CD4抗体の投与により解除された。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ (Tamachi et al., 投稿中)。

トカインの誘導を介してCD4陽性T細胞非依存的にアレルギー性炎症を惹起しえるのに対して、IL-25の発現が低い状況下では、IL-25によるアレルギー性炎症の惹起にCD4陽性T細胞との協調が必要であると考えられる。

5. IL-25応答性細胞

IL-25投与に際しTh2サイトカインを産生する細胞は、いまだ同定されていない。T細胞やB細胞を欠くRag2欠損マウスにおいてもIL-25過剰投与によるIL-5やIL-13の産生が認められることより、T細胞やB細胞以外の細胞がIL-25刺激に際しTh2サイトカインの産生能を持つことは確かである[1,2]。また各種遺伝子欠損マウスを用いた研究や抗体による除去実験等により、IL-25応答性細胞は、NK細胞、単球、好酸球、肥満細胞、好塩基球、好中球でないことが示唆されている[1,2]。一方、興味深いことに、Rag2と共通 γ 鎖(γ c)のダブル欠損マウスでは、IL-25投与による好酸球増多が認められなくなることが示された[2]。 γ cはIL-25レセプターのコンポーネントではないこと、 γ cは好酸球の分化にも必須でないことを考え合わせると、これらの結果は、IL-25応答性細胞の分化或いは活性化に γ cをレセプターとして利用するサイトカインが必須であることを示唆している。

6. IL-25レセプターとシグナル伝達経路

IL-25Rは、56kDaの膜貫通タンパク質でIL-17Rに類似した構造を持つ[4,6]。IL-25Rからのシグナル伝達に関しては、一部の細胞株でNF- κ Bが活性化されることが示されているがその詳細は不明であった。そこで我々は、IL-25シグナル伝達機構、特にIL-25Rの細胞内領域にはTRAF6結合配列が存在することより、IL-25シグナル伝達におけるTRAF6の役割を解析した。その結果、IL-25によるNF- κ Bの活性化は、野生型マウス由来mouse embryonic fibroblast (MEF)では認められるがTRAF6欠損MEFではほとんど認められないこと(図5A)、IL-25によるNF- κ Bの活性化は、優性抑制型TRAF6により抑制されること

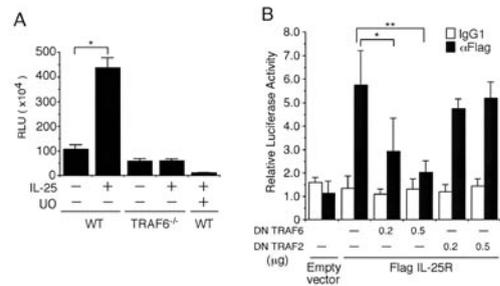


図5 IL-25シグナル伝達におけるTRAF6の役割

(A) 野生型マウス由来mouse embryonic fibroblast (MEF) 及びTRAF6欠損MEFにレトロウイルスを用いてIL-25Rを発現させ、その後、IL-25で刺激した。核抽出液を調整し、NF- κ B p65の核内集積をNF- κ B p65結合DNAを用いたELISAにて解析した。IL-25刺激によるNF- κ B p65の核内集積は、TRAF6欠損MEFでは強く抑制されていた。 $*p<0.01$ 。

(B) COS細胞にFlagタグを付加したIL-25Rを優性抑制型TRAF6 或いは優性抑制型TRAF2とともに発現させた。抗Flag抗体によりIL-25Rを架橋刺激し、NF- κ Bの活性化をレポーター法にて検討した。優性抑制型TRAF6は、IL-25R架橋刺激によるNF- κ Bの活性化を抑制した。 $*p<0.05$, $**p<0.01$ (Maezawa et al., J. Immunol, in press)。

(図5B)を明らかとし、IL-25Rからのシグナル伝達にTRAF6が重要な役割を果たしていることを示唆した。

7. おわりに

アレルギー性気道炎症の病態形成におけるIL-25の役割が明らかになりつつある(図6)。しかし、IL-25関連研究において、最も早急に解決すべき課題であるIL-25に反応しTh2サイトカインを産生する非T非B細胞の同定は、未だ達成されていない。IL-25反応性細胞の同定は、IL-25によるアレルギー性炎症増悪の分子機構の解明につながるという生物学的観点からのみでなく、IL-25反応性細胞の機能あるいはシグナル伝達系を抑制することによりIL-25依存的アレルギー性炎症の抑制が可能になるという臨床的観点からも非常に重要である。今後、これらの研究を通じ、アレルギー性疾患治療のターゲットとしてのIL-25の可能性を明らかにしていきたい。

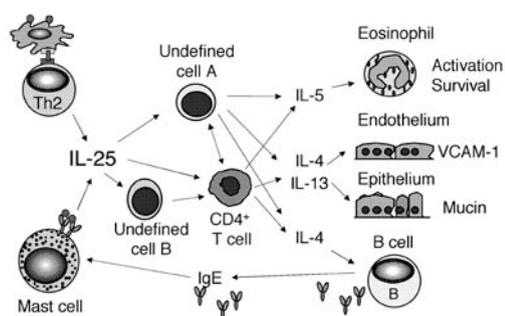


図6 アレルギー性炎症におけるIL-25の役割

IL-25は、Th2細胞が産生する新規IL-17ファミリーサイトカインとして同定された。我々は、1) アレルギー性炎症の重要なエフェクター細胞である肥満細胞がIgE架橋刺激によりIL-25を産生すること、2) 産生されたIL-25はアレルギー性気道炎症を増強すること、3) IL-25によるアレルギー性炎症の増強にはCD4陽性T細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。IL-25反応性細胞の同定およびIL-25とCD4陽性細胞が協調してアレルギー性炎症を増強する分子機構の解明が今後の重要な課題である。

謝 辞

本研究は、千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 齋藤教授、岩本前助教授のご指導のもと、鈴木浩太郎先生、加々美新一郎先生、前澤裕子先生、池田 啓先生、玉地智宏先生らの協力によりなされたもので、諸先生にこの場をかりて深謝いたします。

文 献

- 1) Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S. IL-25, a novel molecule that induces IL-4, IL-5 and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001; 15: 985-95.
- 2) Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002; 169: 443-53.
- 3) Pan G, French D, Mao W, Maruoka M, Risser P, Lee J, Foster J, Aggarwal S, Nicholes K, Guillet S, Schow P, Gurney AL. Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2-biased response, and multiorgan inflammation in mice. *J Immunol* 2001; 167: 6559-67.
- 4) Lee J, Ho W-H, Maruoka M, Corpuz RT, Baldwin DT, Foster JS, Goddard AD, Yansura DG, Vandlen RL, Wood WI, Gurney AL. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem* 2001; 276: 1660-4.
- 5) Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003; 101: 3594-6.
- 6) Tian E, Sawyer JR, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Shaughnessy JD Jr. Evi27 encodes a novel membrane protein with homology to the IL17 receptor. *Oncogene* 2000; 19: 2098-109.