

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861563

研究課題名(和文) IL-31を介したアレルギー性鼻炎の制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of IL-31 in the pathogenesis of allergic rhinitis

研究代表者

野山 和廉 (Noyama, Yasuyuki)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：80646183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性鼻炎(スギ花粉症)患者の末梢血単核細胞(PBMC)の約66%は抗原刺激に対してIL-31を産生し、産生陽性者では花粉飛散期の症状およびQOLスコアが有意に高値を示した。PBMCからのIL-31産生はIL-4およびIL-33の添加で有意に増強された。一方、末梢血由来の自然リンパ球ではIL-2+IL-33の刺激でIL-31の産生はみられなかった。以上の結果より、ヒトPBMCにおけるIL-31産生はおもにCD4陽性細胞であり、病態の重症化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：66% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with Japanese cedar pollinosis produced IL-31 in response to Cry j 1, the major allergen molecule in Japanese cedar pollen. Symptom score and QOL score were significantly higher in patients with positive IL-31 production than those with negative production. IL-31 production by PBMCs were significantly increased following the exposure to IL-2 and IL-33. On the other hand, no induction of IL-31 production was seen in innate lymphoid cells in PBMCs. These results suggest that main IL-31 producing cell in PBMCs was CD4 positive T cells, and the cells are involved in the exacerbation of allergic rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科学、アレルギー学

キーワード：IL-31 スギ花粉症 リンパ球 IL-33 IL-2 自然リンパ球 CD127 IL-5

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は 40%近い有病率を示し、国民の QOL や労働生産性に重大な障害を与えている。従ってアレルギー性鼻炎における根治的治療ならびにバイオマーカーの確立は急務である。アレルギー性鼻炎は Th2 型の免疫疾患であり、アレルゲンに特異的な Th2 細胞が感作・発症・重症化に中心的に働く。従って Th2 細胞の制御は、アレルギー性鼻炎の根治や予防のターゲットとなる。

IL-31 は 2004 年に同定された新しいサイトカインである。IL-31 は主に活性化ヘルパー T 細胞、特に Th2 細胞から産生されることから、アレルギー疾患への関与が注目されている。これまでに、アトピー性皮膚炎患者や気管支喘息患者では健常人に比べ血清 IL-31 濃度が高値を示すこと、特にアトピー性皮膚炎では血清 IL-31 濃度が痒みの重症度と相関することなどが報告されるようになった (Neis ら 2006、Lei ら 2007)。しかしながら、アレルギー性鼻炎における IL-31 の役割については未明な点が多かった。

2. 研究の目的

新規 Th2 型サイトカインである IL-31 に注目し、アレルギー性鼻炎の病態における IL-31 の役割についてマウスモデルおよびヒト細胞を対象として解析する。その結果を基に、IL-31 をターゲットとしたアレルギー性鼻炎に対する新規診断・治療法の探索を進める。

3. 研究の方法

ヒト T 細胞の IL-31 産生機構の解明

スギ花粉症患者から末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。PBMC をスギアレルゲン Cry j 1 にて刺激する際に、種々の濃度のデキサメタゾンあるいは LL-37 を添加し、IL-31 の産生変動を観察した。また IL-4、IL-33、IFN- γ 、IL-2 などのサイトカインを添加し、

IL-31 産生の変動について検討した。HLA 拘束性についても、抗 HLA-DR 抗体を用いて検討した。

アレルギー性鼻炎患者および健常人での血清および鼻汁中 IL-31 の測定

スギ花粉飛散前 (1 月)、スギ花粉飛散ピーク時 (3 月上~中旬) およびスギ花粉飛散後 (5 月) の 3 期に血清および鼻汁を採取する。スギ花粉に感作されていない健常人を対照とした。血清および鼻汁採取時に、症状および QOL を JRQLQ 調査票を用いてモニターした。血清および鼻汁中の IL-31 が症状および QOL と相関をするのか検討した。さらに花粉飛散前の IL-31 量がスギ花粉飛散ピーク時の症状および QOL に関連するか検討し、IL-31 がアレルギー性鼻炎のバイオマーカーとなりうるか解析した。

アレルギー性鼻炎マウスモデルにおける IL-31 の役割の検討

BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) をアラムと共に全身感作し、その後に OVA 点鼻チャレンジにて鼻炎を惹起するモデルを作製した。抗原にて点鼻チャレンジを行う際に、IL-31 を点鼻した。点鼻チャレンジに伴うくしゃみや鼻かきなどの症状、血清抗原特異的 IgE/IgG1/IgG2a 抗体価、鼻粘膜浸潤好酸球数、顎下部リンパ節細胞の抗原刺激によるサイトカイン産生 (IL-4/IL-5/IL-10/IL-13/IL-17A/IFN- γ 等) などのパラメータが、IL-31 の点鼻により変化を生じるのか検討し、IL-31 が In vivo で向炎症性 (Pro-inflammatory) に働くか、抑制性 (Anti-inflammatory) に働くか解析した。

自然リンパ球の IL-31 産生

PBMC から磁気ビーズ法をもちいて自然リンパ球 (Lineage 陰性、CD127 陽性細胞) を単離した。自然リンパ球を IL-2、IL-33、IL-25

を単独あるいは複合して添加し、7日培養後、培養上清中の2型サイトカイン(IL-5、IL-13、IL-31)をELISAにて測定した。またPBMCからCD4陽性細胞を除去した細胞群においても同様の検討を行った。

4. 研究成果

ヒトT細胞のIL-31産生機構の解明

スギ花粉症患者由来PBMCはスギ花粉抗原に対してIL-31を産生することを示した。さらにIL-31産生量と症状およびQOLが正の相関を示すことから、アレルギー性鼻炎においてIL-31は重症化に關与する重要なサイトカインであることが示された。さらに他施設との共同研究で、鼻粘膜ではIL-31は浸潤炎症細胞に発現すること、IL-31はヒト鼻粘膜上皮細胞株からのムチン(MUC5AC)発現を亢進することが明らかになった。

IL-37の添加はCry j 1に特異的なIL-31産生を増強しなかった。一方、デキサメタゾンの添加は濃度依存性にIL-31の産生を抑制し、1 μ Mではほぼ完全に抑制した。さらにデキサメタゾンの添加によるIL-31産生の抑制は、ステロイド受容体拮抗薬であるRU486の添加で有意に解除された。以上の結果より、IL-31はステロイド感受性であることが示唆された。またCryj1特異的なIL-31産生は抗HLR-DR抗体の添加で有意に抑制されることが示され、IL-31産生はクラスII高速性であることが示唆された。

IL-4およびIL-33の添加によって、有意なIL-31の産生増強がみられた。IL-2の添加では有意な変動はみられなかった。逆にIFN- γ の添加によって、IL-31産生の有意な抑制がみられた。Cry j 1刺激に対して、66名中22名(33.3%)は有意(SI>2)なIL-31産生を示さず、Non-responderと考えられた。Non-responderにおいても、IL-2、IL-4およびIL-33の添加により有意なIL-31産生が誘導された。以上の結果より、IL-31の産生は

遺伝的に規定されたものではなく、IL-4やIL-33の存在など微少環境によって左右される可能性が示唆された。

アレルギー性鼻炎患者および健常人での血清および鼻汁中IL-31の測定

スギ花粉飛散期に、スギ花粉症患者および非スギ花粉症患者より血清を採取し、血清中のIL-31をELISAにて測定した。スギ花粉症患者では非スギ花粉症患者に比べ、血清中のIL-31濃度が有意に高値を示した。一方、PBMCでみられたQOLスコアとの有意な正の相関は、血清では認めなかった。以上の結果からは、血清IL-31濃度はスギ花粉症の重症度を反映するバイオマーカーとはなりにくい可能性が示唆された。

アレルギー性鼻炎マウスモデルにおけるIL-31の役割の検討

OVA感作後のチャレンジ相でIL-31を点鼻し、症状の変化を観察した。OVA点鼻誘発にてBALB/cマウスはくしゃみおよび鼻かきを発症した。リコンビナントIL-31の点鼻は症状(くしゃみおよび鼻かき)の有意な変動を示さなかった。今後、投与したIL-31の量などについて検討が必要と思われる。

自然リンパ球のIL-31産生

既報(Bartemes et al. JACI 2014)の通り、IL-2+IL-33の刺激に対して自然リンパ球は強力にIL-5およびIL-13を産生した。一方、本刺激によるIL-31は認めなかった。またPBMCからCD4陽性細胞を磁気ビーズ法にて除去し、同様の刺激によるIL-31産生を検討した。自然リンパ球での結果と同様に、CD4陽性細胞除去PBMCはIL-2+IL-33の刺激に対してIL-5およびIL-13を産生したが、IL-31の産生は少なくともタンパクレベル(ELISA)では確認できなかった。以上の結果より、ヒト末梢血リンパ球におけるIL-31産生はおも

に CD4 陽性細胞であり、自然リンパ球の関与は否定的と考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Noyama Y, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Haruna T, Makihara S, Kanai K, Koyama T, Taniguchi M, Ishitoya J, Kanda A, Kobayashi Y, Asako M, Tomoda K, Nishizaki K. IL-22/IL-22R1 signaling regulates the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps via alteration of MUC1 expression. Allergology International 有 2016 In press

Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Haruna T, Higaki T, Noyama Y, Makihara S, Kanai K, Nishizaki K. Staphylococcal protein A-formulated immune complexes suppress enterotoxin-induced cellular responses in nasal polyps. Journal of Allergy and Clinical Immunology 有 2015 vol.136 pp.343-350

DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.058

DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.058

DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.058

[学会発表] (計 3 件)

野山 和廉、岡野 光博、假谷 伸、檜垣 貴哉、春名 威範、西崎 和則、慢性副鼻腔炎におけるムチンの関与、第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会、広島国際会議場、2015 年 10 月 1 日 ~ 3 日

野山 和廉、岡野 光博、小野田 友男、檜垣 貴哉、假谷 伸、春名 威範、西崎 和則、線維素性唾液管炎の 2 症例、第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会、オークラアクトシティホテル浜松、2015 年 6 月 25 日 ~ 26 日

野山 和廉、岡野 光博、檜垣 貴哉、春名 威範、小山 貴久、西崎 和則、慢性

副鼻腔炎における IL-22 の病態制御メカニズムの検討、第 64 回日本アレルギー学会学術大会、グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール、2015 年 5 月 26 日 ~ 28 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野山 和廉 (NOYAMA Yasuyuki)

岡山大学病院・耳鼻咽喉科・医員

研究者番号 : 80646183