

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02670

研究課題名(和文) 通常型樹状細胞のIL-22RA2による上皮組織恒常性維持に対する制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of IL-22RA2 produced by conventional dendritic cells in the regulatory mechanism for the maintenance of epithelial homeostasis

研究代表者

佐藤 克明 (Sato, Katsuaki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：40301147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL-22RA2欠損マウスはWTマウスと比較して尋常性乾癬やアレルギー喘息の病勢の亢進とともにこれら疾患での炎症/免疫応答の亢進を示した。一方、IL-22RA2はIL-22による角化細胞の増殖および細胞周期促進に対する抑制効果を示し、これら疾患に対する防御効果を示した。以上の結果から、尋常性乾癬やアレルギー喘息において、IL-22RA2の病因的IL-22シグナルに対する調節機構を明らかにした。従って、通常型樹状細胞から産生されるIL-22RA2は皮膚角化細胞のIL-22シグナル制御機構に基づいた皮組織恒常性維持に重要な役割を担うことが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに不明であった「上皮組織に局在する通常型樹状細胞のIL-22RA2産生」に着目し、上皮組織の恒常性の維持および破綻における「通常型樹状細胞」の意義とその「IL-22RA2」を介する制御機構を初めて証明した。さらに、これまでに未知であった『上皮-免疫系クロストーク』に関する「通常型樹状細胞のIL-22シグナル調節機能」の重要性に基づいた上皮組織恒常性維持における新たな概念の提唱により、当該領域の発展に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Il22ra2<sup>-/-</sup> mice exhibited more severe progressions of the pathogenesis of psoriatic dermatitis and allergic asthma than WT mice. Furthermore, Il22ra2<sup>-/-</sup> mice showed the enhanced inflammation and immune responses as compared with WT mice. On the other hand, IL-22RA2 not only inhibited the IL-22-mediated proliferation and aberrant differentiation of keratinocytes but also protected against the development of psoriatic dermatitis and allergic asthma. Thus, our findings suggest that IL-22RA2 produced by conventional dendritic cells play a critical role in the maintenance of epithelial homeostasis mediated through the regulation of IL-22 signaling in keratinocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 サイトカイン 上皮細胞 炎症 免疫疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞 (DCs) は通常型 DCs (cDCs) と形質細胞様 DCs (pDCs) に大別される複数の亜集団から構成される。DCs は炎症状態では自然免疫と適応免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞として免疫系を賦活し、定常状態では免疫寛容を誘導する制御細胞として免疫学的恒常性の維持に重要であると考えられている。

IL-22 は IL-10 ファミリーに属し、その受容体は IL-10 受容体 $\beta$  (IL-10RB) と IL-22 受容体 $\alpha 1$  (IL-22RA1) から構成されるヘテロ二量体膜結合型受容体である。IL-22 は CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセット (T<sub>H</sub>17 細胞・T<sub>H</sub>22 細胞)、 $\gamma\delta$ T 細胞、自然リンパ球 (ILCs) 等の免疫細胞により産生される。また、IL-22 は免疫細胞には直接作用せず、IL-10RB/IL-22RA1 の発現が限局する上皮細胞 (呼吸器、消化管、皮膚、肝臓) に作用し、その分化能・増殖能・運動能の調節により組織恒常性維持に寄与するとともに抗菌ペプチド分泌により細胞外病原体 (細菌・真菌等) に対する感染防御に関与すると考えられている。一方、IL-22 シグナルの増強は上皮細胞に対する IL-22RA1 の直接的な活性化効果に加え、産生誘導された抗菌ペプチドの活性化効果に基づいた異常分化増殖により尋常性乾癬などの慢性炎症性免疫疾患の増悪に関与することが示唆されている。

IL-22R には膜結合型受容体の IL-22RA1 に加え、分泌型受容体の“IL-22 受容体 $\alpha 2$  (IL-22RA2)”が存在し、IL-22RA2 は IL-22RA1 よりも高い IL-22 結合高親和性 (20~1,000 倍) を示すことから、生体内での IL-22 シグナルの調節因子として作用すると考えられている。IL-22RA2 の遺伝子発現は呼吸器、消化管、皮膚、リンパ組織において広く認められるが、申請者らは皮膚組織や粘膜上皮組織 (呼吸器・腸管など) に多く認められる cDCs 亜集団 “CD103<sup>+</sup>cDCs” が最も高い発現を示すことを見出した。しかしながら、上皮組織恒常性の維持および破綻に基づく上皮組織炎症慢性化病態の成立における CD103<sup>+</sup>cDCs の関与およびその IL-22RA2 を介した IL-22 シグナル調節機構についてはいまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では上皮組織恒常性の維持および破綻に基づく上皮組織炎症慢性化病態の形成における制御機構の解明を目的として、IL-22RA2 欠損マウスを用いて上皮組織 (皮膚および呼吸器粘膜) に慢性炎症を呈する自己免疫疾患 (尋常性乾癬) やアレルギー疾患 (喘息) における IL-22RA2 の病因的 IL-22 シグナルに対する調節機構を明らかにする。さらに、IL-22RA2 を標的とした上皮組織炎症慢性化病態の治療法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

研究方法は以下の通りである。

### 1. 尋常性乾癬の解析

自己免疫性皮膚炎の病態形成における CD103<sup>+</sup>cDCs の IL-22RA2 を介した表皮角化細胞機能に対する制御機構およびその制御に基づく免疫応答調節について、WT マウスを対照として恒常的 cDCs 特異的消失マウス、一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウス、IL-22RA2 欠損マウスにおける尋常性乾癬の病勢・病態・炎症/免疫応答を比較検討した。尋常性乾癬はマウスの耳介にイミキモド (ベセルナクリーム 5%; IMQ) を 6 日間塗布し発症させた。

#### 1-1) IL-22RA2 遺伝子発現解析

IMQ 塗布前後に耳介と所属リンパ節を採取し、定量的 PCR 法にて IL-22 と IL-22RA2 の遺伝子発現を経日的に測定した。

#### 1-2) 病勢評価

IMQ 塗布後に耳介の臨床スコア (紅斑・腫脹・脱落乾燥表皮) を経日的に測定した。

#### 1-3) 病理組織解析

IMQ 塗布 6 日目に耳介を採取した。病理組織解析として、H&E 染色を行い、表皮層肥厚や白血球浸潤で示される皮膚炎症を評価した。また、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の免疫染色を行い、皮膚病変部での角化細胞増殖を評価した。さらに、免疫蛍光染色を行い、好中球・T 細胞・ $\gamma\delta$ T 細胞・cDCs・pDCs の皮膚浸潤を解析した。

#### 1-4) サイトカイン/抗菌ペプチド/角化細胞最終分化マーカー発現解析

IMQ 塗布 6 日目に耳介と所属リンパ節を採取し、サイトカイン (I 型 IFN・IL-1・IL-17・IL-19・IL-20・IL-22・IL-22RA2・IL-23・IL-24・IL-36・TSLP・TNF- $\alpha$ )・抗菌ペプチド (S100A8/A9・Defensin・RegIII $\gamma$ )・角化細胞最終分化マーカー (Keratin-10[KRT10]・Filaggrin[FLG]・Loricrin[LOR]) の遺伝子発現について定量的 PCR 法により解析した。

#### 1-5) 免疫細胞構成解析

IMQ 塗布 6 日目に脾臓・所属リンパ節を採取後、免疫細胞構成とともに CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセット (T<sub>H</sub>1 細胞/T<sub>H</sub>17 細胞/T<sub>H</sub>22 細胞)、IFN- $\gamma$ /IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞、3 型 ILCs の存在比率・細胞数についてフローサイトメトリー法により解析した。

### 2. アレルギー喘息の解析

アレルギー喘息の病態形成における CD103<sup>+</sup>cDCs の IL-22RA2 を介した呼吸器上皮細胞機能に対する制御機構およびその制御に基づく免疫応答調節について、WT マウスを対照として恒常的 cDCs 特異的消失マウス、一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウス、IL-22RA2 欠損マウスにおけるアレルギー喘息の病勢・病態・炎症/免疫応答を比較検討した。アレルギー喘息モデルはマウスに OVA と Alum の混合物を 0 日目と 7 日目に感作免疫、初回免疫後 14 日目/15 日目/16 日目に OVA を経鼻的に感作させ、17 日目に胸部所属リンパ節、血清、気管支肺胞洗浄液、肺を採取した。

#### 2-1) IL-22RA2 遺伝子発現解析

肺組織と所属リンパ節での IL-22 と IL-22RA2 の遺伝子発現を定量的 PCR 法により解析した。

#### 2-2) 気管支肺胞洗浄液解析

気管支肺胞洗浄液中の浸潤白血球（好酸球、好中球、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、cDCs、pDCs）の存在比率・細胞数についてフローサイトメトリー法により解析した。

#### 2-3) 病理組織（気道リモデリング）解析

肺組織の病理組織解析として、H&E 染色による気道炎症や白血球浸潤、PAS 染色による上皮組織肥厚ならびに分泌細胞（杯細胞）の過形成および粘液貯留を評価した。

#### 2-4) 気道抵抗性評価

メタコリン吸入に対する肺・気道反応性について、侵襲的メカニカルベンチレーター（flexiVent）を用いて解析した。

#### 2-5) サイトカイン/ケモカイン発現解析

肺組織のサイトカイン（IL-4・IL-5・IL-13・IL-22・IL-22RA2・IL-25・IL-33）・ケモカイン（CCL2・CCL5・CCL7・CCL11・CCL13・CCL17・CCL22・CCL24・CCL26）の発現について定量的 PCR 法により解析した。

#### 2-6) OVA 特異的抗体とサイトカインの産生解析

血清と気管支肺胞洗浄液における OVA 特異的抗体（IgG、IgE）とサイトカイン（IL-4・IL-5・IL-13・IL-33）の産生を ELISA 法により解析した。

#### 2-7) OVA 特異的 T 細胞応答解析

OVA を抗原とした WT cDCs との共培養による所属リンパ節 CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖能を計測すると同時にそのサイトカイン（IL-4・IL-5・IL-13・IL-33）産生量を ELISA 法により解析した。また、フローサイトメトリー法にて T<sub>H</sub>2 細胞の生成を解析した。

### 3. 可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の生物活性評価

IL-22 による角化細胞の増殖および細胞周期促進に対する作製済みの可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の抑制効果について、ヒト IgFc キメラ分子を対照とするフローサイトメトリー法にて評価した。また、IL-22 による角化細胞の抗菌ペプチドの遺伝子発現亢進および角化細胞最終分化マーカーの遺伝子発現抑制に対する可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の阻害効果について定量的 PCR 法により解析した。

### 4. 尋常性乾癬とアレルギー喘息に対する IL-22RA2 の防御効果の解明

尋常性乾癬とアレルギー喘息に対する IL-22RA2 の防御効果を明らかにした。具体的には、尋常性乾癬やアレルギー喘息を発症した WT マウスに対照群にはヒト IgFc キメラ分子、実験群には可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子を投与し、上述の 1) 2) の検討項目に従い、病勢防御効果とともに病理組織・炎症/免疫応答を比較検討した。

## 4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

### 1. 尋常性乾癬の解析

1-1) IMQ 塗布前では IL-22RA2 の発現は耳介皮膚と所属リンパ節において認められた。一方、IMQ 塗布後では IL-22RA2 の発現は塗布前と比較して耳介皮膚と所属リンパ節で減少した。1-2) WT マウスでは IMQ 塗布後、臨床スコアが増加した。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスでは臨床スコアの減弱が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは臨床スコアの亢進が認められた。1-3) IMQ 塗布 WT マウスでは、皮膚炎症、皮膚病変部角化細胞増殖、好中球/T 細胞/γδT 細胞/cDCs/pDCs の皮膚浸潤が認められた。一方、IMQ 塗布 IL-22RA2 欠損マウスでは IMQ 塗布 WT マウスと比較して、これらの皮膚炎症病変の増悪が認められた。1-4) IMQ 塗布 WT マウスの所属リンパ節ではサイトカイン/抗菌ペプチド/角化細胞最終分化マーカーの遺伝子発現が認められ、IMQ 塗布 IL-22RA2 欠損マウスではこれらの発現の更なる亢進が認められた。1-5) 未処置 WT マウスと比較して、IMQ 塗布後 WT マウスの脾臓・所属リンパ節では CD4<sup>+</sup>T 細胞サブセット、IFN-γ/IL-17 産生γδT 細胞、3 型 ILCs の増加が認められた。一方、IMQ 塗布 IL-22RA2 欠損マウスでは IMQ 塗布 WT マウスと比較して、これらの更なる増加が認められた。

### 2. アレルギー喘息の解析

2-1) 肺組織と所属リンパ節において、IL-22 と IL-22RA2 の発現が認められた。2-2) WT マウス

ではアレルギー喘息発症後、気管支肺胞洗浄液中の浸潤白血球数の増加が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスでは気管支肺胞洗浄液中の浸潤白血球数の増加の減少が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは増加が認められた。2-3) WT マウスではアレルギー喘息発症後、肺における気道炎症、白血球浸潤、上皮組織肥厚、分泌細胞(杯細胞)の過形成および粘液貯留の増加が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスではこれらアレルギー病態の緩和が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは増悪が認められた。2-4) WT マウスではアレルギー喘息発症後、肺・気道抵抗性が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスでは肺・気道抵抗性の低下が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは増加が認められた。2-5) WT マウスではアレルギー喘息発症後、肺組織のサイトカイン・ケモカインの発現が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスではサイトカイン・ケモカインの発現低下が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは発現増加が認められた。2-6) WT マウスではアレルギー喘息発症後、血清と気管支肺胞洗浄液における OVA 特異的抗体とサイトカインの産生が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスでは OVA 特異的抗体とサイトカインの産生低下が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは産生増加が認められた。2-7) WT マウスではアレルギー喘息発症後、OVA 特異的 T 細胞応答が認められた。一方、WT マウスと比較して、恒常的 cDCs 特異的消失マウスと一過性 CD103<sup>+</sup>cDCs 特異的消失マウスでは OVA 特異的 T 細胞応答の減弱が認められたが、IL-22RA2 欠損マウスでは増強が認められた。

### 3. 可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の生物活性評価

IL-22 による角化細胞の増殖および細胞周期促進に対する可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の抑制効果が認められた。また、IL-22 による角化細胞の抗菌ペプチドの遺伝子発現亢進および角化細胞最終分化マーカーの遺伝子発現抑制に対する可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の阻害効果が認められた。

### 4. 尋常性乾癬とアレルギー喘息に対する IL-22RA2 の防御効果の解明

尋常性乾癬やアレルギー喘息を発症した WT マウスへの可溶性 IL-22RA2-ヒト IgFc キメラ分子の投与は病勢防御効果とともに炎症/免疫応答制御効果を示した。

従って、尋常性乾癬とアレルギー喘息の病態形成における CD103<sup>+</sup>cDCs の IL-22RA2 を介した呼吸器上皮細胞機能に対する制御機構およびその制御に基づく免疫応答調節が解明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukaya T, Fukui T, Uto T, Takagi H, Nasu J, Miyanaga N, Arimura K, Nakamura T, Koseki H, Chojiookhuu N, Hishikawa Y, Sato K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pivotal role of IL-22 binding protein in the epithelial autoregulation of interleukin-22 signaling in the control of skin inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷知宏、福井丈仁、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Pivotal role of IL-22BP in the epithelial autoregulation of IL-22 signaling in the control of skin inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野ホームページ <a href="http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/meneki/">http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/meneki/</a>
--

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------