

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15418

研究課題名(和文) ヒト白斑モデルTh17型マウスを用いた白斑発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanism of vitiligo using mice with Th17-type response.

研究代表者

片山 一郎 (Katayama, Ichiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80191980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前白斑発症におけるTh17型免疫反応の重要性、自己免疫疾患発症におけるMHCミスフォールド蛋白の意義を報告した。これらの知見で白斑発症メカニズムの解明に取り組んだ。ヒトとマウスの数種のメラノサイト抗原をクローニングし、発現ベクターに組み込み細胞に発現、蛋白レベルで確認した。MHCとそれらの抗原の関係、メラノサイト色素産生や免疫反応への影響を解析した。また化学物質による白斑発症機構を解析し紫外線やサイトカインがNF- κ B経路に影響しメラノサイトの生存を調節することを見出した。最終的に期間中の白斑発症マウスの樹立に至らなかったが、今回の成果で今後白斑マウスモデルを樹立したい。

研究成果の概要(英文)：We had reported that significant role of Th17 cells in the development of vitiligo. On the other hand, we found that cellular misfolded proteins/ MHC complex resulted in development of autoimmune diseases. Therefore, we considered that these mechanisms might be involved in vitiligo development. Recently, rhododendrol revealed to induce leukoderma like vitiligo. We thought pathogenesis of rhododendrol-induced vitiligo might have implications for understanding vitiligo. We found that melanocytes were damaged with rhododendrol in the presence of ultraviolet light and an inflammatory cytokine. These effects depended on NF- κ B activity. As for establishment of model mice with vitiligo, we cloned several melanocyte antigens of both mice and human, introduced into the expression vector, and confirmed protein expression. We analyzed functions of MHC/melanocyte antigens. We would like to make mice model using the established constructs and the knowledges provided in this study.

研究分野：皮膚科

キーワード：免疫学 ストレス 生体分子

1. 研究開始当初の背景

汎発性尋常性白斑では有効な治療法はなく、患者 QOL の低下による医療経済的な損失は大きい。近年自然免疫系の応答に関わる NALP1 遺伝子の一塩基多型による可能性が報告された。さらにわれわれは IL17A 産生 T 細胞(Th17)と樹状細胞が白斑病変部で活性化し Inflammasome 関連サイトカイン産生を誘導することを初めて報告した。さらに尋常性白斑における MelanA 反応性 CD8⁺T 細胞と制御性 T 細胞の役割を明らかにしてきた。

また表皮角化細胞、真皮線維芽細胞による協調作用、微生物や物理化学物質も加わった微小環境形成が白斑形成に重要と考えた。一方 HLA によるミスフォールド自己抗原蛋白の提示とそれによる自己免疫疾患発症機構を見出し白斑における検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

これら Th17 型 T 細胞を含めた T 細胞による免疫反応、HLA による自己免疫疾患誘導機構、種々の微小環境への皮膚の応答機構の知見を融合し *in vivo* での尋常性白斑発症機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

いくつかのヒト及びマウスメラノサイト抗原をヒト及びマウスメラノーマ細胞よりクローニングした。その後それらを発現ベクターに組み込み細胞での発現を western blot した。

HLA とメラノサイト抗原を共発現させメラノサイト抗原の提示をフローサイトメーターで解析した。

メラノサイトやトランスフェクタントの培養系に Rhododendrol を添加後紫外線や炎症性サイトカインを作用させ、メラノサイトの NF- κ B のリン酸化、NF- κ B による転写活性を western blot やルミのメーターで解析した。

4. 研究成果

Th17 細胞、MHC ミスフォールド蛋白提示機構、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞による協調作用、微小環境形成が白斑形成に重要と考察し、それらを *in vivo* の実験系で証明しようと考えた。さらに最近口ドデノールの塗布が尋常性白斑様の症状を誘導し社会問題となった。化学物質や、物理刺激、炎症等が汎発性白斑の誘引となる事は以前より知られていたが発症機構は不明だった。そこでこれら外的要因の白斑発症への影響を解析した。まず種々のヒトとマウスのメラノサイト抗原の遺伝子クローニングに成功し発現ベクターに組み込み細胞に発現し蛋白レベルで発現確認した。さらに MHC や HLA とそれらの抗原の関係、メラノサイトへの影響を解析した。また口ドデノールが TNF- α や紫外線などの外的刺激と協調しメラノサイトをアポトーシスの方

向に誘導することを証明した。これらのツールを用いて白斑モデルマウスの樹立を試みた。最終的に期間中の白斑発症マウスの樹立に至らなかったが、白斑モデルマウスの樹立は自己免疫性汎発性白斑発症機構の解析に欠かせないことから、今回クローニングしたメラノサイト抗原や今回得られた知見をもとに今後も白斑マウスモデルの樹立に取り組んでいく所存である。

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 13 件)

1) Arase N, Arase H: Cellular misfolded proteins rescued from degradation by MHC class II molecules are possible targets for autoimmune diseases. J. Biochem. 2015;158(5):367-72.

2) Tanimura K, Jin H, Suenaga T, Morikami S, Arase N, Kishida K, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Takasugi K, Ohmura K, Yamamoto K, Katayama I, Sasazuki T, Lanier LL, Atsumi T, Yamada H, Arase H: 2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. Blood. 2015;125(18):2835-44.

3) Hirobe S, Azukizawa H, Hanafusa T, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Katayama I, Okada N, Nakagawa S: Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. Biomaterials. 2015;57:50-8.

4) Eleftheriadou V, Thomas K, van Geel N, Hamzavi I, Lim H, Suzuki T, Katayama I, Anbar T, Abdallah M, Benzekri L, Gauthier Y, Harris J, Silva de Castro CC, Pandya A, Goh BK, Lan CC, Oiso N, Al Issa A, Esmat S, Le Poole C, Lee AY, Parsad D, Taieb A, Picardo M, Ezzedine K; Vitiligo Global Issues Consensus Group: Developing core outcome set for vitiligo clinical trials: international e-Delphi consensus. Pigment Cell Melanoma Res. 2015;28 (3):363-9.

5) Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K: Guideline for medical professionals (i. e. dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. J Dermatol. 2015;42(2):113-28.

6) Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I: Possible involvement of CCR4⁺ CD8⁺ T cells and elevated plasma CCL22 and CCL17 in patients with rhododendrol-induced leukoderma. J Dermatol Sci. 2015;77(3):188-90.

7) Tagami-Nagata N, Serada S, Fujimoto M,

Tanemura A, Nakatsuka R, Ohkawara T, Murota H, Kishimoto T, Katayama I, Naka T: Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) induces significant preclinical anti-tumor effect in malignant melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2015;24(11):864-71.

8) Tanaka M, Yang L, Wataya-Kaneda M, Suzuki T, Okamura K, Hozumi Y, Yang F, Katayama I: Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 in a Japanese infant. *J Dermatol*. 2015;42(9):906-7.

9) Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I: An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. *J Dermatol Sci*. 2015;77(3):185-8.

10) Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ: NUPA2 amplification coupled with PTEN deficiency promotes melanoma development via CDK activation. *Cancer Res*. 2015;75(13):2708-15.

11) Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I: 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci*. 2015;77(3):182-5.

12) Arase N, Yang L, Tanemura A, Yang F, Suenaga T, Arase H, Katayama I: The effect of rhododendrol inhibition of NF- κ B on melanocytes in the presence of tyrosinase. *J Dermatol Sci*. 2016;83(2):157-9.

13) Terao M, Katayama I: Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci*. 2016;84(1):11-6.

〔学会発表〕(計 10 件)

1) Arase N, Jin H, Tanimura K, Yamaoka T, Kiyohara E, Ohmura K, Murota H, Arase H, Katayama I: Novel autoantibody against the 2GP1/HLA-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcerations. 14th International Workshop on Langerhans Cells, Kyoto, Japan (2015.11.05-08)

2) Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I: Silencing of tuberous sclerosis complex (TSC) 2 via siRNA causes reduction of autophagy and impairment of melanogenesis in cultured human skin epidermal melanocytes: implication for a potential mechanism of hypopigmented

macules in tuberous sclerosis complex. 2015 World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada (2015.06.08-13)

3) Yang F: Dynamic visualization of dendritic cells in the skin from patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma, Poster Presentation. LC2015 (14th International Workshop on Langerhans Cells) Kyoto, Japan (2015.11.07)

4) Arase N, Tanimura K, Hui J, Matsuoka S, Yamaoka T, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Ohmura K, Murota H, Arase H, Katayama I: Presence of anti-2GP1/HLA-DR complex autoantibodies in the non-APS patients with recurrent limb ulcerations. 日本研究皮膚科学会 第 40 回学術大会・総会 岡山 (2015.12.11-13)

5) Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in hypopigmented macules in patients with tuberous sclerosis complex. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okayama (2015.12.11-13)

6) 荒瀬規子: ミスフォールド蛋白質 MHC Class II 複合体と自己免疫疾患. 第 3 回ケラチノサイトと免疫を勉強する会 東京 (2015.03.28)

7) 荒瀬規子, Hui Jin, 谷村憲司, 山岡俊文, 室田浩之, 荒瀬 尚, 片山一朗: ミスフォールドタンパク質 HLA クラス II 複合体と自己免疫疾患 原因不明難治性皮膚潰瘍症例での 2GP1 HLA-DR 複合体抗体の検討- 第 22 回分子皮膚科学フォーラム 高知 (2015.04.17-18)

8) 高橋 彩, 楊 飛, 楊 伶俐, 永田由子, 西岡めぐみ, 荒瀬規子, 種村 篤, 片山一朗: 難治性ロドデノール誘発性脱色素斑患者 9 例の臨床的検討. 第 67 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 長崎 (2015.10.17-18)

9) 山賀康右, 片山一朗: Claudin-1 ノックダウンマウスの表現型からみた皮膚恒常性の維持機構. 第 7 回センターリサーチセミナー 大阪 (2015.08.23)

10) 楊 伶俐, 金田真理, 種村 篤, 楊 飛, 片山一朗: 炎症性疾患における表皮 stem cell マーカーの検討 第 10 回大阪免疫皮膚アンチエイジング 大阪 (2015.10.22)

11) Arase N, Jin H, Tanimura K, Matsuoka S, Ohmura K, Murota H, Katayama I, Arase H: Novel Autoantibody against neo-self 2-glycoprotein I/HLA-DR Complex. 日本免疫学会総会 沖縄 (2016.12.05-07)

12) Arase N, Tanemura A, Yang L, Jin H, Nishioka M, Yang F, Aoyama Y, Suenaga T, Arase H, Katayama I: Immunological analysis of the patients with vitiligo vulgaris and rhododendrol-induced leukoderma. 第 41 回日本研究皮膚科学会総会 仙台 (2016.12.09-11)

13)Takahashi A, Yang L, Yang F, Arase N, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Mast cell activation promotes possible transient hypermelanosis of the perilesional skin in rhododendrol induced-leukoderma. The 41st Annual Meeting of the JSID Sendai (2016.12.09-11)

14)Yang F, Wataya-Kaneda M, Yang L, Tanemura A, Katayama I:Dynamic visualization of dendritic cells in the skin from patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma.日本研究皮膚科学会第 41 回年次学術大会 仙台 (2016.12.10)

15)荒瀬規子:ロドデノールによる白斑症状の免疫学的機序に関する研究. 第 115 回皮膚科学会総会;化学物質(ロドデノール)による白斑研究基金研究成果報告会 京都 (2016.06.03-05)

16)荒瀬規子,種村篤,楊伶俐,楊飛,西岡めぐみ,高橋彩,片山一郎:ロドデノール白斑発症機構の解析. 第 27 回日本色素細胞学会シンポジウム 岐阜(2016.11.12-13)

17)高橋彩,楊伶俐,楊飛,荒瀬規子,種村篤,金田眞理,片山一郎:白斑における IL-17 産生細胞の検討. 第 115 回日本皮膚科学会総会 京都(2016.06.03-05)

18)楊飛,楊伶俐,種村篤,金田眞理,片山一郎:白斑に伴うメラノサイト、樹状細胞動態の検討.第 27 回日本色素細胞学会学術大会 岐阜 (2016.11.12)

19)楊伶俐,金田眞理,楊飛,高橋 彩,種村篤,片山一郎:ロドデノールの表皮ケラチノサイトへの作用. 第 79 回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会 東京 (2016.02.20-21)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 一郎 (Katayama Ichiro)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 80191980

(2)研究分担者

荒瀬 規子 (Arase Noriko)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号: 30360481

楊 伶俐 (Yang Lingli)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)
研究者番号: 40711784

越智 沙織 (Ochi Saori)

大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 00597495

(3)研究協力者