

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15732

研究課題名(和文) IL-22結合タンパクによる皮膚炎症慢性化に対する制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of IL-22 binding protein in the regulatory mechanism for chronic skin inflammation

研究代表者

深谷 知宏 (Fukaya, Tomohiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20624323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IL-22結合タンパク(IL-22BP)欠損マウスではWTマウスと比較してイミキモド誘発性乾癬の病勢の亢進を示した。また、IL-22BP欠損マウスではイミキモド誘発性乾癬の病変部における炎症細胞の浸潤および炎症性サイトカイン産生の亢進を示した。さらに、皮膚角化細胞IL-22刺激試験においてIL-22BPはIL-22シグナル増強を阻害し、皮膚角化細胞の異常分化増殖を抑制した。以上の結果から、IL-22BPは皮膚角化細胞のIL-22シグナル制御機構の重要な役割を担い、皮膚炎症慢性化を阻止することが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに未知であった皮膚炎症慢性化病態の成立機構におけるIL-22シグナル調節機構の役割および“IL-22BP機能”に着眼した分子基盤を解明した。さらに、非感染性慢性炎症性皮膚免疫疾患の成立における新たな概念の提唱により、当該領域の発展へ貢献した。

研究成果の概要(英文)：IL22ra2^{-/-} mice exhibited a more severe IMQ-induced psoriatic dermatitis than WT mice. Furthermore, IL22ra2^{-/-} mice showed enhanced epidermal infiltration of inflammatory leukocytes and higher transcriptional expression of cytokines and chemokines, as well as epithelial inflammation-related molecules, in psoriatic lesions. Although keratinocytes showed increased proliferation and aberrant differentiation upon stimulation with IL-22, IL-22BP entirely inhibited the IL-22 mediated changes in the functionality of keratinocytes. Thus, our findings suggest that IL-22BP has a critical role in the regulation of IL-22 signaling in keratinocytes to prevent chronic inflammatory skin diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫寛容 自己免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 樹状細胞 (DCs) は樹状突起を有する系統マーカー陰性、MHC クラス II 陽性の抗原提示細胞である。DCs は、通常型樹状細胞 (cDCs) と形質細胞様樹状細胞 (pDCs) に大別されるサブセットから構成される。さらに、cDCs は CD8 や CD103 の発現の有無により細分化される。DCs は自然免疫と適応免疫を繋ぐ重要な抗原提示細胞として認識されているが、免疫応答における個々のサブセットの役割やその機能制御機構については不明な点が多く残されている。申請者は先に皮膚組織や粘膜組織 (呼吸器、腸管など) に多く認められる CD103⁺cDCs の機能特性の解明を目的として、免疫細胞間の DNA マイクロアレイ解析を行い、CD103⁺cDCs の特異的高発現分子として、IL-22 結合タンパク (IL-22BP) を同定した。

(2) IL-10 ファミリーに属する IL-22 は主に活性化した CD4⁺T 細胞サブセット (T_H17 細胞、T_H22 細胞)、T 細胞、3 型自然リンパ球などから産生され、IL-22 受容体 (IL-22R) には膜結合型受容体の IL-22RA1 に加え、高親和性分泌型受容体の IL-22BP が存在する。IL-22RA1 を介する IL-22 シグナルは上皮細胞から抗菌ペプチド産生を誘導することにより細胞外寄生病原体に対する感染防御に関与し、また、上皮細胞の分化能や増殖能の調節により各種臓器の恒常性維持においても重要な役割を担っていると考えられている。一方、IL-22 シグナルの増強は上皮細胞の異常分化増殖誘導により慢性炎症性免疫疾患の増悪に関与することが示唆されている。しかしながら、生体内での IL-22BP を介した IL-22 シグナル調節機構についてはいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

活性化リンパ球から産生される IL-22 は上皮細胞機能の制御に基づく感染防御や臓器恒常性維持のみならず、そのシグナル異常増強が慢性炎症性免疫疾患の増悪に関与することが示唆されている。申請者は先に皮膚組織や粘膜組織に多く認められる CD103⁺cDCs の特異的高発現分子として、IL-22BP を同定し、その病態生理学的役割の解明を目的として IL-22BP 欠損マウスを作製した。本研究課題では IL-22BP 欠損マウスを用いて CD103⁺cDCs の IL-22BP を介した生体内 IL-22 機能に起因する皮膚炎症慢性化病態の成立に対する制御機構を明らかにし、IL-22BP を標的とした新規免疫療法の開発を試みた。

3. 研究の方法

研究方法は以下の通りである。

(1) IL-22BP 欠損マウスの尋常性乾癬の解析

本研究課題ではイミキモド誘発性マウス尋常性乾癬モデルを用いた。WT マウスと IL-22BP 欠損マウスにおける尋常性乾癬の病勢について比較検討した。

IL-22BP 遺伝子発現解析

IMQ 塗布マウスの耳介、所属リンパ節を採取し、定量的 PCR 法にて IL-22 と IL-22BP の遺伝子発現を経日的に測定した。

病勢評価

IMQ 塗布後、耳介の紅斑、腫脹、脱落乾燥表皮を経日的に測定した。

病理組織解析

IMQ 塗布 8 日目の耳介を採取した。表皮層肥厚や白血球浸潤で示される皮膚炎症を評価するため、H&E 染色を行なった。また、皮膚病変部での皮膚角化細胞の増殖を評価するため、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) の免疫染色を行なった。さらに、免疫蛍光染色を行い、顆粒球、T 細胞の皮膚浸潤を解析した。

サイトカイン/ケモカイン発現解析

IMQ 塗布 8 日目の耳介、所属リンパ節を採取した。定量的 PCR 法を用いて病態局所のサイトカイン (IL-1・IL-17・IL-19・IL-20・IL-22・IL-23・IL-24・IL-36・TNF- α)、ケモカイン (CCL20・CXCL1) の発現について解析した。

(2) 免疫細胞構成解析

IMQ 塗布 8 日目の耳介、所属リンパ節を採取した。フローサイトメトリー法を用いて免疫細胞構成、CD4⁺T 細胞サブセット (T_H17 細胞/T_H22 細胞)、IL-17/IL-22 産生 T 細胞の存在比率、細胞数について解析した。

(3) 可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子の作製

マウスへの IL-22BP 投与を目的とし、可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子を作製した。そのため、ヒト IgFc 分子キメラ分子発現ベクターに IL-22BP cDNA を挿入し、IL-22BP cDNA-ヒト IgFc 分子キメラ分子発現ベクターを作製した。さらに、発現ベクターを 293T 細胞に遺伝子導入し、得られた培養上清より可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子を精製した。

(4) 可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子の生物活性評価

IL-22 によるマウス皮膚角化細胞の増殖および分化異常に対する可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キ

メラ分子の抑制効果について WST-1 増殖試験および qPCR 法を用いて評価した。

(5) 尋常性乾癬に対する IL-22BP の防御効果の解明

尋常性乾癬発症 WT マウスに対照群にはヒト IgFc キメラ分子、実験群には可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子を投与し、病勢に対する IL-22BP の防御効果を検討した。さらに、皮膚病態局所について、病理組織、サイトカイン(IL-1・IL-17・IL-19・IL-22・IL-24)、抗菌ペプチド(S100a7)、皮膚角化細胞分化マーカー (Krt10) 産生を比較検討した。

4 . 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

(1) IL-22BP 欠損マウスの尋常性乾癬の解析

WT マウスと比較して IL-22BP 欠損マウスでは IMQ 塗布による耳介の紅斑、腫脹、脱落乾燥表皮の著しい亢進を示した。さらに、IL-22BP 欠損マウスでは WT マウスと比較して病態局所のサイトカイン、ケモカインの遺伝子発現の増強を示した。一方、H&E 染色により IL-22BP 欠損マウスでは表皮層肥厚や白血球浸潤で示される皮膚炎症が WT マウスと比較して亢進を示した。また、PCNA 染色の結果、IL-22BP 欠損マウスでは WT マウスと比較して皮膚病変部における皮膚角化細胞増殖の亢進を示した。

(2) 免疫細胞構成解析

WT マウスと比較して IL-22BP 欠損マウスでは皮膚炎症組織への好中球、T 細胞の浸潤亢進を示した。また、WT マウスと比較して IL-22BP 欠損マウスでは TH17 細胞、TH22 細胞、T 細胞からの IL-17、IL-22 産生の増強が認められた。

(3) 可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子の生物活性評価

IL-22 シグナルにより皮膚角化細胞は著しい増殖および終末分化異常の誘導を示すが、可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子の添加によりこれら皮膚角化細胞の過増殖および分化制御不全が阻止された。

(4) 尋常性乾癬に対する IL-22BP の防御効果の解明

ヒト IgFc キメラ分子投与群と比較して可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子投与群では IMQ 塗布による耳介の紅斑、腫脹、脱落乾燥表皮の軽減を認めた。さらに、可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子投与群ではサイトカイン、抗菌ペプチド産生の減弱を認めた。また、ヒト IgFc キメラ分子投与群では IMQ 塗布により、皮膚角化細胞分化マーカー発現の著しい減弱を示した。一方、可溶性 IL-22BP-ヒト IgFc キメラ分子投与群では、健常マウスと同程度の皮膚角化細胞分化マーカー発現が認められた。

以上の結果から、IL-22BP は皮膚角化細胞の異常分化増殖誘導を抑制し、尋常性乾癬の病態形成を阻止する事が解明された。また、尋常性乾癬に対する IL-22 シグナル阻害を介した IL-22BP 治療の有効性が示唆された。

本研究課題により、皮膚角化細胞における IL-22BP を介した皮膚炎症慢性化抑制機構の存在が明らかとなった。今後、本研究成果を応用し皮膚慢性自己免疫性疾患への IL-22BP を標的とした新たな治療法の開発へ繋がる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomohiro Fukaya, Takehito Fukui, Tomofumi Uto, Hideaki Takagi, Junta Nasu, Noriaki, Miyanaga, Keiichi Arimura, Takeshi Nakamura, Haruhiko Koseki, Narantsog Choijookhuu, Yoshitaka Hishikawa, Katsuaki Sato	4. 巻 9
2. 論文標題 Pivotal Role of IL-22 Binding Protein in the Epithelial Autoregulation of Interleukin-22 Signaling in the Control of Skin Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.01418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷知宏、福井丈仁、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Early life antibiotic-driven gut dysbiosis promotes the breakdown of oral tolerance mediated through the dysregulation of dendritic cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都倫史、高木秀明、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Requirement of gut mucosal plasmacytoid dendritic cells for establishing oral tolerance to prevent undesirable allergic disorders
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木秀明、宮永宜明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Essential role of submandibular lymph node conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy on allergic asthma
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井丈仁、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、西川陽太郎、佐藤克明
2. 発表標題 Pivotal role of CD103 expressed on conventional dendritic cells in the development of psoriasiform dermatitis through the regulation of cutaneous inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深谷知宏、福井丈仁、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Pivotal role of IL-22BP in the epithelial autoregulation of IL-22 signaling in the control of skin inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井丈仁、深谷知宏、宇都倫史、高木秀明、奈須遵太、宮永宜明、佐藤克明
2. 発表標題 Crucial role of CD103 in the development of psoriasiform dermatitis through the regulation of cutaneous inflammation
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木秀明、宮永宜明、宇都倫史、深谷知宏、奈須遵太、福井丈仁、佐藤克明
2. 発表標題 Crucial role of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮永宜明, 高木秀明, 宇都倫史, 深谷知宏, 奈須遵太, 福井丈仁, 佐藤克明
2. 発表標題 Tolerogenic function of conventional dendritic cells in the protective effect of sublingual immunotherapy (SLIT) on allergic disorders
3. 学会等名 第 47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇都倫史, 高木秀明, 深谷知宏, 奈須遵太, 福井丈仁, 宮永宜明, 佐藤克明
2. 発表標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in establishing oral tolerance leading to abortive allergic sensitization
3. 学会等名 第 47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深谷知宏, 福井丈仁, 宇都倫史, 高木秀明, 奈須遵太, 宮永宜明, 有村慶一, 中村雄, 佐藤克明
2. 発表標題 Critical role of IL-22 binding protein in the control of skin inflammation
3. 学会等名 第 46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇都倫史, 高木秀明, 深谷知宏, 奈須遵太, 福井丈仁, 宮永宜明, 有村慶一, 中村雄, 佐藤克明
2. 発表標題 Critical role of plasmacytoid dendritic cells in the induction of oral tolerance for the control of allergic sensitization
3. 学会等名 第 46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木秀明, 宇都倫史, 深谷知宏, 奈須遵太, 福井丈仁, 宮永宜明, 有村慶一, 中村雄, 佐藤克明
2. 発表標題 Tolerogenesis of gastrointestinal plasmacytoid dendritic cells impacts the induction of oral tolerance
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----