

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462694

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

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.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：扁桃炎 IL-17 CD4 リンパ球

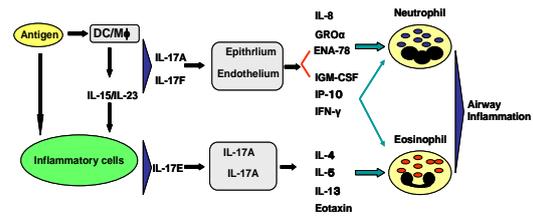
1. 研究開始当初の背景

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きている。

従ってこれまでの慢性扁桃炎、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ことを企画するに至った。



2. 研究の目的

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。

IL-17 の扁桃炎への関与の着眼点

- ・扁桃炎における T リンパ球-B リンパ球の相互作用
- ・新規の T 細胞特異的なサイトカイン
- ・炎症性サイトカインやケモカインの産生の誘導
- ・活性化 CD4+ 細胞からの産生による炎症の成立

3. 研究の方法

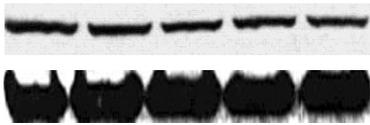
平成 25 年度

1. 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す。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う。

<Western blotting の結果>



II. 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する。PBS にて洗浄した後、細胞膜を 0.25%トリプシン-0.01%EDTA によって浸透化する。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 にて測定する (扁桃の研究にて実績のある横井秀格講師に研究指導をしてもらう)。

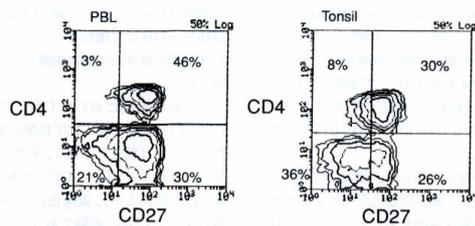
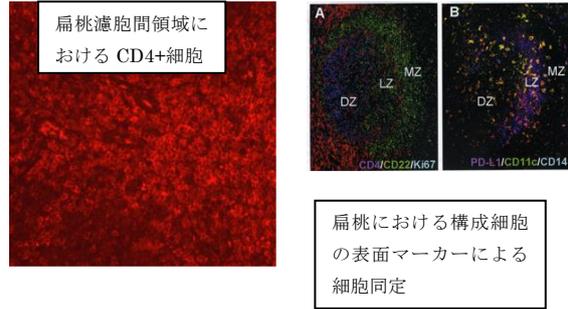


図5 末梢血リンパ球 (PBL) と扁桃リンパ球 (Tonsil) における CD4/CD27 抗原の発現

平成26年度

IL-17 蛋白の局在に関する組織学的検討

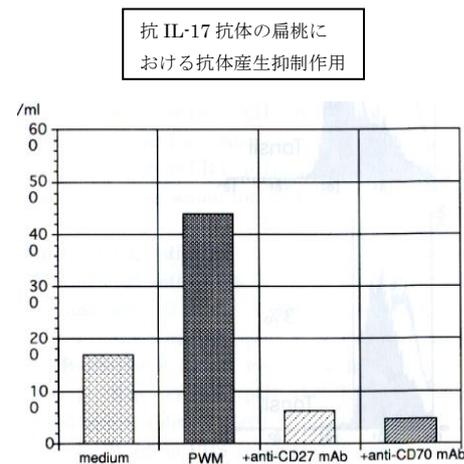
扁桃の濾胞間に多数局在しており免疫応答に深く関わっている CD4 陽性細胞を摘出した扁桃の凍結切片を作成し免疫染色 (二重染色) にて IL-17 の局在、発現量を解析する。



平成27年度

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。

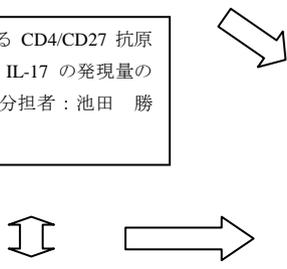


Western blotting による IL-17 蛋白量と免疫組織学による局在の解析 (研究分担者: 楠 威志)

FACS による CD4/CD27 抗原陽性細胞の IL-17 の発現量の解析 (研究分担者: 池田 勝久)

研究の総括 (一針 幸子)

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 (研究協力者: 神谷 和作)



4. 研究成果

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。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きている。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が見いだされた。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。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

一針 幸子 (ICHIHARI Yukiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30327803

(2) 研究分担者

楠 威志 (KUSUNOKI Takeshi)

順天堂大学・医学部・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

(3) 連携研究者