

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17790

研究課題名(和文) 制御性T細胞に着目した新規乾癬マウスモデルの作製と治療応用

研究課題名(英文) Generation of novel mouse model for psoriasis focusing on regulatory T cell

研究代表者

氏家 韻欣(Ujiie, Inkin)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：40822705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬は青年～中年に好発する、代表的な皮膚の炎症性角化症である。乾癬におけるTh1/Th2/Th17バランスについては、これまでに動物モデルを用いた研究が少なく未解明な部分が多い。本研究でT-bet(Th1)とStat6(Th2)のダブルノックアウトマウス(DKO)を用いてイミキモド塗布乾癬モデルを作成し解析したところ、DKOマウスではコントロールの野生型(WT)マウスに比べて塗布した耳の厚さが厚く、イミキモド塗布部皮膚に浸潤するIL-17陽性CD4+T細胞の割合が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、IL-17産生CD4+T細胞(Th17)の増加が、イミキモド誘発性乾癬モデルの炎症の増強に関与していることを示唆している。つまり、乾癬におけるTh17細胞の重要性が新規乾癬モデルマウスによって示された。今後はこの系を発展させ、制御性T細胞(Treg)のマスター転写因子であるFoxp3をノックアウトさせたFoxp3, T-bet, Stat6トリプルノックアウトマウスを作成することで乾癬におけるTregの役割を明らかにし、更なる病態解明につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis vulgaris is a common inflammatory keratotic disease. Th1/Th2/Th17 balance in psoriasis is still largely unknown because the evidence of the Th balance by in vivo studies is limited. We analyzed the experimental psoriasis model induced by topical imiquimod using T-bet(Th1) and Stat6(Th2) double knockout(DKO) mice and found that the imiquimod-treated ear thickness is thicker in DKO mice than wild type(WT) mice and IL-17-producing CD4+ T cells in the lesional skin are increased in DKO mice compared to those in WT mice, suggesting the positive-correlation between the number of IL-17-producing CD4+ T cells and the imiquimod-treated ear thickness.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 Stat6 T-bet Foxp3 イミキモド サイトカイン IL-17

1. 研究開始当初の背景

乾癬は青年～中年に好発する、代表的な皮膚の炎症性角化症であり、厚い銀白色の鱗屑を伴う紅斑が全身の皮膚に出現する疾患である(図1上)。物理的刺激などのストレスを受けた表皮角化細胞が放出するDNAや抗菌ペプチドの複合体が、真皮に浸潤する樹状細胞を活性化してTNF- α 産生を誘導し、分泌されるIL-12やIL-23によってナイーブTリンパ球がTh17に分化する。Th17はIL-17やIL-22などを産生し、表皮角化細胞の増殖を誘導し、乾癬の組織学的変化が形成される(図1下)。

制御性T細胞(Treg)は免疫応答を抑制するCD4⁺T細胞サブセットであり、末梢性免疫自己寛容の成立において重要な役割を果たしており、多くの皮膚疾患でTregの機能不全が病態に関与していると考えられている。Tregのマスター転写因子であるFoxp3の遺伝子変異により、ヒトではIPEX(Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)症候群と呼ばれる全身臓器における自己免疫疾患を生じる。このIPEX症候群では高頻度で皮膚炎が生じるが、乾癬様の皮膚炎を生じることもある(Halabi-Tawil M, et al. *Br J Dermatol*, 2009)。しかしながら、乾癬におけるTregの役割は何か?という問いは、これまでに動物モデルを用いた実験がほとんどないため大部分が未解明である。

我々のグループにおいてはロックアウトマウスを用いたTreg研究が盛んにおこなわれており、これまで自己免疫疾患におけるTregの役割を解析してきた(Ujii H, et al. *J Immunol*, 2016, Muramatsu K, et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2018)。

Foxp3マウス(Scurfyマウス)は激しい自己免疫を生じるため5-6週で死亡する。ここで、Treg, Th1, Th2関連の転写因子(Foxp3, T-bet, Stat6)をロックアウトすることによって免疫応答をTh17に傾けた新規乾癬自然発症マウスモデルでは、Th17優位の自己免疫応答が生じ、乾癬様皮疹が自然発症するのではないかと仮説を立てた(図2)。

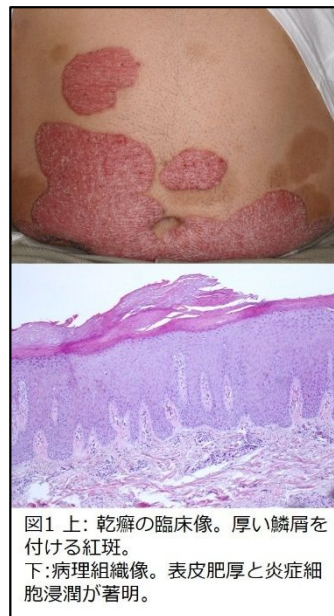
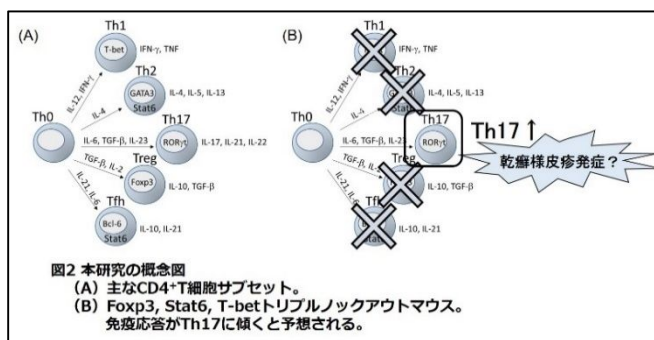


図1上: 乾癬の臨床像。厚い鱗屑を付ける紅斑。
下: 病理組織像。表皮肥厚と炎症細胞浸潤が著明。

我々が作成したFoxp3^{-/-}/T-bet^{-/-}/Stat6^{+/-}マウス(Stat6がヘテロ)はDAY54の時点で生存しており、皮疹もScurfyマウスに比べて弱かった。これは、Foxp3に加えてT-betも欠損していることにより炎症が低減しているためと考えた。この結果より、ロックアウトマウスを用いてScurfyマウスを従来よりも長期生存させ、乾癬におけるTregの関与を検証する着想に至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は、Treg, Th1, Th2関連の転写因子(それぞれFoxp3, T-bet, Stat6)をロックアウトすることで免疫応答をTh17に傾けた新規乾癬自然発症マウスモデルを作成し、乾癬におけるTregの役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 転写因子(Foxp3, T-bet, Stat6)トリプルノックアウトマウスの作成、および乾癬様皮疹が発症するか否かの観察

Foxp3^{+/-}/T-bet^{-/-}/Stat6^{-/-}マウス(オス)とFoxp3^{+/-}/T-bet^{-/-}/Stat6^{-/-}マウス(メス)の交配を行い、トリプルノックアウトマウスを作成する。ロックアウトマウスにおいて免疫応答がTh17優位となるか否か、皮疹の肉眼的・病理組織学的性状についての検討を計画した。

(2) 転写因子(T-bet, Stat6)ダブルノックアウトマウスに対するイミキモドクリーム外用による免疫応答の観察

上記トリプルノックアウトマウスについて、乾癬様皮疹が想定より軽度であった場合について、イミキモドクリームを外用することにより乾癬様皮疹を誘導する計画である。その際、T-betおよびStat6ノックアウトにより免疫応答がどのように異なるかを把握する目的で、T-betとStat6をノックアウトしたダブルノックアウト(DKO)マウス(Foxp3^{+/-})にイミキモドを外用し、皮疹の評価、および皮膚に浸潤する炎症細胞のサイトカイン産生を検討した(n=8)。また、コント

ロールとしてワセリンを外用したDKOマウス (n=7)、イミキモドを外用したWTマウス (n=8)、ワセリンを外用した WT マウス (n=8)についても同様の検討を行った。外用については、外用開始1日前にマウスの背部に除毛クリームを外用して除毛したうえで、イミキモド 62.5mg (ベセルナ®クリーム 1/4 包)ないし同量のワセリンを背部と片耳に1日1回外用し、外用開始後6日後に皮疹の病理組織学的評価、皮膚・脾臓からのリンパ球採取を行った。皮疹の肉眼的評価は、紅斑・肥厚・鱗屑それぞれについて4段階 (0: 皮疹なし~4: 重度)で評価を行い、それぞれの合計点(最大12点)を skin score とした。

4. 研究成果

(1) 転写因子(Foxp3, T-bet, Stat6)トリプルノックアウトマウスの作成、および乾癬様皮疹が発症するか否かの観察

Foxp3^{+/+}/T-bet^{-/-}/Stat6^{-/-}マウスと Foxp3^{+/+}/T-bet^{-/-}/Stat6^{-/-}マウスの交配を継続していたが、交配時における食殺などが原因で、現時点で実験に必要な数のマウスを得ることができなかった。

(2) 転写因子(T-bet, Stat6)ダブルノックアウトマウスに対するイミキモドクリーム外用による免疫応答の観察

DKOマウス、WTマウスに対しイミキモドクリームを連日外用することにより、背部に鱗屑を伴う紅斑が出現し、肥厚も伴っていた(図3)。

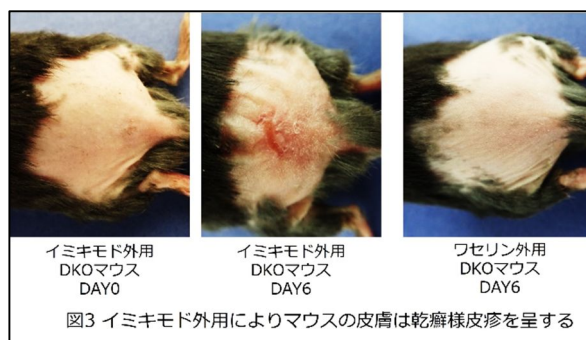


図3 イミキモド外用によりマウスの皮膚は乾癬様皮疹を呈する

イミキモド外用群において DAY6 時点で Skin score を比較したところ、DKOマウスは 6.00±1.00、WTマウスは 5.13±0.78 とDKOマウスでより強い炎症を呈する傾向が見られた(統計学的有意差なし)。一方、ワセリン外用群においては DAY6 時点で、DKOマウスで 0.29±0.45、WTマウスで 0.50±0.71 と、ほとんど皮疹はみられなかった。また、外用部の耳の肥厚についても、イミキモド外用DKOマウスでは外用前 195μm(平均値)に対し外用後は 393μm と平均 198μm の肥厚が見られたのに対し、イミキモド外用WTマウスでは、外用前 200μm に対し外用後 348μm と、平均 148μm の肥厚を呈し、DKOマウスでより肥厚の度合いが強く(p<0.05)、強い炎症を反映しているものと考えた(図4)。

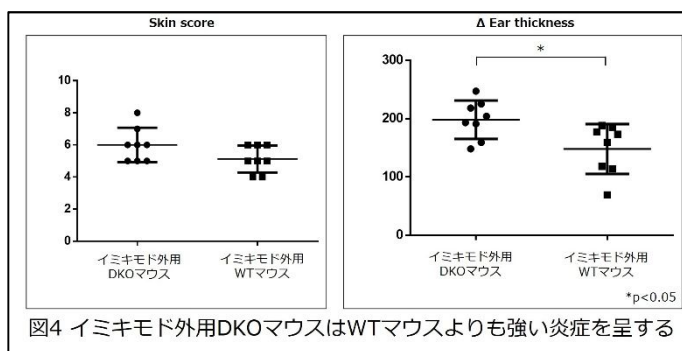


図4 イミキモド外用DKOマウスはWTマウスよりも強い炎症を呈する

病理組織学的には、イミキモドを外用したWTマウスは、不全角化、顆粒層の菲薄化、表皮肥厚など、乾癬に類似した変化を呈した。ワセリンを外用群ではDKOマウス、WTマウスともに正常組織の範疇であった。イミキモドを外用したDKOマウスでは不全角化が明らかでなかったり、表皮肥厚が不規則であるなど、WTマウスのような典型的な乾癬様病理組織像と異なる組織学的変化を示した(図5)。

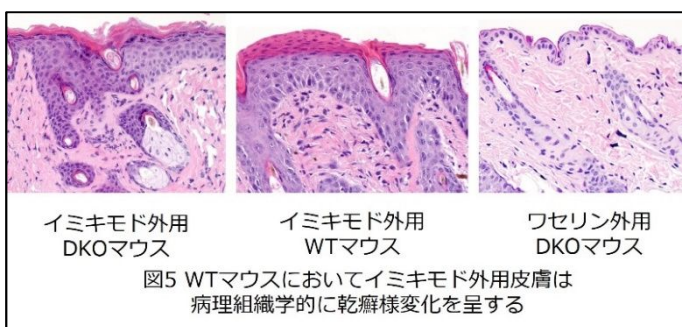


図5 WTマウスにおいてイミキモド外用皮膚は病理組織学的に乾癬様変化を呈する

上記マウスの外用部皮膚から抽出したリンパ球および脾臓のリンパ球について、CD4 陽性細胞におけるサイトカイン産生を、フローサイトメトリーを用いて検証した。イミキモド外用 DKO マウスにおいて、外用部における皮膚リンパ球の IL-17 陽性細胞は $31.3 \pm 14.2\%$ と、イミキモド外用 WT マウスの $8.4 \pm 2.1\%$ にして高値であった。また、ワセリン外用 DKO マウスの皮膚リンパ球の IL-17 陽性細胞は $10.3 \pm 1.7\%$ であり、イミキモド外用 WT マウスよりも高い割合であった。ワセリン外用 WT マウスについては $2.9 \pm 2.9\%$ と、上記のいずれよりも低い割合を示した。

一方で、イミキモド外用・ワセリン外用の両群について、DKO・WT マウスとも脾臓リンパ球における IL-17 陽性細胞の割合は 1.0% 未満と低い割合であった(表 1)。

イミキモドまたはワセリン外用後のCD4陽性T細胞におけるIL-17陽性細胞の割合					
(n=4)	イミキモド	ワセリン	(n=4)	イミキモド	ワセリン
DKO	31.3±14.2%	10.3±1.7%	DKO	0.8±0.7%	0.7±0.5%
WT	8.4±2.1%	2.9±2.9%	WT	0.1±0.1%	0.5±0.4%
外用部の皮膚リンパ球			脾臓		

表1 イミキモド外用部皮膚においてIL-17陽性細胞の割合が増加する

【考察】

DKO マウスに対するイミキモド外用において、Th1/Th2 がロックアウトされていることにより、免疫応答が Th17 へ傾き、DKO マウスでは WT マウスに比べてより強い乾癬様皮疹を呈し、skin score が高値を示したと考えられる。また、フローサイトメトリーの結果より、ワセリン外用群では DKO マウスは WT マウスよりも皮膚における IL-17 陽性細胞が多く、イミキモド外用群では DKO・WT マウスのいずれも外用部皮膚局所における IL-17 陽性細胞が増加した。しかしながら脾臓における IL-17 陽性細胞の割合は各群において低値であった。これらの結果から、Th1/Th2 ロックアウトにより免疫応答の Th17 へのバランスが傾くために皮膚局所への IL-17 陽性細胞浸潤をきたし、さらに乾癬様炎症が重なった場合にはより強く皮膚局所への IL-17 陽性細胞浸潤が誘導され、皮疹の病態形成に影響を及ぼしている可能性が考えられた。この検証を進めるため、今後、皮膚浸潤細胞の IL-17 染色や外用部の遺伝子発現解析を進めていく。

また、上記仮説より、Foxp3, T-bet, Stat6 トリプルロックアウトマウスの乾癬モデルマウスとしての期待がさらに高まるものと考えられたため、今後のトリプルロックアウトマウス作成、および乾癬における Treg の役割解析を継続して行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	氏家 英之 (Ujiie Hideyuki)		
研究協力者	葭本 倫大 (Yoshimoto Norihiro)		

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