

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292174

研究課題名(和文) インターロイキン - 19 の 型アレルギー炎症発症メカニズムにおける新規調節機能

研究課題名(英文) New function of interleukin-19 in type-IV contact hypersensitivity

研究代表者

東 泰孝 (Azuma, Yasu-Taka)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50298816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：IL-19はIL-10ファミリーに分類されるサイトカインである。型アレルギー炎症モデルである接触型過敏症を作製し、IL-19の機能的役割を検討した。IL-19遺伝子欠損マウス(KO)および野生型マウス(WT)の腹部に0.5% DNFB 25 μ Lを塗布した。5日後、耳介に0.1% DNFB 10 μ Lを塗布した。IL-19KOはWTと比べて耳介腫脹が増大した。また、HE染色によってもIL-19KOはWTよりも浮腫の増大ならびに炎症性細胞浸潤の顕著な増加など、炎症の明らかな悪化が認められた。以上の結果より、IL-19は抗原特異的なT細胞応答に対して重要な機能的役割を担う可能性が示唆される。

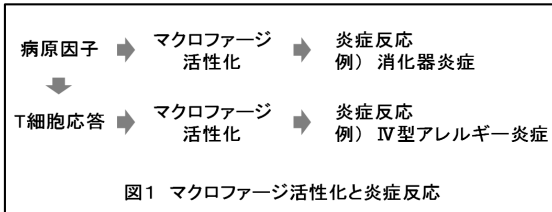
研究成果の概要(英文)：IL-19 is a member of the IL-10 family of interleukins and is an immuno-modulatory cytokine produced by the main macrophages. There is an increasing focus on the interaction and relationship of IL-19 with the function of T cells. Contact hypersensitivity (CHS) is T cell-mediated cutaneous inflammation. Therefore, we asked whether IL-19 causes CHS. We investigated the immunological role of IL-19 in CHS induced by 1-fluoro-2,4-dinitrofluorobenzene as a hapten. IL-19 was highly expressed in skin exposed to the hapten, and ear swelling was increased in IL-19 knockout mice. The exacerbation of the CHS response in IL-19 knockout mice correlated with increased levels of IL-17 and IL-6, but no alterations were noted in the production of IFN γ and IL-4 in the T cells of the lymph nodes. In addition to the effect on T cell response, IL-19 knockout mice increased production of inflammatory cytokines. These results show that IL-19 suppressed hapten-dependent skin inflammation in the CHS.

研究分野：薬理学

キーワード：皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは病原因子に直接応答して炎症反応を引き起こすだけでなく、生体内に侵入した異物に反応したT細胞によっても活性化を受けて炎症反応を惹起する(図1参照)。



アレルギー反応は無害な環境抗原に対する免疫系の過剰反応であり、免疫応答を生じる作用機序の違いにより4群に分類される。

、 、 型アレルギー反応における免疫応答の作用因子はIgEやIgGなどの抗体である。これに対して、 型アレルギー反応では、一回目の抗原との接触によりマクロファージや樹状細胞のToll様受容体が抗原を異物として認識し、その後の抗原特異的T細胞により炎症が惹起される(図2参照)。

	I型	II型	III型	IV型
免疫応答の作用因子	IgE	IgG	IgG	T細胞

図2 各アレルギーの作用因子

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、 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、研究代表者は申請者は2003年よりIL-19に関する研究を展開し、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が知られている。

2. 研究の目的

マクロファージは病原因子に直接応答して炎症反応を引き起こすだけでなく、生体内に侵入した異物に反応したT細胞によっても活性化を受けて炎症反応を惹起することから(図1参照)これまでの研究成果を踏まえ、本研究では、IL-19による 型アレルギー炎症調節機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、IL-19遺伝子欠損(IL-19KO)マウスを用いて、接触型過敏症と遅延型過敏症の2つの 型アレルギー炎症モデルを作製し、T細胞応答およびその後のマクロファージ活性化におけるIL-19の免疫学的役割を明らかにする。

本研究では、抗原の種類および応答する T 細胞の種類異なる、代表的な 2 つの型アレルギー-炎症モデルを用いて、野生型 (WT) マウスと IL-19K0 マウスの間で比較検討を行い、炎症病態の増悪また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。

3. 研究の方法

接触型過敏症モデル：金属や化学物質の経皮接触により、自己タンパク質が構造変化あるいはハプテン化されることにより抗原性を取得して起こるアレルギー-炎症である。本モデルは CD4⁺T 細胞依存性の炎症である (図 3 上参照)。

WT マウスと IL-19K0 マウスにハプテンであるオキサゾロンを剃毛した腹部に塗布し免疫する (感作)。7 日後、耳介にオキサゾロンを塗布し (再感作)、1 日 ~ 7 日後の腫脹を経時的に測定する。

接触型過敏症	<ul style="list-style-type: none"> ・低分子抗原 (ハプテン) ・表皮での炎症 ・CD4⁺T 細胞によるマクロファージ活性化
遅延型過敏症	<ul style="list-style-type: none"> ・高分子抗原 (タンパク質など) ・真皮での炎症 ・CD8⁺T 細胞による細胞障害 ・CD4⁺T 細胞によるマクロファージ活性化

図3 2つのIV型アレルギー-炎症モデルの特徴

遅延型過敏症モデル：抗原を皮下に直接投与することからタンパク質などの高分子物質を抗原とすることが可能であり、抗原に対して真皮での炎症を主徴とする。本モデルでは CD4⁺T 細胞に加えて CD8⁺細胞障害性 T 細胞も重要である (図 3 下参照)。

WT マウスと IL-19K0 マウスに、タンパク質抗原であるメチル化 BSA (mBSA) を CFA アジュバントとともに腹部皮下投与する (感作)。7 日後、mBSA を後肢足底の皮下に投与し (再感作) 1 日 ~ 3 日後の腫脹を経時的に測定する。

4. 研究成果

平成 25 年度

遅延型過敏症モデルを用いて解析を行い、WT マウスと IL-19K0 マウスの間で、組織炎症の程度に相違があるかどうかを比較検討した。遅延型過敏症モデルは、メチル化 BSA を 2 回免疫することでアレルギー-炎症を惹起させた。具体的には、WT マウスと IL-19K0 マウスに、タンパク質抗原であるメチル化 BSA を CFA アジュバントとともに腹部皮下投与した (感作)。感作 7 日後、メチル化 BSA を後肢足底の皮下に投与し (再感作) 1 日後および 2 日後の腫脹を経時的に測定した。その結果、1 日後および 2 日後のいずれの時点においても、IL-19K0 マウスの腫脹は WT マウスより有意に大きくなることが明らかとなった。続いて、感作 7 日後にリンパ節ならびに脾臓を摘出後、リンパ節細胞および脾細胞を調製し、による再刺激を行った。その結果、再刺激に応答したリンパ節細胞および脾細胞の増殖能は IL-19K0 マウスの方が WT マウスよりも有意に高かった。さらに、メチル化 BSA 再刺激に応答したリンパ節細胞および脾細胞の IFN- γ 産生能も、IL-19K0 マウスの方が WT マウスよりも有意に高かった。一方、メチル化 BSA 再刺激に応答したリンパ節細胞および脾細胞の IL-4 産生能は、IL-19K0 マウスと WT マウスは同程度であった。以上の結果より、IL-19 は遅延型過敏症モデルにおける活性化 T 細胞の機能において重要な役割を演じる可能性が示唆される。

平成 26 年度

接触型過敏症モデルを用いて解析を行い、組織炎症の程度に WT マウスと IL-19K0 マウスの間で相違があるかどうかを比較検討した。接触型過敏症モデルは、WT マウスと IL-19K0 マウスにハプテンであるオキサゾロンを剃毛した腹部に塗布し免疫 (感作フェーズ) し、1 週間後、耳介にオキサゾロンを塗布 (再感作フェーズ) することで皮膚炎を惹起させた。耳介塗布 24 時間後および 48 時間後の腫脹を

デジタルシックネススケジを用いて経時的に測定したところ、24時間後では IL-19K0 マウスの腫脹は WT マウスより有意に大きくなることが明らかとなった。しかしながら、48時間後の時点では、WT マウスと IL-19K0 マウスの間に著明な変化は見られなかった。そこで次に、染色を施し組織学的観察により評価したところ、24時間後の IL-19K0 マウスでは WT マウスと比べて炎症性細胞の浸潤程度の増加ならびに浮腫が酷くなることを見出した。しかしながら、48時間後の時点では、WT マウスと IL-19K0 マウスの組織炎症の間に著明な相違は見出せなかった。続いて、24時間後における耳介のミエロペルオキシダーゼアッセイを行い好中球ミエロペルオキシダーゼ活性を測定したところ、IL-19K0 マウスのミエロペルオキシダーゼ活性は WT マウスと比べて有意に高い値を示した。また、腫脹の程度とミエロペルオキシダーゼ活性の値には正の相関があることを認めた。

平成27年度

前年度得られた成果についてさらに解析を進めた。すなわち、オキサゾロン誘発性接触型過敏症モデルを IL-19K0 マウスを用いて各種検討した。前年度、皮膚炎に伴う耳介の腫脹が WT マウスに比べて IL-19K0 マウスで悪化することを見出したが、そのメカニズムの一つとしてリンパ節における IFN- γ 産生量の増加ならびに耳介における IFN- γ 発現量の増加が関与することを明らかにした。一方、IL-4 産生量ならびに発現量には明確な変動は認められなかった。したがって、IL-19 が欠損することにより、Th1 応答が増加することで皮膚炎腫脹が悪化したと考えられる。

平成28年度

前年度の得られた成果についてさらに解析を進めた。接触型皮膚炎の起こる機序として、1型ヘルパー細胞 (Th1) と2型ヘルパー

細胞 (Th2) とが関与する型に大きく2つ考えられる。これまでの3年間の成果において IL-19 は Th1 が関わる炎症応答の制御に関する可能性を明らかにしてきた。そこで、Th2 が関与する機序のモデルを用いての関与の可能性ならびにの免疫学的役割の全容解明へとつなげることを目的とした。そのため、FITC 誘発性接触型過敏症モデルを用いて、平成26年度ならびに平成27年度と同様の解析を実施し、WT マウスと IL-19K0 マウスを用いて比較検討を行った。その結果、再感作24時間後の耳介腫脹を測定したところ、WT マウスと比べて IL-19K0 マウスは同程度の腫脹を示し、両者間に有意な相違は認められなかった。さらに、再感作48時間後の評価においても明確な相違を見出すことはできなかった。したがって、Th2 介在性接触型皮膚炎モデルにおいては IL-19 の遺伝子欠損は著明な変化を与えないと結論づけた。以上の結果より、IL-19 は接触型皮膚炎において発症機序により異なる関与の可能性を示すことを発見した。具体的には Th1 が関与する機序においては重要な免疫学的役割を示すものと推察される。今後は、Th1 介在性応答において重要な役割を演じる IL-17 産生細胞 (Th17) における IL-19 の関与をさらに追及する予定である。

平成29年度

これまでの研究実績により、IL-19K0 マウスにおいて Th1 型接触型皮膚炎は悪化すること、しかしながら、Th2 型接触型皮膚炎には影響を与えないことを見出した。IL-19K0 マウスにおいて Th1 型接触型皮膚炎が悪化する機序について、さらに詳細な解析を実施した。リンパ節細胞を用いて、ハプテン特異的な T 細胞応答を調べたところ、IL-19K0 マウスでは WT マウスと比べて、IL-17 産生能ならびに IL-6 産生能の有意な増加が認められた。一方、IFN- γ 産生能および IL-4 産生能には顕著な

違いは見られなかった。この結果をサポートする結果として、耳介中における IL-17 発現量も、IL-19K0 マウスにおいて WT マウスよりも有意に増加していた。ここまでの成果で、IL-19 が Th17 細胞に影響を与える可能性が考えられた。そこで、続いて、脾臓細胞を用いて、T 細胞を CD3 および CD28 を用いて活性化増殖させたのち、IL-17 産生能を測定したところ、IL-19K0 マウスにおいて WT マウスよりも有意に増加することが明らかとなった。以上の成果より、IL-19K0 マウスにおいて Th1 型接触型皮膚炎が悪化する機序として、IL-19 は Th17 細胞の機能調節を介して Th1 介在性皮膚炎の病態に影響を与えることを見出した。本研究実績は、皮膚炎の病態解明ならびに今後の新規創薬作用点の探索に繋がることが期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Fujimoto Y, Fujita T, Kuramoto N, Kuwamura M, Izawa T, Nishiyama K, Yoshida N, Nakajima H, Takeuchi T, Azuma YT. The Role of Interleukin-19 in Contact Hypersensitivity. **Biol Pharma Bull** 2018 41(2)182-189. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 藤本泰之、東 泰孝、中嶋秀満、竹内正吉 (2017) アレルギー性皮膚炎における IL-19 を介した新規調節機構の解明. 第160回日本獣医学会学術集会、9月13日、鹿児島.
2. 藤本泰之、東 泰孝、中嶋秀満、竹内正吉 (2016) IL-19 によるアレルギー性炎症調節機構の解明. 第129回日本薬理学会近畿部会、6月24日、広島.
3. 藤本泰之、東 泰孝、中嶋秀満、竹内正吉 (2015) 接触型過敏症における IL-19 の機能的役割. 第158回日本獣医学会学術集会、9月8日、十和田.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等への記載なし

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