

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08672

研究課題名(和文) 乾癬病変部表皮角化細胞産生EBI3含有サイトカインに関する研究

研究課題名(英文) Research on EBI3-containing cytokines produced by epidermal keratinocytes in psoriatic lesions

研究代表者

森実 真 (Morizane, Shin)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：80423333

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)：乾癬病変部表皮角化細胞産生EBI3含有サイトカイン(IL-27、IL-35、IL-39)について、それらの発現の有無について検討した。乾癬病態に類似の刺激で培養した正常ヒト表皮角化細胞において、EBI3の発現が転写レベルで増強することを見出した。また、蛋白レベルではEBI3をモノマーとしては検出出来たが、IL-27、IL-35、IL-39として検出することは出来なかった。これらの結果から同細胞がIL-27、IL-35、IL-39を産生しているとは考えにくく、EBI3モノマー・ホモダイマー・ホモトリマーあるいは未知のヘテロダイマーなどを産生している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬病変部表皮角化細胞は過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成に大きく関与している。我々の研究は同細胞がIL-39を発現していないことを示唆した。本研究成果は乾癬の病態解明に貢献するのみならず、新規治療剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of EBI3-containing cytokines (IL-27, IL-35, IL-39) produced by epidermal keratinocytes in the lesions of psoriasis. In normal human epidermal keratinocytes cultured with psoriasis-like stimuli, we found that EBI3 expression was enhanced at the transcriptional level. At the protein level, EBI3 was detected as a monomer, but not as IL-27, IL-35 or IL-39.

These results suggest that it is unlikely that these cells produce IL-27, IL-35, or IL-39, and that they may produce EBI3 monomers, homodimers, homotrimers, or unknown heterodimers.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮角化細胞 乾癬 IL-39 EBI3

## 1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は表皮肥厚および好中球・T細胞浸潤を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。Th1 および Th17 細胞は特に病態形成において重要な役割を果たすと考えられる。病変部表皮角化細胞も過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成に大きく関与する。

IL-23 (p19 と p40 のヘテロダイマー) は Th17 細胞の分化・増殖・維持に重要なサイトカインである。ウステキヌマブは IL-12/IL-23 の共通サブユニットである p40 に対する抗体製剤であり、2010 年に承認され広く臨床で使用されている。さらに IL-23 のもう一つのサブユニットである p19 に対する抗体製剤 (リサンキズマブ、グセルクマブ、チルドラキズマブ) も臨床ですでに有効性が示されている。

2006 年に表皮角化細胞も IL-23 を発現することが報告されているが (*J Immunol.* 2006;176(3):1908-15) 近年さらに同細胞由来の IL-23 の重要性を示唆する論文が報告された。(*Nat Commun.* 2018;9(1):1420) 一方、2015 年に Ramnath らは表皮角化細胞における、これまでに報告されていないサイトカイン p19 と EB13 (EBV-induced gene 3、34kDa) のヘテロダイマーの存在を報告した (*Immunol Cell Biol.* 2015;93(9):771-9)。翌年、そのサイトカインは IL-39 として、Bリンパ球から産生され、好中球を活性化し、全身性エリテマトーデスの病態に関与する、と報告された。IL-39 の -サブユニットは p19 であり、p19 抗体製剤は IL-39 にも結合する可能性がある。

一方で、EB13 を含むヘテロ二量体サイトカインとして他に IL-27 (EB13 と p28) および IL-35 (EB13 と p35) が挙げられる。IL-27 は活性化 T 細胞による様々な炎症性サイトカイン産生を抑制する。IL-27 の持つ免疫抑制作用の一部は活性化 T 細胞に対して免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生を誘導することによると考えられている。その一方で、表皮角化細胞を IL-27 で刺激すると CXCL9、CXCL10、CXCL11 の発現が誘導され、乾癬病変部への炎症細胞誘導に関与するとの報告もある (*J Invest Dermatol.* 2010;130(4):1034-9)。IL-35 もまた炎症抑制作用を有し、乾癬病変部でも炎症抑制に働くと報告されている (*J Immunol.* 2016;197(6):2131-44)。しかしながら、表皮角化細胞がこれらのサイトカインを蛋白として発現するかについては未だ報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は乾癬病変部表皮角化細胞産生 EB13 含有サイトカイン (IL-27、IL-35、IL-39) について、それらの蛋白発現の有無、および乾癬病態形成への関与について検討することである。乾癬病態に類似の刺激で培養した正常ヒト表皮角化細胞の濃縮培養上清を用いてこれらの蛋白発現の有無を nano LC-MS/MS 等で検討する。

乾癬病変部の表皮角化細胞は形態学的に異常であり、過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成にも大きく関与しているが、同細胞がこれらの EB13 含有サイトカインを発現するかについては未だ報告がない。本研究によってそれらの蛋白発現の有無や病態関与が明確に示されれば、乾癬の病態解明に貢献するのみならず、新規治療剤の開発に繋がる可能性がある。

## 3. 研究の方法

乾癬患者皮膚病変部、あるいは皮膚腫瘍手術標本断端のパラフィンブロック標本を用いて、EB13、p19 の発現を免疫染色法によって解析する。

培養正常ヒト表皮角化細胞 (NHEKs) を炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-13、IL-17A、IL-17C、IL-22、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、いずれも 50ng/ml、R&D systems 社) で 24~96 時間刺激後、p19、p28、p35 発現量をリアルタイム PCR (Applied Biosystems 社) で検討する。また既存の ELISA キット (R&D systems 社または MyBioSource 社) を用いて培養上清中の IL-27、IL-35、IL-39 の発現について検討する。検出が難しい場合は培養上清を遠心式限外ろ過フィルター (Amicon Ultra、Merck Lifescience 社) にて 25~80 倍濃縮して検討する。

同様に濃縮培養上清を 200 $\mu$ L 準備し、一次抗体 (抗 EB13 抗体、Proteintech 社または抗 p19 抗体 (チルドラキズマブ、サンファーマ株式会社)) と 4 一晩インキュベートする。Protein A アガロースビーズ (20-50  $\mu$ L、50%ビーズスラリー、Cell Signaling Technology 社) 処理後、PBS で洗浄し、0.1mol/l グリシン-塩酸緩衝液 (pH2.2) 120  $\mu$ L で懸濁し、結合蛋白質を溶出する。その後トリプシン消化 (0.4  $\mu$ g Trypsin、37 $^{\circ}$ C、一晩) し、nano LC-MS/MS による受託プロテオーム解析を依頼する (Agilent 1100LC/MSD Trap XCT Ultra、岡山大学医学部共同実験室)。

## 4. 研究成果

乾癬患者皮膚病変部のパラフィンブロック標本を用いて、EB13 の発現を免疫染色法によって検討したところ、EB13 は乾癬病変部の表皮にて全層性に高発現していることが確認された。加えて p19 も表皮全層において高発現していることが明らかになった。

NHEKs を種々のサイトカインで刺激 (すべて 50ng/ml) したところ TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  によって

EBI3の発現が転写レベルで増強することを見出した。加えてTNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ +IL-17Aの三重刺激ではEBI3の発現が相乗的に増強された。また、既存のELISAキットを用いて培養上清中のIL-27、IL-35、IL-39の発現について検討したところ、種々のサイトカイン刺激下においてもp19とEBI3をモノマーとして検出することは出来たが、いずれのサイトカインも検出することは出来なかった。

NHEKsをサイトカイン（TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ +IL-17A、いずれも50ng/ml）で24～96時間刺激後、培養上清を遠心式限外ろ過フィルターにて25～80倍濃縮し、一次抗体（抗EBI3抗体）と4～晩インキュベート。Protein Aアガロースビーズ処理後、PBSで洗浄し、0.1mol/l グリシン-塩酸緩衝液（pH2.2）120  $\mu$ Lで懸濁し、結合蛋白質を溶出。その後トリプシン消化（0.4  $\mu$ g Trypsin、37℃、一晩）し、nano LC-MS/MSによる受託プロテオーム解析を施行したところ、EBI3蛋白を検出することが出来たが、p19、p28、p35は検出されなかった。さらに、一次抗体を抗p19抗体（チルドラキズマブ）に変えて同様の実験を行ったところ、p19を検出することは出来たが、p40、EBI3は検出されなかった。

これらの結果からは表皮角化細胞がIL-27、IL-35、IL-39を産生しているとは考えにくく、EBI3モノマー・ホモダイマー・ホモトリマーあるいは未知のヘテロダイマーなどを産生している可能性が示唆された。

乾癬病変部表皮角化細胞は過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成に大きく関与している。我々の研究は同細胞がIL-39を発現していないことを示唆した。本研究成果は乾癬の病態解明に貢献するのみならず、新規治療剤の開発に繋がる可能性がある。

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 Kota Tachibana, Nina Tang, Hitoshi Urakami, Ai Kajita, Mina Kobashi, Hayato Nomura, Minori Sasakura, Satoru Sugihara, Fan Jiang, Nahoko Tomonobu, Masakiyo Sakaguchi, Mamoru Ouchida, Shin Morizane	4. 巻 22
2. 論文標題 Multifaceted Analysis of IL-23A- and/or EB13-Including Cytokines Produced by Psoriatic Keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312659.	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
---------	---------