

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790491

研究課題名(和文) RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎の発症機構

研究課題名(英文) Development of psoriasis-like chronic dermatitis in RhoH deficient mice

研究代表者

為広 紀正 (Tamehiro, Norimasa)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：80597881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：RhoHは造血系の細胞に特異的に発現しているRhoファミリー低分子Gタンパク質であり、胸腺内のT細胞分化やT細胞の活性化に必須であることが報告されている。我々は胸腺特異的遺伝子の一つとしてRhoHを単離し、RhoHノックアウトマウスを作製した。このノックアウトマウスの解析結果から、Balb/c背景のマウスでは乾癬様皮膚炎を自然発症することを見出し、皮疹の形成にはT細胞が関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：RhoH, a hematopoietic lineage cell specific atypical small GTPase, plays the critical roles on T cell development and activation. As a specific target gene during thymocytes development, we have focused on RhoH and generated knock-out mice. These mice showed to the spontaneous development of psoriasis-like chronic dermatitis. The psoriatic eruption occurring in RhoH null mice might be dependent on the function of lymphocyte.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：T細胞 乾癬

1. 研究開始当初の背景

欧米では人口の約2~3%が乾癬を発症し、多くの著名人が罹患するなど極めて一般的な慢性皮膚炎として知られている。また、本邦に於いても罹患患者数が年々増加しており、現在十万人以上を数えている。1970年代に免疫抑制剤シクロスポリンが乾癬の治療効果を持つと報告されたことから、乾癬の発症に対するT細胞の寄与が注目された。さらに、近年発見された新たなT細胞サブセットの出現により、IL-17を産生するT細胞の病態における役割が議論されている。しかし、これだけ患者数が多い疾患であっても、皮疹の形成には多種細胞間における複雑な相互作用ネットワークが関与していることから、未だ病因については明確になっていない。

申請者が所属する研究グループでは、胸腺でのT細胞の成熟過程において、特徴的な発現変動が認められる分子として非定型低分子G蛋白RhoHを抽出し、欠損マウスを作成している。このRhoHノックアウトマウスでは、T細胞分化の停滞並びに胸腺のサイズの縮小が認められ、また、RhoHは受容体シグナルの伝達機構において重要な役割を担う事が明らかとなった。このため、RhoH欠損によるT細胞の分化不全が、適応免疫系の崩壊を招き自己免疫疾患等の病態を誘発する可能性が高いと考え、系統の純化(10世代)を行った。Balb/c背景のRhoH欠損マウスにおける表現系を解析してみると、加齢に伴い慢性皮膚炎を高率に自然発症することを見出した。炎症部位には、表皮の肥厚化、棍棒上変化、微小膿瘍の形成、好中球やT細胞の稠密な炎症性細胞浸潤等が認められ、あたかもヒト乾癬の病理像のような特徴的な病理所見が観察された。

過度の炎症応答の継続は慢性的な炎症性疾患の原因となる。このため、免疫システムの行き過ぎた応答を抑制するため、自己反応性T細胞の働きを抑える制御系T細胞Tregは、炎症応答の沈静化において極めて重要な働きを示す。ヒト乾癬患者では、そもそもTreg機能が健康人と比べ低下している事、更に、乾癬の治療によってTreg細胞数が増加する事が報告されていることから、乾癬病態においてもTregは非常に重要な役割を担う事が考えられる。このため、乾癬におけるTregの機能を理解し、その働きを人為的に制御する試みは新たな乾癬の治療戦略の開発において重要であると考えられた。

2. 研究の目的

(1)RhoH欠損マウスが乾癬特有の特徴を再現しているかについて、モデル動物としての有用性を検証する。特に、表皮の肥厚並びに炎症性細胞の浸潤 ヒト乾癬患者で認められる応答性との比較 発症の原因となる細胞の同定に関する理解を目指す。

(2)本研究の成果により、RhoHと免疫疾患との関わりを明らかにし、乾癬に対する新しい治療戦略を提案することを目的とする。具体的には、RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎が、制御系T細胞の機能低下、或いは絶対数の減少に伴う事象であるかを検討し、野生型のTreg移入により病態の進行が改善できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1)RhoH欠損マウスの乾癬モデルとしての有用性

RhoH欠損マウスにおいて、皮疹病変の免疫組織化学的性質を調べ、どのような炎症性細胞が浸潤しているか?表皮の増殖が認められるか?について確認する。詳細には、炎症が認められる病変部位の組織凍結切片を作成し、免疫染色法による細胞の同定並びに細胞状態の把握を行う。また病変部位に浸潤している細胞を解析し、増減が認められるサイトカイン産生細胞を探索する。

外傷(テープストリッピングによる角質の除去)により炎症反応を惹起し、乾癬様症状が誘発されるかを確認する。(ケプネル現象)

成熟T並びにB細胞が存在しないRAG欠損マウス、及びT細胞特異的にRhoHを発現するトランスジェニックマウスを用いて乾癬様皮疹の形成に与える影響について検討する。

(2)乾癬治療に対する細胞移植の有効性評価

RhoH欠損マウスで認められる乾癬様病態の進行は野生型マウス由来の正常なTreg(CD4/CD25陽性)細胞により抑制または根治できる」という仮説を検証するため、野生型Treg細胞をRhoH欠損マウスに尾静注し、乾癬様病態の退縮を観察する。この際、RhoH欠損マウスの皮膚炎発症に関わる時間的制約は、ザイモザンの腹腔投与によって比較的短時間で病態を形成することにより解消し、効率的に解析を進める。

4. 研究成果

(1) 遺伝子背景をBALB/c系統に統一したRhoH欠損マウスでは、SPF環境飼育下において、眼瞼腫脹が認められる。肉眼所見による判定から、RhoH欠損マウスでは加齢に伴い有意な炎症病態の進行が観察される事が分かった。そこで、腫脹が認められた部位の免疫組織化学的性質を調べたところ、RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮疹にはCD4陽性細胞や好中球が浸潤しており、またケラチノサイトの増殖促進によって表皮が肥厚している事が明らかとなった。更に、このCD4陽性細胞にはIL17を産生するTh17細胞が含まれており、また、RhoH欠損マウスの各リンパ節においてもTh17細胞の頻度は有意に増加していた。

テープストリッピングによる非炎症部位での角質除去はケプネル現象を誘発し、RhoH

欠損マウスの炎症所見はヒト乾癬患者における診断基準を満たしていた。

成熟 T 細胞と B 細胞を欠く Rag2 欠損マウスに RhoH 欠損マウスを交配し、乾癬様皮疹の形成を観察したところ、RAG2/RhoH dKO マウスにおいて皮膚炎の発症は抑制された。従って、本病態は T 細胞か B 細胞、或いは両方の細胞集団によって齎される疾患であると考えられた。そこで次に T 細胞のみで発現が誘導される RhoH トランスジェニックマウスを RhoH 欠損マウスと交配し、T 細胞のみで RhoH の発現が回復したマウスを作成した。この RhoH^{-/-};Tg マウスにおいても病態の進行は阻害され、RhoH 欠損マウスで認められる乾癬様皮疹は T 細胞機能に起因することが示された。

(2) RhoH 欠損マウス中に存在する制御性 T 細胞 (Treg) の機能並びに総数はいずれも野生型に比べ低下していた。そこで、RhoH 欠損マウスをレシピエントとし、野生型並びに RhoH 欠損マウス由来 Treg 細胞を尾静注したマウスにおいて病態の退縮を観察した。しかし、申請者の仮説に反し、野生型の Treg を移入しても有為な病態の改善は認められず、本マウスを用いた実験系において Treg 移入による病態の治療効果はないと示唆された。

以上、本研究によって RhoH 欠損マウスはヒト乾癬患者と酷似した病理所見を示し、モデル動物として乾癬治療法の開発に役立つものと考えられる。今回、制御系 T 細胞移植による病態の改善効果は認められなかったが、本マウスを用いた新規治療法の開発には、更なる検証が必要とされる。また、本解析によって得られた情報は、抗原シグナルを制御する分子の欠損によって乾癬様病態が発症するという初めての知見であり、乾癬病態の解明にも有用であると予想された。

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 2 件)

Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H. Differential function of Themis CABIT domains during T cell development. PLoS One. 2014 Feb 21;9(2):e89115.
doi: 10.1371/journal.pone.0089115.

Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Hayakawa K, Suzuki H. Differential requirement for RhoH in development of TCR CD8 IELs and other types of T cells. Immunol Lett. 2013 Mar;151(1-2):1-9.
(査読有)
doi: 10.1016/j.imlet.2013.02.007.

[学会発表](計 3 件)

Norimasa Tamehiro, Post-translational regulation of RhoH via the proteasomal pathway. 99th Annual Meeting The American Association of Immunologists. 6May2014 Boston

Norimasa Tamehiro, TCR-dependent proteasomal degradation of RhoH in CD4CD8 double positive thymocytes. 日本免疫学会総会 2012 年 1 月 2 日 神戸

Norimasa Tamehiro, A non-synonymous SNP variant of RhoH reduces TCR mediated signal transduction via proteasomal degradation. 日本免疫学会総会 2013 年 1 月 11 日 幕張

[図書](計 0 件)

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

為広 紀正 (TAMEHIRO, Norimasa)
国立国際医療研究センター 上級研究員
研究者番号: 80597881

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 協力研究者

鈴木 春巳 (SUZUKI Harumi)
国立国際医療研究センター 部長
研究者番号 : 70235985