

平成22年 5月 22日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20780209  
 研究課題名 (和文) 炎症応答および炎症性腸疾患におけるインターロイキン-19の役割  
 研究課題名 (英文) Role of interleukin-19 on the inflammatory bowel disease  
 研究代表者  
 東 泰孝 (AZUMA YASUTAKA)  
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
 研究者番号：50298816

## 研究成果の概要 (和文)：

インターロイキン (IL)-19 遺伝子欠損マウス (KO) を用いてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎モデルを作製した。生存率は、IL-19KO は野生型 (WT) と比べて低下した。また、体重減少、血便の有無、下痢、いずれも IL-19KO の方が WT よりも酷かった。次に、遠位結腸の HE 染色像でも、IL-19KO は WT よりも上皮細胞の欠損が多く、炎症性細胞の浸潤も顕著に増加し、炎症の明らかに悪化した。

## 研究成果の概要 (英文)：

We show that IL-19-deficient mice are more susceptible to experimental acute colitis induced by DSS, and this increased susceptibility is correlated with the accumulation of macrophages and the increased production of IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  and KC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：消化管疾患

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：薬理、粘膜免疫、炎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) インターロイキン (IL)-19 は IL-10 ファミリーに分類される新規のサイトカインである。IL-19 の機能は、マクロファージにおいて LPS により発

現誘導されることから炎症応答に関与する可能性が示唆される。加えて、B 細胞や上皮組織に特異的に発現し、T 細胞からは産生されないことが報告されている。しかしながら、免疫学系全般にお

ける IL-19 の役割はほとんど明らかにされていない。特に、IL-19 と炎症大腸炎との関連性の追求は、IL-10 遺伝子欠損マウス (KO) において炎症性の腸炎が自然発症することから、炎症大腸炎発症メカニズム解明に大いなる治療学的意義を持つものである。

(2) IL-19 は 2000 年に IL-10 とのホモログサーチにより発見されたサイトカインであるにも関わらず、遺伝子欠損マウスを用いた成果報告は全くなく、今回、研究代表者の公表論文が世界で初めての報告となった。

## 2. 研究の目的

IL-19 遺伝子欠損マウスを用いて、炎症性腸疾患モデル動物を作製し、大腸炎発症における IL-19 の病態生理学的役割を解析することを目的とした。さらに、IL-19KO より調整したマクロファージおよび樹状細胞を用いて各種 TLR リガンド刺激条件下における TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-6、および IL-10 産生能を野生型マウス (WT) と比較検討を行った。

## 3. 研究の方法

【DSS 誘発性急性大腸炎モデル】3%硫酸デキストランナトリウム (DSS) を飲水にて 7 日間与え、その後、普通水に戻しさらに 7 日間与えることで誘導した。DSS は腸上皮のバリア機能低下により大腸炎を発症する。

【DSS 誘発性慢性大腸炎モデル】2%DSS を飲水にて 5 日間与え、その後、普通水を 5 日間与える 10 日間のサイクルを計 3 回繰り返すことにより誘導した。

【組織学的観察】結腸部位を摘出した後、ヘマトキシリン・エオジン染色により、炎症の程度、上皮細胞の損傷の有無などを観察する。

【組織培養】結腸部位摘出後、培養メディアウム中にて 24 時間培養を行った後、上清中に産生されてくる各種サイトカインを ELISA キットにより測定する。

【マクロファージ】WT および IL-19KO の骨髄細胞を採取後、M-CSF を用いた分化誘導によりマクロファージを調製する。

【樹状細胞】WT および IL-19KO の骨髄細胞を採取後、GM-CSF を用いた分化誘導により樹状細胞を調製する。

【ELISA アッセイ】WT および IL-19KO 由来マクロファージおよび樹状細胞を各種 TLR リガンドで刺激した後、培養上清中に産生される TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、および IL-10 を ELISA キットにより測定する。

## 4. 研究成果

### (1) 急性腸炎モデル

飲水開始 14 日後までの生存率を比較検討したところ、IL-19KO は WT と比べて感受性が高く、それに伴うマウス個体の生存率も低くなることが明らかとなった。また、体重減少、血便の有無、下痢の程度、いずれも IL-19KO の方が WT よりも酷いことが明らかとなった。次に、飲水開始 5 日後について遠位結腸部位の HE 染色像を観察したところ、IL-19KO では WT よりも上皮細胞の欠損が多く、加えて炎症性細胞の浸潤も顕著に増加するなど、炎症の明らかな悪化が認められた。

### (2) 慢性腸炎モデル

急性腸炎モデルに加えて、慢性大腸炎モデルを作製し、炎症性腸疾患における IL-19 の役割についてさらに詳細な検討を行った。飲水投与開始から 30 日後の時点で遠位結腸を採材した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により炎

症の程度を観察した。また、リンパ球の動態を観察するために、T細胞と形質細胞に対する免疫染色を行った。さらに、遠位結腸を24時間組織培養した後、産生される各種サイトカインを、ELISAを用いて測定した。その結果、飲水開始30日後における大腸炎の指標はWT、IL-19K0ともに回復していた。そのときの遠位結腸におけるHE染色像では、両群ともに炎症反応が見られたものの、その間に顕著な差は認められなかった。免疫染色でリンパ球を観察したところ、形質細胞の発現量はIL-19K0の方がWTと比べて減少していた。組織培養によるサイトカイン産生量は、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 産生量がWTに比べてIL-19K0では有意に増加していた。一方、IL-10およびIL-13産生量はWTに比べてIL-19K0の方が有意に減少していた。

### (3) インビトロ実験系の評価

LPS処置に伴うマクロファージからのTNF- $\alpha$ 、IL-12およびIL-6産生能を測定したところ、IL-19K0由来マクロファージの産生能は、WT由来マクロファージと比べて、いずれの産生能も有意に増加することが明らかとなった。さらに、TLR2/TLR6にはMALP2、TLR1/TLR2にはPAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>、TLR2にはpeptidoglycan (PGN)、TLR3にはdouble-stranded RNA (poly(I:C))、TLR5にはflagellin、TLR7にはloxoribine、TLR8にはR848、TLR9にはCpG oligo DNA (CpG)、をそれぞれのTLRに対する特異的リガンドとして同様の検討を行ったところ、LPSの場合と同様にIL-19K0由来マクロファージでは各種サイトカイン産生能の亢進が認められた。しかしながら、IL-10産生能については、いずれのTLRリガンドを用いた場合においても、IL-19K0はWTと同程度であった。一方、樹状細胞を用

いて、マクロファージと同様の検討を行ったところ、TNF- $\alpha$ 、IL-12およびIL-6産生能については、IL-19K0とWTの間に明確な相違は認められず、さらに、細胞表面上のMHC class II、CD80およびCD86の発現レベルについても、IL-19K0の発現レベルはWTと同程度であった。マクロファージと樹状細胞に発現するIL-19をPCRにより解析したところ、マクロファージではLPSを含む各種TLRリガンドによってIL-19発現が観察されたのに対して、樹状細胞では、TLRリガンドによるIL-19の発現誘導は認められなかった。各種TLRリガンドによるIL-19の誘導経路を明らかにするために、TLRファミリーの主要アダプターであるMyD88およびTRIFを各々欠損させたマウスのマクロファージを用いて解析を行ったところ、IL-19誘導経路はMyD88の下流にあることが明らかとなった。

(4) 特筆すべきは、今回、世界で初めてIL-19遺伝子欠損マウスを用いた成果を論文発表できたことである。今回得られた研究成果は、国内では、日本消化器免疫学会にて発表を行い、海外においては国際粘膜免疫学会議にて発表を行った。いずれも、高い注目を集め、活発な議論を展開することができた。

今後も、IL-19の免疫学的役割解明に向けて世界をリードしていきたい。

## 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. Yasu-Taka Azuma, Yukiko Matsuo, Mitsuru Kuwamura, George D. Yancopoulos, David M. Valenzuela,

Andrew J. Murphy, Hidemitsu Nakajima, Margaret Karow and Tadayoshi Takeuchi (2010) Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation. **Inflamm. Bowel Dis.** 16(6), 1017-1028. (本誌は査読システムの有る雑誌である)

[学会発表] (計4件)

1. 東 泰孝、竹内正吉 (2010) 炎症性腸疾患におけるIL-19の役割. 第149回日本獣医学会学術集会、3月26日、武蔵野.
2. Yasu-Taka Azuma, Yukiko Matsuo, Mitsuru Kuwamura, Hidemitsu Nakajima, and Tadayoshi Takeuchi (2009) Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation. 14th International Congress of Mucosal Immunology, 7/5-9, Boston (MA, USA).
3. 東 泰孝、松尾有希子、桑村 充、中嶋秀満、竹内正吉 (2009) IL-19 遺伝子欠損マウスにおけるDSS誘発性大腸炎の増悪. 第46回日本消化器免疫学会総会、7月23日、松山.
4. Yasu-Taka Azuma, Yukiko Matsuo, Mitsuru Kuwamura, Hidemitsu Nakajima, and Tadayoshi Takeuchi (2009) Interleukin-19 protects mice with DSS-induced acute colitis. 7th Annual Conference on Cytokine & Inflammation, 1/29-30, San Diego (CA, USA).

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 泰孝 (AZUMA YASUTAKA)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50298816

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：