

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 5月27日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591242

研究課題名（和文）モデルマウスを用いた乾癬発症に必要な IL-23/Th17 経路の解明

研究課題名（英文）Investigation of IL-23/Th17 axis in pathogenesis of psoriasis using a mouse model.

研究代表者

高石 樹朗（TAKAISHI MIKIRO）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：10303223

研究成果の概要（和文）：我々はユニークな乾癬病態モデルである K5.Stat3C トランスジェニックマウスを用いて、乾癬発症における IL-23 および IL-22 の寄与を検討した。IL-23 を欠損するマウスでは乾癬様皮疹の形成が減弱した。一方、IL-22 が欠損するマウスにおいては、対照と同程度に皮疹が形成された。この結果より、IL-23 は乾癬の病態に重要な役割を果たすこと、また、IL-22 には代償経路が存在する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The roles of IL-23 and IL-22 in pathogenesis of psoriasis were investigated using K5.Stat3C transgenic mice, as a unique mouse model for psoriasis. The development of psoriasis-like lesions was attenuated in the K5.Stat3C mice being deficient in IL-23 production. In other hands, the lesions in the IL-22 deficient mice were generated as same as in the control mice. The results indicated that IL-23 played a significant role in psoriasis and that some alternative pathways could compensate the loss of IL-22 in development of psoriasis-like lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

乾癬発症には IL-23/Th17 軸が関わりと考えられるようになった。当時、臨床試験中だった抗 IL-12/23p19 抗体が乾癬に著効したこともそれを支持するものだった。しかしながら、乾癬発症のメカニズムは未だ不明な点があり、IL-23 あるいは IL-22 の病態における意義を *in vivo* 実験系により明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

乾癬発症に深く関わりとされる IL-23/Th17 軸を中心としてその分子メカニズムを解明することを目的とする。最も優れた乾癬モデルマウスの一つである K5.Stat3C マウスを IL-22 および IL-23 欠損マウスと交配することにより、これらサイトカインの乾癬発症への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) K5.Stat3C トランスジェニックマウスにおける乾癬様皮疹形成に対する IL-22 および IL-23 の寄与についての検討

①K5.Stat3C トランスジェニックマウスと IL-22 欠損マウスあるいは IL-23p19 欠損マウスを交配して、K5.Stat3C:IL-22^{-/-}と K5.Stat3C:IL-23p19^{-/-}を作出する。

12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の背部皮膚への反復塗布 (6.8 nmols/ 200 μ l、週 3 回、4 週間) により乾癬様皮疹を生じさせる。生じた皮疹について組織学的に比較検討する。

②TPA 塗布により早期に生じる変化を捉えるために、TPA 塗布を隔日で 2 回行い、その皮膚における、サイトカイン、成長因子等の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR により比較検討する。

(2) 表皮角化細胞で発現するサイトカイン類のプロファイリング

K5.Stat3C マウスおよび野生型マウスの表皮角化細胞の初代培養を用いて IL-17、IL-22、IL-23 を始めとする主要サイトカイン、ケモカインおよびそのレセプター群の発現プロファイルをリアルタイム RT-PCR にて明らかにする。

(3) 乾癬様皮疹形成に対する抗サイトカイン中和抗体の抑制効果の検討

K5.Stat3C マウスに抗マウス IL-23p19 抗体を単回投与し、(1) の実験と同様に TPA を反復投与して乾癬様皮疹を形成させる。

4. 研究成果

(1) ①K5.Stat3C:IL23p19^{+/-}および K5.Stat3C:IL23p19^{-/-}の背部皮膚に TPA を 4 週間塗布した結果、K5.Stat3C:IL23p19^{+/-}では乾癬様皮疹が形成されたのに対して、K5.Stat3C:IL23p19^{-/-}では、皮疹形成が明らかに減弱した。K5.Stat3C:IL-22^{-/-}に TPA を 4 週間塗布した結果、K5.Stat3C:IL-22^{+/-}と同等の乾癬様皮疹が形成された。②これら遺伝子改変マウスにおいて、TPA 刺激により早期に変化する種々のサイトカイン・成長因子等の発現変化をリアルタイム PCR により検討した。K5.Stat3C:IL23p19^{-/-}においては、IL-17A、IL-17F、IL-22 の減少に加えて、IL-19、IL-20、IL-24 が減少していた。また、Hb-EGF、TGF- α 、KGF、VEGF などの増殖因子、CCL3、CCL20 といったケモカイン、

そして S100A8、S100A9 も著しく減少していた。

一方で、K5.Stat3C:IL-22^{-/-}では、これらの遺伝子発現は K5.Stat3C:IL-22^{+/-}とほぼ同程度であった。

これらの結果より、乾癬モデルマウスである K5.Stat3C トランスジェニックマウスにおいて、IL-23 が Th17 サイトカインのみならず、IL-19 ファミリーである IL-19、IL-20、IL-24 あるいは様々な増殖因子・ケモカイン等の産生にも関わっていること、また IL-22 にはその機能を代償する他の分子が存在する可能性が示唆された。

(2) マウス表皮角化細胞 (ケラチノサイト) 初代培養を用いて遺伝子発現を検討した

①IL-23; ケラチノサイトでは IL-23p19 (I123a) は発現するものの IL-12p35 (I112a) および IL-12p40 (I112b) は発現しなかった。従って機能的な IL-12 および IL-23 はマウスケラチノサイトより産生されないと考えられる。

②IL-20 ファミリー; IL-19 および IL-24 の発現が確認された一方で、IL-20 と IL-22 は発現していなかった。IL-20 が発現しないのはヒトケラチノサイトと大きく異なる点である。IL-24 は K5.Stat3C マウス由来ケラチノサイトで野生型と比較して発現が強かった。野生型マウス由来ケラチノサイトにおいても IL-6 あるいは EGF の刺激により発現が増加した。レセプターについては IL-20R2、IL-10R2、IL-22R1 の発現が確認された。K5.Stat3C マウス由来ケラチノサイトでは IL-22R1、IL-20R2 の発現が対照と比較して僅かながら減少していた。

③IL-17; マウスケラチノサイトでの IL-17A および IL-17F の発現は検出出来なかったが、そのレセプターである IL-17RA および IL-17RC は発現していた。これらは、トランスジェニックマウス由来細胞で僅かに上昇した。

④ケモカイン; CCL20 の発現は野生型とトランスジェニックマウス両者の間で大きな差異は認められなかった。CCL3 は K5.Stat3C マウス由来ケラチノサイトで発現が減少した。

⑤EGFR リガンド; TGF- α 、HB-EGF の発現は IL-17A 刺激により誘導され、その程度はトランスジェニックマウス由来ケラチノサイトにおいて野生型より強かった。

今回の検索で得られた着目すべき結果は、IL-24 の発現が Stat3 を介した細胞内シグナル伝達経路により制御されている可能性が示された点である。TGF- α 、

HB-EGF の発現が IL-17A で誘導され、また Stat3 が協調的に関わることを示唆された結果も興味深い。

(3) 抗マウス IL-23p19 に対する中和抗体を投与し、TPA 塗布により皮疹を誘導したところ皮疹の程度が減弱した。これは IL-23 ノックアウトマウスを用いた実験結果と良く一致した。

(4) 考察

遺伝子改変マウスを用いた研究および中和抗体を用いた研究から、乾癬発症には IL-23 が重要な働きをすることを改めて示した。IL-23 は Th17 サイトカインである IL-17A/F、IL-22 の産生のみならず皮膚においては IL-19、IL-20、IL-24、EGFR リガンド等の産生に関わることが示唆された。IL-22 を欠損するマウスにおいても乾癬様皮疹が誘導されたことから、IL-22 の作用は他のサイトカイン等によって代償される可能性がある。

培養ケラチノサイトを用いた検討では IL-24 の発現が K5、Stat3C マウス由来細胞でより強く、また IL-6、EGF 刺激により発現が増加した。さらに、表皮で IL-24 を高発現するトランスジェニックマウスは表皮肥厚と角化異常を呈するという報告 (He M et al. 184(4):1793-8, J Immunol. 2010) があることから、IL-22 の欠損を代償するケラチノサイト由来の候補因子の一つとして IL-24 が挙げられる。すなわち、IL-6 や EGFR リガンド存在下でケラチノサイト内の Stat3 が活性化すると IL-24 の産生が高まる。その IL-24 はケラチノサイト自らのレセプター (IL-22R1 と IL-20R2 のヘテロダイマー) に結合して、IL-22 と類似の細胞内シグナル伝達を介して細胞を増殖させる。つまり、IL-24 オートクラインよりケラチノサイトの増殖が正に制御される。乾癬病変において IL-24 が高発現しているという報告 (Wang F et al. Br J Dermatol. 167(1):92-102, 2012) があるが、乾癬の病態における IL-24 の役割については更に詳細な検討が必要である。

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 88 件)

- ① Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S,

Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. J Invest Dermatol. 査読有り, [Epub ahead of print] 2013
doi:10.1038/jid.2013.199.

- ② Hirai T, Kanda T, Sato K, Takaishi M, Nakajima K, Yamamoto M, Kamijima R, Digiovanni J, Sano S. Cathepsin K Is Involved in Development of Psoriasis-like Skin Lesions through TLR-Dependent Th17 Activation. J Immunol. 査読有り, 2013 190(9): 4805-11. doi: 10.4049/jimmunol.1200901.
- ③ Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Sano S. Clear association between serum levels of adipokines and T-helper 17-related cytokines in patients with psoriasis. Clin Exp Dermatol. 査読有り, 2013 38(1): 66-70. doi:10.1111/j.1365-2230.2012.04465.x.
- ④ Shiga T, Yokogawa M, Nakajima K, Kitagawa C, Tarutani M, Kumagai N, Sano S. Topical tacrolimus treatment does not facilitate photocarcinogenesis in cancer-prone mice. J Dermatol Sci. 査読有り, 2012 68(2): 112-5. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.08.005.
- ⑤ Tanemura A, Kotobuki Y, Itoi S, Takata T, Sano S, Katayama I. Positive link between STAT3 activation and Th17 cell infiltration to the lesional skin in vitiligo vulgaris. J Dermatol Sci. 査読有り, 2012 67(3): 207-9. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.06.010.
- ⑥ Tarutani M, Nakajima K, Uchida Y, Takaishi M, Goto-Inoue N, Ikawa M, Setou M, Kinoshita T, Elias PM, Sano S, Maeda Y. GPHR-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for the formation of lamellar granules and the skin barrier. J Invest Dermatol. 査読有り, 2012 132(8): 2019-25. doi:10.1038/jid.2012.100.
- ⑦ Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kamijima R, Digiovanni J, Sano S. Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells. Mol Carcinog. 査読有り, 2012 [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/mc.21901.
- ⑧ Takata T, Tarutani M, Zouboulis CC, Sano S. Sebaceous glands as the

- primary target of EGFR-inhibitors in the development of papulopustular eruption. *J Dermatol Sci.* 査読有り, 2012 66(2): 165-8.
doi:10.1016/j.jdermsci.2012.02.012.
- ⑨ Miyoshi K, Takaishi M, Digiovanni J, Sano S. Attenuation of psoriasis-like skin lesion in a mouse model by topical treatment with indirubin and its derivative E804. *J Dermatol Sci.* 査読有り, 2012 65(1): 70-2.
doi:10.1016/j.jdermsci.2011.10.001.
- ⑩ Takata T, Taniguchi Y, Ohnishi T, Kohsaki S, Nogami M, Nakajima H, Kumon Y, Terada Y, Ogawa Y, Tarutani M, Sano S. FDG PET/CT is a powerful tool for detecting subclinical arthritis in patients with psoriatic arthritis and/or psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci.* 査読有り, 2011 64(2): 144-7.
doi:10.1016/j.jdermsci.2011.08.002.
- ⑪ Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Morishige R, Sano S. Kinetics of circulating Th17 cytokines and adipokines in psoriasis patients. *Arch Dermatol Res.* 査読有り, 2011 303(6): 451-5.
doi: 10.1007/s00403-011-1159-3.
- ⑫ Nakajima K, Sano S, Uchida Y, Akiyama M, Morita Y, Shimizu H. Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. *J Dermatol Sci.* 査読有り, 2011 63(1): 64-6.
doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.009.
- ⑬ Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Shiga T, Miyoshi K, Nakajima H, Kamijima R, Tarutani M, Benson JM, Elloso MM, Gutshall LL, Naso MF, Iwakura Y, DiGiovanni J, Sano S. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J Immunol.* 査読有り, 2011 186(7): 4481-9.
doi:10.4049/jimmunol.1000148.
- ⑭ Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Kanda T, Tarutani M, Iiyama T, Asao N, DiGiovanni J, Sano S. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol.* 査読有り, 2011 131(1): 108-17.
doi: 10.1038/jid.2010.255.

[学会発表] (計 398 件)

- ① 佐野栄紀. 乾癬の新規治療法 2012 年 07 月 15 日 第 42 回日本皮膚アレルギー

ー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢プリンスホテル (軽井沢町)

- ② Takaishi M, Nakajima K, Ouyang W, Sano S. Development of psoriasis-like lesions in a mouse model by IL-23-dependent but IL-22-independent. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011 年 12 月 9 日 京都国立国際会館 (京都市)
- ③ Takaishi M, Nakajima K, Ouyang W, Sano S. IL-23 is essential, but IL-22 is dispensable for the development of psoriasis-like lesions in K5.Stat3C mice 41st Annual ESDR Meeting 2011 年 9 月 9 日 Barcelona, Spain
- ④ 高石 樹朗, 中島喜美子, Wenjun Ouyang, 佐野 栄紀. 乾癬マウスモデルにおける IL-23 依存性 IL-22 非依存性シグナルによる皮疹形成. 2011/09/09 第 26 回日本乾癬学会学術大会 大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑤ 高石 樹朗, 片岡 健, Kaoru Kiguchi, Michal Gilliet, 佐野 栄紀, John Digiovanni. K5.Stat3 トランスジェニックマウスに生じる乾癬様皮疹における Plasmacytoid dendritic cells (PDCs) の関与 2010 年 9 月 3 日 第 25 回日本乾癬学会学術大会 宇部全日空ホテル (宇部市)
- ⑥ Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Miyoshi K, Benson JM, Elloso MM, Gutshall LL, Naso MF, Iwakura Y, DiGiovanni J, Sano S. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesion in a mouse model 2010 年 8 月 28 日 14th International congress of immunology 神戸ポートピアホテル (神戸市)
- ⑦ Takaishi M, Yokogawa M, Miyoshi K, Nakajima K, DiGiovanni J, Sano S. STA-21, a stat3 inhibitor, induces differentiation of normal human epidermal keratinocytes and human, keratinocyte derived cell lines. 2010 年 5 月 5 日 70th SID 2010 Annual Meeting, Hilton Atlanta Hotel, Atlanta, U.S.A

[図書] (計 10 件)

- ① 佐野栄紀. 乾癬, 今日の治療指針 2012 年版 (Vol154). 医学書院. 2012, pp1014-1016
- ② 佐野栄紀. 乾癬の動物モデル (遺伝子改変マウス, 皮膚科臨床アセット 10. 中山書店, 2012, pp44-49
- ③ 佐野栄紀, 悪性内皮細胞腫, 瀧川雅浩

- 他編，皮膚疾患最新の治療 2011-2012，
南江堂，2011，pp226-227
- ④ 佐野栄紀，第4節乾癬モデル，疾患モデル
の作製と利用－免疫疾患，株式会社エ
ル・アイ・シー，2011，pp67-76
- ⑤ 佐野栄紀，魚鱗癬，飯塚一編，今日の
治療指針 2010 年版 (Vol. 52)
医学書院，2010，pp967

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：膠原病の病態モデル動物、当該病態モ
デル動物の作製方法、及び当該病態モデル動
物のスクリーニング方法

発明者：佐野 栄紀，横川 真紀，高石 樹朗

権利者：国立大学法人高知大学

種類：特許

番号：特願 2012-074752

出願年月日：2012 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高石 樹朗 (TAKAISHI MIKIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：1 0 3 0 3 2 2 3

(2) 研究分担者

三好 研 (MIYOSHI KEN)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：2 0 2 7 4 3 9 2

(H22 のみ)

中島 喜美子 (NAKAJIMA KIMIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：2 0 4 0 3 8 9 2

佐野 栄紀 (SANO SHIGETOSHI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：8 0 2 7 3 6 2 1