

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293258

研究課題名(和文) デスマoglein3特異的細胞性免疫が誘導する皮膚炎モデルの分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of skin inflammation induced by desmoglein 3-specific T cells

研究代表者

高橋 勇人 (Takahashi, Hayato)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40398615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：Interface dermatitis (ID)は扁平苔癬、重症薬疹、GVHDや腫瘍随伴性天疱瘡など様々な皮膚疾患で共通して認められる病理組織像であるが、その分子メカニズムの詳細は不明である。本研究では遺伝子改変マウスを駆使してIDのメカニズムを解析し、その結果T細胞の転写因子であるT-bet, Stat1が重要であることを明らかにした。一方、新しい免疫学的な概念の創出を目指し、IL-27下流で特異的に働く遺伝子を抽出したところ、コレステロール代謝酵素が同定でき、その働きが免疫制御に寄与することを明らかにした。本研究成果は皮膚炎における将来の新しい治療法の開発に大きく役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Interface dermatitis is a pathological feature which is commonly observed in a variety of skin diseases including lichen plans, severe drug adverse reaction, graft-versus-host disease, paraneoplastic pemphigus and so on. The molecular mechanism that leads to interface dermatitis has not been understood. In this project, we took advantage of genetically engineered mice and discovered that T-bet and Stat1, crucial transcriptional factors in T cell differentiation, are keys in development of interface dermatitis. On the other hand, we also sought to establish a novel concept in the field of Immunology in this project. Through investigating genes which are specifically induced by interleukin (IL)-27, we found that cholesterol metabolizing enzyme is induced by IL-27 and the function contributes to immune regulation. Our results are promisingly expected to be useful to invent a new treatment for skin inflammatory diseases in the future.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：Interface dermatitis Desmoglein T cell

1. 研究開始当初の背景

Interface dermatitis (ID) は扁平苔癬、薬疹 (多形紅斑、Stevens- Johnson 症候群や中毒性表皮壊死症)、GVHD や膠原病にともなう皮膚症状、腫瘍随伴性天疱瘡などで認められる病理組織像の名称であり、リンパ球の真皮表皮境界領域への浸潤と表皮基底細胞の液状変性などの病理学的な特徴を有する。臨床の現場で頻りに遭遇し、既存のステロイドや免疫抑制剤などの治療に抵抗性で致死的な経過をとる症例も認めるにもかかわらず、その分子レベルでの病態の詳細は依然不明である。

申請者らは過去に天疱瘡モデルマウスから Dsg3 特異的 CD4⁺T 細胞クローン株を複数個樹立し、その性質を解析してきた。そのうち天疱瘡を誘導できる病原性のあるクローン株から Dsg3 特異的 T 細胞受容体遺伝子を単離し、Dsg3 特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (Dsg3H1) マウスを作成した。Dsg3H1 マウス自身は天疱瘡を誘導する能力を認めなかったが、Dsg3 を発現する表皮に自ら浸潤し、病理学的に ID を引き起こす能力があることが明らかにされた。またこの実験系から IFN- γ を欠失させると EAD が消失することから、この ID は IFN- γ 依存性であることが示された。この実験的に誘導された ID を実験的自己免疫性皮膚炎 (experimental autoimmune dermatitis; EAD) と呼んでい

2. 研究の目的

(1) ID の分子メカニズムの解明

ID は多岐にわたる皮膚疾患で共通して観察される病理学的変化ではあるが、その形態学的変化がどのような分子メカニズムで誘導されるかという点についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究課題において ID が誘導される分子メカニズムを明らかにすることを目的として、免疫学的に重要な分子を欠損した遺伝子改変マウスを用いて、明らかにしていく。

(2) 新規 T 細胞サブセット ThX の同定

ID を含む皮膚炎症性疾患や皮膚自己免疫疾患の治療は未だにステロイドや免疫抑制剤に頼る場面が多く、従来にない治療戦略の設定には新たな基礎免疫学的な発見や概念の創出が不可欠と考えられる。本研究課題の目標の一つとして、新しい機能をもった T 細胞サブセットの同定を掲げ、新規機能を同定することを通じて、新しい免疫制御方法の開発の基礎データとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ID の分子メカニズムの解明

EAD では Dsg3H1 T 細胞が直接皮膚や口腔粘膜上皮に浸潤し ID が生じる。Dsg3 特異的 T 細胞が IFN- γ を欠失した場合には、ID が生じないことから、T 細胞が産生する IFN- γ 分子が EAD の病態形成に重要であると考えられる。しかし、IFN- γ は IL-12 とともにオートクライン/パラクラインの機構により Th1 細胞の分化誘導に重要な分子であることが知られており (図 1)、EAD においては皮膚を直接傷害する Th1 細胞の誘導のためだけに IFN- γ が必要なのか、あるいは IFN- γ 自身が皮膚を直接障害している分子なのかは不明であった。そこで IFN- γ 受容体 (R)^{-/-} マウスと Rag2^{-/-} マウスを交配して IFN- γ R^{-/-}Rag2^{-/-} マウスを作成し、レシピエントマウスとして使用して EAD を誘導することによって、Th1 細胞から放出される IFN- γ の角化細胞に対する病因的影響を評価した。一方、IFN- γ は T 細胞において転写因子である T-bet の発現を誘導し、この T-bet が IFN- γ の産生をさらに誘導することによって Th1 への分化を促進させる (図 1)。そこで IFN- γ と密接に関連する T-bet の欠損マウスと Dsg3H1 マウスを交配し、T-bet^{-/-}Dsg3H1 T 細胞を作成し、EAD 誘導における病原性を検討した。また T 細胞において IFN- γ の作用は IFN- γ R 下流の Stat1 分子を介して発揮される (図 1)。そこで Stat1 欠損マウスと Dsg3H1 マウスを交配して Stat1^{-/-}Dsg3H1 T 細胞を作成し、この EAD 誘導における病原性も検討した。

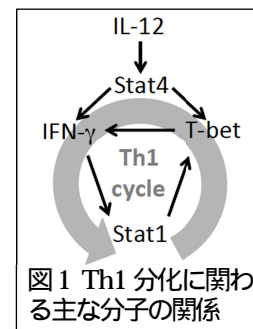
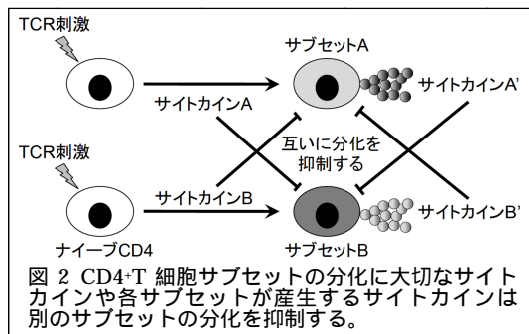


図 1 Th1 分化に関わる主な分子の関係

(2) 新規 T 細胞サブセット ThX の同定

ナイーブ CD4⁺T 細胞はそれぞれ特有の機能を有する幾つかのサブセットに分化することが知られている。その過程の特徴として、あるサブセットの分化に重要なサイトカインは、別のサブセットの分化を抑制することが知られている (図 2)。そこで、全てのサブセットを抑制しうるサイトカインを用いてナイーブ CD4⁺T 細胞を刺激し分化させると、既知のサブセットへ分化することなく、新たな機能をもった未知のサブセット (ThX) へ分化できる可能性を考えた。本研究では、IL-27 は Th17 と iTreg の分化を抑制することを確認し、Th1 と Th2 分化を抑制する TGF- β と組み合わせることで ThX の誘導を試みた。すなわち、野生型マウ

ス(C57BL/6)から CD4⁺CD62L^{hi} CD44^{lo}CD25⁻のナイーブ T 細胞を FACS にて単離し、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体にくわえて、IL-27 と TGF-β で刺激し ThX の誘導を試みた。既知サブセットも誘導し、各サブセットの遺伝子発現解析を行い、ThX に特異的に発現する遺伝子を同定した。実際に IL-27 と TGF-β により ThX 特異的遺伝子が発現するかを定量 PCR にて確認した。また ThX 特異的遺伝子が周囲のリンパ球に与える影響を *in vitro* で評価した。また *in vivo* にお



ける ThX の動態を評価するために、ThX 特異的遺伝子のレポーターマウスとして IRES プロモーター下で EGFP-Cre 融合タンパクを発現するマウスを作成し、評価した。また、ThX 特異的遺伝子欠損マウスを導入し、接触皮膚炎モデルを用いて、同遺伝子の機能を評価した。

4. 研究成果

(1) ID の分子メカニズムの解明

まず、EAD において、Dsg3H1 T 細胞が直接皮膚や口腔粘膜上皮に浸潤し ID が生じるが、Dsg3H1 T 細胞が産生する IFN-γ が ID の誘導においてどの程度重要であるかを評価するため、IFN-γR^{-/-}Rag2^{+/+}マウスに Dsg3H1 T 細胞を移入し EAD の程度を評価したところ、EAD は減弱あるいは消失することなく、発症した。すなわち、EAD の発症において、T 細胞から産生された IFN-γ は角化細胞に発現する IFN-γR に作用することにより ID が生じるわけではなく、IFN-γ が直接的な病原因子ではないことが分かった。またこの結果から、IFN-γ の重要性は産生する T 細胞自身に働きかけ、Th1 への分化を加速させるための役割として重要であることが示唆された。一方、Stat1 欠損マウスと Dsg3H1 マウスを交配して Stat1^{-/-}Dsg3H1 T 細胞を作成し、Rag2^{+/+}マウスに移入することにより、Stat1 分子の EAD 誘導における重要性を検討した。その結果、Stat1 を欠損すると、皮膚炎が生じなかった。すなわち EAD の実験系においては、Stat1 分子が ID 発症において極めて重要であることが示された。さらに、T-bet の欠損マウスと Dsg3H1 マウスを交配し、T-bet^{-/-}Dsg3H1 T 細胞を作成し、Rag2^{+/+}マウスに移入することにより、T-bet の EAD 誘導における重要性を検討した。T-bet を欠失すると、消失すると期待された皮膚炎は消失し

ないことがわかった。しかし、病理学的検討を行うと、ID でみとめられる液状変性は観察されず、多数の炎症細胞浸潤を認めた。T-bet を消失すると T 細胞の分化が Th1 へ向かなくなる結果、Th1 で生じる ID は誘導されず、かわりに別の特徴をもった炎症が皮膚に生じることがわかった。以上の結果から、ID の病型誘導という観点においては T-bet は重要であることがわかったが、皮膚の炎症自体の誘導には T-bet は重要ではなく、むしろその上流に存在する Stat1 分子が最も重要であることがわかった。現在、さらに ID を誘導している T 細胞を単離し、genome-wide な遺伝子発現解析を行い、ID を直接誘導する分子の同定を行っている最中である。

(2) 新規 T 細胞サブセット ThX の同定

上記方法で ThX に加えて、既知の Th1, Th2, Th17, iTreg を *in vitro* で誘導し、RNA-seq により genome-wide な遺伝子発現解析を行い、ThX のみに特異的に発現する遺伝子を抽出した。その結果、コレステロール 25-水酸化酵素が最上位の発現遺伝子としてリストされた。コレステロール 25-水酸化酵素は定量 PCR においても IL-27 と TGF-β の刺激で誘導されることが確認でき、また TGF-β 単独では同遺伝子は発現誘導されず、IL-27 単独で誘導される分子であることがわかった。しかし、IL-27 存在下で、TGF-β を添加するとコレステロール 25-水酸化酵素の発現は容量依存性の増加し、TGF-β はコレステロール 25-水酸化酵素の発現を増強させる役割があることがわかった。コレステロール 25-水酸化酵素はコレステロールを 25-水酸化コレステロールに変換する酵素である。そこで、T 細胞を IL-27 と TGF-β で刺激後、培養上清中に産生される 25-水酸化コレステロールをガスクロマトグラフィー-質量分析計で測定したところ、確かに 25-水酸化コレステロールが分泌されることがわかった。一方、同酵素による代謝産物である 25-水酸化コレステロールを培養 T 細胞に添加すると T 細胞に細胞死が誘導され、25-水酸化コレステロールは免疫応答に関与する活性化 T 細胞に細胞死を誘導することで、免疫を制御する可能性が考えられた。さらに、同遺伝子欠損マウスを用いて接触皮膚炎モデルを誘導したところ、皮膚炎の程度が欠損マウスにおいて強く、コレステロール 25-水酸化酵素は免疫制御の観点から重要な分子であることが示唆された。最後に、Ch25h 遺伝子座に IRES プロモーター下で EGFP-Cre 融合タンパクを発現する遺伝子をノックインし、そのマウスの T 細胞を IL-27 と TGF-β により刺激し、ThX を誘導した。しかし、理由は不明であるが、期待された EGFP の発現を観察できず、同マウスを用いた *in vivo* における ThX の同定は困難であることがわかった。以上のことから、IL-27 刺激により CD4⁺T 細胞にコレステロール 25-水酸化酵素が発現し、25-水酸化コレステロールが分泌する

こと、この分子が免疫制御機能を有していることが明らかになり、T細胞の新しい機能を同定することができた。

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 1 件)

1. Michael Kasperkiewicz, Christoph T. Ellebrecht, Hayato Takahashi, Jun Yamagami, Detlef Zillikens, Aimee S. Payne and Masayuki Amagai: Pemphigus. Nat Rev Dis Primers In press. (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. Hayato Takahashi, Hisashi Nomura, Hisato Iriki, Akiko Kubo, Yohei Mikami, Yuka Kanno, John O'Shea, Masayuki Amagai: Novel immune regulation by CD4⁺ T cells via cholesterol 25-hydroxylase pathway. 第24回分子皮膚科学フォーラム. ベルサール東京日本橋(東京都中央区) 2017.4.14-15
2. Hayato Takahashi, Hisashi Nomura, Hisato Iriki, Yohei Mikami, Yuka Kanno, John O'Shea, Masayuki Amagai: 25-hydroxycholesterol secreted from CD4⁺ T cells mediates novel immune regulation by interleukin-27. The 45th annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 2016.12.5-7
3. Hayato Takahashi, Hisashi Nomura, Hisato Iriki, Akiko Kubo, Yohei Mikami, Yuka Kanno, John O'Shea, Masayuki Amagai: Novel immune regulation by CD4⁺ T cells via cholesterol 25-hydroxylase pathway. European Society for Dermatological Research Annual Meeting 2016. München, Germany. 2016.9.7-10
4. Hayato Takahashi: Advances on the pemphigus mouse model. 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada. 2015.6.8-13

[図書](計 1 件)

1. Jun Yamagami, Hayato Takahashi, and Masayuki Amagai: Pemphigus. Immunology of the Skin Springer p405-417, 501 ページ

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 25-ヒドロキシコレステロールを有効成分として含有してなる、活性化されたT細胞及び/又はB細胞に選択的な細胞死誘導剤又は細胞死促進剤

発明者: 高橋勇人、天谷雅行

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-111556

出願年月日: 2016年6月3日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勇人 (TAKAHASHI, Hayato)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号: 40398615

(2) 研究分担者

天谷 雅行 (AMAGAI, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 90212563

佐々木 貴史 (SASAKI, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号: 70306843

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

John O'Shea, M. D.

National Institute of Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, USA