

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 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2011～2012

課題番号：22591921

研究課題名（和文） 新規 T 細胞特異的サイトカイン IL-17 による慢性扁桃炎発症の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the onset of chronic tonsillitis induced by new type of cytokine, IL-17 Development of hearing aid applied to the ear drum directly driven by vibration

研究代表者

一針 幸子（ICHIHARI YUKIKO）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30327803

研究成果の概要（和文）：

慢性扁桃炎、扁桃肥大、また病巣扁桃炎の病態への IL-17 の関与と発症機序に作用することを分子レベルで証明した。扁桃炎疾患により摘出した扁桃リンパ球、コントロールとして同一患者の末梢血リンパ球を分離し FACS, Western Blotting による IL-17 蛋白発現量を解析した。扁桃の濾胞間の IL-17 の局在、発現量の違いが判明した。また、In vitro にて分離した扁桃 B 細胞を pokeweed mitogen を用いて、T 細胞を介した B 細胞活性化の実験系にて IL-17 の抗体産生への関与が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated the relevance of IL-17 to chronic tonsillitis, tonsillar hypertrophy, and focus infection. The expression of IL-17 protein was investigated by FACS and Western blotting using tonsillar lymphocytes and peripheral blood lymphocytes. The localization and expression of IL-17 was differed among several disorders. The B cells inside tonsillar tissues stimulated by pokeweed mitogen resulted in a significant contribution to production of IL-17 antibodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：口腔咽頭科学

1. 研究開始当初の背景

耳鼻咽喉科領域において扁桃は上気道における MALT (mucosa associated lymphoid tissue) として重要な器官であるが、耳鼻咽喉科外来診療において扁桃炎は日常一般に遭遇する疾患であり、単に細菌感染というだけでなく、反復性感染を来し炎症の遷延化により掌蹠膿疱症や慢性腎炎、IgA 腎症等の病巣感染などの全身症状を引き起こす。その発生機序、病因や全身症状の発現にいたる過程の詳細については、いまだ完全には解明されていない。

扁桃炎の起因として溶連菌などの細菌感染やウイルス感染が考えられるが、免疫臓器である扁桃において、それら外来性抗原に対し抗原提示細胞から T リンパ球を刺激し抗体産生細胞となりえる B 細胞との相互作用の免疫応答がおこり生態の恒常性を維持している。これらの免疫応答になんらかの異常をきたした際、習慣性扁桃炎や病巣感染症などの慢性炎症に移行することが考えられる。

一方でインターロイキン-17 (IL-17) は最近発見された T 細胞特異的なサイトカインであり、上皮細胞、内皮細胞や線維芽細胞などに作用して IL-1 β 、IL-6、TNF α 、G-CSF などの炎症性サイトカインや IL-8 などのケモカインの産生を誘導し、炎症反応において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。IL-17 は主として活性化 CD4⁺細胞から産生され炎症の成立に関与すると考えられており、最近 IL-17 と慢性炎症疾患との関係が注目されるようになっている。

IL-17 は新しい慢性炎症に関与するサイト

カインであるが耳鼻咽喉科領域における研究成果はほとんどない。耳鼻科における代表的な慢性炎症性疾患、扁桃炎において慢性炎症性マーカー IL-17 を解析することは世界に先駆けてこれらの疾患の病態、またその違いを見出す事が出来ると確信する。

抗生物質の発達した今日においても習慣性や慢性の扁桃炎、また病巣感染症には手術的摘出による治療を余儀なくされているのが現状であり、この研究が新たな治療法の可能性についての基礎となることが考えられる。たとえば扁桃炎の発症に関わる限定された IL-17 に対する抗体投与等により特異的治療や予防の可能性も示唆され、臨床にフィードバックされるものとする。そして将来的には、今日耳鼻科領域において、日常頻繁に行われている扁桃摘出手術の適応にも影響を及ぼす可能性がある。

2. 研究の目的

慢性扁桃炎、扁桃肥大、また病巣扁桃炎の病態への IL-17 の関与と発症機序に作用することを分子レベルで証明する。扁桃炎における IL-17 の関与を解明し、また習慣性扁桃炎、扁桃肥大、病巣感染症などの各疾患におけるその発現量の違いを解析することによりそれぞれの疾患の病態の違いを見出す。すなわち各扁桃炎疾患により摘出した扁桃リンパ球、コントロールとして同一患者の末梢血リンパ球を分離し FACS, Western Blotting による IL-17 蛋白発現量を解析する。また CD4⁺は扁桃の濾胞間に多数局在しており免疫応

答に深く関わっているが摘出した扁桃の凍結切片を作成し免疫染色（二重染色）にて IL-17 の局在、発現量を解析する。また、In vitro にて分離した扁桃 B 細胞を pokeweed mitogen を用いて、T 細胞を介した B 細胞活性化の実験系にて IL-17 の抗体産生への関与も検討する。

3. 研究の方法

本研究の方法の概要を以下に記す。

①Western blotting による各種扁桃疾患別の IL-17 蛋白量の解析

②FACS による CD4/CD27 抗原陽性細胞の IL-17 の発現量の解析

③IL-17 蛋白の局在に関する検討：CD4/CD27 抗原陽性細胞の IL-17 抗体を用いた二重免疫染色による組織学的観察

④T 細胞-B 細胞の相互連関における IL-17 の役割に関する検討

具体的には以下の方法で施行する。

Western blotting による IL-17 蛋白量の解析
習慣性扁桃炎、扁桃肥大、病巣感染症などの各疾患における IL-17 の発現量の違いを解析することによりそれぞれの疾患の病態の違いを見出した。摘出した扁桃のリンパ球、コントロールとして同一患者の末梢血リンパ球を分離し、protease inhibitor 入りのバッファーにて組織を融解し、その特異的抗体を用いて免疫沈降しその後通常の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、メンブレンに移し、化学発光を用いた Western blotting にて解析、また LAS-1000 (FUJI) を用いて検出及び定量を行った。

FACS による CD4/CD27 抗原陽性細胞の IL-17 の発現量の解析扁桃よりリンパ球を分離し、12穴のプレートに培養した。PBS にて洗浄した後、細胞膜を 0.25%トリプシン-0.01%EDTA によって浸透化した。CD4, CD27, IL-17 の抗体と 30 分間反応させ、洗浄後に FITC 標識ヒツジ抗マウス抗体と反応させて、FACS にて測定した。

IL-17 蛋白の局在に関する検討：CD4/CD27 抗原陽性細胞の IL-17 抗体を用いた二重免疫染色による組織学的観察

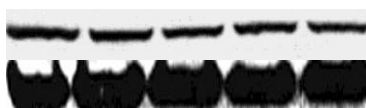
扁桃の濾胞間に多数局在しており免疫応答に深く関わっている CD4 陽性細胞を摘出した扁桃の凍結切片を作成し免疫染色（二重染色）にて IL-17 の局在、発現量を解析する。
T 細胞-B 細胞の相互連関における IL-17 の役割に関する検討

In vitro にて分離した扁桃 B 細胞を pokeweed mitogen を用いて T 細胞を介した B 細胞活性化の実験系を確立する。抗 IL-17 抗体使用した IL-17 の抗体産生への関与も検討する。

4. 研究成果

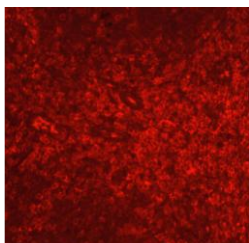
1) 各扁桃炎疾患により摘出した扁桃リンパ球、コントロールとして同一患者の末梢血リンパ球を分離し FACS, Western Blotting にて IL-17 蛋白発現量を解析した。病巣感染症 > 習慣性扁桃炎 > 扁桃肥大の順で IL-17A 蛋白量に差異を見出した。

<Western blotting の結果>



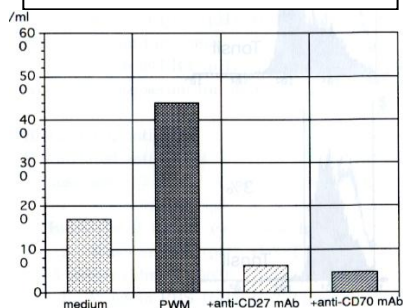
2) CD4+は扁桃の濾胞間に多数局在しており免疫応答に深く関わっているが摘出した扁桃の凍結切片を作成し免疫染色（二重染色）にてIL-17の局在、発現量の違いが判明した。

<扁桃濾胞間領域におけるCD4+細胞>



3) In vitroにて分離した扁桃B細胞をpokeweed mitogenを用いて、T細胞を介したB細胞活性化の実験系にてIL-17の抗体産生への関与が明らかになった。

<抗IL-17抗体の扁桃における抗体産生抑制作用>



4) 扁桃から分離されたリンパ球を用いて、FACSによる解析の結果、CD4とCD27細胞が高率にIL-17を産生していることが証明され、扁桃におけるIL-17に産生の責任細胞が同定された。

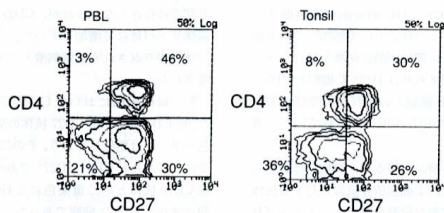


図5 末梢血リンパ球 (PBL) と扁桃リンパ球 (Tonsil) におけるCD4/CD27抗原の発現

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)

Sato D, Suzuki Y, Kano T, Suzuki H, Matsuoka J, Yokoi H, Horikoshi S, Ikeda K, Tomino Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Mar;27(3):1090-7. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一針 幸子 (ITYIHARI YUKIKO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30327803

(2) 研究分担者

神谷 和作 (KAMIYA KAZUSAKU)
順天堂大学・医学部・講師
研究者番号：10374159

楠 威志 (KUSUNOKI TAKESI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30248025

池田 勝久 (Ikeda Katsuhisa)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：70159614