

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09769

研究課題名(和文) 発症機序最上流に表皮バリア機能異常があるという新視点による乾癬表皮・免疫病態解明

研究課題名(英文) Stat3 activation in epidermal keratinocytes induces psoriasis-like lesions via activation and migration of Langerhans cells to skin draining lymph nodes.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫バリアにおいて重要な役割を担うランゲルハンス細胞は乾癬病変において活性化しており、また、乾癬病態成立において不可欠な役割を持ち、皮膚所属リンパ節においてIL-23を産生し、Th17細胞を誘導する可能性を、モデルマウス(K5.Stat3Cマウス、ランゲリンDTR、ノックインマウス)を用いて示した。また、乾癬病態成立において、表皮細胞におけるStat3の活性化はランゲルハンス細胞を活性化しやすく、皮膚所属リンパ節への遊走を促しやすいことを明らかにし、さらに、表皮細胞が産生するIL-1 β は表皮内ランゲルハンス細胞を活性化させる因子のひとつである可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Langerhans cells (LCs) were activated in psoriatic lesion of patients with psoriasis and psoriasis-like lesions of K5.Stat3C mice treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Notably, compared with nontransgenic mice, K5.Stat3C mice showed an increased number of LCs in the sDLNs before psoriasis-like lesions developed. Importantly, the psoriasis-like lesions in K5.Stat3C mice_langerin DTR KI mice were significantly attenuated in the absence of LCs, indicating that LCs were essential to the development of psoriasis-like lesions. Flow cytometric analysis of cells from sDLNs in TPA treated-K5.Stat3C mice revealed that LCs produced IL-23. Moreover, IL-1 β was up-regulated in keratinocytes of Stat3C mice. Our study suggests that Stat3 activation in keratinocytes induces the activation of LCs and that migration of LCs to sDLNs is essential for the pathogenesis of psoriasis through producing inflammatory cytokines such as IL-23.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 皮膚バリア障害 Stat3 Langerhans細胞

1. 研究開始当初の背景

乾癬は欧米で人口の 2-4%を占める頻度の高い疾患であり、本邦においても患者数は増加している。乾癬は、表皮角化細胞の増殖亢進による表皮肥厚を伴う角化異常および多核白血球が深く関与する顕著な炎症により特徴づけられる慢性の炎症性疾患である。乾癬の病態は表皮と免疫系の病的クロストークによって形成されるが、どちらが一次的な引き金を引くかは不明である。免疫系の病態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。一方、皮膚バリア機能維持に関与する late cornified envelop (LCE) 3B, 3C が乾癬感受性遺伝子の 1 つとして報告され、表皮側の要因としてバリア破綻が病態発症に関与する可能性が示された (Trend Genet 2010; 26: 415)。

申請者らは、平成 24 年度基盤研究 C (乾癬発症に関与する皮膚バリア障害)より研究費を受け、皮膚の角層バリア機能において重要な脂質の 1 つであるセラミドの合成酵素 (serine palmitoyl transferase:SPT) 遺伝子を表皮特異的に破壊したマウス (K5.SPT KO マウス) において、表皮肥厚、角層下への多核白血球遊走、毛細血管拡張などを示す乾癬様皮疹を自然に発症し、そのセラミド合成酵素欠如によって生じた乾癬様皮膚病変は、ヒト同様に IL-23/Th17 ($\gamma\delta$ -IL-17) 軸に依存しており、抗 IL-12/23p40 抗体投与によって乾癬様皮疹の誘導を阻止できることを報告し、表皮におけるバリア障害が乾癬病態の発症に関与する可能性を示した (J Invest Dermatol 2013; 133: 2555)。また、申請者らの研究室で開発した乾癬モデルマウス (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によって乾癬様皮疹を誘導でき、その乾癬様皮疹は、IL-23/Th17 軸に依存しており、この軸を標的とする抗体 (抗 IL-12/23p40, 抗 IL-23p19, 抗 IL-17A 抗体) によって乾癬様皮疹形成が抑制されることを報告した (図 4, 5) (Nat Med. 2005;11:43, J Immunol 2011; 186: 4481)。

バリア障害修復時に表皮細胞から IL-1 α , TNF- α , GM-CSF, IL-6 などのサイトカインが産生される。乾癬はケネル現象によって当たりやすい部位、バリア障害を受けやすい部位に好発する。よって、乾癬発症部位において、持続的バリア障害からの修復遅延によって過剰に産生されるサイトカインが乾癬病態を誘導する可能性が考えられる。ランゲルハンス細胞は、表皮内における抗原提示樹状細胞であるが、その機能は十分に明らかにされていない。表皮細胞から産生される IL-1, TNF- α , GM-CSF などがランゲルハンス細胞を活性化させることが知られている。そこで、申請者らは、炎症性角化症である乾癬病態発

症におけるランゲルハンス細胞の関与について解析した。

2. 研究の目的

乾癬の病態の発症機序最上流に表皮バリア機能異常があるという新視点から、免疫バリアにおいて重要な役割を担うランゲルハンス細胞の乾癬病態形成における役割を解明する。

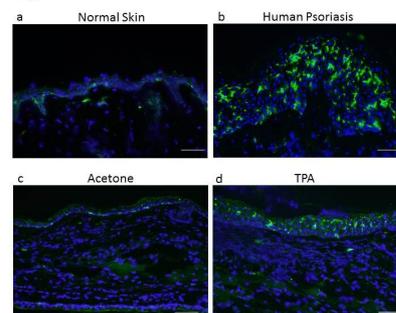
3. 研究の方法

- 1) ヒト乾癬病変および乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) におけるランゲルハンス細胞の活性化を免疫染色を用いて確認する。
- 2) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の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フローサイトメトリー解析 (FACS) を用いて検討する。
- 3) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) とジフテリア毒素投与によってランゲリン陽性細胞を欠失できるマウスを交配したマウスにおける乾癬様病変の誘導について検討する。
- 4) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) のランゲルハンス細胞をマイクロアレイ解析をする。
- 5) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の産生するサイトカインについて FACS を用いて検討する。
- 6) 表皮細胞におけるランゲルハンス細胞を刺激するサイトカインを real-time RT-PCR を用いて遺伝子レベルで同定する。

4. 研究成果

- 1) ヒトの乾癬病変 (図 1a,b) と乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の乾癬様病変 (図 1c,d) におけるランゲルハンス細胞を形態学的に比較したところ、ランゲルハンス細胞は大型化し表皮突起を伸ばし表皮中央に位置するあるいは真皮内へ遊走し活性化していることを確認した。

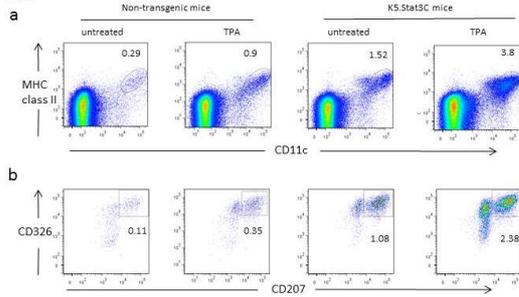
図 1



- 2) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) に 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を塗布することによって乾癬様病変を誘導できる。乾癬様病変を誘導した乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) および乾癬様病変を誘導していない乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の皮膚所属リンパ節に遊走するランゲルハンス細胞をフローサイトメトリー解析 (FACS) 施行してみると、コントロールの正常マウスと比較して、乾癬様病変の有無にかかわらず、乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の皮膚所属

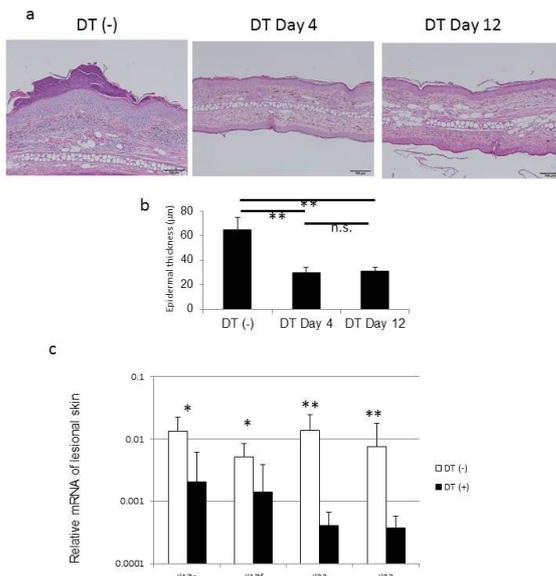
リンパ節へ遊走するランゲルハンス細胞の数は増加していた。この結果は、Stat 3 が活性化している表皮細胞においてランゲルハンス細胞は活性化しやすく皮膚所属リンパ節に遊走しやすいことを示した。(図 2 a, b)

図2



3) Langerin- DTR ノックインマウスは、ヒトのランゲリンプロモーターのもとジフテリア毒素受容体を発現しており、ジフテリア毒素(DT)を投与することによってランゲリン陽性細胞を欠失させることができるマウスである。乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) と Langerin- DTR ノックインマウスを交配したマウスに TPA を塗布したところ、乾癬様病変の誘導は完全に抑制された(図 3 a,b)。この結果は乾癬病態成立においてランゲルハンス細胞が重要な役割を担うことを示した。ランゲルハンス細胞を欠失した皮膚では、乾癬様病変に発現している IL-23/Th17 軸に関連したサイトカインである IL-17A, IL-17F, IL-22, IL23 の発現は低下していた(図 3 c)。

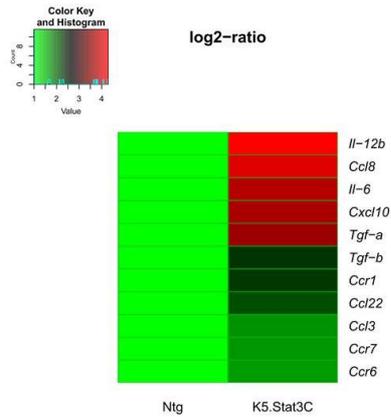
図3



4) 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) におけるランゲルハンス細胞の機能解析をするため、乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) 表皮からランゲルハンス細胞を採取し、正常マウス表皮のランゲルハンス細胞と比較したマイクロアレイ解析を行った。その結果、IL-12β, CCL8, IL-6, CXCL10, TGF-αが高発現していることが明らかになった(図 4)。IL-12βは、

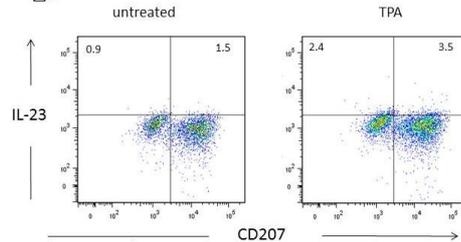
IL-12, IL-23 に共通するサブユニットである。Th17 細胞は樹状細胞から産生される IL-23 環境下に誘導される。この結果はランゲルハンス細胞は IL-23 を産生し乾癬病変成立において重要な働きをする Th17 の誘導に関与している可能性を示した。

図4



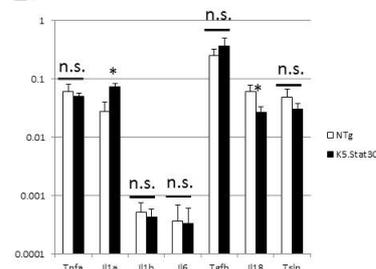
5) 次に、乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) に TPA 塗布し乾癬様病変を誘導した乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の皮膚所属リンパ節細胞を用いて FACS 解析しランゲルハンス細胞の IL-23 の産生を検討したところ、ランゲルハンス細胞は IL-23 を産生していることを確認した(図 5)。

図5



6) 最後に、乾癬病変成立時に表皮内に存在するランゲルハンス細胞を活性化する表皮の産生サイトカインを検討したところ、TPA 塗布し乾癬病変を誘導した表皮細胞においては IL-1αが正常マウス表皮と比較して高発現していることが明らかになった(図 6)。この結果より、表皮細胞が産生する IL-1αがランゲルハンス細胞を活性化している可能性が示唆された。

図6



以上のことより、乾癬病変成立においてはバリア免疫に関与するランゲルハンス細胞が重要な役割をしており、ランゲルハンス細胞は皮膚所属リンパ節において IL-23 を産生し

Th17 を誘導し、乾癬病変成立に関与していることが明らかになった。また、表皮細胞における Stat3 の活性化はランゲルハンス細胞を活性化、遊走させやすく、表皮細胞が産生する IL-1 α は表皮内ランゲルハンス細胞を活性化させる因子のひとつである可能性が示唆された。

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 25 件)

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

2. Shibata Y, Ohko K, Sano S: Can patch test sensitization with gold sodium thiosulfate be ruled out? - a case report. *Contact Dermatitis*, 78(1): pp.94-95, 2018. 査読有
doi: 10.1111/cod.12864.

3. 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): pp.841-843, 2017. 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.13556.

4. 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*, 19;7:46565, 2017. 査読有
doi: 10.1038/srep46565.

5. Shimoda Y, Sato Y, Hayashida Y, Yamazaki Y, Mizukawa Y, Nakajima K, Shiohara T, Aoyama Y. Lichen amyloidosis as a sweat gland/duct-related disorder: resolution associated with restoration of sweating disturbance. *Br J Dermatol*, 176(5): pp.1308-1315, 2017. 査読有
doi: 10.1111/bjd.15060.

6. Takeichi T, Sugiura K, Nomura T, Sakamoto T, Ogawa Y, Oiso N, Futei Y, Fujisaki A, Koizumi A, Aoyama Y, Nakajima K, Hatano Y, Hayashi K, Ishida-Yamamoto A, Fujiwara S, Sano S, Iwatsuki K, Kawada A, Suga Y, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M: Pityriasis Rubra Pilaris Type V as an Autoinflammatory Disease by CARD14

Mutations. *JAMA Dermatol*, 153(1): pp.66-70, 2017. 査読有
doi: 10.1001/jamadermatol.2016.3601.

7. Nakajima H, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Sano S: Leucine-rich a-2 glycoprotein is an innovative biomarker for psoriasis. *J Dermatol Sci*, 86(2): pp.170-174, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.01.008.

8. Matsushima T, Nakajima H, Ohko K, Nakajima K, Sano S: Chlorothiazide-induced photoaggravation of psoriatic lesion during narrowband ultraviolet B treatment in a case of psoriasis vulgaris. *J Dermatol*, 44(6): e122-e123, 2017. 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.13764.

9. 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.

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

11. Charruyer A, Fong S, Vitcov GG, Sklar S, Tabernik L, Taneja M, Caputo M, Soeung C, Yue L, Uchida Y, Arron ST, Horton KM, Foster RD, Sano S, North JP, Ghadially R: Brief Report: Interleukin-17A-Dependent Asymmetric Stem Cell Divisions Are Increased in Human Psoriasis: A Mechanism Underlying Benign Hyperproliferation. *Stem Cells*, 35(8): pp.2001-2007, 2017. 査読有
doi: 10.1002/stem.2656.

12. Kubo T, Ochi Y, Baba Y, Hirota T, Tanioka K, Yamasaki N, Ypshimitsu M, Higuchi K, Takenaka T, Nakajima K, Togawa T, Tsukimura T, Sano S, Tei C, Sakuraba H, Kitaoka H: Prevalence and clinical features of Fabry disease in Japanese male patients with diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol*, 69(1): pp.302-307, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.jjcc.2016.05.014.

13. Takahashi A, Nakajima K, Togitani K, Aoki N, Miyoshi K, Sano S: Spontaneous

remission of aleukemic cutaneous myeloid sarcoma followed by crisis of acute monoclonal leukemia. *J Dermatol*, 43(4): pp.452-453, 2016. 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.13202.

14. Kamiya K, Aoyama Y, Wakashima C, Kudo T, Nakajima K, Sano S, Ishii N, Teye K, Hashimoto T, Iwatsuki K, Tokura Y : Atypical pemphigus with immunoglobulin G autoantibodies against desmoglein 3 and desmocollin 3. *J Dermatol* , 43(4): pp.429-431, 2016. 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.

15. Hashida Y, Kamioka M, Tanaka M, Hosokawa S, Murakami M, Nakajima K, Kikuchi H, Fujieda M, Sano S, Daibata M : Ecology of Merkel Cell Polyomavirus in Healthy Skin Among Individuals in an Asian Cohort. *J Infect Dis*, 213(11): pp.1708-1716, 2016. 査読有
doi: 10.1093/infdis/jiw040.

16. Hashida Y, Nakajima K, Nakajima H, Shiga T, Tanaka M, Murakami M, Matsuzaki S, Naganuma S, Kuroda N, Seki Y, Katano H, Sano S, Daibata M : High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *J Clin Virol*, 82: pp.101-107, 2016. 査読有
doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.011.

17. 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): e0156904, 2016. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0156904.

18. Shibata T, Ohto U, Nomura S, Kibata K, Motoi Y, Zhang Y, Murakami Y, Fukui R, Ishimoto T, Sano S, Ito T, Shimizu T, Miyake K. Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int Immunol*, 28(5): pp.211-222, 2016. 査読有
doi: 10.1093/intimm/dxv062.

19. 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): pp.445-453, 2015. 査読有
doi: 10.1038/jid.2014.426.

20. Kanno A, Tanimura N, Ishizaki M, Ohko K, Motoi Y, Onji M, Fukui R, Shimozato T, Yamamoto K, Shibata T, Sano S,

Sugahara-Tobinai A, Takai T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh S, Miyake K : Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat Commun*. 4;6:6119, 2015. 査読有
doi: 10.1038/ncomms7119.

21. Shiga T, Sato K, Kataoka S, Sano S : TNF inhibitors directly target Th17 cells via attenuation of autonomous TNF/TNFR2 signalling in psoriasis. *J Dermatol Sci*, 77(1): pp.79-81, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.11.008.

22. Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Nagata K, Nakajima H, Sano S, Hayashi K. Comparison of Akt/mTOR/4E-BP1 pathway signal activation and mutations of PIK3CA in Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative carcinomas. *Hum Pathol*, 46(2): pp.210-216, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.humpath.2014.07.025.

23. Nakajima H, Matsushima T, Sano S : Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma arising from folliculitis decalvans. *J Dermatol*, 42(7) : pp.741-743, 2015. 査読有
doi: 10.1111/1346-8138.12880.

24. 中島喜美子 : 全身作用型経皮吸収型製剤の進歩と皮膚トラブル : 皮膚診療, 37(5) : pp.434-441, 2015. 査読有

25. 中島喜美子 : 乾癬と IL-12/23 受容体. 分子リウマチ治療, 8(4): pp.219-223, 2015. 査読有

[学会発表](計9件)

1. Nakajima K, Yamamoto M, Sano S : Histopathological findings of ongoing, inflammatory vitiligo. The 2nd Annual Meeting of the East Asian Vitiligo Association and the 1st Annual Meeting of the Japanese Society for Vitiligo. 大阪 2018.3.9.

2. Nakajima K : Mouse model of psoriasis and their relevance. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 高知 2017.12.15-17.

3. Nakajima K, Uchida Y and Sano S : Cold-sensing ameliorated ichthyosis in a patient with Dorfman-Chanarin syndrome likely through reversed lipolysis under thermo-regulation in keratinocytes. 47th Annual ESDR Meeting 2017. Salzburg

2017.9.27-30.

4. 中島喜美子 : 乾癬病態における「表皮と免疫系のクロストーク」第 116 回日本皮膚科学会総会. 仙台 2017.6.2-4.

5. Nakajima K, Ishimoto T, Uchida Y and Sano S : Cold-sensing ameliorated ichthyosis in a patient with Dorfman-Chanarin. The 46th Society for Investigative Dermatology (SID)2017 Annual Meeting. Portland Oregon 2017.4.26-29.

6. 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. ドイツ 2016.9.7-10.

7. 中島喜美子 : モデルマウスを用いた乾癬病態の解明. 第 115 回日本皮膚科学会総会. 京都 2016.6.3-5

8. Nakajima K, Kataoka S, Yamamoto M, Malissen B, Sano S : 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. LC2015 14th International Workshop on Langerhans Cells. 京都 2015.11.5-8.

9. 中島喜美子 : 関節症性乾癬の病態・治療. 第 114 回日本皮膚科学会総会. 横浜 2015.5.29-31

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

中島 英貴 (NAKAJIMA, 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