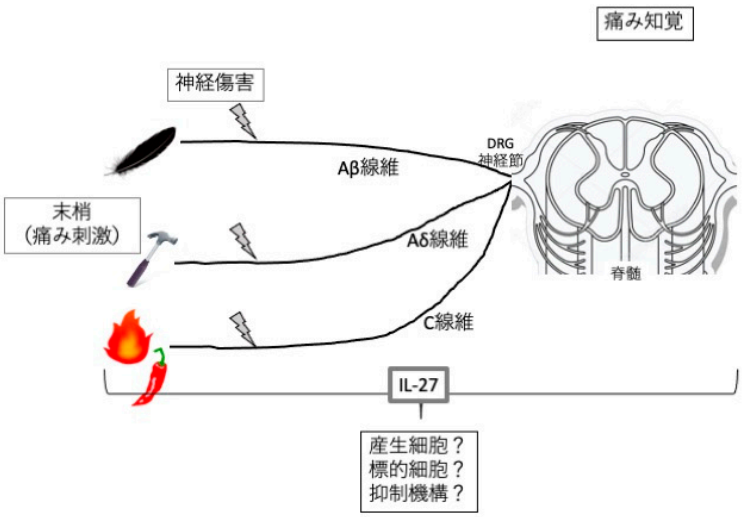
55　IL-27による新規疼痛制御機構の解明と治療応用	吉田　裕樹

【目的】インターロイキン 27（IL-27）は、IL-12 サイトカインファミリーに属するサイトカインであり、p28 サブユニットと EBI-3 サブユニットからなる。IL-27 は Th1 誘導作用に加え、免疫・炎症抑制作用を持つユニークなサイトカインであり、特にその免疫・炎症抑制作用は、自己免疫疾患や生活習慣病の背景にある自然炎症、あるいは感染に引き続く過剰な炎症を抑制しうる新規の抗炎症・免疫抑制剤の標的として注目されている。近年、我々は、IL-27 には疼痛抑制作用があることを見出した。IL-27 サブユニット、あるいは受容体（WSX-1 分子）を欠損するマウスは、痛み刺激に過敏になり、また神経障害に伴う神経因性疼痛が過剰になる。IL-27 による疼痛抑制作用は、既知の消炎鎮痛薬やオピオイド受容体を介したものとは全く異なる新規の疼痛抑制作用によるものと考えられる。本研究では、この IL-27 による疼痛抑制作用に関して、以下の点を明らかにすることを目的とする。1. IL-27 産生細胞、およびその標的となる細胞（例：皮膚に存在する細胞、伝達神経、中枢神経系の細胞など）を同定し、その分子機構を明らかにする。2. IL-27 投与と同様の効果を持つ低分子物質などのスクリーニングを行い、新規鎮痛薬のシーズを探索する。
【方法】IL-27 産生細胞を同定する目的で、IL-27 p28 サブユニットの下流に Venus（蛍光色素）をコードする遺伝子を導入したレポーターマウスを作製し、組織切片を蛍光顕微鏡で解析を行った。IL-27 標的細胞を同定する目的で、痛覚を伝える C 線維を単離し、RT-PCR 法で受容体（WSX-1 分子）の発現を解析した。また、IL-27 シグナル欠損時の疼痛過敏の責任細胞（神経線維）を同定する目的で、生体外に単離した神経線維を刺激し、各神経線維の興奮（発火）を測定した。また、神経線維以外に、皮膚や、中枢神経系が IL-27 の産生細胞・標的部位となっている可能性を考え、単離可能な細胞に関して IL-27 やその受容体の発現を解析した。IL-27 に関する創薬シーズの探索について、上記 IL-27 レポーターマウスと同様のレポーターベクターを遺伝子導入したレポーター細胞を作製し、IL-27 産生を誘導する物質の探索に方針を変更、スクリーニングを行った。
【結果】IL-27 レポーターマウス組織の蛍光顕微鏡による観察では、皮膚、神経線維、中枢神経系ともに、無刺激状態で蛍光シグナルを発する細胞は観察されなかった。IL-27p28、および WSX-1 を欠損するマウス由来の C 線維はともに、野生型に比べ過剰な神経興奮を示した。しかし、これらの細胞において p28 や WSX-1 の発現は確認できなかった。皮膚ランゲルハンス細胞、中枢内グリア細胞では、WSX-1 の発現が確認できた。レポーター細胞を用いたスクリーニングでは、複数の IL-27 産生誘導物質候補を得ることが出来た。

IL-27 による疼痛制御；産生細胞と標的部位



55. IL-27 による新規疼痛制御機構の解明と治療応用

吉田　裕樹

佐賀大学 医学部 分子生命科学講座 免疫学分野

Key words：IL-27，疼痛，神経因性疼痛，免疫抑制，炎症

緒　言

IL-27 は、IL-12 サイトカインファミリーに属するサイトカインであり、p28 と EBI-3 の 2 つのサブユニットから形成され、その受容体は WSX-1 分子と gp130（IL-6 受容体シグナル伝達サブユニット）からなる。研究代表者らによる、*WSX-1* 欠損マウス、および *IL-27* 欠損マウスの解析により、1. IL-27 には Th1 型免疫誘導作用があること、および 2. IL-27 には免疫抑制作用があること、が明らかにされている。IL-27 は、免疫誘導作用と抑制作用の両方を持つ点でユニークなサイトカインであり、炎症・免疫反応が緩徐であるときには主として Th1 誘導作用を示すが、過剰な炎症・免疫反応が生じている状況では免疫抑制作用を示す。研究代表者らは、IL-27 やその受容体欠損マウスでは、感染や自己免疫病態に伴う炎症が過剰になり、時に致死性を示すほか、糖尿病や動脈硬化など生活習慣病の背景に存在する自然炎症も過剰になり、生活習慣病の増悪を来すことなどを報告してきた。さらに、リコンビナント IL-27 投与によりこうした過剰な炎症を抑制することができることから、IL-27 は新規抗炎症性薬剤開発の標的としても注目されている［1］。

我々は、神経因性疼痛（神経障害性疼痛：Neuropathic Pain，Neuralgia）のメカニズム解明の過程で、IL-27 シグナルを欠損するマウス（IL-27 欠損、または受容体欠損マウス）が、坐骨神経切除による神経因性疼痛モデルにおいて、疼痛に対し過敏になっている（疼痛閾値が低い）ことを見出した［2］。神経因性疼痛は、神経の傷害に伴って生じる慢性疼痛であり、ヒトではがんや手術などの物理的傷害、あるいはヘルペスウイルスなどの感染による神経傷害に伴って生じるものが知られており、原因となる傷害や感染がなくなったあとも、生活の質を著しく損なう疼痛が持続することが多く、そのメカニズムの解明はいまだ不十分であり、有効な薬剤も存在しない。さらに、IL-27 シグナル欠損マウスにおける、さまざまな刺激による疼痛に対する感受性の解析により、これらの欠損マウスにおいては、機械刺激、温熱、寒冷、化学刺激、いずれによる疼痛に対しても過敏になっていること、また *IL-27* 欠損マウスではリコンビナント IL-27 投与により 30 分以内に疼痛に対する感受性が正常化すること、さらに、神経切除モデルにおいては術前から疼痛に対する感受性が亢進していることを見出し、報告した。*IL-27* シグナル欠損マウスに発達や行動の異常は認められず、また IL-27 を介した疼痛制御は、既知のプロスタグランディンやオピオイドを介した経路には依存しない。これらの結果は、IL-27 シグナルが恒常的に疼痛感受性を制御していること、この疼痛抑制は Aβ、Aδ、C ファイバーを含む多彩なニューロンに作用していること、などを示しており、さらに IL-27 投与による疼痛抑制が速やかに生じることから、この疼痛抑制は細胞分化や新規タンパク質産生を必要としない機構によるものと考えられる。

これらを踏まえ、本研究では、この IL-27 による疼痛抑制作用に関して、1. IL-27 産生細胞、およびその標的となる細胞（例：皮膚に存在する細胞、伝達神経、中枢神経系の細胞など）を同定し、その分子機構を明らかにする、2. IL-27 投与と同様の効果を持つ低分子物質などのスクリーニングを行い、新規鎮痛薬のシーズを探索する、ことを目的とした。

方法および結果

1. IL-27 レポーターマウスの作製

IL-27 による疼痛制御に関して、IL-27 産生細胞を同定する目的で IL-27 p28 レポーターマウスを作製した。IL-27 p28 サブユニットをコードする遺伝子の下流に、IRES 配列を挟んで *Venus* 遺伝子が接続されたノックインマウスを作製し、C57BL/6 マウスへの戻し交配を終えた。レポーターマウスは設計通りに機能し、LPS で刺激した場合には樹状細胞による Venus タンパクの発現（＝p28 タンパクの発現）が確認された（図 1）。

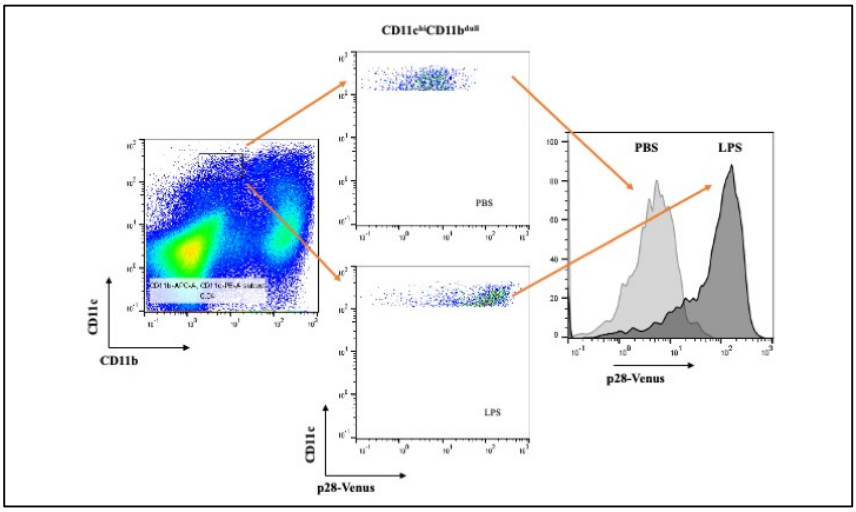


図 1. IL-27 p28 レポーターマウス
IL-27 p28レポーターマウスにLPS、または対照としてPBSを腹腔内に*in vivo*投与し、6時間後に脾臓細胞を調製、$CD11c^{high}CD11b^{dull}$の樹状細胞におけるVenus蛍光を測定した。

このマウスを用いて、無刺激・無処置のマウスから座骨神経の凍結切片を作製、Venus シグナルの発現を蛍光顕微鏡により観察したが、蛍光シグナルを検出することは出来なかった。研究開始時には、IL-27 の標的細胞は疼痛刺激を伝達する神経線維を想定していたが、疼痛刺激部位である皮膚や、最終的に疼痛を認識する中枢神経系も IL-27 の標的部位である可能性が考えられたため、皮膚、脊髄を含む中枢神経系においても凍結切片を作製し蛍光顕微鏡による解析を行ったが、いずれにおいても蛍光シグナルを検出することは出来なかった。

2. IL-27 および受容体遺伝子の発現解析

IL-27 p28 レポーターマウスにおいては、痛み刺激伝達に関わる細胞や組織において IL-27 の発現は確認できなかった。一方、他研究者により、単離した皮膚ランゲルハンス細胞、およびケラチノサイトにおいて WSX-1 の発現が報告されている。また、中枢神経系においては、同じく単離したグリア細胞において WSX-1 の発現が報告されている。そこで、皮膚においてはランゲルハンス細胞とケラチノサイト、痛み刺激の伝達に関わる神経線維、および中枢神経系においてはグリア細胞を単離し、RT-PCR 法により IL-27 関連遺伝子の発現を解析したところ、ランゲルハンス細胞とケラチノサイト、および グリア細胞において WSX-1 の発現が確認できた。これらの細胞において、無刺激・無処置の状態では IL-27 p28 の発現は認められなかった。また、次に示す神経生理学的解析のために体外に単離した神経線維に関しては、C ファイバーにおいても WSX-1、および IL-27 p28 の発現は確認されなかった。

3. IL-27 による制御を受ける神経線維の生理学的解析

我々は、IL-27 シグナルを欠損するマウスにおいては、機械刺激、温熱刺激、寒冷刺激、および化学刺激、いずれに対しても疼痛過敏を示すことを報告した。このことは、それぞれ別個の疼痛刺激を伝える Aβ、Aδ、C ファイバーのいずれも IL-27 の制御を受けていることを示している。これらを検証する目的で、また IL-27 シグナル欠損における

疼痛過敏の責任細胞を生理学的に検証する目的で、体外に露出させた坐骨神経から神経細胞の太さにより C ファイバーを同定し、体外に単離した C ファイバーを機械刺激し、これに対する神経興奮（発火）の閾値、および頻度を生理学的に解析した（図 2）。この結果、*WSX-1*、*p28*、および *EBI-3* を欠損するマウス由来の C ファイバーはいずれも野生型マウス由来の神経線維と比べて、刺激に対して有意に低い刺激閾値、および高い発火頻度を示した。ただし、本実験は一匹ずつのマウス由来の神経線維を複数検証したものであり、独立した複数のマウス由来の神経細胞における検討は未実施である。また、Aβ、Aδファイバーに対する検討は行えていない。なお、神経線維、後根神経節、対応する部位の脊髄の組織学的解析では、その構造や細胞の割合などに IL-27 シグナル欠損による影響は認められなかった。

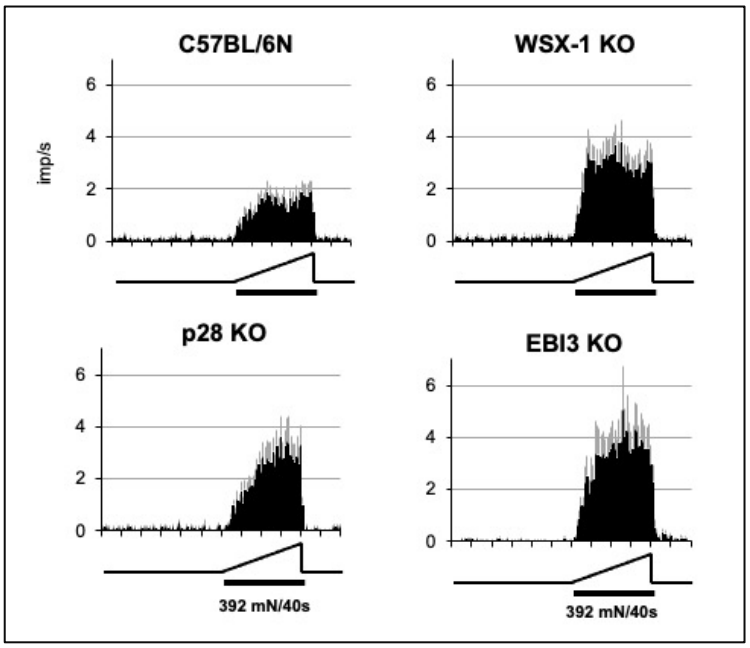


図 2. IL-27 シグナル欠損 C ファイバーの過剰興奮
C57BL/6Nマウス（野生型対照）、および*WSX-1*、*IL-27 p28*、あるいは*IL-27 EBI-3*を欠損するマウスの坐骨神経から、Cファイバーを体外に単離し、機械刺激（横軸。強度）を加え、神経線維の発火頻度（縦軸。発火／秒）を測定した。マウスは各系統一匹を用い、神経線維は各マウスから20本以上を解析。

4. IL-27 の作用を模倣できる低分子化合物の探索

本研究では、IL-27 の免疫炎症抑制作用、および疼痛抑制作用を模倣できる低分子化合物の探索を目的の一つに掲げていた。WSX-1 の下流では IL-27 刺激により STAT1/3 が活性化することが知られており［1］、また一部の T 細胞が IL-10 を産生し［3］、免疫・炎症抑制に関与することが知られている。IL-27 と類似した化合物探索の目的のため、共同研究先（施設名、担当者名は記載しない）と討議を重ねた結果、1. STAT のレポーターアッセイは、バックグラウンドの問題からマススクリーニングに適していない、2. T 細胞の系は、セルラインを用いないとマススクリーニングに適していない、かつ IL-10 産生が再現できるセルラインなどを探索する必要がある、などの問題が考えられた。このため、マクロファージなどの主たる IL-27 産生細胞からの IL-27 産生を誘導できる化合物の探索に方針を転換した。この目的のために、1 の IL-27 p28 レポーターマウスにおいて用いた Venus 発現ベクターをマクロファージ系セルラインに遺伝子導入したレポーター細胞を作製した。この細胞は、LPS 刺激により Venus タンパクによる蛍光シグナルを発し、同時に IL-27 p28 を産生することを確認した。この細胞を用いた一次スクリーニングを実施し、複数の IL-27 産生誘導物質候補を得た。

考　察

本研究の範囲内では、研究の目的の第一にあげたIL-27の作用部位あるいは産生細胞・標的細胞を同定することはできなかった。以下に考察を示す。

作製されたIL-27 p28レポーターマウスは設計通りに機能した（図1）。したがって、皮膚から神経線維、中枢神経系に至るまでIL-27 p28の発現（Venus蛍光色素のシグナル）を検出できなかったことは、レポーターシステムの感度によるものと考えられる。これは、IL-27シグナル欠損マウスにおける疼痛知覚過敏は、無処置・無刺激の状態でも観察され、IL-27は（低濃度であっても）恒常的に産生され、常時疼痛知覚を制御しているものと考えられるためである。このため、検出感度を上げるために、p28やVenusタンパクに対する抗体と二次抗体を用いた検出などの工夫が必要と考えられる。あるいは、p28やVenusのmRNAを検出する*in situ*ハイブリダイゼーションなどの方法により検出が可能になるものと思われ、検討している。しかしながらレポーターマウスを用いた解析により、これまでLPS刺激によりIL-27を産生するとされてきた樹状細胞においても、単純に試験管内でLSP刺激するのみではIL-27が産生されないことを確認している。これらのことから、IL-27産生には何らかの二次的なシグナルあるいは、周囲の細胞などから得られる刺激によるプライミング（準備状態）が必要な可能性も浮かび上がっている。現在、樹状細胞におけるIL-27産生機構や必要とされるシグナルなどを詳細に検討しており、ここで得られる知見を、例えば神経細胞に当てはめて検討する必要があると考えている。

一方、神経生理学的解析では、IL-27、あるいはその受容体を欠損するマウスにおいて体外に単離した神経線維そのものに過敏性と過剰反応が認められたことから、ニューロンがIL-27の標的である可能性が考えられた（図2）。しかしながら、先に示したように神経線維において受容体やIL-27 p28の発現が確認できていない、神経周囲にもIL-27 p28が検出できていないなどの理由から、現時点では神経線維がIL-27の標的であるとは断定できない。ニューロンそのものが標的である可能性に加え、周辺に存在する細胞がIL-27シグナル欠損により性質が変化し、間接的に神経線維の性質が変わっている可能性も考え、注意深く生理学的検討を続けていく予定である。

本研究のもう一つの目的である、IL-27投与と同様の効果を持つ低分子物質などのスクリーニングに関しては、さまざまな検討を加えた結果、（局所的に）IL-27産生を誘導できる低分子化合物の探索に方針を変更した。この目的にかなうスクリーニング用のレポーターを作製し、一次スクリーニングを行った。得られた候補化合物に関して、二次スクリーニングの方法やバリデーションの方法を検討している。

本研究においては、第一の目的である、疼痛知覚に関するIL-27の標的細胞や分子機構の解明には至らなかった。しかし、レポーターマウスの解析により、生体内でのIL-27産生は、これまで骨髄細胞由来の樹状細胞やマクロファージ、あるいは細胞株などを用いて得られた解析結果と比べて、より複雑であることが明らかになってきた。本研究により得られた知見を元に、疼痛知覚制御を含むIL-27の生理的役割について、より詳細な解析を行っていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科感染防御学講座免疫学分野の八坂敏一博士、および佐賀大学医学部麻酔・蘇生学講座笹平川奈緒美博士である。また、研究の遂行に関わった、佐賀大学医学部麻酔・蘇生学講座の笹栗智子博士、および佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野の三宅靖延博士、見市（三田村）文香博士、中村公秀医師に感謝する。

文　献

1）　Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. Annu Rev Immunol. 2015 33:417-43. PMID: 25861977 DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112134

2) Sasaguri T, Taguchi T, Murata Y, Kobayashi K, Iizasa S, Iizasa E, et al. Interleukin-27 controls basal pain threshold in physiological and pathological conditions. Sci Rep. 2018 Jul 23;8(1):11022. Epub 2018/07/25. PMID: 30038376 DOI: 10.1038/s41598-018-29398-3

3) Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Honma K, Hara H, Yoshida H, et al. Interleukin-27-Producing CD4(+) T Cells Regulate Protective Immunity during Malaria Parasite Infection. Immunity. 2016 Mar 15;44(3):672-82. PMID: 26968425 DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.011