

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04888

研究課題名(和文)紫外線照射による全身性ループス増悪の病態解明

研究課題名(英文)The effect of UV irradiation on development of systemic lupus in mouse model

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、トール様受容体(TLR)7アゴニスト外用によってマウスにループス様自己免疫疾患を誘導することを発見し報告した。さらに、それがUVB照射によって促進された。この病態にHMGB-1の関与を想定したが、複数の実験系にて否定した。また、TLR7シグナル過剰の遺伝子改変マウスを用いた系では紫外線による効果が再現されず、TLR7アゴニスト外用誘導系のみでの特異な現象と結論づけた。TLR7アゴニスト外用による早期乾癬様症状とループス様自己免疫性炎症のキネティクス解析およびTLR7の関与につき詳細に解析し、それぞれの疾患で治療と増悪因子となるUVBの役目につき考察を加えた。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that topical treatment of mice with TLR7 agonists led to development of lupus-like autoimmunity. Furthermore, the simultaneous UVB irradiation with topical TLR7 stimulation of the skin could facilitate the autoimmunity, prompting us to hypothesize that UVB irradiation-induced HMGB-1 produced by epidermal cells might play an additive role in the development of lupus-like condition. However, no evidence was given regarding the commitment of HMGB-1 in multiple experimental settings. We next explored the effect of UVB irradiation in another lupus model, however, no supporting result was obtained. We concluded that the effect of UVB irradiation was limited to topical TLR7 agonists-treated model. Finally, we demonstrated the two distinct effects of imiquimod, a TLR7 agonist, on development of psoriasis-like dermatitis and lupus-like disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：膠原病 トール様受容体 紫外線照射 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

- (1) 我々は、トール様受容体(TLR)7アゴニストであるイミキモド(IMQ)やレジキモド(R848)の外用によって野生型マウスにループス様自己免疫疾患を誘導することを発見し、報告した(Arthritis Rheumatol, 2014,66:694)。本研究の成果は、経皮的ルートからのTLR7 刺激によって発症する新規ループス様自己免疫疾患モデルとしてのみならず、皮膚からのTLR7 を介するシグナルと SLE についての病因論的関連性を示唆する画期的な発見である。
- (2) 一般に SLE やその他自己炎症性症候群において、紫外線曝露が発症の環境要因となり、病状を悪化させることも知られている。TLR7 径路は plasmacytoid dendritic cell (pDCs)依存性であり、皮膚からの刺激が効率的であることを示したが、同時に皮膚、とくに表皮を標的とする紫外線刺激がこの径路に作用する可能性を考えた。

2. 研究の目的

全身性紅斑性狼瘡(SLE)をはじめとして全身性自己免疫疾患は紫外線刺激により増悪することが知られている。我々のマウスモデルマウスの系において紫外線刺激が早期の lupus 様自己免疫性炎症の発症に関わる機序を明らかにすることを目的とする。また、IMQ 外用によって早期に乾癬様皮膚炎、その後 lupus 症状が誘導できるが、その2つの疾患の免疫学的相違を明らかにすることも目的とした。なぜなら、興味深いことにこれら2つの疾患は紫外線刺激がそれぞれ症状の緩和(治療に用いられている)および増悪と相反するものであるからである。

3. 研究の方法

- (1) HMBG1はUVB照射によって障害された表皮細胞より分泌され、自然免疫の増悪driverとしてあるいはalarminとして作用することが知られている。このため、この関与を検討するため表皮特異的HMBG1ノックアウトマウスを作製する目的でfloxedマウスの入手を試みたが、供与されなかった。そこで、

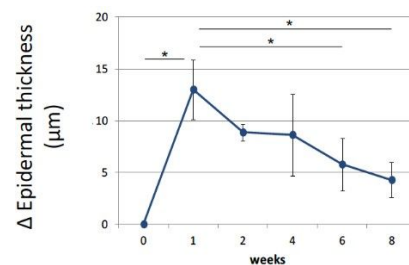
HMBG1の阻害薬である

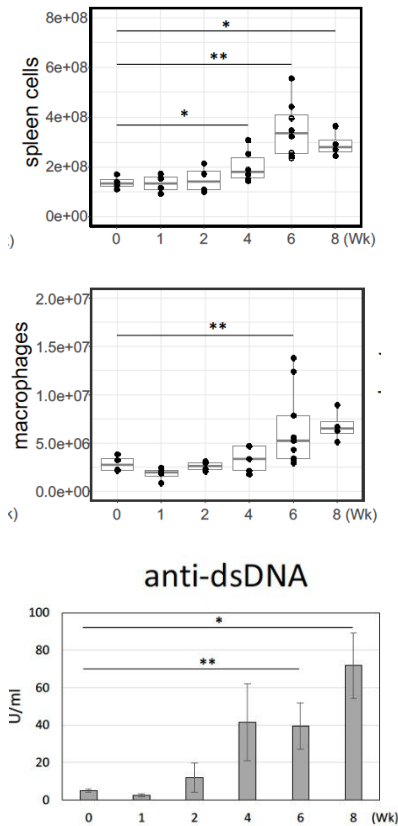
Glycyrrhizin(GC)を投与して、UVB照射を行いR848外用し阻害薬の投与による影響を検討した。

- (2) 連携研究者である東大医科研の三宅博士よりUnc93b1D34A/D34A ノックインマウス(D34Aマウス)を用いて、紫外線照射による発症の変化を病理組織学的、脾細胞を用いた免疫学的、血清学的解析を行った。
- (3) IMQ外用後の乾癬様皮膚炎およびlupus様自己免疫炎症発症のキネティクス解析を病理組織学的、脾細胞をもちいたフローサイトメトリーにて検討した。

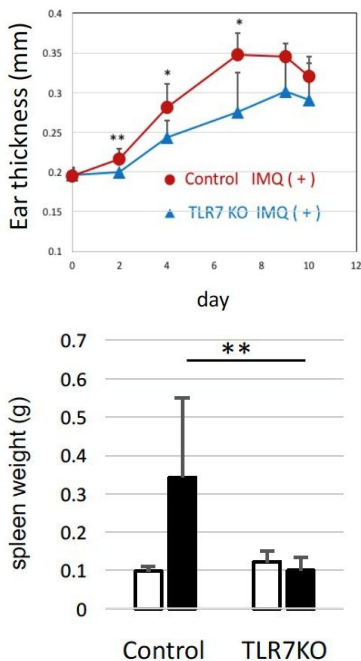
4. 研究成果

- (1) HMBG1の阻害薬である Glycyrrhizin(GC)を投与下紫外線照射、R848外用による脾重量、脾細胞の数、自己抗体(anti-ANA, anti-ds-DNA, anti-sm)titerを検討したが、投与群との差は確認できなかった。
- (2) D34Aマウスに紫外線を照射し、自己抗体、臓器障害を病理組織学的に検討したが、照射群で増悪は認められなかった。
- (3) IMQをマウス耳介に外用後経時的に表皮厚、脾細胞数、各細胞サブセットおよび血清中の抗ds-DNA抗体を測定した。表皮厚は外用1週目をピークとしてその後は減弱する一方、脾重量、脾細胞あるいは好中球、マクロファージ数は4週以降に漸減し6-8週でピークとなった。同時に抗dsDNA抗体価も4週以降で上昇し、乾癬様皮膚炎とは異なるキネティクスを示すことが明らかになった。

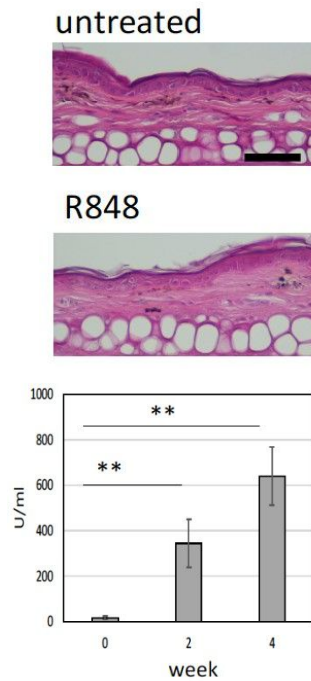




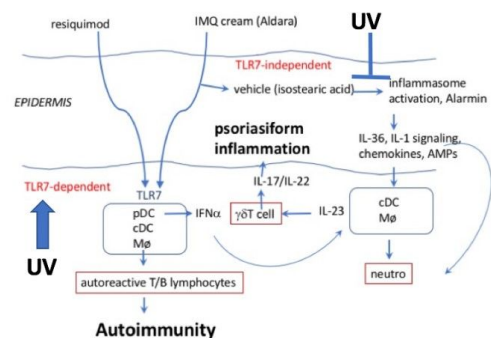
(4) 野生型およびTLR7ノックアウト (KO) マウスを用いてIMQ外用後の表皮厚を計測した。さらにそれらの脾重量を比較した。TLR7KOマウスにおいて野生型に較べて有意に肥厚が減弱するも、ある程度の炎症はみとめられた。一方、その後の脾腫や抗核抗体など自己免疫性炎症はTLR7KOに認められなかった。



(5) レジキモド(R848)はIMQ同様TLR7のアゴニストであるが、この外用においても乾癬様皮膚炎は誘導できない一方、2週以降に自己抗体を検出できた。



過去に報告があるようにIMQクリーム
の基剤による inflammasome 活性化が乾癬様炎症に関わる一方で、TLR7刺激はループス様自己免疫性炎症を誘導できることが明らかになった。UVの効果はそれぞれの病態形成において抑制と促進と相反するものである可能性を示唆している。



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 22 件)

1) Takaishi M, Satoh T, Akira S, Sano S: Regnase-1, an immuno-modulator, limits the IL-36/IL-36R auto-stimulatory loop in keratinocytes to suppress skin

inflammation. *J Invest Dermatol*. In press 2018 査読有 DOI: 10.1016/j.jid.2017.12.033.

2) Sano S, Kubo H, Morishima H, Goto R, Zheng R, Nakagawa H.: Guselkumab, a human interleukin-23 monoclonal antibody in Japanese patients with generalized pustular psoriasis and erythrodermic psoriasis: Efficacy and safety analyses of a 52-week, phase 3, multicenter, open-label study. *J Dermatol*. 45, 529-539, 2018 査読有 DOI: 10.1111/1346-8138.14294

3) Nakajima K, Sano S.: Mouse models of psoriasis and their relevance. *J Dermatol*. 45,252-263, 2018 査読有 DOI: 10.1111/1346-8138.14112.

4) Sano S.: Proposal for long-term protocols after Psoriasis Area and Severity Index clear with initial biologic therapy: Happily ever after with or without biologics in psoriasis therapy. *J Dermatol* 44, e234-e235, 2017 査読有 DOI:10.1111/1346-8138.13930.

5) Takaishi M, Ishizaki M, Suzuki K, Isobe T, Shimozato T, Sano S : Oral administration of a novel ROR γ t antagonist attenuates psoriasis-like skin lesion of two independent mouse models through neutralization of IL-17. *J Dermatol Sci*, 85(1):12-19, 2017 査読有 DOI:10.1016/j.jdermsci.2016.10.001

6) Teraishi M, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Higashi Y, Shimoda S, Asada Y, Hijikata A, Ohara O, Hiraki Y, Mizuno S, Fukada T, Furukawa T, Wakamatsu N & Sano S : Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular similarity between Mowat-Wilson syndrome and Ehlers-Danlos syndrome. *Sci Rep*, 7: 46565, 2017 査読有 DOI:10.1038/srep46565

7) Nakajima K, Ishiguro M, Shiohama A, Kubo A, Sano S : Novel frame-shift mutation in SERPINB7 in a Japanese patient with Nagashima-type palmoplantar keratosis. *J Dermatol*, 44(7):841-843, 2017 査読有 DOI:10.1111/1346-8138.13556

8) Sano S : Proposal for long-term protocols

after Psoriasis Area and Severity Index clear with initial biologic therapy: Happily ever after with or without biologics in psoriasis therapy. *J Dermatol*, 44(10):e234-e235, 2017 査読有 DOI:10.1111/1346-8138.13930

9) Takaishi M, Tarutani M, Takeda J, Sano S.: Mesenchymal to Epithelial Transition Induced by Reprogramming Factors Attenuates the Malignancy of Cancer Cells. *PLoS One* 11(6) : 2016 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0156904

10) Yamamoto M, Nakajima K, Takaishi M, Kitaba S, Magata Y, Kataoka S, Sano S : Psoriatic inflammation facilitates the onset of arthritis in a mouse model . *J Invest Dermatol*, 135(2):445-453, 2015 査読有 DOI:10.1038/jid.2014.426

11) Sano S : Psoriasis as a barrier disease . *Dermatologica Sinica*, 33 : 64-69, 2015 査読無 <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.04.010>

12) 佐野栄紀:【TNF 阻害剤の可能性を再考する】Ps 領域 関節症性乾癬 (psoriatic arthritis:PsA)の最新知見 皮膚科の立場から. *クリニシアン*, 64(7) : 644-650, 2017 査読無

13) 佐野栄紀:自己免疫疾患-Preclinical State から発症・早期診断まで 臓器特異的自己免疫疾患 乾癬の preclinical stage から発症まで. 別冊 医学のあゆみ, 128-133, 2017 査読無

14) 佐野栄紀 : 今、話題になっていること-皮膚科編 乾癬の治療. *医事新報*, 4878 : 28-34, 2017 査読無

15) 佐野栄紀:【全身性免疫疾患の機序の解明】正常マウス皮膚にTLR7 アゴニストを外用することによる新規ループス腎炎モデルマウスの開発 . *臨免疫・アレルギー科*,65(2) : 119-125, 2016 査読無

16) 佐野栄紀 : 乾癬性関節炎の画像所見 (PET-CT・関節エコー) . *J Visual Dermatol*,15(5) : 476-481, 2016 査読無

17) 佐野栄紀 :【自己免疫疾患-Preclinical State から発症・早期診断まで】臓器特異的自己免疫疾患 乾癬の preclinical stage から発症まで . *医のあゆみ*, 258(10) : 1021-1026, 2016 査読無

18)佐野栄紀：正常マウス皮膚に TLR7 アゴニストを外用することによる新規ループ腎炎モデルマウスの開発．臨床免疫・アレルギー科 65，119-125，2016 査読無

19)佐野栄紀：「脂肪細胞と免疫：オーバービュー」．皮膚アレルギーフロンティア，13(1)：7-12，2015 査読無

20)佐野栄紀：写真で学ぶアレルギー「これが関節症性乾癬だ!～臨床～」皮膚アレルギーフロンティア，13(1)：56，2015 査読無

21)佐野栄紀：生物学的製剤のパラドックス反応機序．臨床皮膚，69(5)：59-62，2015 査読無

22)佐野栄紀：乾癬．Visual Dermatol，14(9)：1038-1044，2015 査読無

〔学会発表〕(計7件)

1)Sano S, Ohko K, Satoh T, Akira S, Takaishi M. Regnase-1 in keratinocytes limits the IL-36/IL-36R auto-stimulatory loop to buffer skin inflammation. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)，2017

2)Sano S. Recent psoriasis research that verifies the effectiveness of biologics. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society For Investigative Dermatology (JSID) 2016年12月09日～2016年12月11日仙台国際センター(宮城県仙台市)

3)Yamamoto M, Kasai M, Kawaguchi A, Suzuki K, Kamijima R, Shirotake S, Udaka K, Sano S. Topical treatment with nano-sized particles of cyanoacryl polymer ameliorates experimental dermatitis through bactericidal effect. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society For Investigative Dermatology (JSID) 2016年12月09日～2016年12月11日仙台国際センター(宮城県仙台市)

4)M Takaishi, M Tokunaga, C Kokubu, J Takeda, and S Sano. A novel gene Ahed plays key roles in proliferation, survival, and differentiation of murine epidermis. 46th Annual ESDR Meeting 2016 (国際学会) 2016年09月07日～2016年09月10日 Technical University of Munich(Munich, Germany)

5)Nakajima K, Hashida Y, Shiga T,

Nakajima H, Daibata M and Sano S. High burden of Merkel cell polyomavirus DNA in the nonlesional, sun-exposed skin of patients with Merkel cell carcinoma 46th Annual ESDR Meeting 2016 (国際学会) 2016年09月07日～2016年09月10日 Technical University of Munich(Munich, Germany)

6)Kataoka S, Yamamoto M, Ohko K, Kamijima R, Matsuoka C, Sano S. Kinetic of two distinct diseases induced by topical treatment with imiquimod cream in mice: skin inflammation and systemic autoimmunity. 日本研究皮膚科学会第40回年次学術大会・総会(JSID) 2015年12月11日～2015年12月13日 岡山コンベンションセンター

7)Sano S. Relevance of clinical research models. 23th World Congress of Dermatology (招待講演) 2015年06月08日～2015年06月13日, Vancouver Convention Centre (Canada)

〔図書〕(計2件)

1)佐野栄紀：皮膚疾患 炎症性・自己免疫性疾患 乾癬 1336 専門家による私の治療 2017-18 年度版．日本医事新報社，東京：967-968，2017

2)佐野栄紀：乾癬性関節炎．分子標的/Bio時代のリウマチ・膠原病治療ストラテジー．文光堂、東京：80-87，2015

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

高石 樹朗 (TAKAISHI, Mikiro)

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：10303223

中島 喜美子 (NAKAJIMA, 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

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

寺石 美香 (TERAISHI, Mika)
高知大学・医学部・研究員
研究者番号：40437736

石元 達士 (ISHIMOTO, Tatsushi)
高知大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40750039

大湖 健太郎 (OHKO, Kentarou)
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：90595274

(3)連携研究者

三宅 健介 (MIYAKE, Kensuke)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：60229812