

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461700

研究課題名(和文) 乾癬に関わるランゲルハンス細胞の役割：モデルマウスを用いた解析

研究課題名(英文) A role for Langerhans cells in psoriasis: analysis of mouse model

研究代表者

山本 真有子 (Yamamoto, Mayuko)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：20423478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬モデルマウス(K5.Stat3C)を用いて乾癬発症におけるランゲルハンス細胞(LC)の役割について検討した。K5.Stat3Cマウスの皮膚所属リンパ節LCの数は正常マウスと比較して増加しており、Stat3Cが活性化した表皮においてLCが活性化し、リンパ節へ遊走しやすいことを示唆した。TPA外用による皮疹誘導時にはさらにLCの遊走が増加し、他の樹状細胞とともにIL-23を産生した。Langerin-eGFP-DTRマウスを用いて検討したところ、真皮Lang陽性細胞の有無に関わらずLCが除去された条件下では皮疹の誘導が完全に抑制され、乾癬様病変の成立にLCが不可欠であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the role for Langerhans cells (LCs) in psoriasis. Compared with control mice, psoriasis-prone K5.Stat3C mice, whose keratinocytes exhibited active Stat3, showed increased number of langerin(+) cells in the skin-draining lymph nodes (SdLN), suggesting LCs with a tendency of emigration from the epidermis under the influence of Stat3 activated-keratinocytes. They developed psoriasis by topical TPA treatment, which further enhanced LC migration. Skin lesion was attenuated when LCs were inducibly depleted, strongly suggesting that LCs were essential for psoriasis development. There were increased number of IL-23 producing-LCs and other DCs in SdLN cells when treated with TPA. Collectively, our study indicates that Stat3 activation of keratinocytes lead to LC activation and emigration to SdLN, which process is essential for psoriasogenesis through producing cytokines such as IL-23.

研究分野：皮膚科学

キーワード：尋常性乾癬 ランゲルハンス細胞

1. 研究開始当初の背景

乾癬の病態形成は表皮と免疫系の病的クロストークによって成立する。免疫系として抗菌ペプチドなどの刺激による樹状細胞の活性化によるサイトカイン産生(自然免疫)およびそれに引き続く IL-23/Th17 軸の活性化(獲得免疫)が考えられている。表皮側の一次的要因の1つとしては皮膚バリア破綻が想定されており、表皮バリア維持に関わる遺伝子が疾患感受性遺伝子に同定された(Trend Genet 2010; 26: 415)。我々はセラミド合成酵素 (serine palmitoyl transferase:SPT)の遺伝子を表皮細胞特異的に破壊したマウス(K5.SPT-KO マウス)において、バリア破綻とともに乾癬病変類似の皮膚病変を自然に発症し、病変部ではランゲルハンス細胞が形態学的にも機能的にも活性化している所見を得た(J Invest Dermatol 2013; 133: 2514)。一方、乾癬モデルマウス(K5.Stat3C トランスジェニックマウス)はテープストリッピングによるバリア破壊で乾癬に酷似する皮疹を誘発でき、この皮疹はヒトの乾癬同様 IL-23/Th17 軸依存性であった。しかし、このマウスにおけるランゲルハンス細胞の役割は不明であった。ランゲリン DTR ノックインマウス(Langerin DTR KI)は、ジフテリア毒素(DT)投与によりランゲルハンス細胞および真皮ランゲリン陽性細胞を消失させることができる。このマウスを K5.Stat3C トランスジェニックマウスと交配することにより、乾癬様病変とランゲルハンス細胞の関わりを明らかにする。

2. 研究の目的

K5.Stat3C トランスジェニックマウスの乾癬様皮疹形成におけるランゲルハンス細胞の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

K5.Stat3 トランスジェニックマウスと Langerin DTR KI マウスを交配したマウスにおける乾癬様皮疹についての解析をおこなう。

(1) ヒトの乾癬皮疹部および K5.Stat3C マウスに TPA 塗布により誘導した乾癬様皮疹におけるランゲルハンス細胞の活性化について免疫染色により形態学的に評価する。

(2) K5.Stat3C マウスにおいて、皮膚所属リンパ節へのランゲルハンス細胞の遊走について評価する。所属リンパ節における IL-23 産生樹状細胞の存在をフローサイトメトリ解析にて評価する。

(3) ランゲリン DTR ノックインマウスにおいて、DT 投与後の表皮内、真皮内のランゲリン陽性細胞の経時的变化を免疫染色にて評価する。

(4) DT 投与した K5.Stat3C:ランゲリン DTR マウスを用いて、TPA による乾癬様皮疹の形成について組織学的に評価する。DT 投与 4 日後および 12 日後について評価する。

(5) DT 投与 4 日後のランゲリン DTR マウス耳介に TPA 塗布し、塗布部および所属リンパ節における Th17 系サイトカイン等の m-RNA 発現レベルを rtRT-PCR により解析する。

4. 研究成果

(1) ヒトの乾癬皮疹部を抗 CD1a 抗体で免疫染色したところ、健常皮膚と比較してランゲルハンス細胞が活性化していた(図 1a)。K5.Stat3C マウスの耳介に TPA を塗布して誘導した乾癬様皮疹においても、抗 CD207 抗体による免疫染色にて、ランゲルハンス細胞が活性化していることが確認された(図 1b)。

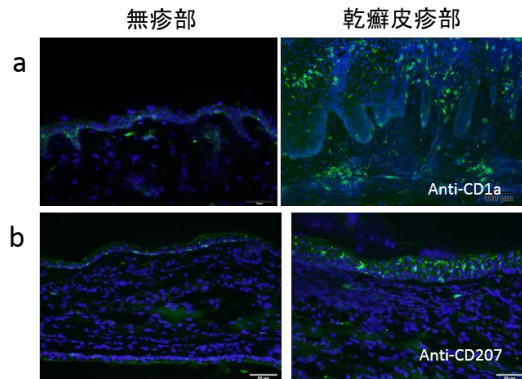


図1

(2) 野生型マウスと K5.Stat3C マウスをそれぞれ TPA 処置群と無処置群にわけ、所属リンパ節に遊走した細胞をフローサイトメトリ解析した。皮膚から遊走した樹状細胞(CD11c+CD40+細胞)中のランゲルハンス細胞(CD207+CD326+細胞)を観察したところ、K5.Stat3C マウスは野生型マウスと比較して無処置でもリンパ節内のランゲルハンス細胞を含めた樹状細胞が増加しており、TPA 処置群ではさらに増加していた。また、IL-23 を産生するランゲルハンス細胞および IL-23 を産生する他の DC も増加していた(図 2)。

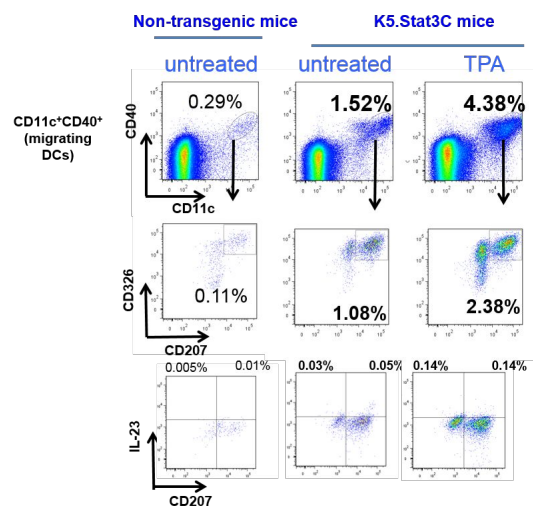


図2

TPA 処置 n=8, 非処置 n=8

(3)ランゲリン DTR ノックインマウスはDT 投与4日後にはランゲリン陽性細胞が消失した。12日後には真皮のランゲリン陽性細胞が回復したが、表皮のランゲリン陽性細胞は消失したままであった(図3)。

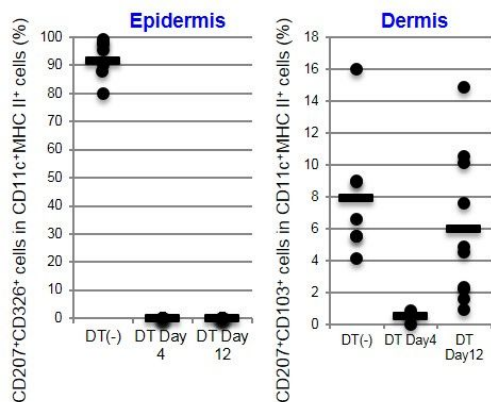


図3

No DT treatment (n=9), DT treatment at day 4 (n=7), DT treatment at day 12 (n=11). **p<0.01, Kruskal-Wallis one-way analysis.

(4) DT 投与4日後と12日後のTPA処理した耳介の組織学的変化(A)。DT処理4日後と12日後のランゲリンDTRマウスではTPAによる乾癬様皮膚の誘導が抑制され、K5.Stat3Cマウスの乾癬様皮膚の形成はランゲルハンス細胞の存在に依存することが示唆された(図4)。

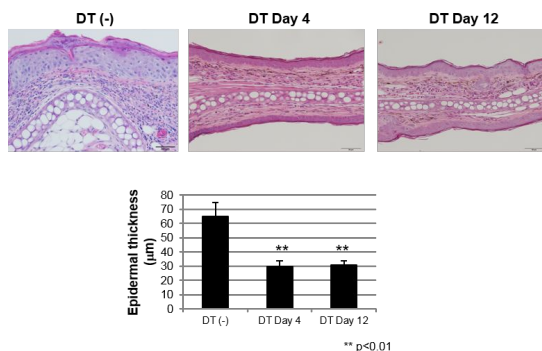


図4

DT 非投与 n=19、DT 投与4日目 n=8、DT 投与12日目 n=9。**p<0.01 Mann-Whitney U test.

(5)DT 投与4日後のランゲリンDTRマウス耳介にTPA塗布し、塗布部および所属リンパ節におけるm-RNA発現レベルをrtRT-PCRにより解析した。所属リンパ節ではIL-17A, IL-17F, IL-22, IL-12/23p40, IL-12p35といったTh17関連サイトカインの転写レベルがDT非投与群と比較して低下していた。TPA塗布部では同様にTh17関連サイトカインに加え

抗菌ペプチドの発現も低下していた(図5)。

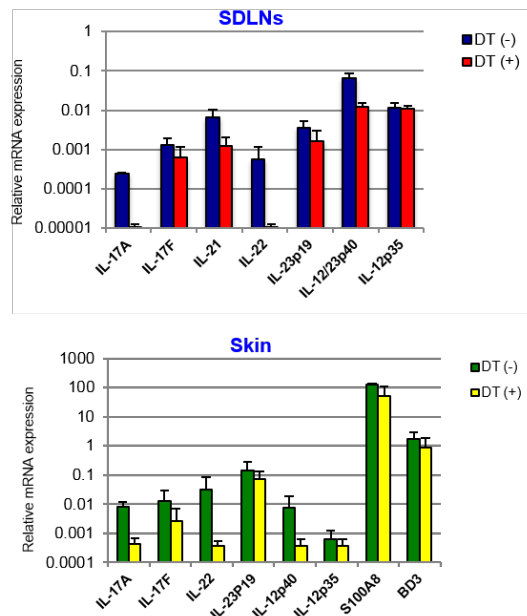


図5

DT 非投与 n=7, DT 投与4日目 n=6 **p<0.01, *p<0.05, Mann-Whitney U test.

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)

Psoriatic inflammation facilitates the onset of arthritis in a mouse model. Mayuko Yamamoto, Kimiko Nakajima, Mikiro Takaishi, Shun Kitaba, Yasuhiro Magata, Sayo Kataoka, Shigetoshi Sano. J Invest Dermatol. 135(2), 445-453. 2015. 査読有 DOI:10.1038/jid.2014.426

[学会発表](計7件)

骨髄異形成症候群(MDS)に伴った環状紅斑。 山本真有子, 中島英貴, 佐野栄紀, 池野史典。第79回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会、2016年2月20日-2月21日、東京、新宿区、京王プラザホテル

Langerhans cells migrate to lymph nodes with increased number in mice with Stat3 activation in epidermal keratinocytes and are essential for development of psoriasis-like lesion. Kimiko Nakajima, Kataoka S, Yamamoto M, Bernard M, Sano S. 2015年11月18日-11月20日、第44回日本免疫学会学術集会、北海道、札幌市、札幌コンベンションセンター

Langerhans cells migrate to lymph nodes with increased number in mice with Stat3 activation in epidermal keratinocytes and

are essential for development of psoriasis-like lesion. Kimiko Nakajima, Sayo Kataoka, Mayuko Yamamoto, Bernard Malissen, Shigetoshi Sano. LC2015 14th International Workshop on Langerhans Cells, 2015年11月5日-11月8日, Kyoto, Kyoto International Community House

抗BP180抗体陽性であった bullous lichen planus. 山本真有子、中島喜美子、佐野栄紀、高橋 綾. 第67回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2015年10月17日-10月18日、長崎県、長崎市、長崎ブリックホール

Langerhans cells migrate to lymph nodes with increased number in mice with Stat3 activation in epidermal keratinocytes and are essential for development of psoriasis-like lesions. Kimiko Nakajima, Sayo Kataoka, Mayuko Yamamoto, Bernard Malissen, Shigetoshi Sano. 45th Annual ESDR Meeting, 2015年9月9日-9月12日、The Netherlands, Rotterdam, The Beurs-World Trade Center

乾癬様病変成立に関わる Langerhans 細胞の役割. 中島喜美子、片岡佐誉、山本真有子、Bernard Malissen、佐野栄紀. 第30回日本乾癬学会学術大会. 2015年9月4日-9月5日、愛知県、名古屋市、ウェスティンナゴヤキャッスル

A peculiar reticulated eruption: adverse skin reaction following antifolate drugs. Mayuko Yamamoto, Kimiko Nakajima, Shigetoshi Sano. 23th World Congress of Dermatology, 2015年6月8日-6月13日, Canada, Vancouver, Vancouver Convention Centre.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
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
山本 真有子 (YAMAMOTO, Mayuko)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教
研究者番号：20423478

(2)研究分担者
中島 喜美子 (MAKAJIMA, Kimiko)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授
研究者番号：20403892

中島 英貴 (MAKAJIMA, Hideki)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師
研究者番号：70314995

佐野 栄紀 (SANO, Shigetoshi)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授
研究者番号：80273621