

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791189

研究課題名(和文) 尋常性乾癬の病態形成における皮膚樹状細胞の機能解明

研究課題名(英文) Investigation on the mechanisms of skin residual dendritic cells in the development of psoriasis vulgaris.

研究代表者

吉木 竜太郎 (YOSHIKI, Ryutaro)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30412646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性乾癬は免疫学的失調に伴う皮膚のケラチノサイトが過剰に増殖する疾患である。皮膚に存在するランゲルハンス細胞は皮膚に存在する免疫担当細胞であることが知られている。今回我々はTh17に関連するランゲルハンス細胞とガンマデルタT細胞に着目し検討を行ったところ、ランゲルハンス細胞を消去したマウスでは乾癬様の变化は有意に減少した。またランゲルハンス細胞を消去したマウスではTh17に関連したサイトカインの減少も観察された。これらの結果よりランゲルハンス細胞がイミキモドを用いた乾癬様皮疹の形成に必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disease that involves dysregulated interplay between immune cells and keratinocytes. Langerhans cells (LCs) are a subset of dendritic cells that reside in the epidermis and regulate immune responses. In this study, we focused on Th17-related factors and assessed the role of LCs and gamma-delta T cells in the development of psoriasis using a mouse psoriasis model triggered by topical application of imiquimod (IMQ). Langerhans cell depletion by means of diphtheria toxin (DT) in Langerin DT receptor-knocked-in mice suppressed hyperkeratosis, parakeratosis and ear swelling in the IMQ-treated regions. In addition, LC-depleted mice showed decreased levels of Th17-related cytokines in IMQ-treated skin lesions. These results suggest that LCs are required for the development of psoriasis-like lesions induced by IMQ in mice.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：尋常性乾癬 ランゲルハンス細胞 ガンマデルタT細胞 Th17 IL-23 IL-17

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は皮膚科日常診療において比較的多く眼にする疾患である。特徴のある皮疹が消退を繰り返し、患者にとっては日常生活の質の低下を招くという意味で非常に問題となる疾患の一つとして挙げられる。尋常性乾癬に対しては、ステロイド外用剤、活性型ビタミン D3 外用剤および紫外線療法を主とした治療を行う。近年では生物学的製剤の導入も開始されるようになったが、未だ根治療法の確立していない疾患である。尋常性乾癬の皮疹においては表皮角化細胞の著明な増加が見られるほか、CD4 陽性、CD8 陽性 T リンパ球の浸潤も認める。つまり尋常性乾癬は表皮そのものの異常ではなく皮膚における何らかの免疫学的変調が大きな原因となっていることが現在では明らかとなっている。近年、Th17 陽性細胞の関与、IL-23 の関与など免疫学的な立場からの尋常性乾癬の病態解明が徐々に進みつつある。

申請者はこれまで皮膚における免疫抑制に関して研究を行ってきた。その中で、マウス皮膚に紫外線 B (UVB) を照射した場合における抗原特異的免疫抑制には、紫外線照射によるランゲルハンス細胞が IL-10 産生かつ OX40 ligand を発現するようになり、所属リンパ節において抗原特異的調節性 T 細胞を誘導することを明らかにした。また、これは紫外線照射のみならず、植皮という皮膚に大きなストレスがかかる状態でも同様にランゲルハンス細胞から IL-10 が産生されることを明らかにしてきた (Yoshiki et al. J Immunol 2010)。

2. 研究の目的

皮膚科領域において紫外線療法尋常性乾癬のみでなく、アトピー性皮膚炎・皮膚リンパ腫など多くの疾患の適応となる。しかし、外用療法、内服療法が第一選択となる場合が多くまた長期間にわたる加療が必要である。近年生物学的製剤も徐々に普及しつつあるが、薬価が非常に効果であり、患者にかかる経済的負担、通院などの肉体的負担も非常に大きく、何より尋常性乾癬は臨床像においても患者に多大な精神的負担をかけることが多い。そこで申請者は尋常性乾癬と皮膚における免疫担当細胞の一つである樹状細胞の役割解明を第 1 の目的とする。樹状細胞、特に皮膚においてはその最前線

で抗原提示や免疫調整を担っている非常に重要な細胞であり、その樹状細胞と尋常性乾癬の病態との関連性を明らかにすることで、現在行われている治療法以外でさらに効果的な治療への応用につなげることを最終的な目標とする。平成 24、25 年度の科研費交付期間内に以下の 2 つを明らかにしたい。

- (1) : 尋常性乾癬の病態成立に関わる皮膚樹状細胞の同定 (平成 24 年)
- (2) : 尋常性乾癬に関わる皮膚樹状細胞の機能抑制とそれによる尋常性乾癬の病態コントロール (平成 25 年)

3. 研究の方法

- (1) 尋常性乾癬の病態成立に関わる皮膚樹状細胞の同定

近年皮膚における免疫担当細胞は、ランゲルハンス細胞、ランゲリン陽性真皮樹状細胞、ランゲリン陰性真皮樹状細胞が知られている。それぞれが尋常性乾癬の皮疹形成にどのように関わっているか詳細な機序は不明である。そこで、尋常性乾癬モデルマウスを作成する中で、それぞれの樹状細胞を特異的に消去することで尋常性乾癬の皮疹にどのような影響を与えるか検討する。

【方法】

ジフテリアトキシンを投与することで、ランゲルハンス細胞を含むランゲリン陽性の樹状細胞を特異的に消去できるマウス (Langerin-DTR knocked in mice) を用いる。IL-23 を皮膚に投与すると、投与部位に尋常性乾癬と同様の皮疹が形成されることが知られている。

マウスの耳介皮膚に IL-23 を皮下注射する。これを 4 日ごとに 4 回繰り返し、耳介に尋常性乾癬の皮疹を形成させる。予めジフテリアトキシンを投与しておく、ランゲルハンス細胞およびランゲリン陽性真皮樹状細胞が消去され、皮膚にはランゲリン

陰性真皮樹状細胞のみが存在することとなる。また、ジフテリアトキシン投与後5日目にはランゲリン陽性真皮樹状細胞のみ神秘に再分布することが知られており、この状態で皮膚にIL-23を投与することでランゲルハンス細胞のみが存在しない状態での尋常性乾癬の病態が検討できる。

尋常性乾癬に関わる皮膚樹状細胞の機能抑制とそれによる尋常性乾癬の病態コントロール

平成24年度に得られた知見をもとに、尋常性乾癬の病態に関与している皮膚樹状細胞とその与える影響を検討し、*in vitro*でその機能を変化させたものをマウスに投与し尋常性乾癬のコントロールができるか検討する。

【方法】

平成24年の結果をもとに、*in vitro*で皮膚樹状細胞を紫外線もしくはサイトカインを投与することで、尋常性乾癬抑制性のDCへ変化させマウス腹腔内へ投与。その後、耳介皮膚にIL-23を投与することでマウス皮膚における尋常性乾癬の皮疹をコントロールする。

尋常性乾癬の皮疹の程度は以下の6項目をもとに評価を行う。

1. 表皮の厚さ
2. 不全角化の有無
3. 表皮のケラチン6などの免疫染色によるケラチン発現の違い
4. リンパ球の浸潤の程度
5. 皮膚組織中のサイトカイン量
6. 血液中のサイトカイン量

4. 研究成果

(1): ランゲルハンス細胞を消去すると乾癬様皮疹の形成が抑制される

ランゲリンDTRマウスにジフテリア毒素を投与するとランゲリン陽性細胞のみが特異的に消去される。ジフテリア毒素投与から10日するとランゲリン陽性の神秘樹状細胞のみが再分布することが知られている。この状態でランゲルハンス細胞のみが

消去された状態のマウスを作製することができる。コントロールマウスとランゲルハンス細胞のみが消去されたマウスそれぞれにイミキモドを5日間外用すると、コントロールマウスでは耳介の腫脹、炎症細胞浸潤、角層の増殖など尋常性乾癬様の皮疹がみられるが、ランゲルハンス細胞が消去されたマウスではこれら乾癬様変化が優位に抑制された。また細胞増殖活性の指標であるKi-67陽性細胞、乾癬発生時に観察されるStat3陽性細胞もそれぞれ優位に減少していた。これらの結果より、ランゲルハンス細胞が乾癬皮疹形成に重要であることが示唆された。

(2): ランゲルハンス細胞を消去すると乾癬形成に重要とされるサイトカインの産生が抑制される

ランゲルハンス細胞を消去したマウス、コントロールマウスにそれぞれ5日間イミキモドクリームを外用し、6日目の皮膚からmRNAを採取して乾癬形成に重要であるとされるIL-23, IL-17, IL-22, TNF- α の産生をリアルタイムPCR法で検討した。ランゲルハンス細胞を消去したマウスではこれらサイトカインの産生が優位に減少していることがわかった。

(3): イミキモド外用時、皮膚でIL-23を産生するのはランゲルハンス細胞である。

乾癬皮疹初期に重要であるとされるサイトカインにIL-23がある。イミキモド外用時、皮膚においてIL-23を産生している細胞を検討するため、イミキモドを5日間外用した皮膚を酵素処理し、細胞浮遊液を作成。フローサイトメトリーを用いて細胞内サイトカインの産生を検討したところ、イミキモド外用後の皮膚においてIL-23を産生している細胞はランゲルハンス細胞であることが解明された。

(4): ランゲルハンス細胞を消去すると乾癬形成に重要であるIL-17A産生性CCR6陽性ガンマデルタT細胞の表皮への浸潤が抑制される。

過去の報告により皮膚に存在するガンマデルタT細胞から産生されるIL-17Aが乾癬の皮疹誘導に大きくかかわっていることが示されている。ランゲルハンス細胞とガンマデルタT細胞との関連を調べるため、コントロールマウスとランゲルハンス細胞を消去したマウスにイミキモドを5日間外用し、真皮・表皮それぞれにみられるガンマデルタT細胞のサブセットをフローサイトメトリーで検討した。ランゲルハンス細胞を消去したマウスでは表皮に浸潤するガンマデルタT細胞の数が優位に減少していることがわかった。またこの表皮に浸潤するIL-17A産生性ガンマデルタT細胞はCCR6陽性であることも併せて確認された。

(5) : ランゲルハンス細胞はイミキモド外用後、所属リンパ節において IL-23 を産生する。

イミキモドを用いたマウスモデルでは所属リンパ節において IL-17A 産生性ガンマデルタ T 細胞の増殖が確認されている。また、IL-23 とリンパ節細胞を共培養すると IL-17A 産生性ガンマデルタ T 細胞の増殖が生じることも過去報告されていた。所属リンパ節における IL-23 の産生細胞を調べるためイミキモド外用後の所属リンパ節細胞をフローサイトメトリーで検討したところ、所属リンパ節における IL-23 産生性細胞はランゲルハンス細胞であることがわかった。

(6) : 皮膚におけるランゲルハンス細胞が IL-17A 産生性ガンマデルタ T 細胞を誘導している。

イミキモド外用後の皮膚において IL-23 を産生するランゲルハンス細胞が皮膚由来であるかどうかを検討するため、IL-23 ノックアウトマウスを用いた。ランゲルハンス細胞は放射線に対する耐性があることがわかっている。そこで野生型マウスに放射線を照射したのち、IL-23 ノックアウトマウス由来の骨髓細胞を移植すると皮膚のランゲルハンス細胞のみが IL-23 を産生し、リンパ節・血球細胞は IL-23 を産生しない状態のマウスを作製することができる。同様に IL-23 ノックアウトマウスに放射線を照射し、野生型マウスの骨髓を移植すると皮膚のランゲルハンス細胞は IL-23 を産生せず、リンパ節・血球細胞は IL-23 を産生するマウスが作成される。これらのマウスに対してイミキモドを外用し乾癬様皮疹の生じ方を耳介圧を測定することで検討すると、野生型マウスと同様の耳介腫脹を示したのは野生型マウスに IL-23 ノックアウトマウス由来の骨髓を移植したマウスのみであった。以上の結果より皮膚由来のランゲルハンス細胞が所属リンパ節において IL-23 を産生し、IL-17A 産生性ガンマデルタ T 細胞を誘導することが解明された。

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 1 件)

IL-23 from Langerhans cells is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17A-Producing gamma-delta T cells.

Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y and Nakamura M
Journal of Investigative Dermatology
2014 Feb 25 (in press)

査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
特記事項なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉木 竜太郎 (YOSHIKI Ryutro)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号 : 30412646

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし