

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 6月 7日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791129

研究課題名（和文） アレルギー疾患における IL-16 の抑制機能の解明

研究課題名（英文） Inhibitory effect of IL-16 on allergic diseases

研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA NAOKI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：70453917

研究成果の概要（和文）：本研究では、接触皮膚炎における CD8 陽性 T 細胞由来 IL-16 の機能について検討した。IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスでは遅発性の炎症反応が起り、ハプテン塗布後 1 週間を過ぎるとほとんどのマウスが死亡した。このマウスでは、血清中の IL-17 濃度が有意に高値を示した。また、GOT 活性の上昇やアルブミン/グロブリン比の低下が観察された。本研究結果は、CD8 陽性 T 細胞から産生される IL-16 が接触皮膚炎の遅発性反応に対して抑制的に働くことを示しており、CD8 陽性 T 細胞中の制御性細胞による免疫抑制機構の存在が示唆される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to examine the role of IL-16 produced by CD8⁺ T cells in contact dermatitis. Rag-2-deficient mice reconstituted with IL-16-deficient CD8⁺ T cells exhibited severe late-phase inflammatory response and most of mice died around 7 days after hapten application. IL-17A concentration was significantly elevated in sera of IL-16-deficient CD8⁺ T cells-transferred Rag2-deficient mice. In addition, increase of GOT activity and decrease of albumin/globulin ratio were observed in sera of these mice. These results indicate that IL-16 produced by CD8⁺ T cells plays an inhibitory role in late-phase reaction of contact dermatitis, suggesting the existence of immunomodulatory mechanism by CD8⁺ regulatory T cells.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー、炎症、インターロイキン-16

1. 研究開始当初の背景

(1) IL-16 は、リンパ球の遊走物質として同定されたサイトカインであり、CD8 陽性 T 細胞で恒常的な発現が見られ、CD4 陽性 T 細胞、マスト細胞、好酸球、樹状細胞、上皮細胞や線維芽細胞ではサイトカインなどの刺激によって発現が誘導される (J Leukoc Biol. 2000; 67: 757.)。IL-16 の受容体は CD4 及び CD9 であり、Th1 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) などの CD4 陽性細胞あるいは CD9 陽

性のマスト細胞の遊走を促進する (Immunol Today. 1996; 17: 476.; Blood, 2006; 107: 135.)。また、IL-16 は T 細胞上の IL-2 受容体発現亢進作用があり、活性化 T 細胞あるいは Treg の生存を間接的に維持させる。さらに、単球やマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を惹起する (J Immunol. 1998; 160: 2115., Immunology. 2000; 100: 63.)。

(2) IL-16 遺伝子のプロモーター領域の

SNP と接触皮膚炎の間に関連が見られることや (J Allergy Clin Immunol. 2003; 112: 1191.)、喘息や遅延型過敏症の炎症局所では IL-16 の発現が亢進していることから (J Immunol. 1998; 160: 2998., Blood. 2000; 95: 2869.)、IL-16 が接触皮膚炎や喘息の病態形成に関与することが示唆されている。しかしながら、接触皮膚炎や喘息における IL-16 の役割について、IL-16 欠損マウスを使った堅固かつ詳細な機能解析は未だ行われていない。この点を明らかにするために IL-16 欠損マウスを用いた検討を行っている。

(3) 接触皮膚炎モデルでは、既報の IL-16 中和抗体を使用した結果 (Clin Exp Immunol. 2005; 140: 213.) とは逆に、FITC 誘導性皮膚炎が IL-16 欠損マウスにおいて有意に抑制される事実を見出した。したがって、FITC 誘導性接触皮膚炎において IL-16 は炎症反応の促進に関与すると考えられた。さらに、IL-16 産生細胞のうち、どの細胞が接触皮膚炎の誘導に関与するのかを明らかにするために、T 細胞を欠損する Rag-2 欠損マウスへ野生型マウスまたは IL-16 欠損マウスから単離精製した T 細胞の移入実験を行った。Rag-2 欠損マウスに IL-16 欠損マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を移入した接触皮膚炎モデルでは、初期反応は抑制されたが、遅発性の炎症反応の亢進が認められ、ハプテンを塗布した耳介の炎症は劇症化した。さらに実験後 1 週間を過ぎると、機序は不明であるが、ほとんどが死亡した。これらの現象は IL-16 を産生する CD8 陽性 T 細胞が、遅発性の炎症に対して抑制的に働く機能を持ち合わせているためと理解される。

(4) 喘息モデルにおいては、IL-16 中和抗体投与と recombinant IL-16 投与が気道炎症あるいは気道過敏症を軽減するという矛盾した結果がこれまでに報告されており (J Immunol. 1998; 160: 2998., Clin Exp Allergy. 2002; 32: 1651.)、IL-16 の喘息における役割についての評価は定まっていない。前項の接触皮膚炎と同様に、IL-16 欠損マウスを用いて実験的喘息モデルを作出し、喘息における IL-16 の機能評価を試みた。その結果、IL-16 欠損マウスの喘息モデルでは、気道炎症病態は野生型マウスと差がないことが見出された。しかしながら、IL-16 欠損マウスでは、IgE の産生と気管支肺泡洗浄液中の IL-5 量が亢進していた。これは、喘息モデルにおいて、IL-16 が気道炎症には影響をおよぼさず、IgE 抗体産生や IL-5 産生に対してのみ抑制的に機能することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、IL-16 と CD8 陽性 Treg に注目し、IL-16 欠損マウスに接触皮膚炎と喘息の

2 つのアレルギー疾患モデルを誘導した際にそれぞれ観察される IL-16 の抑制機能とそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

本研究の具体的な達成目標は、以下の 2 点である。

- (1) 接触皮膚炎モデルで Rag-2 欠損マウスへの IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞移植系で見出された炎症劇症化メカニズムの解明
- (2) 喘息モデルで見出された IL-16 による IgE 産生と IL-5 産生の抑制メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 野生型マウスと C57BL/6 背景の Rag-2 欠損マウスは、それぞれ日本エスエルシー株式会社と米国タコニック社から購入した。C57BL/6 背景の IL-16 欠損マウスは、Hardy Kornfeld 先生よりご供与頂いた。すべてのマウスは Specific Pathogen Free 室内で維持され、研究機関の「動物実験等の実施に関する基本指針」に準じて実験を行った。

(2) CD8 陽性 T 細胞の単離精製は iMag システムを用いて行った。野生型及び IL-16 欠損マウスから脾臓とリンパ節を摘出し、細胞懸濁液を調製した。溶血反応・洗浄の後、細胞懸濁液にビオチン標識抗マウス B220、ビオチン標識抗マウス CD4、ビオチン標識抗マウス CD11b、ビオチン標識抗マウス CD11c、ビオチン標識抗マウス DX5、ビオチン標識抗マウス C-Kit、ビオチン標識抗マウス FcεRIα、ビオチン標識抗マウス Ter119、ビオチン標識抗マウス γδTCR、ビオチン標識抗マウス Gr-1 を加え 4°C で 30 分間インキュベーションした。洗浄後にストレプトアビジンビーズを添加、インキュベーションし、磁気スタンドを用いてネガティブフラクションを回収した。単離精製した CD8 陽性 T 細胞の純度は、95% 以上であった。細胞数をカウントし、 5×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。Rag-2 欠損マウスに 200 μL の細胞懸濁液を静脈内投与することで (1×10^7 cells/mouse)、野生型または IL-16 欠損 CD8 陽性細胞の再構築を行った。

(3) FITC による接触皮膚炎は、背部を剃毛したマウスに 200 μL の 2.0% FITC を塗布することで感作を行い、感作 5 日後に 40 μL の 0.5% FITC を耳介皮膚の両面に塗布することによって誘導した。接触皮膚炎誘導 8 日目に、各マウスから採血を行い、血清を採取した。

(4) IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスの異常な遅発性の反応時に体内でどのような変化が起きているのかを調べるために、野生型 CD8 陽性 T 細胞を移

入した Rag-2 欠損マウスをコントロールとして血清中のサイトカイン濃度 (IFN- γ 、IL-6、TNF、IL-1 β 、IL-17A) を ELISA にて測定、比較した。

(5) IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスでの炎症劇症化による死亡の原因を調べるために、血清中のサイトカイン濃度に加えて、各種テストワコーを用いて血液生化学検査 (GOT、CPK、BUN、アルブミン/グロブリン比、カルシウム濃度) を行った。

4. 研究成果

(1) 血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスでは、野生型マウス、Rag-2 欠損マウスと比較して、血清中の IL-17A 濃度が有意に高い値を示した (図 1)。また有意差は見られなかったものの、IL-6 濃度が IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスの血清で増加傾向を示した。血清中の IFN- γ 及び TNF- α 濃度に差は認められなかった。血清中の IL-1 β 濃度は、いずれのマウスにおいても検出限界以下だった。これらの結果より、CD8 陽性 T 細胞から産生される IL-16 は IL-17A や IL-6 の産生に対して抑制的に作用し、接触皮膚炎における遅発性の炎症反応を制御していることが示唆された。

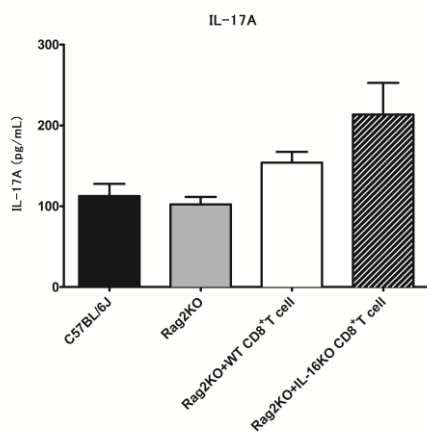


図 1. 接触皮膚炎誘導 8 日目における血清中 IL-17A 濃度

(2) 血液生化学検査の結果、野生型マウス、Rag-2 欠損マウス、野生型 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスと比較すると、GOT 活性の上昇、アルブミン濃度の低下、アルブミン/グロブリン比の減少が IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスで観察された (図 2)。CPK、BUN 及びカルシウム濃度は、いずれのマウスにおいても同程度であった。これらの結果より、IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスでは、心機能が腎機能には影響がなく、

肝機能が障害されていることが示唆された。

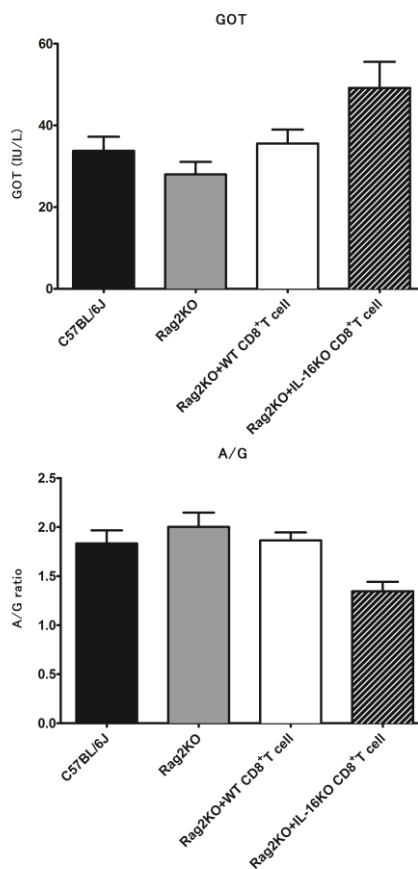


図 2. 接触皮膚炎誘導 8 日目の GOT 活性及びアルブミン/グロブリン比

(3) IL-16 欠損マウス自体、あるいは IL-16 欠損マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を移入した Rag-2 欠損マウスにおいて、前述のような接触皮膚炎モデルでの増悪化は認められなかった。Rag-2 欠損マウスに CD8 陽性 T 細胞を移植し、CD8 陽性 T 細胞が活性化される接触皮膚炎モデルの場合には、CD4 陽性 Treg の不在のためか CD8 陽性 T 細胞の炎症促進作用が野生型よりも顕在化しやすいと予想される。一方、ヒト滑膜細胞キメラマウス (免疫不全 NOD-scid マウスに慢性関節リウマチ患者から採取した滑膜細胞を皮下に移植して作成) を使った実験では、このマウスに同一ドナーからの滑液中 T 細胞を移植すると、滑膜細胞の炎症性サイトカイン発現が減少したことが報告されている。滑液中 T 細胞のうち、CD8 陽性 T 細胞のみが抑制活性をもち、この抑制活性は IL-16 によって担われていた (J Immunol, 1999; 162: 4293.)。申請者の観察している IL-16 欠損 CD8 陽性 T 細胞の抑制活性の欠如は、上述の実験結果を支持し、IL-16 を産生する CD8 陽性 Treg の存在を示唆している。

(4) CD4 陽性 Treg の発見の端緒となった実験では、CD4 陽性 CD25 陰性細胞を移植する

ことで全身性の炎症が引き起こされたヌードマウスに、CD4 陽性 CD25 陽性細胞を移植することで、その炎症が効率よく抑制された (J Immunol. 1995;155(3):115)。この実験系のアナロジーから、Rag-2 欠損マウスに CD8 陽性 T 細胞を移植して誘導できる接触皮膚炎モデルでは、CD8 陽性 T 細胞中の制御性細胞が産生する IL-16 が接触皮膚炎で制御されるべき後期の炎症に対して抑制的に働いていると考えられる。

(5) 過去に“抑制 T 細胞”が IgE 産生を抑制し、抑制 T 細胞には CD8 陽性細胞も存在していたとされることを考慮すると、本研究成果は大変興味深い。さらなる研究によって、IL-16 を産生する CD8 陽性 Treg によるアレルギー疾患の制御機構を明確に示すことが出来れば、新たな学術的側面があぶり出されることが期待され、今後の IL-16 を介した研究の進展に大きく寄与出来ると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 梶原直樹，大保木啓介，Hardy Kornfeld, 奥村康，斎藤博久，中江進，芝崎太、FITC による接触皮膚炎における IL-16 の役割、Conference for BioSignal and Medicine (CBSM)2012、平成 24 年 9 月 1-2 日、ホテル近鉄アクアヴィラ伊勢志摩
- (2) 梶原直樹，大保木啓介，森田英明，Hardy Kornfeld, 奥村康，斎藤博久，中江進，大森啓太郎，田中あかね，松田浩珍、FITC による接触皮膚炎における IL-16 の役割、Conference for BioSignal and Medicine (CBSM)2011、平成 23 年 6 月 24-26 日、軽井沢プリンスホテルウエスト

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA NAOKI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員
研究者番号：70453917

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし