

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461685

研究課題名(和文) IRF5の皮膚炎症における役割と悪性黒色腫

研究課題名(英文) The role of IRF5 in cutaneous inflammation and malignant melanoma

研究代表者

門野 岳史 (Kadono, Takafumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80292910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IRF5は生体防御に不可欠な分子で、様々な炎症性サイトカイン産生を誘導し、免疫におけるTh1型反応とTh2型反応とを調節する。本研究ではIRF5がどのように皮膚の炎症を制御するかに関して接触皮膚炎のモデルを利用して検討した。IRF5欠損マウスでは感作相の異常によりTh1型反応が減弱する一方、Th2型反応は逆に増強した。感作相では樹状細胞が重要であるが、IRF5欠損樹状細胞ではIL-12の発現が低下し、これがTh1型反応の減弱に繋がると考えられた。また、Th2反応を誘導する樹状細胞数が増加することが分かり、これがTh2型接触皮膚炎の増強に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：IRF5 is critical for immunity and induce the production of various inflammatory cytokines to regulate Th1-Th2 balance. In this study, we investigated the role of IRF5 for cutaneous inflammation using contact hypersensitivity model. In IRF5 deficient mice, Th1-type immune responses were significantly reduced, whereas Th2-type immune responses were significantly augmented due to the abnormality in sensitization phase. Dendritic cells are critical for sensitization and inducing immune responses. IRF5-deficient dendritic cells express less IL-12, which presumably leads to reduced Th1-type immune responses. In addition, the number of dendritic cells known to induce Th2-type immune responses were significantly augmented, which might cause increased Th2-type contact hypersensitivity. Thus, IRF5 is critical for balancing Th1-Th2 immune responses.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：IRF5 接触皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

皮膚における炎症は生体の恒常性の維持に不可欠である。皮膚は様々な感染に対して生体防御の最前線にあることに加えて、悪性黒色腫などの皮膚悪性腫瘍の発育を阻止しなければならない。また、その一方で過剰な免疫応答は接触皮膚炎、感染、アトピー性皮膚炎など様々な皮膚疾患に繋がる。皮膚における炎症は様々なサイトカイン、ケモカインによって多様な形態をとる。例えば CD4 陽性 T 細胞を例に挙げると古典的には IL-12 及び IFN- γ 産生を主徴とする Th1 細胞および IL-4、IL-5、IL-13 が反応の主体となる Th2 細胞に加え、IL-17 産生を特徴とする Th17 細胞、IL-22 が中心の Th22 細胞、IL-9 産生によって定義される Th9 細胞などが明らかになってきた。また、抑制性 T 細胞を主体とする抑制系の反応も複数存在し、これらの反応が単独、若しくは複合することにより皮膚の炎症が構成されてくる。このような、様々な皮膚の炎症の構成要素がどのように制御されているかについては未だ明らかではなく、皮膚の炎症の最適化により、感染、癌、炎症性皮膚疾患の治療に繋がると考えられる。

Interferon regulatory factor (IRF) ファミリーは type I インターフェロンを制御する転写因子として同定され、ウイルスなどの外敵に対する生体防御に不可欠な役割を果たしている。IRF ファミリーの一員である IRF5 は樹状細胞、マクロファージ、B 細胞などの血球細胞に主として発現し、type I インターフェロンの誘導に加えて、Toll like receptor-MyD88 のシグナルカスケードを制御し、IL-12p40、IL-6、および TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を調節する (Takaoka A, et al. Nature 2005)。IRF5 は IL-12p40 の転写を誘導することにより細菌感染に対して重要な役割を果たすが、この作用はウイルス感染に伴う IRF3 によって拮抗される (Negishi H, et al. Nat Immunol 2012)。また、Leishmania 感染においては感染防御に不可欠な Th1 反応を誘導し、Th1 型反応と Th2 型反応とを調節することが知られている (Paun A, et al. PLoS Pathogens 2011)。更に IRF5 は Fas 依存性のアポトーシスの誘導にも関わることが知られている (Couzinet A, et al. Proc Natl Acad Sci USA

2008)。一方で、IRF5 は全身性エリテマトーデス (Han JW, et al. Nat Genet 2009)、全身性強皮症 (Radstake TR, et al. Nat Genet 2010)、関節リウマチ (Stahl EA, et al. Nat Genet 2010)、潰瘍性大腸炎 (Anderson CA, et al. Nat Genet 2011) などの自己免疫性炎症性疾患に全ゲノム関連解析によって関連付けられ、IRF5 が様々な病態に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。実際、全身性エリテマトーデスのモデルマウスにおいて IRF5 の欠損により症状が改善することが知られ、その要因として病原性を有する IgG2a サブタイプの自己抗体産生の減少 (Savitsky DA, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2010) やケモカインの産生減少に伴う plasmacytoid dendritic cell の遊走低下が挙げられている (Xu Y, et al. J Immunol 2012)。更には、悪性黒色腫においても IRF5 の遺伝子多型と免疫療法の効果との関連が報告されており (Uccellini L, et al. J Transl Med 2012)、IRF5 の腫瘍免疫への関与も想定される。しかしながら、皮膚の炎症における IRF5 の役割については未だ明らかではないことより、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は炎症性サイトカイン産生および type I インターフェロンの誘導を通じて Th1 型反応と Th2 型反応を調節する IRF5 がどのように皮膚の炎症を制御するかについて明らかにすることである。本研究では皮膚の炎症として 2 つのモデルを用いる。1 つは炎症制御の側面から接触皮膚炎モデルを用いて IRF5 の役割について樹状細胞などの細胞に焦点を当てて主として欠損マウスを用いて解析する。もう 1 つのモデルとしては生体防御の側面から悪性黒色腫腫瘍細胞の接種を行い、腫瘍免疫について検討する。

3. 研究の方法

炎症制御の側面からは接触皮膚炎モデルを用いる。野生型マウス、IRF5 欠損マウスに対して、主として Th1 型反応を誘導する DNFB 若しくは Th2 型反応を誘導する FITC などを用いて接触皮膚炎を惹起し、反応の違いを評価する。また、どの血球細胞に発現している IRF5 が重要かどうかについて

主として養子移入を用いて評価する。生体防御の側面からは悪性黒色腫瘍細胞を接種するモデルを用いる。同じく、野生型マウス、IRF5 欠損マウスに B16 悪性黒色腫瘍細胞を接種した後の腫瘍の出現頻度、成長速度を計測する。更に、腫瘍病変への好中球、リンパ球、組織球、肥満細胞などの炎症細胞浸潤を検討する。また、腫瘍細胞の増殖を抑制もしくは促進させると考えられるサイトカインなどの発現や産生を検討する。同じくどの血球細胞に発現している IRF5 が腫瘍免疫に重要かどうかについて主として養子移入を用いて評価する。以上の検討によって炎症および腫瘍免疫における IRF5 の役割について明らかにしていく。

4. 研究成果

腫瘍免疫に関しては、悪性黒色腫瘍細胞を耳介や背部に皮下注射する系を用いた。背部には 100 万個、耳介には 50 万個の腫瘍細胞を接種した。腫瘍細胞としては B16F1 と B16F10 を用いた。腫瘍の大きさの評価は接種後 2 週間を目安として行った。腫瘍細胞の大きさは IRF5 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加していた。その後、他の研究室で先行して結果が得られていたことが判明したため、この先の解析に関しては行わず、炎症制御の側面から接触皮膚炎モデルを用いた検討を主体に行うことにした。まず IRF5 欠損マウスおよび野生型マウスに Th1 型反応を主体とする接触皮膚炎を検討する目的で、腹部に DNFB を 2 日連続で塗布し、5 日後に片耳に DNFB を塗布して惹起を行い、経時的に耳の腫脹を対側の耳と比較して、耳介の厚さを測定した。すると IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して耳介の腫脹が有意に軽減していた。また、耳介における浸潤細胞の数を計測したところ、IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して白血球数が有意に減少していた。

一方、Th2 型反応を主体とする接触皮膚炎を検討する目的では FITC を塗布して同様に感作と惹起を行った。驚いたことに FITC 塗布の場合は DNFB 塗布の場合と結果が逆転し、IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して耳介の腫脹が有意に増強していた。同様に耳介における浸潤細胞の数を計測したところ、IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して

白血球数、肥満細胞数いずれもが有意に増加していた。また、一次刺激性皮膚炎を検討する目的でクロトン油の塗布も行ったが、IRF5 欠損マウスと野生型マウスとの間に差は見られなかった。

次に DNFB 惹起後の耳介におけるサイトカインの発現を real-time PCR 法を用いて検討したところ、IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して IFN- γ 、TNF- α といった主として Th1 型反応に寄与するサイトカインの発現が有意に減少していた。一方で、FITC 惹起後の耳介におけるサイトカインの発現を同様に検討したところ、IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 といった主として Th2 型反応に寄与するサイトカインの発現が有意に増強していた。

次に, adoptive transfer の実験を行った。DNFB 感作後の所属リンパ節よりリンパ球を回収し、未感作のマウスに静脈注射した後、DNFB で惹起を行い、耳介の腫脹を評価した。野生型マウスの DNFB 感作リンパ球を野生型マウスに移入し惹起を行った場合は通常の場合と同様に耳介の腫脹がみられたが、IRF5 欠損マウスの DNFB 感作リンパ球を野生型マウスに移入した場合は耳介の腫脹は有意に減弱していた。一方、IRF5 欠損マウスの DNFB 感作リンパ球を IRF5 欠損マウスに移入した場合は予想どおり耳介の腫脹は有意に減弱したのに対して、野生型マウスの DNFB 感作リンパ球を IRF5 欠損マウスに移入した場合は通常の場合と同様に耳介の腫脹がみられた。さらに FITC を用いて同様の実験を行ったところ、DNFB の場合と全く逆の結果が得られた。従って、IRF5 欠損マウスにおいて DNFB による接触皮膚炎が減弱するのは感作相に問題があるためと考えられた。

次に IRF5 欠損マウスの感作相において何故 DNFB による接触皮膚炎が減弱する一方で、FITC による接触皮膚炎は増強するかについて検討を行った。感作相においては、抗原提示細胞がどのように抗原特異的 T 細胞を活性化させるのかが Th1 型反応と Th2 型反応のバランスに重要である。表皮内のランゲルハンス細胞数を検討したところ、IRF5 欠損マウスと野生型マウスの間に差は見られなかった。また、皮膚所属リンパ節における抗原提示細胞の数に差はみられず、CD80 や CD86 といった細胞表面マーカーの発現にも差はみられ

なかった。また、抗原提示細胞とT細胞との共培養では、DNBS添加下ではIRF5欠損抗原提示細胞用いた場合にT細胞増殖能減弱が見られたのに対し、FIT添加下では逆にIRF5欠損抗原提示細胞はT細胞の増殖能が亢進しており、抗原提示細胞の質的な異常が関与していると考えられた。さらに、Th1反応の代表的なサイトカインであるIL-12の発現に関してフローサイトメトリーを用いて確認したところ、IRF5欠損樹状細胞はIL-12サイトカインの発現が低下しており、これがIRF5欠損マウスにおけるTh1型反応の減弱に繋がると考えられた。また、近年Th2反応を誘導する樹状細胞のマーカーとしてMGL2とPDL2が報告されている。IRF5欠損マウスにTh2型反応を起こすと、所属リンパ節にこれらの細胞表面分子を発現するPDL2+ MGL2+ CD103- CD11c+の樹状細胞が増加することが分かり、これがIRF5欠損マウスにおける、Th2型接触皮膚炎の増強に繋がると考えられた。

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4件)

- 1) Toyama T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Shudo K, Sato S, Kadono T: Tamibarotene Ameliorates Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis by Modulating Phenotypes of Fibroblasts, Endothelial Cells, and Immune Cells. *J Invest Dermatol* 136(2): 387-398, 2016. 査読有り
- 2) Ichimura Y, Asano Y, Akamata K, Noda S, Taniguchi T, Takahashi T, Toyama T, Tada Y, Sugaya M, Sato S, Kadono T: I Progranulin overproduction due to Fli1 deficiency contributes to the resistance of dermal fibroblasts to tumor necrosis factor in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 67(12): 3245-3255, 2015. 査読有り
- 3) Kadono T, Tomita M, Tamaki Z, Sato S, Asano Y: Serum levels of anti-Fc receptor IIB/C antibodies are increased in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol* 41(11): 1009-1012, 2014. 査読有り
- 4) Yamada D, Kadono T, Masui Y, Yanaba K, Sato S: α 7 Integrin controls mast cell recruitment, whereas α E integrin modulates the number and function of CD8+ T cells in immune complex-mediated

tissue injury. *J Immunol*, 192(9): 4112-4121, 2014. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 市村洋平, 門野岳史, 遠山哲夫, 山田大資, 増井友里, 佐藤伸一: IRF5はTh1型接触皮膚炎を誘導しTh2型接触皮膚炎を抑制する. 第42回日本臨床免疫学会総会 2014年9月25-27日, 京王プラザホテル(東京都新宿区).
- 2) 市村洋平, 門野岳史, 遠山哲夫, 山田大資, 増井友里, 佐藤伸一: 転写因子IRF5が接触皮膚炎に与える影響について. 第41回日本臨床免疫学会総会 2013年11月27-29日, 海峡メッセ下関(山口県下関市).

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

門野 岳史 (KADONO, TAKAFUMI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80292910

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし