

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K08757  
研究課題名(和文) 接触型過敏症の病態形成におけるIL-21の機能解析

研究課題名(英文) Role of IL-21 in contact dermatitis

研究代表者

須藤 一 (Suto, Hajime)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：90286740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IL-21は、さまざまなヘルパーT細胞サブセットの分化・活性化に関わるが、接触皮膚炎における役割については不明である。本研究の成果として、IL-21R欠損マウスでは、野生型マウスに比べて接触皮膚炎が増悪した。つまり、IL-21は接触皮膚炎を抑制する働きがあることが明らかになった。そこで、IL-21R欠損IL-10レポーターマウスに接触皮膚炎を誘導したところ、野生型レポーターマウスと比較して、皮膚樹状細胞でIL-10の産生の減弱が認められた。したがって、IL-21は皮膚樹状細胞からのIL-10産生を増強することで接触皮膚炎の抑制に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-21には接触型過敏症を抑制する新規機能があることが明らかになった。本研究を遂行することにより、IL-21による接触型過敏症を抑制する分子機構が明確になれば、接触型過敏症の発症機序の全容の理解に貢献できるだけでなく、IL-21を標的とした接触型過敏症の予防・治療への創薬の開発基盤となる基礎的知見を提供できると期待される。また、接触型過敏症の発症機序における、このIL-21の意外な作用の解析は、昨今のIL-21の生理作用の注目度から鑑みても、当該皮膚関係の分野のみならず、基礎免疫の分野でも学術的に非常に重要な位置を占めることが期待される。

研究成果の概要(英文)：IL-21 is known to be involved in differentiation and activation of various types of helper T cell subsets such as Th1, Th2, Th17 and Tfh cells. Nevertheless, the role of IL-21 in development of Th cell-mediated contact dermatitis remains unclear. Therefore, we elucidated it using IL-21 receptor (IL-21R)-deficient mice, and found that the mutant mice showed aggravated development of contact dermatitis compared with wild-type mice, suggesting that IL-21 has a regulatory role in development of contact dermatitis. Using IL-21R-deficient IL-10 reporter mice, we found that IL-10 expression on dermal dendritic cells was significantly decreased in IL-21R-deficient IL-10 reporter mice compared with wild-type IL-10 reporter mice during contact dermatitis. These results imply that IL-21 may induce IL-10 production by dermal DC, followed by suppression of contact dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アレルギー 接触皮膚炎 サイトカイン マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

接触型過敏症は T 細胞依存的な IV 型アレルギー性皮膚炎であり、炎症局所に高レベルの IFN- $\gamma$  産生や過剰な Th1 細胞の集積が認められたため、1 型免疫応答と考えられていた。一方で、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、接触型過敏症は、従来の 1 型免疫応答を中心とした誘導メカニズムだけでなく、2 型と 3 型サイトカインも関わる複雑な機序によってもたらされると考えられている (Allergol Int, 57, 121, 2008)。その一例として、ケラチノサイトから産生される IL-25 は 2 型サイトカインを誘導すると考えられているため、接触型過敏症においても 2 型免疫応答依存的な炎症誘導に関わると期待された。しかしながら、我々は、IL-25 は皮膚樹状細胞から IL-1 $\beta$  を誘導し、その IL-1 $\beta$  が Th17 細胞を活性化することによって、2 型ではなく 3 型免疫応答依存的に接触型過敏症の誘導に関わることを明らかにした (Suto H et al., J Allergy Clin Immunol, 2018)。したがって、接触型過敏症は 1 型免疫応答といった従来の概念ではすべては説明できず、1 型、2 型、3 型免疫応答のクロストークによってもたらされる複雑な機構によって誘導されるものと推測される。

主に T 細胞や NKT 細胞から産生される IL-2 ファミリーサイトカインである IL-21 は、IL-21 受容体 (IL-21R $\alpha$  と IL-2R $\gamma$  からなるヘテロダイマー) を介して、免疫細胞 (T、B、NK、NKT 細胞、樹状細胞、マクロファージ等) や非免疫系細胞 (ケラチノサイトや線維芽細胞等) の活性化を誘導し、宿主の感染防御に重要な役割を演じている。IL-21 は、当初、Th1 細胞の分化促進、Th1 細胞や NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生の誘導作用を持ち、1 型免疫応答の促進に関わることが示されたほか、寄生虫感染や喘息といった 2 型免疫応答に関わることも報告されていた (Blood, 109, 2023, 2007)。また、IL-21 は濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh 細胞) の分化に必須で、IL-4 とともに抗体産生やクラススイッチに重要であることが明らかにされている (Immunity, 29, 117, 2008; Immunity, 29, 195, 2008)。さらに、IL-21 は Th17 細胞の分化や活性化にも関わることが知られている (Nature, 488, 480, 2007; Nature, 488, 484, 2007)。このような IL-21 の多様な作用は、感染防御だけでなく、アレルギーや自己免疫疾患等の慢性炎症疾患の発症に深く関わることが示唆され、その機能解析の重要性が近年、再認識されるに至っている。1 型、2 型、3 型免疫応答のすべてに関わりを持つ IL-21 は、1 型、2 型、3 型免疫応答のクロストークの結果として誘導される接触性皮膚炎の病態形成にも影響を及ぼしている可能性が強く示唆される。接触型過敏症における IL-21 の役割を調査した報告を検索したが、IL-21 中和抗体や IL-21 欠損マウスを用いての接触型過敏症における IL-21 の機能解析を行った報告は現時点でもなされていない。したがって、接触型過敏症の発症機構における IL-21 の関与および役割については明確になっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、IL-21 受容体 (IL-21R) 欠損マウスを利用して、接触型過敏症の発症機構における IL-21 の役割を個体・細胞・分子レベルで明確にすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 接触型過敏症の発症における IL-21 の機能解析

IL-21R 欠損マウスに DNFB、FITC および oxazolone の 3 種の化学物質を用いて接触型過敏症を誘導した。野生型マウスと比較して、①耳介皮膚の厚さの経時的変化の測定、②皮膚病変の病理解析 (H&E 染色)、③血中イムノグロブリン量解析 (ELISA による IgG subsets 測定)、④皮膚病変での遺伝子発現変化解析 (qPCR)、⑤皮膚樹状細胞の遊走・成熟評価、⑥ハプテン特異的なリンパ球応答 (in vitro での増殖応答や FACS による T 細胞サブセットプロファイル解析及び⑦ T 細胞移入による in vivo 解析) を評価した。

### (2) 炎症局所における IL-21 産生細胞と IL-21R 発現細胞の同定

接触型過敏症を誘導した野生型マウスの皮膚組織から細胞を調製した。IL-21 産生細胞を抗 IL-21 抗体を用いた細胞内サイトカイン染色により、また、IL-21R 発現細胞を抗 IL-21R 抗体を用いて、フローサイトメトリーによって解析を行なった。

### (3) IL-21 による炎症抑制機構の解析

接触型過敏症の炎症局所において、IL-21 は抗炎症性サイトカイン (IL-10) を誘導して、炎症の抑制に関わると仮定した。IL-10 レポーターマウス (IL-10-venus マウス) に接触型過敏症を誘導し、皮膚細胞中に IL-10 を産生する細胞の有無をフローサイトメトリーによって評価した。IL-21R 欠損 IL-10-venus マウスの作成を行ない、IL-21R 欠損 IL-10-venus マウスに接触型過敏症を誘導し、フローサイトメトリー解析により、皮膚細胞中の IL-10 産生細胞の割合を IL-10-venus マウスと比較した。

## 4. 研究成果

## (1) 接触型過敏症の発症における IL-21 の機能解析

### ① 耳介皮膚の厚さの経時的変化の測定

DNFB、FITC および oxazolone による接触型過敏症を野生型マウスと IL-21R 欠損マウスに誘導した結果、耳介皮膚の厚さは、野生型マウスと比べて IL-21R 欠損マウスでは有意に厚くなり、皮膚炎が増悪することが観察された。この結果から、IL-21 は、接触型過敏症を抑制する働きがあることが明らかになった。

### ② 皮膚病変の病理解析 (H&E 染色)

接触型過敏症を誘導した 24 時間後の野生型マウスと IL-21R 欠損マウスの皮膚の病理解析を行なった。耳介皮膚の厚さと相関して、接触型過敏症を誘導した IL-21R 欠損マウスの皮膚では、野生型マウスと比べて、表皮が厚くなっており、表皮と真皮に白血球の浸潤が多くみられた。

### ③ 血中イムノグロブリン量解析

接触型過敏症を誘導した野生型マウスと IL-21R 欠損マウスから血清を回収し、血清中のハプテン特異的な抗体価を ELISA 法にて定量した。野生型マウスと比べて、IL-21R 欠損マウスでは、ハプテン特異的な IgM、IgG1、IgG2c のレベルが有意に低下するのに対し、IgG3 と IgA は有意に増加していることが明らかになった。一方、IgG2a と IgE は両群間で差は認められなかった。

### ④ 皮膚病変での遺伝子発現変化解析

接触型過敏症を誘導した 24 時間後の野生型マウスと IL-21R 欠損マウスの皮膚から RNA を回収し、サイトカインやケモカイン遺伝子発現変化を qPCR 法で比較した。野生型マウスと比べて、IL-21R 欠損マウスでは、IL-4、IL-6、CXCL1、CCL11 の発現が有意に増強していた。一方、IL-1b、IL-13、IL-17A、IL-21、IL-22、IL-23、IL-33、IFN-g、TSLP、TNF、CXCL10、MIP2、CCL17、CCL20、CCL21 の発現は両群間で差は認められなかった。

### ⑤ 皮膚樹状細胞の遊走・成熟評価

野生型マウスと IL-21R 欠損マウスの皮膚に FITC を塗布し、24 時間後に従属リンパ節を回収した。リンパ節内の FITC 陽性樹状細胞の割合をフローサイトメトリーで解析を行なった。FITC 陽性樹状細胞の割合は、野生型マウスと比べて、IL-21R 欠損マウスでは有意に低下していることが明らかになった。FITC 陽性樹状細胞上の CD40 や CD86 といった成熟マーカーの発現レベルは両群間で差は認められなかった。これらの結果から、IL-21 は樹状細胞の成熟には影響を与えないが、遊走などの機能に影響を与えていることが示唆された。

### ⑥ ハプテン特異的なリンパ球応答 (in vitro)

DNFB で感作して 5 日後に野生型マウスと IL-21R 欠損マウスのリンパ節を回収し、リンパ節細胞を調製した。リンパ節細胞を DNBS (DNFB の可溶性アナログ) の存在化で培養し、DNBS 特異的な増殖応答をトリチウムラベルしたチミジンの取り込み能を指標として評価した。その結果、増殖能は両群間で差は認められなかった。また、同様に、リンパ節細胞を DNBS で刺激後、細胞を回収し、細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリー解析を行なった。その結果、Th1、Th2、Th17、Treg、Tc1、Tc2、Tc17 の割合は、両群間で差は認められなかった。これらの結果から、IL-21 はハプテンの感作時の T 細胞の分化には必須ではないことが明らかになった。

### ⑦ ハプテン特異的なリンパ球応答 (in vivo)

DNFB で感作して 5 日後に野生型マウスと IL-21R 欠損マウスのリンパ節を回収し、リンパ節細胞を調製した。それぞれのリンパ節細胞を未感作の野生型マウスと IL-21R 欠損マウスに静脈投与により移植した(野生型リンパ節細胞→野生型マウス、野生型リンパ節細胞→IL-21R 欠損マウス、IL-21R 欠損リンパ節細胞→野生型マウス、IL-21R 欠損リンパ節細胞→IL-21R 欠損マウスの 4 群)。移植後、このマウスの耳介皮膚に DNFB を塗布し、移植したリンパ節細胞に依存した接触型過敏症を誘導した。その結果、野生型リンパ節細胞→野生型マウス群と比較して、IL-21R 欠損リンパ節細胞→野生型マウス群では接触型過敏症誘導後の耳介皮膚の厚さは同程度であったのに対し、野生型リンパ節細胞→IL-21R 欠損マウス群と IL-21R 欠損リンパ節細胞→IL-21R 欠損マウス群では、耳介皮膚の厚さは有意に増強していた。これらの結果から、IL-21 はハプテンの感作時の T 細胞の分化には必須ではなく、炎症局所

での T 細胞の機能の制御に関わっていることが示唆された。

#### (2) 炎症局所における IL-21 産生細胞と IL-21R 発現細胞の同定

接触型過敏症を誘導した野生型マウスの皮膚組織から細胞を調製し、市販の抗 IL-21 抗体を用いて、細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーによって IL-21 産生細胞の同定を試みた。同様に、皮膚細胞を用いて、抗 IL-21R 抗体を用いて、フローサイトメトリーによって IL-21R 発現細胞の同定を試みた。しかしながら、発現の強い細胞はフローサイトメトリーでは検出できなかった。今後、皮膚組織での免疫染色法での解析を行う予定である。

#### (3) IL-21 による炎症抑制機構の解析

IL-10 レポーターマウス (IL-10-venus マウス) に接触型過敏症を誘導し、皮膚組織から細胞を調製した。皮膚炎を発症した皮膚では、正常の皮膚と比較して、IL-10 陽性の樹状細胞が増えていることが明らかになった。一方で、IL-21R 欠損 IL-10-venus マウスでは、IL-10 陽性の樹状細胞が少ないことが明らかになった。したがって、IL-21 は皮膚炎局所において、IL-10 を産生する樹状細胞の誘導に関わっている可能性が示唆された。今後、皮膚の樹状細胞を IL-21 で刺激を行い、IL-10 の誘導が起きるかどうかが、樹状細胞が産生する IL-10 が接触型過敏症の抑制に関わるかどうか、といった点を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arae Ken, Ikutani Masashi, Horiguchi Kotaro, Yamaguchi Sachiko, Okada Youji, Sugiyama Hiroki, Orimo Keisuke, Morita Hideaki, Suto Hajime, Okumura Ko, Taguchi Haruhiko, Matsumoto Kenji, Saito Hirohisa, Sudo Katsuko, Nakae Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 Interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin, but not interleukin-25, are crucial for development of airway eosinophilia induced by chitin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85277-4	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 -

1. 著者名 Unno Hirotooshi, Arae Ken, Matsuda Akira, Ikutani Masashi, Tamari Masato, Motomura Kenichiro, Toyama Sumika, Suto Hajime, Okumura Ko, Matsuda Akio, Morita Hideaki, Sudo Katsuko, Saito Hirohisa, Matsumoto Kenji, Nakae Susumu	4. 巻 533
2. 論文標題 Critical role of IL-33, but not IL-25 or TSLP, in silica crystal-mediated exacerbation of allergic airway eosinophilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 493 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizaki T, Itoh S, Yamaguchi S, Numata T, Nambu A, Kimura N, Suto H, Okumura K, Sudo K, Yamaguchi A, Nakae S.	4. 巻 9
2. 論文標題 IL-25 exacerbates autoimmune aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53633-0	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------