

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 23日現在

機関番号：24403
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780300
 研究課題名（和文） 炎症性腸疾患病態発症におけるインターロイキン-19による新規免疫調節機能の解明
 研究課題名（英文） New Immunological 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）：

TNBSを用いてT細胞を主体とするIBDモデルを作製しIL-19の機能的役割について検討を行った。IL-19KOはWTよりも体重減少の程度が酷くなった。IL-19KOはWTよりも上皮細胞の欠損および炎症性細胞の浸潤が悪化し、炎症性細胞浸潤が漿膜にまで達する激しい炎症であった。さらに、IL-19KOではIFN γ 、IL-12、IL-22およびIL-33の発現量が増加した。以上の結果より、TNBS誘発性IBDモデルにおいて、IL-19遺伝子欠損に伴い炎症の悪化が起こることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have used TNBS-induced colitis models to examine the roles of IL-19 in colonic inflammation and thus its possible role in IBD. We show that IL-19-deficient mice are more susceptible to experimental acute colitis induced by TNBS, evaluated by body weight changes, leukocyte infiltration and epithelial cell damage. This increased susceptibility was correlated with increased production of IFN γ , IL-12, IL-22, and IL-33. The finding that IL-19 drives pathogenic adaptive immune responses in the colon suggests that the selective targeting of IL-19 may be an effective therapeutic approach in the treatment of human IBD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：免疫疾患

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：免疫、炎症性腸疾患、インターロイキン-19

1. 研究開始当初の背景

消化管は、常に細菌およびウイルスなどの病原微生物に曝されている。正常では、消化管粘膜に存在する自然免疫担当細胞は、病原微生物に対して不応答になっている。そしてこ

の制御機構の破綻が炎症性腸疾患の発症につながると考えられる。炎症性腸疾患は、ヘルパーT細胞(Th)1型依存性の炎症が惹起されるクローン病とTh2優位な炎症反応が起こる潰瘍性大腸炎とに大きく分けられる。一方、IL-10は自然免疫系細

胞の活性を抑制すること、さらに IL-10 遺伝子欠損マウスにおいて炎症性腸炎が自然発症することから炎症性腸疾患の発症過程に最も重要なサイトカインと考えられる。

IL-19 は IL-10 とのホモログサーチにより 2000 年に発見されたサイトカインであり、IL-20、IL-22、IL-24、IL-26 とともに IL-10 ファミリーを構成する。IL-10 とのアミノ酸レベルの相同性は 21% であるものの、立体構造的に IL-10 と類似することから IL-10 ファミリーに分類される。IL-19 を産生する細胞は免疫系細胞では、活性化されたマクロファージが主要な産生細胞であり、マクロファージよりは少ないものの単球および B 細胞からも産生される。非免疫系細胞では、ケラチノサイトから IL-19 が産生される。臨床的には、IL-19 は喘息と乾癬に関与すると報告されている。加えて、近年、加齢、I 型糖尿病、肺血症、歯周病、心疾患、リウマチ、尿毒症など広範な疾患・病気に関与することが報告されている。しかしながら、これらの報告はほとんどが各疾患における IL-19 の濃度変動について示した結果であり、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。このような現況の中、研究代表者は IL-19 遺伝子欠損マウスを作出し、マクロファージが主に関与する炎症性腸疾患モデルにおいて組織炎症が著明に増悪することを見出し、2010 年、世界で初めて IL-19 遺伝子欠損マウスを用いた成果発表を行った。加えて、IL-19 が炎症性腸疾患に関与することも世界で初めての報告である。本研究成果により、今まで IL-19 の役割は喘息や乾癬に関与することが報告されつつも、その全体的な役割解明にはほど遠かった現状を、炎症性腸疾患発症における急性期のマクロファージへの知見を足がかりとして、今後の IL-19 に関する役割解明の新展開が期待される。臨床的には炎症性腸疾患発症にはマクロファージだけでなく、T 細胞あるいは他の免疫担当細胞も重要な役割を果たすことから、これまでの研究成果をさらに発展させるべく、今回、T 細胞が主に関与する炎症性腸疾患モデルを用いて IL-19 の免疫学的役割のさらなる解明を志向した。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。

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い状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、T 細胞が主に関与する炎症性腸疾患における IL-19 の免疫学的役割について、IL-19 遺伝子欠損マウスを用いた解析から明らかにすることを第一の目的とする。そのため、T 細胞が主に関与する炎症性腸疾患モデルを用いて、IL-19 遺伝子欠損に伴う変化を解析する。実際の炎症性腸疾患には Th1 優位な炎症反応がおこるクローン病と Th2 優位な炎症反応がおこる潰瘍性大腸炎とがあることから、本研究ではモデルとして、Th1 依存性の炎症反応をおこす TNBS 誘発性炎症性腸疾患モデル、および Th2 依存性の炎症反応をおこすオキサゾロン誘発性炎症性腸疾患モデルを用いることで、より IL-19 の機能的役割を明らかにする。最初に着目する評価項目は、これらモデルにおける炎症の組織評価である。野生型マウスと IL-19 遺伝子欠損マウスの間で比較検討を行い、炎症反応の増悪あるいは緩和が認められたモデルについて、さらにそのメカニズムについて詳細な解析を進める。

IL-19 は非免疫系細胞であるケラチノサイトにおいて、IL-20R1 と IL-20R2

のヘテロ二量体と結合した後、シグナル伝達される。IL-20R1 および IL-20R2 は皮膚および肺にもっとも高く発現しており、生殖器官など他の組織においても数多く発現が認められる。IL-19 結合後の IL-20R1/IL-20R2 下流のシグナル伝達は、STAT1 および STAT3 のリン酸化が認められる。一方、免疫系細胞では、IL-20R2 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の機能障害が起こることから、CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞において IL-20R2 は何らかの機能的役割を担う。ところが、IL-20R2 とは異なり、各種 T 細胞において IL-20R1 発現はいずれも認められない。このように、免疫系細胞には IL-20R2 の発現は認められるものの IL-20R1 は認められないとの報告が多い。しかしながら、IL-19 が直接 T 細胞に作用を示す報告も存在することから、IL-20R1/IL-20R2 以外の IL-19 受容体の存在が疑われている。研究代表者は、マクロファージにおいて IL-20R1 および IL-20R2 がともに発現していること、さらに、その下流に STAT1 と STAT3 のリン酸化がおこることを見出した。今回用いる炎症性腸疾患モデルについても、T 細胞を単離した後、IL-20R1 および IL-20R2 の発現の有無、さらには下流のシグナル伝達経路についても明らかにする予定である。

3. 研究の方法

野生型マウスと IL-19 遺伝子欠損マウスを用いて、以下に示す 3 種類の異なる炎症性腸疾患モデルを作製し、その病態変化の比較検討ならびにメカニズム解析を行う。

・オキサゾロンによる炎症性腸疾患モデル

・TNBS による炎症性腸疾患モデル
各モデルいずれも腸炎誘導後、経時的に結腸の組織炎症の程度を観察する。野生型マウスと IL-19 遺伝子欠損マウスの間で比較検討を行い、炎症反応の増悪あるいは緩和が認められたモデルについて、さらなるメカニズム解明のため、経時的に結腸より T 細胞をセレクション単離した後、サイトカイン産生能の解析を行い、IL-19 の免疫学的役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度

インターロイキン-19 (IL-19) 遺伝子欠損マウス (KO) を用いてハプテンである 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を用いて T 細胞を主体とする IBD モデルを作製し、炎症性腸疾患における IL-19 の役割について検討を行った。野生型マウス (WT) および IL-19KO にカテーテルを肛門から 4 cm 挿入した後、TNBS (2.5mg/100 μ L 50% エタノール) を直腸投与した。炎症性腸疾患モデルを作製した。投与後、体重を 5 日間測定した。投与 3 日後、遠位結腸を採材しヘマトキシリン・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、遠位結腸における各種サイトカイン発現量をリアルタイム定量 PCR により解析した。その結果、投与 5 日後までの体重を比較検討したところ、IL-19KO は WT よりも体重減少の程度が酷くなることが明らかとなった。HE 染色像の観察によっても、IL-19KO は WT よりも上皮細胞の欠損および炎症性細胞の浸潤など、炎症の明らかな悪化が認められた。また、IL-19KO では炎症性細胞浸潤が漿膜にまで達する激しい炎症反応であった。さらに、IL-19KO では IFN- γ 、IL-12、IL-22 および IL-33 の発現量増加が認められた。以上の結果より、TNBS を用いて IBD モデルを作製し、IL-19 遺伝子欠損に伴い、IBD 病態が悪化することを見出した。本年度は、この病態悪化のメカニズムについて、詳細な検討を行ったところ、特に、T 細胞が産生する IFN γ の産生能が IL-19 遺伝子欠損に伴い、増加することつきとめ、IL-19 の免疫学的役割の一つに IFN γ 産生能の調節であることを発見した。

(2) 平成 24 年度

インターロイキン (IL) -19 遺伝子欠損マウス (KO) を用いてハプテンであるオキサゾロンを用いて T 細胞を主体とする IBD モデルを作製し、炎症性腸疾患における IL-19 の免疫学的役割に

ついて検討を行った。野生型マウス (WT) およびIL-19K0に、腹部をバリカンにより毛剃りを行ったのち、4% オキサゾロン150 μ Lを塗布した (前感作)。前感作より7日後、マウスにカテーテルを肛門から4 cm挿入した後、3% オキサゾロン100 μ Lを直腸投与した。投与後、体重を5日間測定した。投与3日後、遠位結腸を採材しHE染色により炎症の程度を観察した。また、遠位結腸中のMPO活性をELISAキットにより測定し、炎症の指標とした。さらに、リンパ節を採材したのち、T細胞の増殖培養を行い、上清中に産生されるIFN γ およびIL-4の量をELISAアッセイにより測定した。投与5日後までの体重を比較検討したところ、IL-19K0はWTよりも体重減少の程度が弱くなることが明らかとなった。HE染色像の観察によっても、IL-19K0はWTよりも上皮細胞の欠損および炎症性細胞の浸潤など、炎症の明らかな軽減が認められた。また、好中球浸潤を示すMPO活性においても、IL-19K0ではWTより明らかに低値を示した。さらに、T細胞から産生されるIL-4量はWTの方が高く、IL-19K0では減少が認められた。以上の結果より、オキサゾロン誘発性炎症性腸疾患モデルにおいて、IL-19遺伝子欠損に伴い炎症の軽減が起こることが明らかとなった。

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)

[学会発表] (計4件)

1. Yasu-Taka Azuma, Tadayoshi Takeuchi. The emerging role of interleukin-19 as inflammatory mediators in inflammatory bowel disease. 第86回日本薬理学会年会、3月21-23日、福岡。(シンポジウム) (口頭発表)
2. 東 泰孝、松尾有希子、中嶋秀満、竹内正吉 (2012) IL-19のTNBS誘発性炎症性腸疾患モデルにおける役割。第49回日本消化器免疫学会総会、7月5日、鹿児島。(口頭発表)
3. 東 泰孝、松尾有希子、中嶋秀満、竹内正吉 (2012) TNBS誘発性炎症性腸疾患モデルにおけるIL-19遺伝子欠損マウスを用いた解析。第

- 153回日本獣医学会学術集会、3月28日、さいたま。(ポスター発表)
4. Yasu-Taka Azuma, Yukiko Matsuo, Hidemitsu Nakajima, and Tadayoshi Takeuchi (2012) Interleukin-19 is critical for the development of Th1 cell-mediated colitis in mice. 10th Annual Conference on Cytokine & Inflammation, 1/30-31, San Diego (CA, USA). (ポスター発表)

[図書] (計1件)

図書名：サイトカインのすべて
項目タイトル：IL-19
著者名：東 泰孝
ページ：137-141 (総ページ数 861)
科学評論社 2012年

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