

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19591329

研究課題名（和文）インターロイキン31による脱毛と掻痒誘発機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of alopecia and pruritis induced by IL-31

研究代表者 斎藤 三郎

(SAITO SABURO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10186934

研究成果の概要：IL-31Tg マウスでは、脱毛，激しい掻痒行動および血清 IgE レベルの上昇が認められた。これらの所見は，リコンビナント IL-31（rIL-31）を正常マウスに投与することにより観察された。IL-31 による脱毛は毛周期に関わる毛器官形成シグナル伝達因子によって調節されること，掻痒に関しては rIL-31 の投与によりレセプターの発現が増強すること，血清 IgE レベルの上昇は T 細胞からの Th2 サイトカイン分泌増強によって促進されることなどが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

インターロイキン31（IL-31）は、T細胞から産生され、かゆみを誘発し、アトピー性皮膚炎や気管支炎などのアレルギー疾患に関与するサイトカインとして報告された（Dillon et al. Nature immunology, 2004, 5(7):752-60）。このIL-31は、申請者らが研究を進めていたTh2細胞に強く発現が亢進する新規サイトカインで抗体産生を促進する分子と同一であった（1. 出願番号：特願2003-369583号、発明の名称：げっ歯類動

物の免疫応答調節蛋白質 2. 出願番号：特願2003-434112号 発明の名称：免疫応答調節蛋白質）。アトピー性皮膚炎におけるかゆみとIL-31の関連性については、Bilsboroughらや、Sunkolyら（J Allergy Clin Immunol 2006;117:411-7, 418-25）によっては報告されているが、IL-31の機能、特に脱毛およびかゆみのメカニズムに関する詳細な報告は未だにない。その理由は、極最近見出された新規サイトカインであり、解析手法が確立されていないことに起因する

と思われる。

2. 研究の目的

本研究では、IL-31の機能を最初にモデルマウスで解析する。特に、特定の細胞が一定量のIL-31を産生するマウスを作製してIL-31の発現と症状の関連を調べる。その成果を踏まえた上で臨床研究を行い、IL-31がアトピー性皮膚炎や脱毛の発症にどのように関与しているか解析する。モデルマウスでは、1) 脱毛の発症機序と2) 掻痒誘発機構の解明に焦点をしぼる。臨床研究では、IL-31の発現動態と症状との関連を追及する。

3. 研究の方法

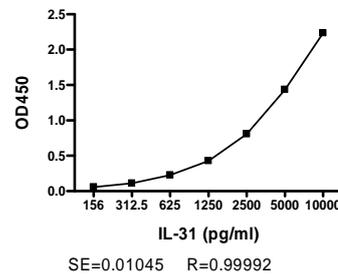
平成19年度は、主にIL-31の発現量を規定したモデルマウスの作製を中心に、IL-31の発現量と脱毛およびかゆみに伴う引っ掻き行動との関連さらにはIL-31の発現量に伴う皮膚症状と血中総IgE量の変動について解析する。平成20年度は、19年度に得られた試料の組織学的解析を中心に研究を進める。IL-31の分泌量と症状の経時的変化を免疫組織学的に捉える。IL-31の発現量を規定したマウスの作製は、19年度に引き続き行い、解析に十分な匹数を確保する。本年度もIL-31の発現量と脱毛およびかゆみに伴う引っ掻き行動との関連さらにはIL-31の発現量に伴う皮膚症状と血中総IgE量の変動について継続して解析する。さらに、IL-31の機能を検証するために、rIL-31をWildマウス(C57BL/6)に投与して症状ならびに組織学的観点から解析する。特に、かゆみのメカニズムについて肥満細胞の欠如したマウスに投与することで、既存のメカニズムとどのように関連するのか検討する。

4. 研究成果

インターロイキン31(IL-31)は、T細胞から産生され、かゆみを誘発し、アトピー性皮膚炎や気管支炎などのアレルギー疾患に関与するサイトカインとして報告されている。そこで、IL-31の機能を解析するためにIL-31過剰発現(IL-31 Tg)マウスを作成し、その表現型について解析した。IL-31 Tgマウスは、CAGプロモーターを用いてIL-31を過剰発現させたマウスであるが、自然交配が難しいために体外受精でF1を作成した。血清中のIL-31の濃度は、アルメニアンハムスター由来モノクローナル抗体と兔由来ポリクローナル抗体をそれぞれ作成し sandwich ELISAの系を確立して定量した(図1)。その結果、IL-31 Tgマウスは6週令ですでに剛毛、脱毛、掻痒行動に伴う引っ掻き傷などの

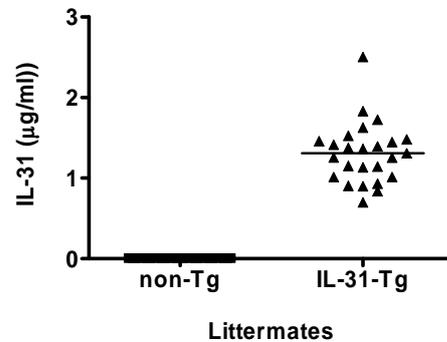
皮膚症状が観察された。血清中のIL-31濃度は約1~2 µg/mlであった(図2)。

図1. IL-31の検量曲線



Capture Ab: Anti-mouse IL-31 rabbit polyclonal antibodies
Detection Ab: Biotinylated anti-mouse IL-31 hamster monoclonal antibody (A5A2)

図2. 血中IL-31濃度



週令が経つと、激しい掻痒行動に伴う擦過傷や皮膚障害が多く認められた。これに対して non Tg littermates の皮膚は正常であり、血中IL-31も認められなかった。IL-31 Tgマウス血清中のIgEレベルは、13週令において non Tgマウスに比較して優位な上昇が認められた(図4)。

図3. 皮膚症状と血中IL-31濃度

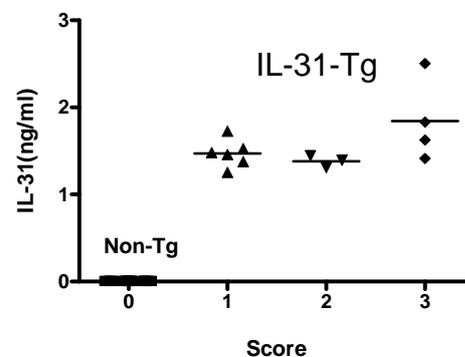
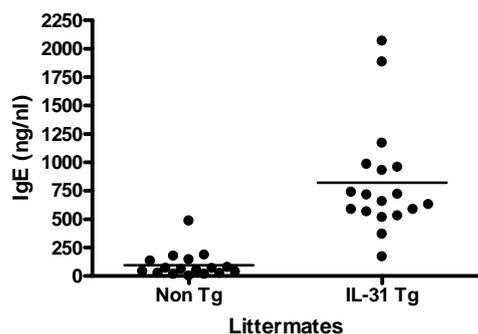


図4. 血清 IgE レベル



このように、我々の作成した IL-31Tg マウスにおいて皮膚症状、搔痒行動さらには IgE 抗体価の上昇が観察された。この結果は、アトピー性皮膚炎を解析する上で有用なモデルマウスになると思われる。

リコンビナント IL-31 (rIL-31) の投与により、これらの所見が再現されるか調べるために、rIL-31 を哺乳細胞に産生させ精製する方法を確立した。rIL-31 の投与によりこれらの所見が再現されることが判明した。rIL-31 の背部皮内投与による脱毛は、投与数日後に腹部からはじまり、投与 2 週間後には背部に渡って広範囲に認められたが、頭部には認められなかった。脱毛部位の組織化学的所見では、毛球部の細胞増殖が認められ、あたかも成長期のものであった。また、毛球部に IL-31 レセプターの発現増強が認められた。毛周期が休止期の場合にのみ、rIL-31 の投与により脱毛が認められことから、rIL-31 投与による脱毛は毛器官形成にかかわるシグナル伝達と関与することが推測された。搔痒に関しては、rIL-31 の投与後 2~3 時間後から痒み症状が認められることから、何らかの因子の発現を介して痒みが生じると考えられた。血清 IgE レベルの上昇は、T 細胞からの Th2 サイトカイン分泌増強によって促進されることが判明した (図 5, 6)。活性化マクロファージに IL-31 レセプターの発現が認められることから、IL-31 によって分泌が促進されるプレサイトカインによって Th2 サイトカインの分泌増強が促進すると推測された。

一方、ヒトにおいては、喘息患者、アトピー性皮膚炎患者において末梢血単核球からの IL-31 の分泌亢進が認められた。この IL-31 分泌能は、IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカイン分泌能と相関するが、Th1 サイトカインである IFN- γ とは相関しなかった。以上のように、IL-31 がアトピー性皮膚炎や喘息の病態に深く関与することがモデル動物およびヒトにおいて明らかになった。

図5. rIL-31 の投与により血清 IgE レベルは増強する

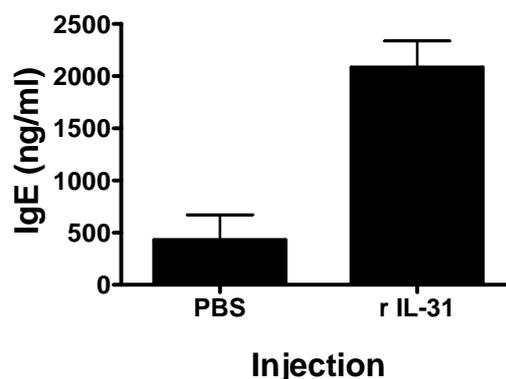
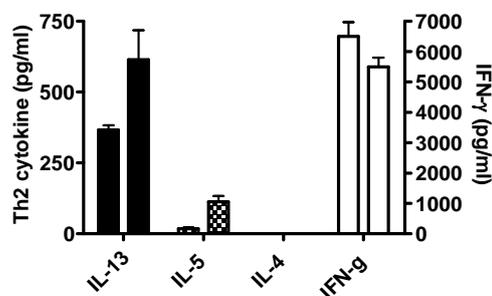


図6. rIL-31 の投与により Th2 サイトカイン産生は増強する



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Nobutake Akiyama, Yuji Ohno, Takahiro Fukuda, Yosinobu Manome, Saburo Saito. Enhancing activity of *N*-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 381, Issue 4, 17 April 2009, Pages 612-618. 査読有

2) 斎藤三郎, 秋山暢丈. IL-31の多面的機能. 臨床免疫・アレルギー科: 50 (6); 640-643, 2008. 査読なし.

[学会発表] (計 7 件)

1) Saito Saburo, Akiyama Nobutake, Kohno

Hideo, Ohno Yuji. IL-31 increases IgE levels in mice. The XXVII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 2008年6月7日～11日. Barcelona, Spain.

2) 齋藤三郎, 秋山暢丈, 神野英生, 大野裕治. IL-31 は血清IgEレベルを増強する. 第38回日本免疫学会総会・学術集会. 2008年12月1日. 国立京都国際会館

3) 齋藤三郎, 秋山暢丈, 大野裕治, 神野英生, 谷野千鶴子, 飯倉克人. IL-31 投与によるマウス血清IgEレベルの上昇. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008年11月27日. 東京国際フォーラム.

4) 飯倉克人, 谷野千鶴子, 佐藤哲夫, 勝沼俊雄, 中川秀巳, 永田欽也, 秋山暢丈, 齋藤三郎. 喘息患者末梢血単核球のIL-31 産生能. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008年11月27日. 東京国際フォーラム.

5) Saito Saburo, Akiyama Nobutake. IgE responses triggered by IL-31. XXVI Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology.. 2007年6月12日. Sweden.

6) 齋藤三郎, 秋山暢丈. Enhanced serum IgE levels in IL-31 transgenic mice. 第37回日本免疫学会総会・学術大会. 2007年11月20日. 東京.

7) 齋藤三郎, 秋山暢丈. IL-31 過剰発現マウスの皮膚症状と血清IgEレベル. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2007年11月1日. 横浜.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 齋藤 三郎
(Saito Saburo)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10186934

(2) 研究分担者 秋山 暢丈
(Akiyama Nobutake)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：00338865

(3) 連携研究者
()

研究者番号：