

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591313
研究課題名（和文） IL-17によるヒト表皮角化細胞のケモカイン産生制御機構の研究
研究課題名（英文） Regulation of chemokine production in human epidermal keratinocyte by IL-17 stimulation

研究代表者

藤山 幹子 (TOYAMA MIKIKO)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60263935

研究成果の概要：皮膚の慢性炎症性疾患として、アトピー性皮膚炎、乾癬がよく知られており、どちらの疾患の病変部位にも IL-17 を産生するリンパ球が存在している。炎症の誘導には、表皮角化細胞より産生されるケモカインが重要な役割を果たしているが、疾患によりその発現パターンは異なっている。ケモカインの産生は炎症性サイトカインで誘導されるが、IL-17 の存在が、その産生を制御していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1)IL-17 と慢性炎症性皮膚疾患

従来から知られている Th1、Th2 の概念に加え、最近、いわゆる Th17 が提唱され、注目されている。Th17 は IL-17 を主に産生する T リンパ球の系統を指す。感染症などによ

る組織障害の際にマクロファージが産生する IL-23 によりナイーブ T 細胞から分化した T 細胞(Th17)から、IL17 は産生される。また、感作された抗原による刺激によっても IL-17 の産生が誘導される。持続的な IL-17 の存在は、炎症の拡大と維持に働くため、自己免疫

疾患などの慢性炎症性疾患においては重要な役割を果たしていると考えられている。

皮膚の慢性炎症性疾患として、アトピー性皮膚炎、乾癬がよく知られており、それぞれ Th2、Th1 の免疫反応を代表する疾患である。これまで、どちらの疾患の病変部位にも IL-17 を産生するリンパ球の存在することが報告されている。皮膚は、常に外界から感染や抗原刺激を受けており、皮膚に浸潤したリンパ球により産生された IL-17 が、それぞれの疾患の病態の形成と、炎症の維持に関わっていると考えられる。

(2)IL-17 と表皮角化細胞のケモカイン産生

皮膚の炎症において、炎症性細胞を遊走させるケモカインの働きは重要であり、アトピー性皮膚炎と乾癬では異なるケモカインが表皮角化細胞から産生されることが知られている。IL-17 は、表皮角化細胞からの IL-8、MIP-3alpha、Gro-alpha などのケモカイン産生を亢進させると報告されている。しかし、IL-17 によるケモカイン産生の抑制についてはほとんど検討されておらず、表皮角化細胞の RANTES の産生が IL-17 により抑制されていることが報告されているのみである。

①乾癬病変部における IL-17 による CTACK の産生抑制

CTACK は、cutaneous-lymphocyte associated antigen(CLA)を発現する T リンパ球を皮膚に遊走させ、ホーミングさせるのに重要なケモカインである。CLA 陽性 T リンパ球は同時に CCR4 を発現しているため、IL-4 の産生能を有する Th2 リンパ球であると考えられている。CTACK は TNF-alpha 刺激により産生が誘導されるが、乾癬病変部では TNF-alpha が豊富に存在しているにも関わらず、その産生は抑制されている。この

病態に IL-17 が関与する可能性が考えられる。

②アトピー性皮膚炎における IL-17 による MIP-1alpha および MIP-1beta の産生制御

MIP-1 は、MIP-1alpha と MIP-1beta のサブタイプにわけられる。MIP-1alpha は CCR1,3,5 に結合し、MIP-1beta は CCR5 に結合し、構造は類似するが、機能は異なる部分がある。

アトピー性皮膚炎の慢性病変では、Th1 サイトカインである IFN-gamma と Th2 サイトカインである IL-4 の両者が関与しており、これらにより誘導される MIP-1alpha と MIP-1beta の産生が、IL-17 による制御を受け、アトピー性皮膚炎の病態形成に関与している可能性が考えられる。

(3) 表皮角化細胞のケモカイン産生における転写因子 IRF1 の関与

大腸の myofibroblast では、IL-17 により RANTES の産生が抑制され、それと同時に転写因子である IRF1 の活性化が抑制されていることが報告されている。マクロファージでは、RANTES の産生には interferon regulatory factor-1 (IRF1)の活性化が必須であると報告されており、IL-17 による RANTES の産生抑制に IRF1 が関与していることを強く示唆する。IRF1 は自然免疫から獲得免疫への移行に関与する重要な転写因子であり、種々のサイトカイン刺激により産生が誘導されると、核内に移行して DNA に結合して種々の蛋白の遺伝子発現を制御する。興味深いことに、IRF1 の抑制系である IRF2 を欠くマウスでは皮膚にのみ炎症を生じ、皮膚の炎症の制御における IRF1、IRF2 の重要性が推測されている。IL-17 の IRF1 活性化抑制作用とあわせ、表皮角化細胞のケモカイン産生において IRF1 は重要な役割を

果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

以上のごとく **IL-17** が、アトピー性皮膚炎や乾癬の病変部位におけるケモカイン産生を制御し、それぞれに特有な炎症を生じ、それに **IRF1** の活性化抑制が関与しているとの仮説が考えられる。本研究では、この仮説に基づき、表皮角化細胞に焦点を絞り、**IL-17** による **CTACK** と **MIP-1beta** の産生抑制機構につき、**IRF-1** の関与を中心において研究を行う。さらには、**IRF1** のケモカイン産生に果たす役割についても解析する。具体的に、下記の項目を明らかにする。

- (1) ヒト表皮角化細胞における **IL-17** によるケモカイン産生
- (2) ヒト表皮角化細胞における **IL-17** による **IRF1** の制御
- (3) **IRF1** の抑制によるケモカイン産生の制御

3. 研究の方法

培養ヒト表皮角化細胞を用いて、**IL-17** によるケモカイン産生、**IL-17** による **IRF1** の活性化の制御、**IRF1** の抑制によるケモカイン産生に与える影響を検討する。

(1) サイトカイン刺激による **CTACK** と **MIP-1beta** の産生 (mRNA と蛋白レベル)
培養ヒト表皮角化細胞を用いて検討する。

(2) **IL-17** による転写因子の制御 (特に **IRF1**) についての検討

IRF1 は、多数のリン酸化部位を有しており、リン酸化と活性化の関連はよくわかっていない。そのため、核内に移行した **IRF1** を検出する方法をとる。

(3) **IRF1** の活性化の抑制についての検討

TNF-alpha、**IFN-gamma+IL-4** による刺激を行ったときの **IRF1** の細胞内移行の至適検討時間を参考に、**IL-17** に変化を検討する。また、他の転写因子についても同様に検討を行う。

(4) **IRF1** の抑制によるケモカイン産生についての検討

CTACK、**MIP-1beta** の産生抑制が、**IRF1** の活性化抑制に基づくものであれば、**IRF1** の活性化を抑制した状況下では、**TNF-alpha**、**IFN-gamma+IL-4** による処理を行っても、それぞれのケモカインが産生されないことが予想される。**IRF1** の活性化を抑制するために、**siRNA** や **decoy** を用いる。

4. 研究成果

(1) サイトカイン刺激による **CTACK** と **MIP-1beta** の産生

培養ヒト表皮角化細胞を用い、サイトカイン刺激による **CTACK** と **MIP-1beta** の産生を調べた。

① **CTACK**

CTACK は、表皮特異的に産生されるケモカインであり、**TNF-alpha** の刺激により産生が誘導されるが、**IL-17** の添加は、強力にその mRNA の発現と産生を抑制した。以前に、**RANTES** の産生が **IL-17** により抑制されることが報告されているが、**CTACK** の産生抑制は、**RANTES** に比べると明らかに強力であった。

② **MIP-1beta**

MIP-1beta の産生は、**IFN-gamma** 刺激により増強することが知られていたが、今回の検討により **IL-4** の添加が強力に産生を増強することが明らかとなった。また、これに **IL-17** を添加すると、**MIP-1beta** の mRNA の発現と産生は顕著に抑制された。

(2)転写因子 IRF1 についての検討

①TNF-alpha 刺激による IRF1 の動態

TNF-alpha 刺激では、刺激後 1 時間で IRF1 の mRNA の発現を認めた。核内蛋白について Western blot を施行したところ、刺激後 3 時間より、IRF1 の核内移行が確認された。

②IL-17 刺激による IRF1 の動態

IL-17 を添加すると、IRF1 の mRNA の発現には影響を与えなかったが、TNF-alpha 刺激により生じる IRF1 の核内移行が抑制されることが確認された。

③IFN-gamma 刺激による IRF1 の動態

IFN-gamma によっても IRF1 の mRNA が誘導され、IL-4 の添加はそれをさらに増強しが、IL-17 の添加は、IRF-1 mRNA の発現増強には影響を与えなかった。

(3)ケモカイン産生における IRF1 の関与の検討

①siRNA を用いた検討

siRNA を用いて培養表皮角化細胞の IRF1 の mRNA の発現を抑制した状態で、CTACK の産生を検討した。IRF1 の発現を抑制すると、CTACK の蛋白の分泌は抑制されたが、他のケモカインである MIP-3alpha の産生には影響を与えなかった。しかし、ヒト表皮角化細胞では、基本的に siRNA の導入効率が悪いこと、CTACK の蛋白産生には刺激後 24 時間以上を要することより、IRF1 の抑制よりもむしろ siRNA の導入処理による細胞の viability の低下が蛋白産生量を減少させている可能性が考えられ、他の方法による確認が必要と考えられた。

②decoy を用いた検討

IRF1 の decoy について、実験の至適条件を検討したが、この decoy の使用により表皮角

化細胞の viability は著しく障害され、IRF1 は表皮角化細胞の培養に重要な役割を果たしている可能性が示された。

③IRF1 ノックアウトマウスを用いた検討

IRF1 のノックアウトマウスでは、表皮の障害は認められない。そこで、ワイルドと IRF1 のノックアウトマウスのマウスを用いて比較検討することとしたが、in vivo では炎症時の種々の代償的作用により IRF1 の役割そのものの評価が難しくなるため、培養細胞を用いることとした。

まず、ワイルドのマウスから採取した皮膚表皮角化細胞を培養し、TNF-alpha や IL-17 刺激を行った。しかし、培養細胞は生着・増殖するものの、細胞の内在性コントロールを含めた mRNA の発現は著しく低下し、TNF-alpha や IL-17 刺激によるいかなる mRNA の発現増強も確認することができなかった。

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 3 件)

① Tohyama M, et al. A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*, 査読有り, 159, 2008, 981-984.

② Tohyama M, et al. CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int Immunol* 査読有り, 19, 2007, 1095-1102

③ Tohyama M, et al. Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br J Dermatol*, 査読有り, 157, 2007, 934-940

[学会発表] (計 2 件)

① Tohyama M. Augmentation of IL-22 receptor expression and IL-20 subfamily production plays a critical role in psoriasis. *International Investigative*

Dermatology 2008, 2008.5.17, 京都

② Tohyama M. Novel mechanism of Stevens-Johnson syndrome and TEN: involvement of fractalkine and CD16+ mononuclear cells. 第32回研究皮膚科学会 2007.4.20, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 幹子 (TOYAMA MIKIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 60263935

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者