

# IL-33 デコイ受容体による皮膚炎症の制御

自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門

早川 盛 禎

Interleukin (IL)-33 is a member of the IL-1 cytokine family. Epithelial cells and vascular endothelial cells produce IL-33 in the nucleus and release it by stress, injury, or necrosis. IL-33 induces the production of Th2-associated cytokines via its receptor, ST2L on type 2 innate lymphoid cells, Th2 cells, and mast cells. Therefore, IL-33/ST2L signaling may contribute to development of allergic diseases such as asthma and atopic dermatitis. The ST2 gene produces a soluble secreted form, soluble ST2, in addition to a transmembrane form, ST2L, by alternative splicing. Soluble ST2 consists of only extracellular domain of ST2L. In previous study, we found that soluble ST2 acted as an IL-33 decoy receptor. Soluble ST2 specifically binds to free IL-33 and inhibits a binding activity of IL-33 for its receptor on target cells. To explore the function of soluble ST2 in vivo, we established that a transgenic mouse that constitutively express murine soluble ST2 cDNA under CAG promoter (ST2-Tg mouse). Here, we show that soluble ST2 is a critical repressor for skin inflammation in a murine model of house dust mite (HDM)-induced atopic dermatitis. Skin inflammation of ST2-Tg mice exhibited a lower development compared to that of wild-type mice. Levels of IL-13, total IgE, and HDM-specific IgE in sera were reduced in ST2-Tg mice. Furthermore, we examined HDM-specific response of lymph node cells in vitro. Analysis of cytokines in culture supernatants revealed the reduction of IL-4, IL-5, and IL-13 productions in ST2-Tg mice. We also applied ST2-Tg mice to hapten-induced contact hypersensitivity (CHS) model with fluorescein isothiocyanate (FITC). Migration of skin dendritic cells and ear swelling developed normally in ST2-Tg mice. These results suggest that soluble ST2 contributes to suppressions of skin inflammation and Th2-type immune response in atopic dermatitis. Therefore, soluble ST2 is a potential therapeutic agent for allergic diseases such as atopic dermatitis.

## 1. 緒 言

インターロイキン-33 (IL-33) は、上皮細胞や血管内皮細胞に発現するサイトカインである<sup>1)</sup>。IL-33 は、自然リンパ球、Th2 細胞、肥満細胞などを活性化し、Th2 サイトカインの産生誘導を介して、アレルギー疾患の病態形成に関与する。アトピー性皮膚炎では、皮膚病変部において IL-33 の発現亢進が報告されている<sup>2)</sup>。

IL-33 受容体 (別名: ST2L) をコードする ST2 遺伝子の遺伝子産物には、膜貫通受容体型 ST2L の他に、分泌型 ST2 がある<sup>3,4)</sup>。分泌型 ST2 は、IL-33 の結合部位である細胞外領域のみを持つ分子で、細胞外に分泌される。我々は、主に *in vitro* による検討から、分泌型 ST2 が IL-33 の機能を抑制するデコイ受容体として働くことを発見した<sup>5)</sup>。分泌型 ST2 は、遊離の IL-33 と特異的に結合し、複合体を形成する。この複合体は IL-33 受容体に結合できないため、標的細胞は活性化されない。生体内においても、分泌型 ST2 は IL-33 デコイ受容体として働くものと予想される。そこで、我々は生体内における分泌型 ST2 の作用を検討

するために、分泌型 ST2 を過剰発現するトランスジェニックマウス (ST2-Tg マウス) を作製した<sup>6)</sup>。

本研究では、ST2-Tg マウスを用いて、ハプテン塗布による接触皮膚炎モデル、およびダニ抗原塗布によるアトピー性皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型 ST2 の作用を中心に検討した。

## 2. 実 験

### 2. 1. マウス

ST2 トランスジェニック (ST2-Tg) マウスは、CAG プロモーターにマウス分泌型 ST2 cDNA を挿入したベクターを用いて作製した<sup>6)</sup>。本研究では、BALB/c 系統にバッククロスしたマウスを使用した。図中では、外因性の分泌型 ST2 cDNA が、ゲノム DNA にヘテロの状態で存在するマウスをトランスジェニック (Tg)、外因性の分泌型 ST2 cDNA がゲノム DNA に挿入されていないマウスを野生型 (Wt) として表記した。ST2-Tg マウスの繁殖、成長、免疫細胞数などは、野生型マウスと比べて、差は見られなかった。

### 2. 2. 皮膚樹状細胞の遊走能の評価

マウスの右耳介の表裏に 0.5% fluorescein isothiocyanate (FITC) 液を 40  $\mu$ l 塗布し、左耳介の表裏に溶媒液を 40  $\mu$ l 塗布した。塗布 24 時間後、右側と左側の顎下リンパ節をそれぞれ採取し、細胞を単離した。細胞に抗 CD16/CD32 抗体を加えて Fc 受容体をブロックした後、7-amino-actinomycin D (7-AAD)、蛍光標識抗 CD11c 抗体、およ



Regulation of skin inflammation with IL-33 decoy receptor

Morisada Hayakawa

Department of Biochemistry, School of Medicine, Jichi Medical University

び蛍光標識抗I-A/I-E抗体を添加した。その後、フローサイトメーターにより、FITC陽性のCD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>細胞を検出した。

### 2. 3. 接触皮膚炎モデル

マウスの腹部の毛をバリカンで刈り、腹部皮膚に0.5% FITC液を200μl塗布して感作した。感作6日後、両耳の耳介の厚さを測定した後、右耳介の表裏に0.5% FITC液を30μl塗布し、左耳介の表裏に溶媒液を30μl塗布した。その後、経時的に両耳の耳介の厚さを測定した。

### 2. 4. アトピー性皮膚炎モデル

マウスの背部の毛をバリカンで刈った後、除毛クリームで処理した。背部皮膚と耳介をテープストリッピングした後、50%グリセロール含有生理食塩水に溶解したコナヒョウヒダニ抽出物(HDM)を100μl (2.5 mg/ml)塗布した。コントロールには、50%グリセロール含有生理食塩水100μlを反復塗布した。塗布は週に2回、8週間行った。その間、経時的に耳介の厚さを測定した。最終塗布から24時間後に背部皮膚、耳介、血清、腋窩リンパ節を採取した。

耳介および背部皮膚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色した。腋窩リンパ節から単離した細胞にHDMを添加し、4日間培養した後、培養上清を採取した。血清中、およびリンパ節細胞の培養上清中のサイトカインと免疫グロブリンの濃度をELISA法により測定した。

## 3. 結 果

### 3. 1. 皮膚樹状細胞の遊走能の解析

皮膚樹状細胞の遊走に対する分泌型ST2の関与を、FITCを用いて検討した。右耳介にFITC液、左耳介には対照として溶媒液を塗布した。24時間経過後、左右の顎下

リンパ節をそれぞれ採取し、FITC陽性の樹状細胞(FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>)をフローサイトメーターにより検出した(図1)。野生型およびST2-Tgマウスともに、左右リンパ節中の樹状細胞(CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>)の割合に差はなかった(図1A)。FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>細胞は、FITC塗布した右耳介側のリンパ節にのみ検出された(図1B)。また、FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>細胞数は、野生型マウスに比べて、ST2-Tgマウスの方が少なかったが、有意差はなかった(図1C)。これらの結果から、分泌型ST2は、ハプテン感作期による皮膚樹状細胞の遊走能には影響しないことが明らかになった。

### 3. 2. ハプテン塗布による接触皮膚炎における皮膚炎症の解析

ハプテンにFITCを用いて接触皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。まず、除毛した腹部皮膚にFITCを塗布して感作した。感作6日後、両耳の耳介の厚さを測定した後、右耳介にFITC液、左耳介に溶媒液を塗布して炎症を惹起した。その後、経時的に両耳の耳介の厚さを測定し、耳介の腫脹を算出した(図2)。FITC刺激による耳介の腫脹のパターンは、野生型およびST2-Tgマウスともに、塗布24時間後がピークとなり、その後減弱した。また、野生型とST2-Tgマウスの耳介の腫脹は同程度であった。これらの結果から、分泌型ST2は、FITCによる接触皮膚炎には影響しないことが示唆された。

### 3. 3. アトピー性皮膚炎モデルにおける皮膚病変部の解析

ダニ抗原によるアトピー性皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。アレルゲンとしてコナヒョウヒダニ抽出物(HDM)を用いて、除毛した背部皮膚と左右耳介に8週間反復塗布することにより炎症を誘導した。対照群には、HDM溶媒液である50%グリ

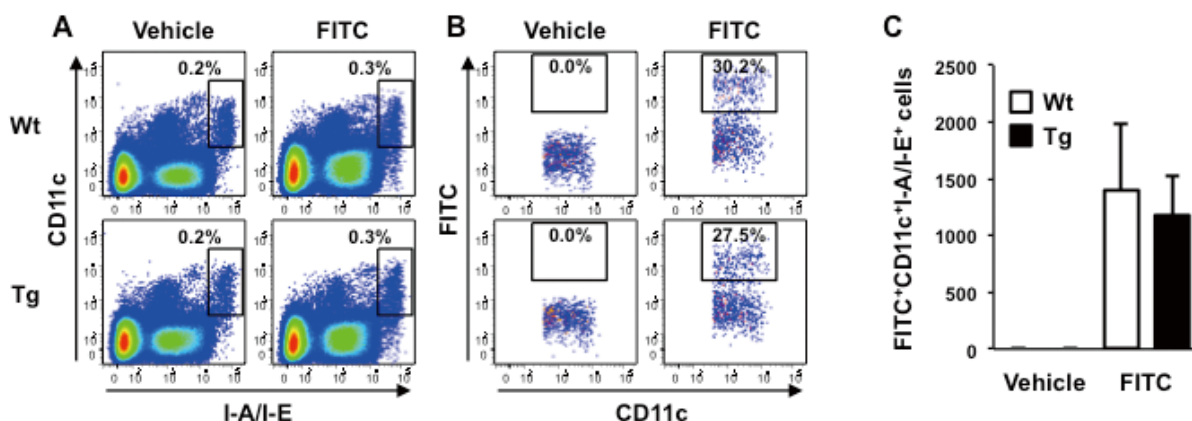


図1 表皮樹状細胞の遊走能の解析

(A) 顎下リンパ節中の樹状細胞(CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>)をフローサイトメーターにより検出した。(B) FITC陽性の樹状細胞(FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>)をフローサイトメーターにより検出した。(C) 顎下リンパ節中のFITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>I-A/I-E<sup>+</sup>細胞数を計測した。

セロール含有生理食塩水を塗布した。経時的に耳介の厚さの測定を行い、最終塗布から24時間後に背部皮膚、耳介、血清、腋窩リンパ節を採取した。経時的に耳介の厚さを測定した結果、野生型およびST2-Tgマウスともに、HDM塗布1週間後から耳介の腫脹が認められたが、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて減弱していた。HDM塗布5週以降は、野生型とST2-Tgマウスとの差が顕著になった(図3A)。耳介の組織像を解析したところ、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて、表皮および皮下組織の肥厚が減弱していた(図3B)。また、HDM塗布した野

生型マウスの背部皮膚は、表皮、真皮、および皮下組織に肥厚が認められた。ST2-Tgマウスでは、HDM塗布により肥厚は生じたが、野生型マウスに比べて減弱していた(図3B)。これらの結果から、ST2-Tgマウスの皮膚炎症は、野生型マウスよりも軽度であることが明らかになった。

### 3. 4. ダニ抗原塗布による血清サイトカインおよび血清IgEの増加

サイトカインと免疫グロブリンの産生について調べるため、各種サイトカイン、総IgE、およびHDM特異的IgE

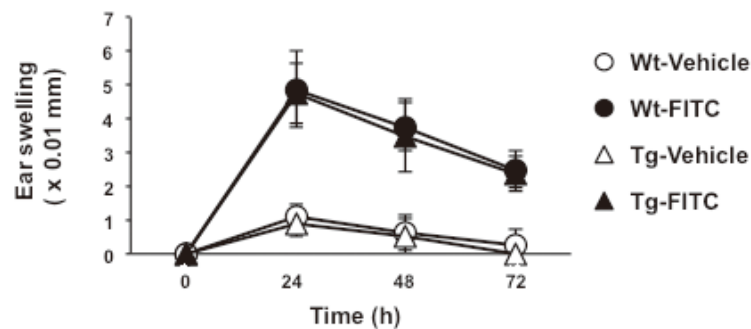


図2 接触皮膚炎による耳介の腫脹  
FITC液(FITC)または溶媒液(Vehicle)塗布後の耳介の厚さから、塗布前の耳介の厚さを差し引き、その差を腫脹とした。

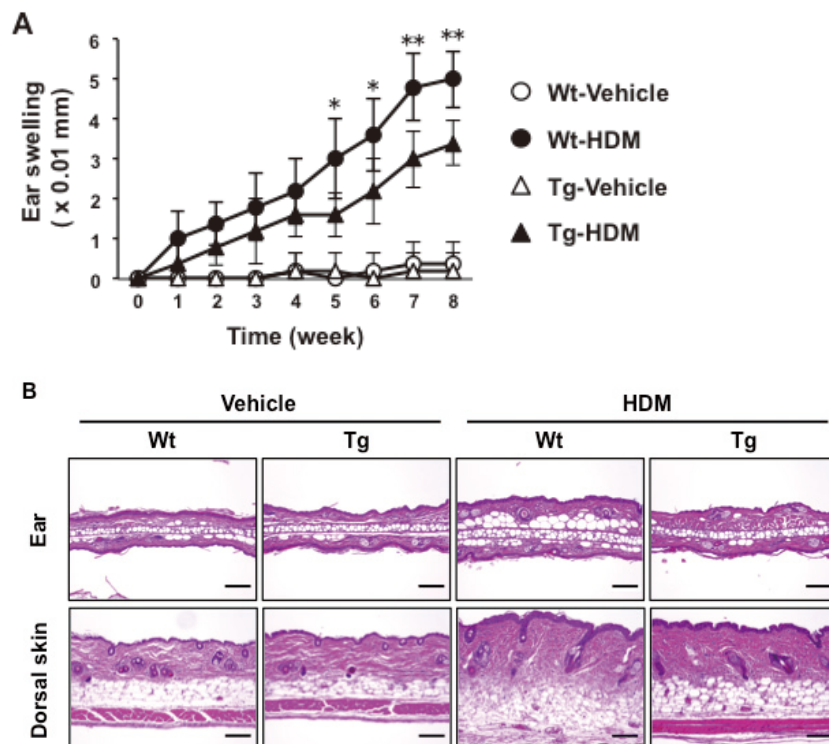


図3 ダニ抗原反復塗布による皮膚病変部の解析  
(A) ダニ抗原(HDM)または溶媒液(Vehicle)塗布後の耳介の厚さから、塗布前の耳介の厚さを差し引き、その差を腫脹とした。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ 。(B) 耳介および背部皮膚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色した。(上段) 耳介、(下段) 背部皮膚。Scale bar=100 μm。

の値をELISA法により測定した。HDM塗布群のST2-TgマウスにおけるIL-13値は、野生型マウスに比べて顕著に低かった。IL-5は非常に低濃度であったが、IL-13と同様の傾向を示した。また、ST2-Tgマウスにおける総IgE値およびHDM特異的IgE値も、野生型マウスに比べて低かった(図4)。IL-4、IFN- $\gamma$ 、およびIL-33は、HDM塗布群および溶媒液塗布群のいずれにおいても、検出限界以下であった。これらの結果から、ST2-Tgマウスでは、Th2サイトカインやIgEの産生が抑制されていることが明らかになった。

### 3. 5. 所属リンパ節におけるサイトカイン産生

腋窩リンパ節から単離した細胞を用いて、ダニ抗原刺激に応じて産生されるサイトカインを調べた。リンパ節細胞にHDMまたは生理食塩水を添加して4日間培養した後、培養上清中のIL-4、IL-5、IL-13、およびIFN- $\gamma$ の

値をELISA法により測定した。HDM塗布群の野生型およびST2-Tgマウス由来リンパ節細胞は、HDM刺激に応じて、IL-4、IL-5、およびIL-13を産生した。しかしながら、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて、いずれのサイトカインも低値であった。一方、IFN- $\gamma$ の産生は、HDM塗布群のST2-Tgマウス由来のリンパ節細胞の方が、野生型マウスに比べて僅かに亢進していた(図5)。これらの結果から、ST2-Tgマウスの末梢リンパ組織におけるTh2型免疫応答は、野生型マウスよりも低下していることが明らかになった。

## 4. 考 察

本研究では、2種類の皮膚炎症モデルにより、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。FITC塗布による接触皮膚炎モデルでは、野生型とST2-Tgマウスにおける皮膚樹状細胞の遊走能と皮膚炎症に大きな違いは見られな

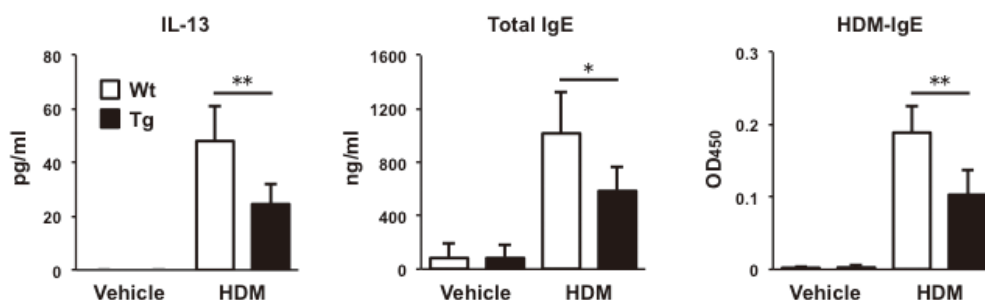


図4 血清サイトカインおよび血清IgEの産生

血清中のIL-13値、総IgE値(Total IgE)、およびHDM特異的IgE値(HDM-IgE)をELISA法により測定した。  
\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ 。

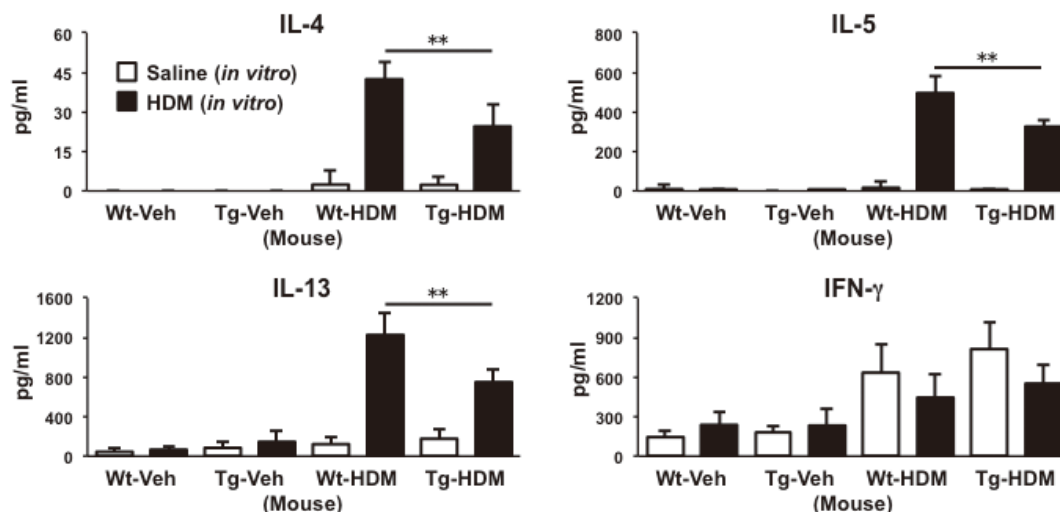


図5 所属リンパ節由来細胞のサイトカイン産生

溶媒液塗布またはHDM塗布した野生型およびST2-Tgマウス(Wt-Veh、Tg-Veh、Wt-HDM、Tg-HDM)の腋窩リンパ節由来の細胞に生理食塩水(Saline)またはダニ抗原(HDM)を添加し、4日間培養した後、培養上清を採取した。培養上清中のIL-4、IL-5、IL-13、およびIFN- $\gamma$ の値をELISA法により測定した。\*\*,  $p < 0.01$ 。

かった。IL-33 欠損マウスにおける接触皮膚炎の各種症状も、野生型マウスと差がないことが報告されている<sup>7)</sup>。このことから、IL-33 / ST2L系は、接触皮膚炎の発症に関与しないものと考えられ、分泌型ST2の有無も皮膚炎症に影響しないことが示唆された。

HDM反復塗布によるアトピー性皮膚炎モデルでは、ST2-Tgマウスの皮膚炎症およびTh2型免疫応答は、野生型マウスに比べて減弱していた。このことから、分泌型ST2は、アトピー性皮膚炎の皮膚炎症を軽減させる作用を持つ可能性が示唆された。ST2-Tgマウスにおける分泌型ST2は、恒常的に様々な組織で発現しているだけでなく、血流を通して全身に循環している。このため、IL-33の機能が分泌型ST2により抑制されるものと考えられた。しかしながら、ELISA法では、HDM刺激した野生型マウスにおいても血清IL-33を検出できなかった。今後、このモデルマウスの皮膚病変部におけるIL-33の発現を調べる予定である。

アトピー性皮膚炎患者では、皮膚病変部にIL-33の発現亢進が認められる<sup>2)</sup>。また、IL-33トランスジェニック(IL-33-Tg)マウスを用いた解析において、IL-33の発現亢進により皮膚炎症が誘導されることが示された<sup>8)</sup>。このIL-33-Tgマウスは、表皮特異的にIL-33を過剰発現しており、アトピー性皮膚炎と似た皮膚炎症を自然発症する。また、Th2サイトカイン産生能力を持つ2型自然リンパ球が皮膚炎症の発症に関与することも示唆された。しかしながら、IL-33がどのような機序で細胞外に産生されるのかは分かっていない。IL-33は、上皮細胞などで発現するが、その細胞内局在は核である。そのため、アトピー性皮膚炎の患者やモデルマウスでは、搔破行動により表皮細胞が傷つき、細胞外にIL-33が放出されるものと考えられている。このように、アトピー性皮膚炎の発症機序にはまだ不明な点は多いが、その発症にIL-33が関与する可能性は強く示唆されている。

## 5. 総括

本研究は、ST2-Tgマウスを用いて、分泌型ST2がアトピー性皮膚炎に見られる皮膚炎症およびTh2型免疫応答を抑制することを明らかにした。今後、アトピー性皮膚炎の発症機序の解明や治療薬の開発に、分泌型ST2、すなわちIL-33 デコイ受容体が寄与することが期待される。

## (引用文献)

- 1) Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, and Kastelein RA; IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity*, 23, 479-490, 2005.
- 2) Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, Liew FY, Melendez AJ.; The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 9773-9778, 2009.
- 3) Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, and Tominaga S.; Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1, *FEBS Lett.*, 318, 83-87, 1993.
- 4) Tominaga S.; A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor, *FEBS Lett.*, 258, 301-304, 1989.
- 5) Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, and Tominaga S.; Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation, *J. Biol. Chem.*, 282, 26369-26380, 2007.
- 6) Ohto-Ozaki H, Kuroiwa K, Mato N, Matsuyama Y, Hayakawa M, Tamemoto H, Tominaga S.; Characterization of ST2 transgenic mice with resistance to IL-33, *Eur. J. Immunol.*, 40, 2632-2642, 2010.
- 7) Oboki K, Ohno T, Kajiura N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S.; IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 18581-18586, 2010.
- 8) Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Haneda T, Mizutani H, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K.; Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, 13921-13926, 2013.