

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22591230

研究課題名（和文）拮抗的レセプター抗体による IL-31 の機能制御

研究課題名（英文）Regulation of the IL-31 function by the blocking antibody to IL-31 receptor

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（和文）：

IL-31 の多機能を解明するために IL-31 レセプター (IL-31R) に対する特異的抗体を樹立した。この抗体は、IL-31R の発現動態を解析できるばかりでなく、拮抗的抗体の投与により IL-31 の機能を解析する上で有用である。さらに、IL-31 の機能を検証するために IL-31 および IL-31R ノックアウト LacZ ノックインマウスを樹立した。現在、遺伝的背景を均一にするために、C57BL/6 マウスで戻し交配をして F7 まで作成できている。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the pleiotropic functions of IL-31, specific antibodies to IL-31 receptor A (IL-31R) were established. These antibodies will be useful tools for analysis of localization of the IL-31R-expressing cells and IL-31 function by administration into mice. Furthermore, to investigate the function of IL-31 or the IL-31 receptor, 2 strains of IL-31 or IL-31 receptor (IL-31R) knockout/LacZ knockin mice were generated. To produce offspring with a genetic identity for the analysis of the pleiotropic functions of IL-31, the heterozygous mouse will be backcrossed 7 or more times into the C57BL/6J genetic background.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：IL-31, IL-31 レセプター, 抗体

1. 研究開始当初の背景

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 (特願 2003-369583 号, げっ歯類動

物の免疫応答調節蛋白質, 斎藤三郎, 秋山暢丈, 他, 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).

申請者らが作成した IL-31 過剰発現 (IL-31Tg) マウスにおいて, 脱毛, 激しい搔痒行動, さらには血清 IgE レベルの上昇が認められた. さらに, これらの所見は rIL-31 を投与したマウスにおいて再現されることを確認している.

アトピー性皮膚炎のモデルである NC/Nga マウスでは, 引っ掻き行動と皮膚の IL-31mRNA の発現レベルが相関すること, ヒトにおいてもアトピー性皮膚炎患者において IL-31mRNA の発現レベルが高く, 搔痒部位において過剰に発現していることなどが報告されており, IL-31 が搔痒誘発に重要な因子であることが指摘されている. 申請者らも重症アトピー性皮膚炎の患者において IL-31 分泌能が非常に高い症例を経験している.

IL-31 レセプター (IL-31R) は, IL-31 レセプター A と オンコスタチン M からなり, ケラチノサイトを含む上皮細胞, 活性化マクロファージおよび後根神経節細胞に発現している. さらに, IL-31 レセプターの発現は, IFN- γ や IL-4 によって増強することが報告されている.

平成 19~20 年度の基盤研究 (C) では, 「インターロイキン 31 による脱毛と搔痒誘発機構の解明」の研究課題で, 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を進めた. 申請者らは最初に IL-31 過剰発現 (IL-31Tg) マウスを作成して IL-31 の機能を調べた.

IL-31Tg マウスは剛毛, 薄毛あるいは脱毛などの毛髪所見や激しい搔痒行動, さらには血 IgE レベルも上昇することが観察された. これらの所見は, rIL-31 を投与した正常マウスにおいても再現されることを確認した.

この研究において, IL-31 の機能は IL-31R を発現している細胞によって規定されることが推測された. しかしながら, IL-31R の発現動態はメッセージレベルでの推測であり, 蛋白レベルでの確に解析できる抗体は今のところない.

2. 研究の目的

本研究では, アトピー性皮膚炎や気管支炎などのアレルギー性疾患の発症に関与するサイトカイン IL-31 の機能を, IL-31R に対する抗体を作成することにより, IL-31R の発現動態および拮抗的抗体の投与により解析する. さらには, IL-31 の機能を, IL-31 および IL-31RA ノックインマウスを作成することによって検証する.

3. 研究の方法

(1) IL-31 レセプター抗体

IL-31RA 抗体を作成するために, 抗原として IL-31RA 蛋白のアミノ酸配列と高次構造から予測したペプチドを抗原として用いる. ポリクローナル抗体は, このペプチドと KLH のコンジュゲートをウサギに繰り返し免疫して作成する. このペプチド抗原に対してポリクローナル抗体が誘導されたかは ELISA 法にて確認する. さらに, ペプチド・アフィニティカラムを用いてポリクローナル抗体から IL-31RA 特異的抗体の精製を試みる. 次にこの精製抗体を用いて免疫組織化学的に IL-31RA の発現動態および *in vivo* に投与することで IL-31 の機能が抑制されるのか検討する. ポリクローナル抗体は研究に使用できる量に限りがあるので, さらに, この抗原をラットおよびハムスターに繰り返し免疫して抗マウス IL-31RA ラットモノクローナル抗体を作成する.

(2) IL-31 および IL-31RA ノックインマウスの作成

IL-31 の機能を検証するために IL-31 および IL-31RA のノックインマウスの作成を試みる. これらのノックインマウスの作成は通常の方法を用い, LacZ 遺伝子を導入する.

4. 研究成果

(1) IL-31 レセプター抗体

IL-31RA 蛋白のアミノ酸配列と高次構造から予測した mGPL65-88 のペプチドと KLH コンジュゲートに対して得られたウサギポリクローナル抗体が, 免疫組織化学的解析により皮膚ケラチノサイトや毛根細胞に発現した IL-31 レセプターを強く認識することを明らかにした. ウサギに免疫して作成した抗マウス IL-31RA ウサギポリクローナル抗体は, ウサギ血清を用いているために様々な抗体をも含んでいるために *in vivo* で使用するためには困難である. そこで, 免疫に使用した mGPL65-88 のペプチドを用いたアフィニティカラムを作成してマウス IL-31RA 特異的抗体の精製を試みた. その結果, mGPL65-88 のペプチド特異的抗体がウサギ一羽から約 3 mg 精製することができた. そこで, この精製抗体が IL-31 レセプターを認識できるのかマウスの皮膚切片を用いて免疫組織学的に解析した結果, 表皮ケラチノサイトや毛根細胞に発現した IL-31 レセプターを認識できることが判明した. 現在, 自然発症アトピー性皮膚炎 Nc/Nga マウスにこれらの抗体を投与することでアトピー様皮膚炎の発症および IgE 抗体産生の増強が抑制されか検討して

いる。なお、対照としては正常ウサギ血清から精製したIgG抗体を投与した。

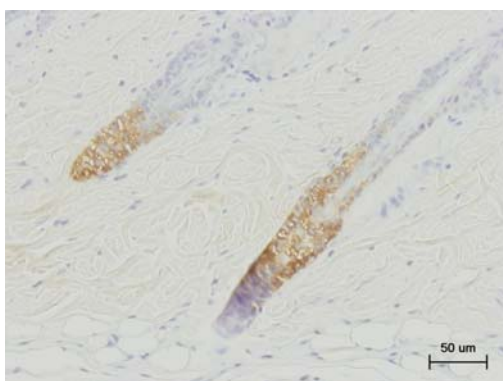
我々が予測したIL-31RA蛋白のペプチド配列はマウスIL-31RAに対するモノクローナル抗体を作成する上でも有用な抗原となることを示唆している。この抗原をハムスターおよびラットに繰り返し免疫して抗マウスIL-31RAモノクローナル抗体の作成を試みているが、これまで力価の高い抗体は得られていない。

(2) IL-31 および IL-31RA ノックインマウスの作成
ノックインマウス (KO) は、通常の方法に従い作成した。

C57BL/6-IL-31tm1(LacZ)は#30と#61, C57BL/6-IL-31RAtm1(LacZ)は#58と#7のそれぞれ2系統を現在維持している。ノックインマウスのバックグラウンド遺伝子を均一にするために、C57BL/6マウスで戻し交配をして現在F7まで作成できている。F6 x F6の交配によりホモノックインマウスを作成して野生型 (W) マウスと比較した結果、①ウサギ抗IL-31RA精製抗体による免疫組織化学的解析では、IL-31RAの発現はWマウスに認められるが、KOマウスでは認められないこと、一方 β -Gal染色はKOマウスに認められるが、Wマウスに認められないことから (図1A, 1B, 図2A, 2B), IL-31の機能を解析する上で申請者が樹立したKOマウスおよびウサギ抗IL-31RA精製抗体は有用な解析手段となると考えられる。

図1. 野生型マウスのIL-31R発現

A. 抗IL-31RA抗体染色



B. 抗 β -Gal抗体染色

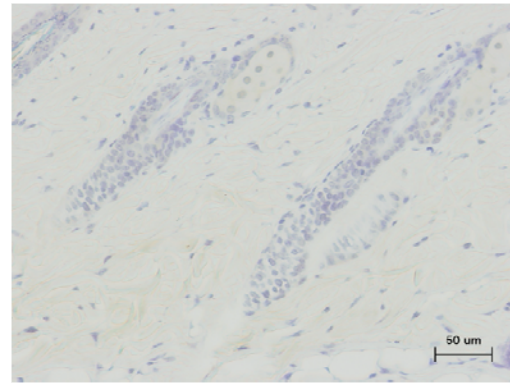
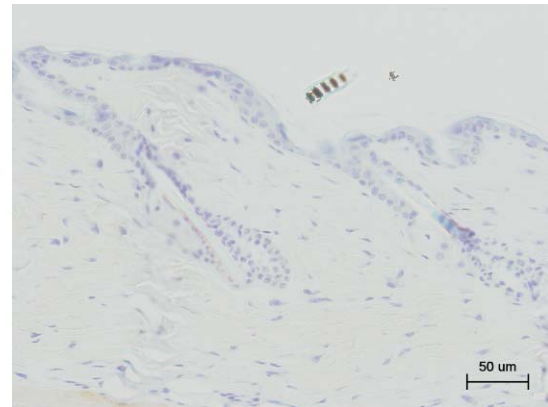
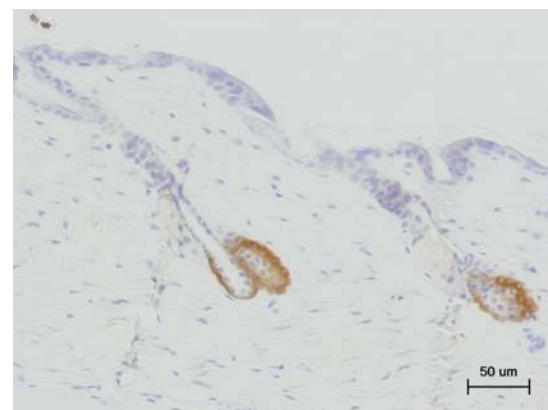


図2. IL-31RノックインマウスのIL-31R発現

A. 抗IL-31RA抗体染色



B. 抗 β -Gal抗体染色



②rIL-31の投与によりIL-31RA KOマウスでは脱毛が認められないことも確認できた。さらに、IL-31によって誘導される血清IgE抗体価の上昇は、IL-31RAを発現した活性化マクロファージが標的となりTh2分化誘導因子が分泌されるためと考えられた。

現在, F7 (-/+) マウスと H6 (-/-) IL-31RA K0 マウスを交配したリッターメイドが産まれており, IL-31 による IgE 抗体産生のメカニズムを検証したいと考えている.

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 1 件)

(1) 齋藤三郎, 秋山暢丈. IL-31 による IgE 産生増強とその機序. 臨床免疫・アレルギー科, 2010;53(1):16-20. (査読なし)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

齋藤三郎. インターロイキン 3 1) IL-31. 矢田純一・宮坂信之編集. サイトカインのすべて: 第 5 7 巻特別増刊号. 科学評論社, 2012;197-203. (査読なし)

[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: 1 0 1 8 6 9 3 4

(2) 研究分担者

秋山暢丈 (AKIYAMA NOBUTAKE)
恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 0 0 3 3 8 8 6 5

(3) 連携研究者

()

研究者番号: