

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22739

研究課題名（和文）乾癬病変部表皮角化細胞産生p19含有サイトカインの検討

研究課題名（英文）Multifaceted Analysis of p19 Including Cytokines Produced by Psoriatic Keratinocytes

研究代表者

杉原 悟 (Sugihara, Satoru)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20874861

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：IL-23はp19とp40、IL-39はp19とEpstein-Barr virus-induced3(EBI3)の二量体であり、抗IL-23p19抗体は乾癬に高い有効性を示している。これらのサイトカインはp19サブユニットを共有しており、IL-39も乾癬の病態に寄与していると考えた。乾癬病変部ではIL23-Ap19とEBI3の発現が増強しており、培養角化細胞においてもTNF- /IL-17A/IFN- の共刺激で上昇し、乾癬治療薬であるデキサメタゾン、ビタミンD3、アシトレチンを加えることで抑制された。また、p19とEBI3で構成される新規のサイトカインの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尋常性乾癬は表皮肥厚および好中球・T細胞浸潤を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。病変部表皮角化細胞は過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成に大きく関与する。同細胞はIL-23（p19とp40のヘテロダイマー）およびIL-39（p19とEBI3（EBV-induced gene 3）のヘテロダイマー）を発現すると報告されているが、IL-23・IL-39以外のp19含有サイトカインの発現に関する報告はまだない。本研究において、これらのサブユニットが乾癬の病態で増強することが判明し、新規のサイトカインの存在の可能性も示唆された。本研究成果は新規治療の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：IL-23(p19/p40) plays a critical role in the pathogenesis of psoriasis and is upregulated in psoriasis skin lesions. And its antibodies are highly effective against psoriasis. IL-39 (p19/Epstein-Barr virus-induced3 (EBI3)), a newly discovered cytokine in 2015, shares the p19 subunit with IL-23. We hypothesized that IL-39, like IL-23, contributes to the pathogenesis of psoriasis. Immunohistochemical analysis showed that IL-23Ap19 and EBI3 expressions were upregulated in the psoriasis skin lesions. In vitro, these expressions were synergistically induced by the triple combination of tumor necrosis factor (TNF)- , IL-17A, and interferon (IFN)- , and suppressed by dexamethasone, vitamin D3, and acitretin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：p19 IL-23 IL-39 psoriasis EBI3

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬は中年に好発する難治性の慢性炎症性皮膚疾患であり、発症頻度は日本人で 0.02~0.1%, 欧米白人で 2~3%と報告されているが、原因は未だに不明である。2015 年に新しいサイトカインである IL-39 が報告された。IL-39 は IL-6/12 サイトカインファミリーに属し、p19 と EBI3 から構成されるヘテロダイマーである。p19 は IL-23 も構成しており、乾癬治療のターゲットである。そのため IL-39 は表皮の異常を示す乾癬の病態に関与している可能性があると考えた。また、これまでのところこのサイトカインと乾癬との関連を示した報告はない。

2. 研究の目的

乾癬の表皮角化細胞における p19 と EBI3 の発現の有無と乾癬病態への関与を調べる。また p19 と EBI3 が構成するサイトカインの発現の有無についても調べる。

3. 研究の方法

免疫組織学的に乾癬皮膚病変部における p19 と EBI3 の発現を解析した。また、乾癬の病態に関与する炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-17A、IFN- γ) で刺激した正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) における IL-23Ap19 と EBI3 の発現を定量リアルタイム PCR (RT-PCR)、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレータンデム質量分析 (LC-MS/MS) により解析した。

4. 研究成果

4.1 乾癬の表皮における IL-23Ap19 と EBI3 の発現増強

正常皮膚と乾癬の患者皮膚切片において、ポリクローナルウサギ抗 IL-23Ap19 抗体およびモノクローナルマウス抗 EBI3 抗体を用いて免疫染色を行った結果、図 1 に示すように尋常性乾癬の皮膚において表皮全体にわたる過剰な発現を確認した。

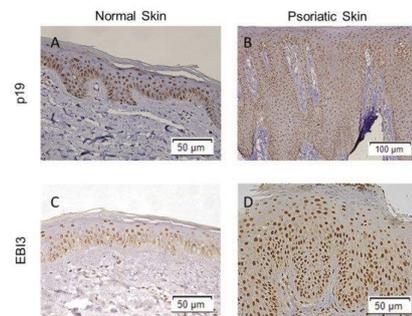


図 1

4.2 TNF- α 、IL-17A および IFN- γ による NHEK における IL-23Ap19 および EBI3 発現の相乗的誘導

NHEK において、TNF- α 、IL-17A および IFN- γ で刺激すると尋常性乾癬の病態に類似して炎症性サイトカイン、ケモカインおよび抗菌ペプチドを産生することが知られている。(文献 1,2)。我々は以前に、NHEK における TNF- α 、IL-17A および IFN- γ の複合刺激によって NHEK が IL-17C、IL-36 γ および抗菌ペプチドである b-defensin-2 を相乗的に誘導することを発表した (文献 3)。以上のことから NHEK を TNF- α 、IL-17A および IFN- γ の 3 つのサイトカインで共刺激することによって尋常性乾癬のケラチノサイトを模倣すると予測した。図 2-A,B において、NHEK を各々のサイトカインで刺激したところ、TNF- α と IL-17A は IL-23Ap19 の mRNA 発現を優位に増強し、また、TNF- α と IFN- γ は EBI3 の mRNA 発現を優位に増強した。図 2-C,D では、TNF- α 、IL-17A および IFN- γ の 3 重刺激で IL-23Ap19 および EBI3 の発現が著明に増強された。

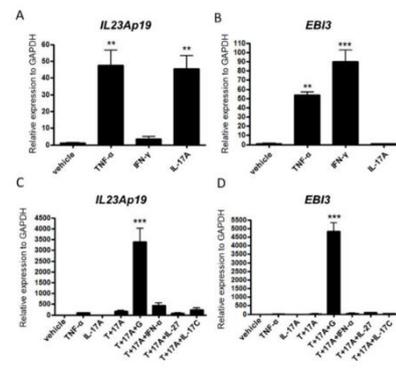


図 2

4.3 デキサメタゾン、ビタミン D3 およびアイトレチンによる局所治療による NHEK における p19 と EBI3 の発現抑制

局所のステロイド外用、ビタミン D3 軟膏、合成レチノイド (アイトレチン) は軽度から中等度の乾癬の標準治療として臨床で使用されている。NHEK において、IL-23Ap19 と EBI3 の発現が上記の 3 剤で抑制されるかどうか検討した。図 3 に示すように、IL-23Ap19 では 3 剤すべてにおいて発現が抑制されたが、EBI3 ではビタミン D3 とアイトレチンのみ発現が抑制された。

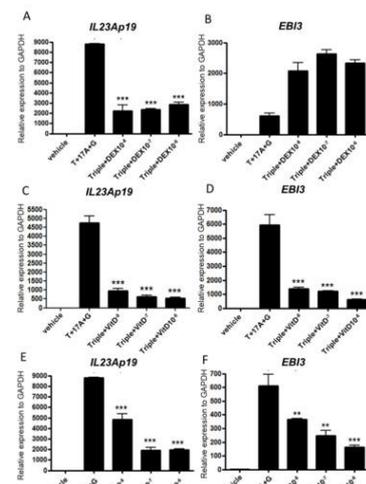


図 3

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

4.4 NHEKにおけるIL-23Ap19およびEBI3蛋白質発現

ELISA法を用いてIL-23Ap19およびEBI3の蛋白質発現を検討した。TNF- α とIL-17AはIL-23Ap19の相乗刺激では図4のようにIL-23Ap19およびEBI3の発現が優位に増強された。しかしながらp19やEBI3のサブユニットを有するサイトカインであるIL-23、IL-27、IL-35、IL-39といった既知の蛋白質は検出されなかった。そこで、NHEKで産生されたIL-23Ap19およびEBI3がどのような形で存在するか、液体クロマトグラフィーを用いたエレクトロスプレータンデム質量分析法を用いて検討したところ、IL-23Ap19とEBI3は蛋白質複合体として検出されたが、既知のサブユニットとの複合体としては検出されなかった。

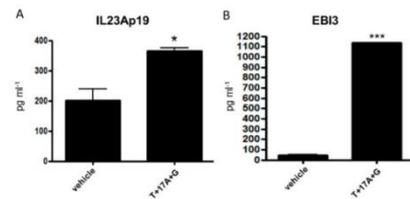


図 4

以上より、乾癬の病態ではIL-23Ap19とEBI3が上昇していることを確認することができた。これらが構成する既存のサイトカインであるIL-23,27,35,39の産生は確認できなかったが、p19とEBI3をサブユニットとして持つ新規のサイトカインの存在を示唆することができた。本研究成果は新規治療の開発に繋がる可能性があり、また乾癬の原因解明の一助になることが期待される。

<引用文献>

1. Chiricozzi, A.; Guttman-Yassky, E.; Suárez-Fariñas, M.; Nograles, K.E.; Tian, S.; Cardinale, I.; Chimenti, S.; Krueger, J.G. Integrative Responses to IL-17 and TNF- α in Human Keratinocytes Account for Key Inflammatory Pathogenic Circuits in Psoriasis. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 677-687.
2. Johansen, C.; Bertelsen, T.; Ljungberg, C.; Mose, M.; Iversen, L. Characterization of TNF- α - and IL-17A-Mediated Synergistic Induction of DEFB4 Gene Expression in Human Keratinocytes through $I\kappa B\zeta$. *J. Investig. Dermatol.* **2016**, *136*, 1608-1616.
3. Morizane, S.; Nomura, H.; Tachibana, K.; Nakagawa, Y.; Iwatsuki, K. The synergistic activities of the combination of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-17A and interferon-gamma in epidermal keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **2018**, *179*, 496-498.

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 Tachibana Kota, Tang Nina, Urakami Hitoshi, Kajita Ai, Kobashi Mina, Nomura Hayato, Sasakura Minori, Sugihara Satoru, Jiang Fan, Tomonobu Nahoko, Sakaguchi Masakiyo, Ouchida Mamoru, Morizane Shin	4. 巻 22
2. 論文標題 Multifaceted Analysis of IL-23A- and/or EB13-Including Cytokines Produced by Psoriatic Keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12659 ~ 12659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312659	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
---------	---------