

Mini Review

アレルギー疾患における遺伝因子の機能的解析とその臨床応用 IL-13を中心に

出原賢治^{1,2)}, 有馬和彦¹⁾, 安永晋一郎¹⁾

¹⁾佐賀医科大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野

²⁾同地域包括医療高度化推進センター重点医療研究部門

Functional analysis of genetic factors in allergic diseases and its application to clinical medicine focusing on IL-13

Allergic diseases are complex disorders involving a combination of genetic and environmental factors. In case of bronchial asthma, these factors result in infiltration of Th-2 lymphocytes, mast cells and eosinophils into asthmatic airways with downstream mediator release and disordered airway function. Cytokines derived from the Th-2 lymphocytes are considered to orchestrate the asthmatic phenotype. Among Th2 cytokines, the significance of IL-13 in the pathogenesis of bronchial asthma has recently emerged. Particularly, the direct action of IL-13 on bronchial epithelial cells is critical for generation of airway hyperresponsiveness. IL-13 signal is regulated by two receptors; one is the heterodimer composed of the IL-13 receptor 1 chain and the IL-4 receptor 2 chain which transduces IL-13 signal, and the other is the IL-13 receptor 2 chain which blocks the IL-13 signal. In this review article, we present our recent findings about the expression mechanism of the IL-13 receptors on bronchial epithelial cells and the functional role of a single nucleotide polymorphism on *IL13* gene as a genetic factor. These findings give us a hint to improve the asthmatic condition by blocking the IL-13 actions.

Rec. 9/12/2002, Acc. 10/5/2002, pp23-28

Kenji Izuhara^{1,2)}, Kazuhiko Arima¹⁾, Shin'ichiro Yasunaga¹⁾

¹⁾Division of Medical Biochemistry, Department of Biomolecular Sciences

²⁾Division of Medical Research, Center for Comprehensive Community Medicine, Saga Medical School

Key words allergy, bronchial asthma, interleukin-13, receptor, polymorphism

アレルギー疾患におけるサイトカインの役割

アレルギー疾患は遺伝要因と環境要因が相互に干渉し合って生じる疾患である¹⁾。近年先進諸国を中心にアレルギー疾患の発症が飛躍的に増大しているのは、環境要因の変化によるものと思われる。しかし、親子間や双生児におけるアレルギー疾患の発症頻度の解析により、遺伝要因が関与していることも明らかである。この2つの要因が組み合わされることにより、アレルギー疾患へ罹患しやすい素因が形成される。

アレルギー疾患の病態の形成にはさまざまな種類の細胞が関与している¹⁾。気管支喘息の場合、アレルギーの刺激により病変部位にリンパ球、マスト細胞、好酸球といった炎症細胞が浸潤し、これらの細胞と、もともと存在している気管支上皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞と

がお互いに作用し合って粘液の産生、粘膜下層の肥厚、平滑筋の過形成といった病態を形成する。このようなさまざまな細胞間での作用を仲介する役割を果たしているのがサイトカインである。

Th2型サイトカインの重要性

ヘルパーT細胞は分泌するサイトカインあるいは細胞表面に発現しているケモカインレセプターのパターンにより、Th1型とTh2型に分類される²⁾。Th1型細胞はIFN- γ 、IL-2、TNF- α を分泌し、CXCR3を発現しているのに対し、Th2型細胞はIL-4、IL-5、IL-10、IL-13を分泌し、CCR3、CCR4を発現している。Th1型細胞はウイルスや細胞内細菌などに対する防御機構に重要であり、Th2型細胞は寄生虫感染防御に重要である。マウスではTh1型とTh2型が明瞭に区別できるのに対し、ヒトではそれほど明らか

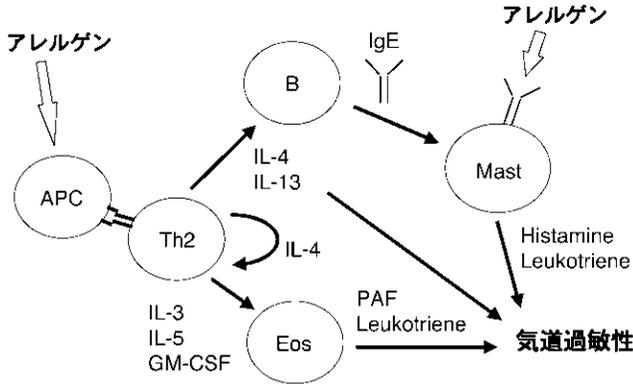


図1 Th2型サイトカインによる気道過敏性の発症機序 (文献4を改変)

IL-4/IL-13によるIgE - マスト細胞の経路の活性化とIL-5による好酸球を介する経路の活性化に加えて、IL-13による直接的な気道組織への作用によって気道過敏性が形成される。

ではないが抗原に反応してどちらかの型に偏る傾向はみられる。気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の発症にはTh2型サイトカインが重要である³⁾。このことは、気管支喘息患者の病変部位ではTh2型のCD4⁺T細胞が主に浸潤していることや、T,Bリンパ球が存在しないSCIDマウスにTh2型CD4⁺T細胞を移入すると気道過敏性が回復するモデルマウスの実験結果などから示されている。

Th2型サイトカインがアレルギー疾患の発症に関与する機序は次のように考えられている⁴⁾(図1)。Th2型細胞が産生するIL-4, IL-13はB細胞に作用してIgE産生を誘導し、産生されたIgEはマスト細胞上のIgEレセプターに結合する。侵入してきたアレルゲンがマスト細胞上のIgEに結合すると、それが引き金となってマスト細胞からヒスタミン、ロイコトリエンなどが放出され、いわゆるI型、あるいは即時型のアレルギー反応を引き起こす。一方、別のTh2型サイトカインであるIL-5は好酸球に作用して、好酸球浸潤や好酸球の活性化を促し、いわゆる遅延型アレルギー反応を引き起こす。

IL-13のアレルギー疾患発症における役割

Th2型サイトカインの中で、従来はその代表的なサイトカインであるIL-4とIL-5がアレルギー疾患の発症において重要だと考えられてきたが、最近になって別のTh2型サイトカインであるIL-13の役割がクローズアップされてきた⁵⁾。その根拠としては、IL-13をマウスに経気管支的に投与すると、粘液産生亢進、杯細胞過形成、気道粘膜下の線維化、気道過敏性亢進といった喘息病態の形成を生じ、逆にIL-13の作用を阻害するとモデルマウスにおいてこれ

表 IL-4 と IL-13 の生物活性 (文献7より引用)

	IL-4	IL-13
Th2 誘導	+	-
T 細胞増殖	+	-
IgE 合成	+	+
単球に対する抗炎症作用	+	+
肥満細胞活性化	+	- ~ ±
粘液合成	+	++
基底膜肥厚	+	++
平滑筋肥大	+	++

らの気管支喘息の病態が形成されなくなるという解析結果があげられる。これらの結果が示す重要な点として、前述したような従来から考えられている気道過敏性の形成機序とは別に、IL-13が直接気道組織に作用して過剰な粘液産生や気道過敏性の亢進を引き起こす可能性が示唆されていることがあげられる。実際最近になって気道過敏性が消失しているSTAT6ノックアウトマウスに対して気管支上皮細胞だけにSTAT6発現を回復させると、IL-13による気道過敏性も回復することが示された⁶⁾。

IL-13は後述するようにIL-4と同じレセプターを共有するため、両者の生物活性は極めて類似している(表)⁷⁾。しかし大きく異なる点は、IL-4はTh2型細胞の誘導作用や肥満細胞の活性化作用を持っているのに対し、IL-13はこのような作用を持っていない。これはこれらの細胞がIL-13R1を発現していないためである。一方、気管支喘息の病態形成に関しては、IL-4, IL-13ともに引き起こせるが、IL-13の方がむしろ強い。非免疫細胞においてIL-13特異的シグナルが存在するかどうかは現時点では明らかでない。IL-4とIL-13の生体内での役割の違いは末梢組織におけるリガンドとしてのIL-4, IL-13の発現量の違いによるのかもしれない。このように、IL-4とIL-13は共通の生物活性を持ちながら、生体内においては前者はより免疫系細胞に対して、後者はより末梢組織において作用するという違いを持っていると考えられている。

IL-13レセプターの構造とその発現調節機構

IL-13は他のサイトカインと同様に細胞膜表面上の特異的レセプターに結合することにより細胞内にシグナルを伝

達していく⁵⁾. IL-13レセプターはIL-4レセプター鎖(IL-4R)とIL-13レセプター鎖(IL-13R 1)より成る. IL-13レセプターにはIL-4も結合でき, type II IL-4Rとも呼ばれている. IL-13がレセプターに結合すると, 細胞内においてJak-STAT経路を中心としてシグナルが伝達されていく. IL-13が結合できる分子としてIL-13R 1以外にIL-13R 2が存在する. このIL-13R 2の細胞内部分は短いため, decoy(おとり)receptorとして働いていると考えられている. 実際, 我々は気道上皮細胞株にIL-13R 2を強制発現させると, IL-4/IL-13によるSTAT6活性化が阻害され, IL-13R 2がdecoy receptorとして機能していることを確認した(Yasunaga S, et al, submitted). 気道組織においてはIL-13R 1とIL-4Rが恒常的に気管支上皮細胞, 気管支平滑筋細胞に発現していることを我々は以前に明らかにしている⁸⁾. しかし, IL-13R 2の発現分布, あるいは発現機構に関しては不明であったため, この点について解析を行った(Yasunaga S, et al, submitted).

まず気管支上皮細胞をIL-4あるいはIL-13で刺激したところ, IL-13R 2遺伝子の発現がmRNAレベルとタンパク質レベルの両方で増強された. 刺激後36時間後までIL-13R 2のmRNA量は増大した. cycloheximide処理によりIL-4/IL-13によるIL-13R 2の発現は阻害されたことから, IL-4/IL-13によるIL-13R 2の発現は何らかのタンパク質新生を介していることが判明した. また, dominant negative型STAT6を発現させた細胞株ではIL-4/IL-13によるIL-13R 2誘導が認められず, STAT6を介したシグナルにより発現が誘導されていることが判明した. 一方, IL-13R 1とIL-4Rの発現はIL-4/IL-13により影響されなかった.

さらに, IL-4/IL-13の発現が増大している喘息誘発マウスの肺組織においてもIL-13R 2の発現が増強されているが解析を行った. あらかじめマウスを卵白アルブミンで感作しておいて, 卵白アルブミンを吸入させると気道過敏性が誘発される. その際に肺組織のIL-13R 2発現を解析したところ, 生理食塩水を吸入させた場合に比べて著明にその発現が亢進していた. IL-13R 1とIL-4Rの発現には再び変化は認められなかった.

これらの結果より, 気管支上皮細胞におけるIL-13シグナルの調節機構は以下のようなと考えられた(図2). 同細胞には定常状態ではIL-13R 1とIL-4Rを発現しているがIL-13R 2は発現しておらず, IL-13のシグナルが伝達される. しかし, IL-13シグナルが伝達されていくと, 次第にIL-13R 2が発現されてIL-13シグナルを阻害するようになる. つまり, IL-13は自分のシグナルをself-limited(自己制限)するように働いている. この気管支上皮細胞でのIL-13シグナルの調節機構はそれ以外の細胞, 例えば

B細胞とは大きく異なる⁹⁾. B細胞では休止状態ではIL-13R 1はほとんど発現されておらず, IL-13シグナルはあまり伝達されない. しかし, 抗IgM抗体や抗CD40抗体でB細胞が活性化されると, IL-13R 1の発現が増強され, IL-13のシグナル伝達が増大する. IL-13R 2は抗IgM抗体/抗CD40抗体やIL-4/IL-13といった刺激を受けても全く発現されない. 気管支上皮細胞でのIL-13シグナルのネガティブフィードバック機構は, 過剰なIL-13シグナルが気道組織にとって危険であることを示しているのだろう. 実際, IL-13を気道組織に過剰発現させたマウスではプロテアーゼ活性の亢進により肺気腫様の形態を示すことが知られている¹⁰⁾.

遺伝的要因としてのIL-13遺伝子

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患では生体内においてTh1反応とTh2反応のバランスがTh2優位に傾いていることが主要な原因であり, 種々の環境あるいは遺伝的要因がその方向に向かわせていると考えられている. そのような環境要因としては, 感染症罹患の減少があげられる¹¹⁾. 感染症への罹患は生体内でのTh1反応の活性化を引き起こす. しかし, それがなければ生体内でのTh1/Th2バランスは相対的にTh2優位に傾いてしまい, アレルギー疾患が起こりやすい状態になってしまう. 近年先進諸国でアレルギー疾患が増加した原因として, 衛生状態が良くなりすぎてしまったためだという'hygiene hypothesis'が唱えられているが, これは上記のようなTh1/Th2バランスのTh2側への傾きとして説明できる.

一方, Th1/Th2バランスをTh2優位に傾ける遺伝的要因としては, Th2型サイトカインのシグナル伝達分子における機能獲得(gain-of-function)変異とTh1型サイトカインのシグナル伝達分子における機能欠失(loss-of-function)変異が想定されている¹²⁾. 前者の一つとしてIL4RA遺伝子の一塩基多型(SNP)が機能的にIL-4シグナルを増強することを我々は以前示している¹³⁾. 後者としてIL12RB2遺伝子における変異などがあげられている¹⁴⁾. 最近我々は, 前者の一つとしてIL13遺伝子上のSNPも含まれることを示した^{8, 15)}.

IL13遺伝子が位置するヒト染色体5q31領域周囲は, これまでに複数のグループによってアレルギー性疾患の疾患感受性遺伝子領域の一つとして同定されていた¹⁶⁾. これまでのところIL13遺伝子近傍には少なくとも7つ以上のSNPが見い出されているが, 翻訳領域内には唯一つのSNPのみが存在し, このSNPはアミノ酸変化を伴う(Arg110Gln, R110Q)⁸⁾. この多型と喘息との相関解析を行ったところ, Q110アリルは日本人・英国人の両方のグループにおいて

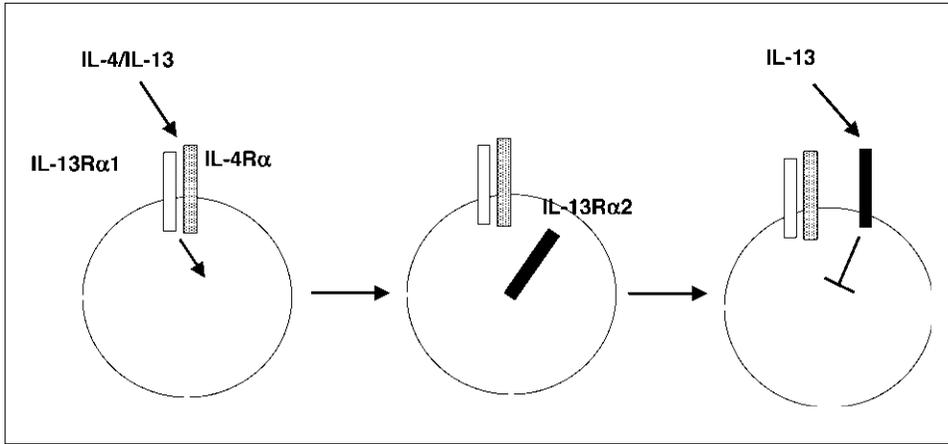


図2 気管支上皮細胞とB細胞におけるIL-13シグナルの調節機構
気管支上皮細胞ではIL-4/IL-13によりIL-13R₂が発現されて、IL-13シグナルをself-limitedとなるような調節機構がある。

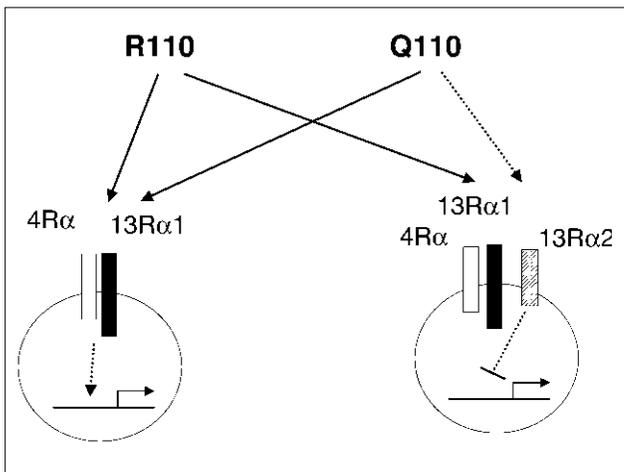


図3 IL13遺伝子のSNPのIL-13レセプターとの結合 (Arg110Gln, R110Q)

IL-13R₁/IL-4R レセプターに対してはQ110とR110は同じ親和性を持って結合するが、IL-13R₂に対してはQ110はR110より親和性が低く、結果的にIL-13シグナルを強く伝達する。

健常対照群よりも喘息患者群において有意に頻度が高かった⁸⁾。特記すべき点はこの相関が、アトピー素因の有無を問わないということと、アレルギー原因遺伝子候補として複数の人種間において一致する相関解析結果が得られた初めての例であったということである。また、日本人学童を対象にIL-13の遺伝的多型と血中濃度との相関について調べたところ、Q110アリルを有す群はR110アリルのホモ接合群よりも血中IL-13レベルが高かった^{8,15)}。このSNP自体、あるいはそれ以外のIL13遺伝子近傍に存在するSNPとアレルギー疾患との間に遺伝学的相関に関する報告がなされているが、これらのSNPは相互に連鎖不均衡にあることも示されていることから^{17,18)}、どのSNPが真にアレルギー形質に影響を与えているのか、あるいはこれらはま

だ見い出されていない近傍の遺伝子多型のマーカーに過ぎないのか不明であった。

そこで我々はR110Qに関する機能解析を行った¹⁵⁾。すなわちR110, Q110それぞれに対応する組換えIL-13タンパク質を作製し、受容体との結合親和性、シグナル伝達の程度、タンパク質の安定性といった点について解析を行った。その結果、気管支喘息と関連することが示されたQ110型IL-13はR110型よりもIL-13R₂受容体との親和性が約1.5倍低く、同受容体によるauto-regulation(おとり効果)を受けにくくなっていると考えられた(図3)。IL-13R₁/IL-4R 受容体複合体との間に親和性の差は検出されず、また同受容体を介して伝えられる細胞内シグナルに関しても両者は差を示さなかった。さらにQ110型の方がR110型よりも血漿中でより安定であることも示された。

以上の機能解析により、連鎖不均衡にあるSNPの中でもアミノ酸変化を伴う遺伝子多型R110Qは実際にIL-13とIL-13R₂受容体との親和性およびIL-13自体の安定性に影響することにより相対的にIL-13シグナルを増強し、気管支喘息の病態を強めることが示唆された。

サイトカインをターゲットとしたアレルギー疾患治療

今まで述べたようにTh1/Th2バランスがTh2優位に傾いていることがアレルギー疾患の発症に重要であることから、Th1反応を増強させることにより、あるいは逆にTh2反応を抑制することにより、アレルギー疾患の治療を目指す試みがなされている⁷⁾。

Th1反応を増強させる戦略としてIL-12あるいはIFN- γ の投与があげられるが、良い結果は得られていない¹⁹⁾。CpGワクチン投与も同じ戦略に基づくものだが、現在検討が進められている²⁰⁾。

抑制すべきTh2型サイトカインとしては、IL-4, IL-5,

IL-13などがあげられている。IL-4の標的細胞上のIL-4レセプターへの結合を阻害する創薬として、可溶性IL-4レセプター鎖、IL-4変異タンパク質などがあげられ、現在臨床の場で検討が進んでいる⁷⁾。IL-5をターゲットとした創薬として抗IL-5抗体が開発されたが、気管支喘息患者の気道過敏性に改善がみられなかったことから、標的としての有用性については疑問視されている²¹⁾。IL-13を標的とした創薬はまだ開発中であるが、本稿で述べたように、特に気管支喘息におけるその重要性から関心が持たれている⁷⁾。

IL-4、IL-13とレセプターとの結合を阻害する創薬の一つとして、可溶性サイトカインレセプターがあげられる。前述したようにサイトカインとレセプターとの結合様式の詳細がSNP研究を通して明らかになってくれば、親和性を高めるようにアミノ酸変異を人為的に導入することにより野生型に比べてより親和性の高い可溶性サイトカインレセプターを作製できるかもしれない。そうすれば、遺伝要因の研究が、単に患者の疾患への罹患危険性を予測するためのものではなく、創薬開発にも役立つことが期待される。

文 献

- 1) Holgate ST: The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402: B2-B4, 1999.
- 2) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cytokines. In: *Cellular and molecular immunology*, 4th ed, W.B. Saunders Com., Philadelphia, 2000, pp235-269.
- 3) 出原賢治: アレルギー疾患とサイトカイン. *実験医学*, 18: 197-202, 2000.
- 4) Drazen JM, Arm JP, Austen KF: Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med*, 183: 1-5, 1996.
- 5) Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K, Hamasaki N, Hopkin JM: Recent advances in understanding how interleukin 13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Therap Exp*, 48: 505-512, 2000.
- 6) Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ: Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med*, 8: 885-889, 2002.
- 7) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S: IL-4 and IL-13: Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets-Inflamm & Allergy*, 1: 263-269, 2002.
- 8) Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA: Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet*, 9: 549-559, 2000.
- 9) Umeshita-Suyama R, Sugimoto R, Akaiwa M, Arima K, Yu B, Wada M, Kuwano M, Nakajima K, Hamasaki N, Izuhara K: Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int Immunol*, 12: 1499-1509, 2000.
- 10) Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Chapman HA, Shapiro SD, Elias JA: Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*, 106: 1081-1093, 2000.
- 11) Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R: Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296: 490-494, 2002.
- 12) 出原賢治: サイトカイン遺伝子とアレルギーの病態. *Allergy 21st Century*, 印刷中.
- 13) Izuhara K, Shirakawa T: The signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med*, 3: 3-10, 1999.
- 14) Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Kasahara K, Kondo N: Mutations of the IL-12 receptor 2 chain gene in atopic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 551-555, 1999.
- 15) Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao X-Q, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K: Up-regulation of IL-13 concentration *in vivo* by the IL-13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 109: 980-987, 2002.
- 16) Anderson GA, Cookson WOCM: Recent advances in the genetics of allergy and asthma. *Mol Med Today*, 5: 264-273, 1999.
- 17) Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Frittsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD: A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 506-513, 2000.
- 18) Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER: Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25: 377-384, 2001.

- 19) Barnes PJ: Cytokine-directed therapies for asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108: S72-S76, 2001.
- 20) Wohlleben G, Erb KJ: Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol*, 22: 618-626, 2001.
- 21) Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356: 2144-2148, 2000.