

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20761

研究課題名（和文）上皮-免疫微小環境の恒常性維持におけるコレステロール硫酸の役割解明

研究課題名（英文）Role of cholesterol sulfate in the homeostasis of the epithelial immune microenvironment

研究代表者

秋好 紗弥香（Akiyoshi, Sayaka）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70966150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：乾癬様皮膚炎モデルにおいて、Cholesterol sulfate (CS)が炎症の重症化に関与する可能性に着目し解析を行なった。解析の結果、皮膚におけるCSの局在およびCS合成酵素SULT2B1の発現細胞を同定し、さらに炎症状態の皮膚において、CSと関与する炎症性サイトカインやケモカイン、免疫細胞に関する重要な手がかりを見出した。CSは、免疫細胞特異的に発現し細胞骨格制御因子として機能するDOCK2分子に対して阻害効果を示す代謝産物であることから、DOCK2と関連した機構により皮膚の炎症を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は、外部の有害因子を排除するメカニズムに偏りが起きた際、上皮細胞と免疫細胞の相互作用による炎症ループが形成される代表的な皮膚疾患である。本研究では、上皮細胞において、CSと免疫細胞が関与した乾癬の病態メカニズムの一端を解明し、CSが炎症ループの病態克服のための新たな標的分子となり得ることを示した。よって、本疾患における炎症の継続・悪化を抑制するような、有効な治療法開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that cholesterol sulfate (CS) is involved in the severity of inflammation in a model of psoriasis-like dermatitis. As a result of functional analysis, we identified the localization of CS and its synthetic enzyme SULT2B1-expressing cells in the skin. In addition, we found important clues regarding inflammatory cytokines, chemokines, and immune cells associated with CS in the inflammatory state of the skin. CS is a metabolite that inhibits the function of DOCK2, which is specifically expressed on immune cells and acts as a cytoskeletal regulator. These findings suggest that CS suppresses skin inflammation through a mechanism involving DOCK2.

研究分野：免疫・炎症

キーワード：炎症 乾癬 上皮-免疫微小環境 免疫細胞 コレステロール硫酸 DOCKファミリー分子

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は上皮-免疫微小環境を構築しており、外部の有害因子を排除するメカニズムに偏りが起こると、上皮細胞と免疫細胞が相互に作用して炎症ループを形成する。表皮角化細胞の異常な増殖を呈する“乾癬”は炎症ループが形成される代表的な疾患であるが、炎症が継続・悪化する仕組みはいまだ不明である。私の所属研究室では最近、生体内で合成されるコレステロール硫酸 (CS; Cholesterol Sulfate) が細胞骨格制御因子である DOCK2 の Rac 活性化を阻害することで、免疫細胞の遊走および活性化を抑制する機能を持つことを発見した。CS は表皮角化細胞の分化・増殖因子であるとの報告がある一方で、CS と免疫細胞の関係性に着目した研究はなく、乾癬との関連も全く不明である。

本研究では、CS の DOCK2-Rac 阻害機能に着目し、上皮-免疫微小環境の恒常性維持に CS が関わるかどうかを CS 欠損マウスとイミキモド誘発性乾癬モデルを用いて検証する。本研究の成果は、乾癬の病態メカニズムの一端を解明することや、免疫細胞が関わる皮膚疾患の治療法開発に貢献できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、皮膚での上皮-免疫微小環境の恒常性維持における CS の役割を明らかにし、CS が乾癬を克服するための新たな標的分子となり得るかどうかを検証することを目的とする。そのために、TLR7 (Toll-like receptor 7) のリガンドであるイミキモドを塗布する乾癬モデルを用いて野生型マウスと CS 合成酵素遺伝子 *Sult2b1* の欠損マウス (CS 欠損) の炎症状態を多角的に解析することで、皮膚における CS の機能的意義を解き明かす。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症前後の皮膚における CS の産生量や局在、合成酵素 SULT2B1 の発現解析

- ・乾癬のモデルとして頻用されている「マウス背側皮膚へのイミキモド塗布」を野生型マウスに対して行い、乾癬様皮膚炎を惹起させる。イミキモド塗布前 (Day 0) から塗布後 (Day 1-5) の皮膚に対して以下の解析を行い、CS と CS 合成酵素 SULT2B1 の変化を評価する。

- ・SULT2B1 の皮膚における発現量を調べるため、Western blot でタンパク質量を、quantitative PCR (qPCR) で遺伝子発現量を解析する。

- ・皮膚内の CS 産生量 (絶対量) を質量分析により計測し、CS 局在については質量分析イメージングを用いて可視化する。

### (2) 皮膚における CS と関与している炎症調節因子や免疫細胞の同定

- ・野生型と *Sult2b1* 欠損マウスのイミキモド塗布前後の皮膚において、炎症性サイトカインやケモカイン (*Il1b*, *Il6*, *Il17*, *Il22*, *Tnfa*, *Cxcl1*) の遺伝子発現量を qPCR で解析し、比較する。同様に、各種免疫細胞の増減をマスサイトメーター (CyTOF) ならびにフローサイトメーター (FACS) を用いて解析することで、責任細胞を同定する。

### (3) CS が抑えている可能性のある免疫細胞 (T 細胞および好中球) の検証

- ・T 細胞のいない *Rag1* 欠損マウスに *Sult2b1* 欠損マウスを交配し、イミキモド誘発性皮膚炎の重症度を評価する。T 細胞が DOCK2 と関係している場合は、*Rag1/Sult2b1* ダブル欠損マウスでは皮膚炎がほとんど起きないと予想される。

- ・*Sult2b1* 欠損マウスに *in vivo* 実験用の抗好中球抗体を投与して好中球を消失させたのち、イミキモド誘発性皮膚炎の重症度を評価する。好中球が DOCK2 と関係している場合は、中和抗体投与後は皮膚炎がほとんど起きないと予想される。

- ・マウスから単離した好中球に CS を添加し、乾癬病態にも関わるとされる活性酸素種 (ROS) 産生や好中球細胞外トラップ (NETs) 形成への影響を解析する (*in vitro* 実験)。

### (4) CS が乾癬の病態を改善するかどうかの検討

- ・イミキモドを塗布した野生型マウスに CS を塗布、あるいは腹腔内や静脈内に投与し、皮膚炎が軽減されるかどうかを観察するとともに、遺伝子発現と免疫細胞の増減を解析する。

- ・*Dock2* 欠損マウスと *Sult2b1* 欠損マウスを交配し、*Dock2/Sult2b1* ダブル欠損・*Dock2* 単独欠損・*Sult2b1* 単独欠損マウスにおける皮膚炎の重症度を比較する。CS が DOCK2 の阻害を介して皮膚炎を抑制している場合、ダブル欠損マウスでは皮膚炎がほとんど起きないと予想される (*Dock2* 欠損マウスと同程度になる)。

### (5) 乾癬患者の皮膚における CS 産生量の検証

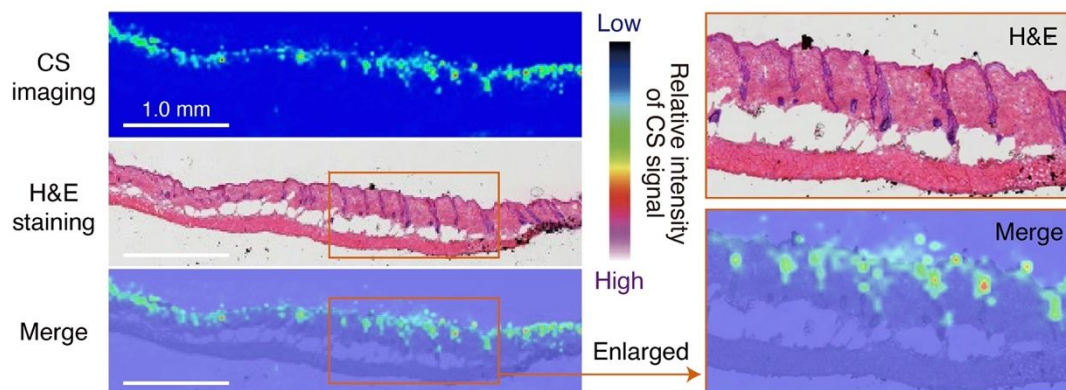
- ・九州大学皮膚科学教室にご協力いただき、尋常性乾癬や膿疱性乾癬を含む“乾癬”の診断が付い

た患者の皮膚を生検し、CS 産生量ならびに SULT2B1 発現を解析する。その際、各皮膚疾患について軽症・中等症・重症と層別化した上で評価する。

#### 4．研究成果

まず初めに、皮膚における CS 局在を明らかにするため、質量分析イメージング法を用いて解析を行った。その結果、CS は上皮組織中に分布することが分かった（図 1 参照）。

図 1：野生型マウスの皮膚横断面（背部）の CS イメージング



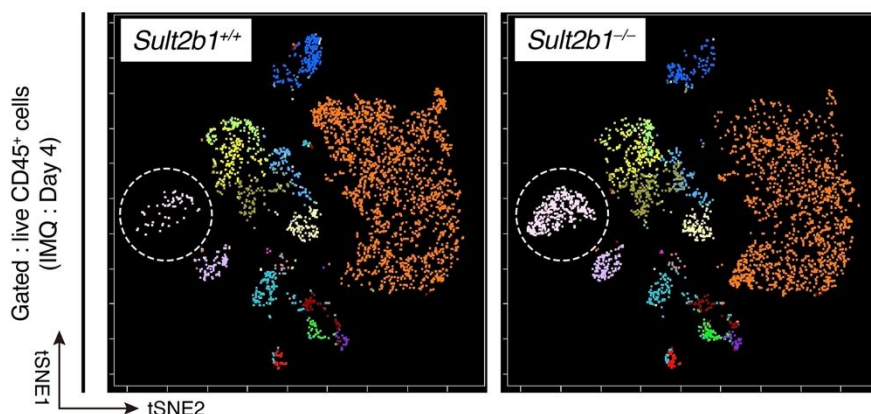
次に、野生型の皮膚でのイミキモド塗布で、CS 合成酵素 SULT2B1 の皮膚における遺伝子発現量およびタンパク質発現量、CS 産生量を測定したところ、Day 0（イミキモド塗布前の野生型）と比べて Day 1 から Day 5 の時間経過において相対的に増加することが分かった。このことから、Sult2b1 および CS が乾癬様炎症に関与していることが示唆された。

さらに、公共データベースにデポジットされている single-cell RNA-seq 解析の結果より、Sult2b1 の発現が顕著に多い細胞を同定した。

また、野生型の皮膚内の CS 産生量（絶対量）を質量分析したところ、Sult2b1 欠損マウスでは完全に消失していた。そこでイミキモド塗布による炎症状態を評価し、野生型マウスと比べ Sult2b1 欠損マウスの皮膚の方が様々な炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現が上昇することを見出した。

また、CyTOF 並びに FACS を用いてイミキモド誘発性皮膚炎における両者の皮膚を比較したところ、著増している免疫細胞、あるいは全く差のない免疫細胞を同定することができた（図 2）。

図 2：野生型 / CS 欠損マウスの皮膚組織内免疫細胞のマスサイトメトリー（CyTOF）



さらに、Sult2b1 欠損マウスの皮膚で著増していた免疫細胞が無い状況下だと皮膚炎の重症度が改善することを見出した。現在、イミキモドを塗布した野生型マウスに CS を塗布、あるいは腹腔内や静脈内投与による皮膚炎の病態改善の評価や、遺伝子発現と免疫細胞の増減の解析などを進めている。加えて、乾癬の診断が付いた患者の皮膚における CS 産生量ならびに SULT2B1 発現の解析を行う準備を進めており、倫理審査の承認待ちの段階である。今後、マウスで得られた知見とヒト検体の結果を比べることで、皮膚疾患の病態解明に貢献できると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------