

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591241

研究課題名（和文） IL-22Rを強発現した三次元培養皮膚を免疫不全マウスに移植した乾癬モデルの開発

研究課題名（英文） Development of living skin equivalent models over-expressing IL-22R on epidermal keratinocytes

研究代表者

藤山 幹子（Tohyama Mikiko）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60263935

研究成果の概要（和文）：乾癬では、IL-22 レセプター(IL-22R)の発現が増強しており、IL-22 に対する反応性が亢進していることが推測される。本研究において、乾癬病変の早期に皮膚で検出される IFN- α が表皮角化細胞の IL-22R の発現を増強させ、IL-22 の感受性を増強させること、IL-22 レセプターを強発現させた表皮角化細胞では、IL-22 刺激で核内の Bcl-3 発現が増強し、乾癬特有の遺伝子発現を増強させることを解明した。以上の結果は、IL-22R を強発現させた表皮角化細胞を用いた三次元皮膚培養皮膚が乾癬モデルになりうることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：IL-22 is an essential cytokine in the pathogenesis of psoriasis. We have found that IL-22 receptor expression is increased in the epidermal keratinocytes of psoriasis. In this study, we elucidated that IFN- α enhances IL-22R expression in cultured keratinocytes, and that IL-22-inducible gene expression is enhanced by nuclear Bcl-3 which is increased by IL-22, particular when IL-22R is over-expressed. These findings suggest that living skin equivalent models highly-expressing IL-22R on epidermal keratinocytes may be a useful too for studying the pathogenesis of psoriasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：乾癬、IL-22、IL-22 レセプター

1. 研究開始当初の背景

Th17 サイトカインである IL-17、IL-22 は、皮膚の表皮角化細胞では、ケモカイン、抗菌ペプチド、増殖因子の産生を誘導し、皮膚の

慢性炎症性疾患である乾癬の病態に関与していることが示唆されている。近年、乾癬の病態形成には、表皮角化細胞で活性化した STAT3 が本質的な役割を果たすことが明ら

かにされており、STAT3 のリン酸化を誘導する IL-22 は、乾癬の病態形成に中心的役割を果たしていると考えられている。

我々は以前、1)乾癬では、IL-22R の発現が増加していること(図 1)、2) IL-22R の発現増加により IL-17 と IL-22 の反応系が増強し、その2つのサイトカインが同時に作用することで乾癬特有の遺伝子発現を生じることが明らかになった。この結果は、IL-22R の発現が表皮角化細胞で増強していると、Th17 リンパ球の浸潤により乾癬の皮疹が形成される可能性を強く示唆する。皮膚への Th17 リンパ球の浸潤は、乾癬とは全く逆の病態として捉えられるアトピー性皮膚炎においても認められ、乾癬特有の所見ではないという事実も、表皮角化細胞の IL-22R の発現の相違がその病態を決定するという仮説を支持する。

乾癬モデル皮膚については、これまでにマウスにおいて種々検討されているが、これまでに乾癬モデルとして広く受容されているものは存在しない。また、ヒト皮膚を SCID マウスに移植し、免疫細胞を局注することにより乾癬モデルを作成しようという試みもなされているが、正常皮膚の特定の遺伝子の発現を増強させて乾癬の病態を形成させるという実験は、この方法では不可能である。そこで、レンチウイルスベクターを用いて IL-22R を強発現させた三次元皮膚は乾癬モデルになりうると考えた。

2. 研究の目的

表皮角化細胞にレンチウイルスベクターを用いて IL-22R の発現を増強させて三次元培養皮膚(skin equivalent)を作製し、in vitro 及びその skin equivalent を移植した SCID マウスで解析し、IL-22R の発現増強の重要性を確認し、乾癬モデルを作成することを目的とした。

同時に、①乾癬において、IL-22R の増強

がどのような機序で生じるのか、②乾癬特有の遺伝子発現が、IL-22 によりどのような機序で制御されるか、についても検討し、乾癬の病態における IL-22 の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)レンチウイルスベクターと三次元皮膚の作成

培養表皮角化細胞が IL22R をほとんど発現しないため、アデノウイルスベクターを用いて IL22R を発現させて検討してきたが、三次元培養皮膚の系においてアデノウイルスベクターは適さない。そこで、IL-22R を発現させるためのレンチウイルスベクターを作成し、表皮角化細胞に導入する。単層の培養細胞で、IL-22R が機能を有して発現されているかを確認する。次に、レンチウイルスベクターを用い IL-22R を強発現させた表皮角化細胞を用い、真皮成分を有する三次元皮膚を作製する。この表皮角化細胞を用いて三次元培養皮膚(skin equivalent)を作製し、サイトカインで刺激し、乾癬特有の遺伝子・蛋白発現が生じるかどうかを確認する。

(2)サイトカインによる IL-22R の発現増強の検討

乾癬の病変部早期に検出されるサイトカインにより、IL-22R の発現が生じるかを、培養細胞、三次元培養皮膚を用いて検討する。

(3)IL-22 による乾癬特有の遺伝子発現の制御についての検討

ウイルスベクターを用いて IL-22R を強発現させた培養細胞に IL-22 刺激を行い、遺伝子発現に関わる細胞内シグナルを検討する。

(4)SCID マウスを用いた乾癬モデルの作成 IL-22R を強発現させた三次元皮膚を SCID

マウスに移植し、*in vitro* の結果をもとに、サイトカインや活性化した免疫細胞の局注を行い、乾癬モデルを作製する。

4. 研究成果

(1) IL-22R を発現するレンチウイルスベクターの作成

作製したレンチウイルスベクターを培養表皮角化細胞に導入し、IL-22R の発現が増強することを確認した。また、IL-22 刺激により、STAT3 のリン酸化の増強、IL-22 誘導遺伝子の発現増強が認められ、強発現させた IL-22R が機能を有していることが確認できた。

(2) レンチウイルスベクター導入を行った三次元皮膚

レンチウイルスベクターにより IL-22R を強発現させた表皮角化細胞を用いて三次元皮膚を作製した。コントロールとして、ウイルス導入を行っていない表皮角化細胞、レンチウイルスベクターにより GFP を発現する表皮角化細胞を用いて比較を行った。レンチウイルスベクターを導入して作製した三次元培養皮膚は、表皮の重層化が生じたものの、ウイルス導入処理を行っていないコントロールと比べ、表皮角化細胞の重層が不十分であり、また角化においても不全角化の状態であった。これは、GFP を発現するレンチウイルスベクター導入時にも認められた。以上のことより、ウイルスベクターを導入した細胞を用いた三次元皮膚の作成にはさらなる改良が必要と考えられ、検討中である。

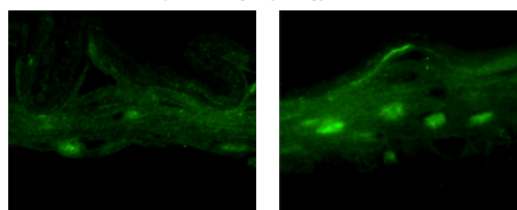
(3) IFN- α による IL-22R 発現増強

乾癬の病態に役割を果たしていると考えられているサイトカインのうち、IFN- α 刺激により IL22R の発現が増強することを見いだした。

IFN- α は乾癬の発症に関与するサイトカ

インとして注目されているが、表皮角化細胞に対する作用については明らかでなかった。三次元培養皮膚において IFN- α の添加は、IL22R の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで増強し、IL-22 の添加による STAT3 のリン酸化、IL-22 誘導遺伝子発現も顕著に増強した。以上の結果は IFN- α が乾癬モデルの作成に重要な要因の一つであることを明らかとしたが、IFN- α により処理した三次元培養皮膚はその後の長期の培養に耐えることができないことも明らかとなった。

IL-22によるSTAT3のリン酸化のIFN- α 処理による増強
(三次元培養皮膚)



Control

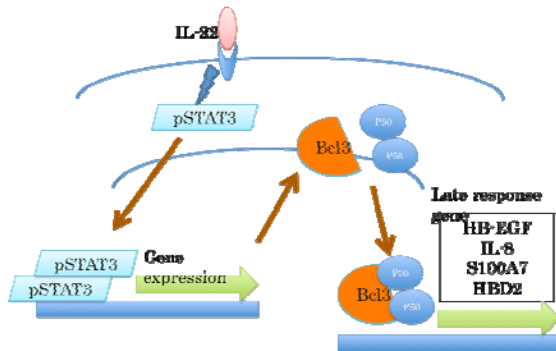
IFN- α pretreatment

(4) IL-22 誘導遺伝子発現の Bcl-3 による制御

IL-22R のリガンドである IL-22 は、乾癬の病態形成に必須のサイトカインであり、特に IL-22 のシグナルにおいては、STAT3 のリン酸化とその活性化が重要と報告されているが、実際に STAT3 が遺伝子の発現にどのように関与しているのかほとんど検討されていない。そこで、IL-22 により種々発現する遺伝子発現とそのメカニズムについて検討した。

IL-22 の刺激により STAT3 のリン酸化は 1 時間以内の早期に認められる。IL-22 により発現が誘導される遺伝子のうち、MCP-1 や SOCS3 は刺激後 1 時間で遺伝子の発現が誘導され、また STAT3 シグナルの抑制により発現が抑制されることより、STAT3 依存性に直接誘導される遺伝子と考えられた。一方、HB-EGF、IL-8、S100A7、HBD2 など乾癬でいずれも発現が増強している蛋白の mRNA は、IL-22 刺激により遅発性に発現が

誘導された。この発現は STAT3 のシグナル抑制により発現が抑制されることより、STAT3 により誘導される 2 番目の因子の関与が示唆された。そこで、Bcl-3 に注目して検討を行ったところ、IL-22 の刺激により Bcl-3 の核内発現の増強がみられることを確認した。siRNA により Bcl-3 の発現を抑制した表皮角化細胞では、IL-22 による HB-EGF、IL-8、S100A7、HBD2 の遺伝子発現が抑制された。さらに、Bcl-3 を表皮角化細胞に強発現させると、HB-EGF、IL-8、S100A7、HBD2 の遺伝子発現が誘導された。以上の結果は、IL-22R 発現増強が、Bcl-3 を介して IL-22 刺激により乾癬に高発現している遺伝子発現を誘導することを示す。



(2)(3)の結果は、IL-22R を強発現させた表皮角化細胞を用いた三次元皮膚培養皮膚は、乾癬モデルになりうることを示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

全て査読あり

- ① Tohyama M, et al. IFN- α enhances IL-22 receptor expression in keratinocyte: a possible role in development of psoriasis. J Invest Dermatol 2012
- ② Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, et al. Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. J Dermatol Sci; 65: 50-57, 2012.
- ③ Dai X, Sayama K, Tohyama M, et al. Mite allergen is a danger signal for the

skin via activation of the inflammasome in keratinocytes. J Allergy Clin Immunol; 127: 806-814, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Tohyama M, et al. Nuclear translocation of Bcl3 and p50 by IL-22 produces HB-EGF, IL-8, S100A7, and human β -defensin 2 in keratinocytes of psoriasis. 41th annual ESDR meeting of the European Society for Dermatological Research, 2012,12,09, Spain
- ② Tohyama M, et al. CISH suppresses IL-17-induced CCL20 production from epidermal keratinocytes in Th2 dominant environment. 日本研究皮膚科学会第 37 回年次学術大会 2012 年 12 月 7 日 沖縄
- ③ Tohyama M, et al. Nuclear translocation of Bcl3 and p50 triggers the expression of IL-22-inducible genes in keratinocytes of psoriasis 日本研究皮膚科学会第 36 回年次学術大会 2011 年 12 月 9 日 京都
- ④ Tohyama M, et al. Interferon alpha enhances IL-22 receptor expression on epidermal keratinocytes. 40th annual ESDR meeting of the European Society for Dermatological Research, 2010,09,09 Finland
- ⑤ Tohyama M, et al. Involvement of IL-22 receptor enhancement by interferon alpha in psoriasis. 日本研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会 2010 年 11 月 3 日 和歌山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 幹子 (Tohyama Mikiko)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60263935

(2) 研究分担者

なし