

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591467

研究課題名（和文） 乾癬の発症における Th17 の役割

研究課題名（英文） The role of Th17 in the pathogenesis of psoriasis

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・講師

研究者番号：20403892

研究成果の概要（和文）：本研究では、乾癬モデルマウス（K5.Stat3C トランスジェニックマウス）の皮疹成立における Th17 の関与を検討した。抗 IL-12/23p40 抗体、抗 IL-23p19 抗体がこのマウスの皮疹発症をほぼ完全に抑制した一方、抗 IL-17A 抗体の効果は限定的であり表皮肥厚を完全には抑制できなかった。以上の結果は、モデルマウスの皮疹形成に Th17 の上流サイトカイン IL-23 が最も重要であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we characterized the effects of anti-mouse IL-17A, anti-mouse IL-12/23p40, and anti-mouse IL-23p19 Abs on the development of psoriasis-like lesions in K5.Stat3C transgenic mice. Treatment with anti-IL-12/23p40 or anti-IL-23p19 Abs greatly inhibited 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal hyperplasia in the ears of K5.Stat3C mice, whereas the inhibitory effect of an anti-IL-17A Ab was relatively less prominent. Taken together, this system provides a useful mouse model for psoriasis and demonstrates distinct roles for IL-23 and IL-17.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：乾癬、Th17、モデルマウス、Stat3

## 1. 研究開始当初の背景

乾癬は、表皮角化細胞の増殖亢進による表皮の肥厚を伴う角化および顕著な炎症により特徴づけられる特異な臨床症状を呈する慢性の炎症性角化症である。表皮と免疫のいずれが原因かにつき長年論争が続いていた。本応募の分担研究者佐野らは、乾癬皮疹部位の表皮角化細胞に Stat3 の活性化を認めることを発見した。さらに、Stat3 を介する表皮細胞シグナリング異常が乾癬発症に関与している可能性を検討するために、表皮角化細胞に活性化型 Stat3 が発現するトランスジェニ

ックマウスを作製した。このマウスは皮膚創傷治癒部位に臨床症状、病理組織像とも乾癬に酷似した皮疹を発症した。このとき乾癬様皮疹の発症には活性化 Stat3 をもつ表皮角化細胞と T リンパ球とのクロストークが必要であることを証明した (Nat Med, 11: 43-9, 2005)。従来より乾癬は IFN $\gamma$  産生性の Th1 優位病と考えられてきたが、様々な自己免疫疾患の発症に関わっている IL-17 を産生する、新たに位置づけられた Th17 T ヘルパーサブセットが、乾癬の発症においても重要な働きをしている可能性が示された。すなわち Th17

を増殖させる IL-23 が乾癬の発症に関与しており (J Exp Med, 199:125-130, 2004, J Invest Dermatol 123: 1037-44, 2004)、Th17 が産生する IL-22 が角化細胞の Stat3 を活性化させることによって直接表皮の肥厚を誘導できることが明らかになった (Nature 445: 648-51, 2007)。このように Th17 の乾癬における役割を明らかにすることは、主任研究者の佐野らの発見を裏付けるのみならず、角化細胞/T 細胞クロストークの本態そのものである可能性がある。

## 2. 研究の目的

乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) の系を用いて Th17 の乾癬発症における関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

乾癬モデルマウス (K5.Stat3C) では全層の皮膚創傷治癒後、テープストリッピング刺激、あるいは TPA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate) の反復塗布によって乾癬様皮疹が出現することを報告した。これらの乾癬様皮疹の病態形成時における Th17 関連サイトカインの発現について検討する。次に、抗 IL-12/23p40 抗体のモデルマウスの皮疹部に対する治療効果について検討する。この抗 IL-12/23p40 抗体は、樹状細胞から産生される IL-23 の働きを阻害し、Th17 の誘導を抑制することによって乾癬の発症を抑える (N Engl J Med, 356:580-92, 2007)。この抗体が有効であれば、このモデルの乾癬病変形成における Th17 の関与を間接的に証明できる。さらに、抗 IL-23p19 抗体、抗 IL-17A 抗体を投与し、乾癬様病変の抑制の程度を検討する。この研究によって、Th1, Th17 のどちらが病態形成に重要であるか、また、IL-23 の下流における IL-17 の病態への関与を明らかにできる可能性がある。

## 4. 研究成果

研究の成果は、Nakajima K, et al. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesion in a mouse model. J Immunol 186:4481-9, 2011. の中で報告した。概略を示すと、

本研究では、乾癬モデルマウス (K5.Stat3C トランスジェニックマウス) の皮疹成立における Th17 の関与を検討した。このモデルマウスは TPA 外用などによって乾癬様皮疹が誘導でき、病理組織のみならず、IL-23, IL-17A, IL-17F, IL-22, S100A8, 9,  $\beta$ -defensin3, 4 の高発現など、乾癬と同一の遺伝子発現プロファイルを示した (図 1、2)。さらに乾癬のバイオロジックである抗 IL-12/23p40 抗体、抗 IL-23p19 抗体がこのマウスの皮疹発症をほぼ完全に抑制した一方、抗 IL-17A 抗体の効果は限定的であり表皮肥厚を完全には抑制できなかった (図 3)。IL-17A 遺伝子欠損 K5.Stat3C マウスに誘導された中程度の皮疹が抗 IL-12/23p40 抗体投与によって完全に消失したことは上記の結果を再現している (図 4)。さらに、抗 IL-12/23p40 抗体、抗 IL-23p19 抗体投与は Th17 サイトカイン (IL-17A, F および IL-22) や抗菌ペプチドの発現をほぼ完全に抑制したが、抗 IL-17A 抗体はそれらを抑制しなかった (図 5)。しかし IL-17 刺激によって培養表皮細胞は好中球遊走に関わるケモカインを分泌し、IL-17A 抗体投与が表皮内の膿疱形成を抑制した事実より、IL-17 は乾癬病変における好中球遊走に関与することを示した。以上の結果は、モデルマウスの皮疹形成に Th17 の上流サイトカイン IL-23 が最も重要であり、それによって活性化された Th17 の産生する IL-22 が表皮肥厚に重要な働きをしていることを示唆する。興味深いことに、TPA 外用や IL-23 皮内注などで乾癬病変を誘導した K5.Stat3C マウスの皮膚所属リンパ節には IL-22 を産生する T 細胞 (Th17 あるいは Th22) のみならず、NK 細胞 (NK-22) が誘導されることが明らかになった。このように、K5.Stat3C マウスを利用し乾癬の病態に関わるサイトカインヒエラルキーを解明できたことによって、治療のためのバイオロジックの位置付けやそれらの作用機序の一端が明らかになった。

図 1

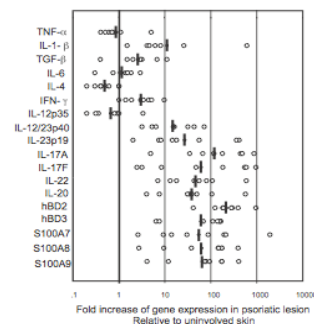


FIGURE 1. Profiles of cytokines,  $\beta$ -defensins, and S100A family proteins in human psoriatic lesional skin relative to contiguous nonlesional skin. Real-time RT-PCR reveals increased mRNA levels of the IL-23/Th17 axis genes, such as IL-12/23p40, IL-23p19, IL-17A, IL-17F, and IL-22, and  $\beta$ -defensins (hBD) and S100A family proteins. Gene expression levels were normalized to transcripts of the HPRT gene. The transcriptional level of each gene in lesional skin was plotted compared with nonlesional skin (set to 1). Bars indicate geometric mean values.  $n = 8$ .

図 2

**FIGURE 2.** Upon short-term topical TPA treatment, K5.Stat3C mice demonstrate epidermal hyperplasia and gene expression profiles similar to those of human psoriasis. **A**, Ear skins were topically treated with TPA on days 1 and 3, and were sampled on day 4. Nontransgenic mice showed marginal epidermal response, but K5.Stat3C mice developed marked hyperplasia of the epidermis. H&E staining. Scale bar, 500  $\mu$ m. **B**, Infiltration of Th17 cells in the dermis of K5.Stat3C mice. Immunostaining of the ear skin of K5.Stat3C mice after short-term TPA treatment demonstrated Th17 cells (triangles, bottom panel), which were probed by Alexa Fluor 488 for CD4 (upper panel) and by Alexa Fluor 594 for IL-17A (middle panel). Arrows, CD4<sup>+</sup> cells other than Th17; \*IL-17-producing cells other than Th17 [some were positive for CD4 (C1), data not shown]; dashed line, epidermis-dermis border, scale bar, 50  $\mu$ m. **C**, Gene expression profiles of lesional skin of K5.Stat3C mice after short-term TPA treatment. As with human psoriasis lesions (Fig. 1), transcriptional levels of IL-23/Th17 genes, including IL-12/23p40, IL-23p19, IL-17A, IL-17F, and IL-22, as well as  $\beta$ -defensins (BD and S100A family proteins), were measured relative to untreated skin. Gene expression was normalized to transcripts of HPRT. The transcriptional level of each gene in lesional skin was plotted in relation to untreated skin (set to 1). Bars indicate mean values. TPA-treated skin, n = 8; untreated control skin, n = 4.

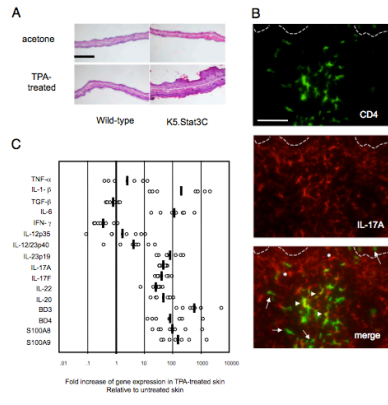
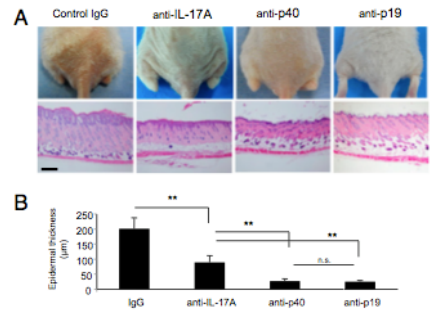
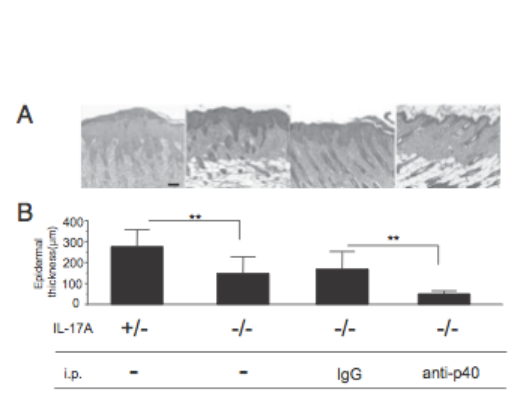


図 3



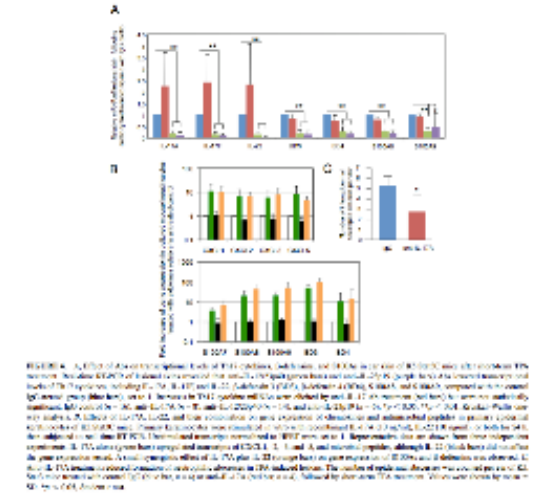
**FIGURE 5.** Effect of Ab treatments on the development of bona fide TPA-induced psoriasiform lesions on the backs of K5.Stat3C mice. **A**, Representative macroscopic and histological views (H&E staining) of dorsal skins of mice treated with TPA following a single treatment with the indicated Abs. Scale bar, 200  $\mu$ m. **B**, Epidermal thickness of the dorsal skin. Mean thickness  $\pm$  SD (in micrometers). IgG control (n = 8), anti-IL-17A (n = 7), anti-IL-12/23p40 (n = 6), anti-IL-23p19 (n = 4). \*\*p < 0.01, Mann-Whitney U test.

図 4



**FIGURE 6.** IL-17A gene deficiency attenuates epidermal hyperplasia of K5.Stat3C mice, but anti-IL-12/23p40 Ab treatment further abolishes the phenotype. **A**, Histological views of the dorsal skin of mice treated with TPA, as noted. Induced bona fide psoriasiform lesions were partially attenuated in IL-17A<sup>-/-</sup>:K5.Stat3C mice (middle left panel) compared with IL-17A<sup>+/-</sup>:K5.Stat3C mice (left panel), but anti-IL-12/23p40 Ab treatment abolished lesions in IL-17A<sup>-/-</sup>:K5.Stat3C mice (right panel), compared with those treated with control IgG (middle right panel). H&E staining. Scale bar, 100  $\mu$ m. **B**, Epidermal thickness of the dorsal skins of mice, as indicated. Mean thickness  $\pm$  SD (in micrometers). IL-17A<sup>+/-</sup>:K5.Stat3C (n = 8), IL-17A<sup>-/-</sup>:K5.Stat3C (n = 7), treated i.p. with control IgG (n = 4) or anti-IL-12/23p40 (n = 4). \*\*p < 0.01, Mann-Whitney U test.

図 5 :



**FIGURE 5.** Effect of Ab treatments on gene expression in TPA-treated skin. The fold increase of gene expression in TPA-treated skin relative to untreated skin was plotted in relation to untreated skin (set to 1). Bars indicate mean values. TPA-treated skin, n = 8; untreated control skin, n = 4.

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 3 件)
- ① Nakajima K. The critical role of the IL-23/Th17 axis in the pathogenesis of psoriasis. Review. J Dermatol (in press)
- ② Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Miyoshi K, Kamijima R, Tarutani M, Benson M, Elloso MM, Iwakura Y, DiGiovanni J, Sano S. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesion in a mouse model. J Immunol 186:4481-9, 2011.
- ③ 中島喜美子, 佐野栄紀: 自己免疫性疾患としての乾癬 病態と治療: Th17と乾癬, アレルギー・免疫 18: 33-38, 2011.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Miyoshi M, Benson JM, Elloso MM, Iwakura Y, DiGivanni J, Sano S. The possible contribution of IL-22-producing-non-T cells in the development of psoriasis-like lesions in the mouse model. 第 35 回日本研究皮膚科学会, 2010. 12. 4, 和歌山
- ② Nakajima K, Tateo Shiga, Mikiro Takaishi, Ken Miyoshi, Shigetoshi Sano: The crosstalk between IL-17, IL-22 and keratinocytes in development of psoriasis-like lesions in a mouse model, 第 24 回表皮細胞研

- 究会, 2010.10.9, 高知
- ③ 中島喜美子, 佐野栄紀: 乾癬モデルマウス (K5.Stat3C transgenic mice) における IL-23/Th17axis について, 第25回日本乾癬学会シンポジウム, 2010.9.3, 宇部
  - ④ Nakajima K., Kanda T., Takaishi M., Miyoshi M., Benson JM., Elloso MM., Iwakura Y., DiGivanni J., Sano S. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesion in a mouse model: anti-IL-6R antibody had no inhibitory effect for the development of lesion. The 14<sup>th</sup> international congress of immunology, 2010.8.28, Kobe, Japan
  - ⑤ Nakajima K., Kanda T., Takaishi M., Miyoshi M., Benson JM., Elloso MM., Iwakura Y., DiGivanni J., Sano S. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesion in a mouse model. The 70<sup>th</sup> SID annual meeting, 2010.5.5, Atlanta, USA
  - ⑥ 中島喜美子: 自然免疫と乾癬・アトピー性皮膚炎, 第109回日本皮膚科学会総会教育講習会, 2010.4.18, 大阪
  - ⑦ Takaishi M., Nakajima K., DiGiovanni J., Iwakura Y., Sano S. Development of psoriasis is dependent on IL-12/23p40, but partially on IL-17A in a mouse model. The 3<sup>9th</sup> ESDR annual meeting, 2009.9.9, Budapest, Hungary
  - ⑧ 中島喜美子, 高石樹朗, 三好 研, 佐野栄紀: 乾癬モデルマウスにおける Th17 の関与について, 第24回日本乾癬学会, 2009.9.4, 東京

## 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・講師  
研究者番号: 20403892

### (2) 研究分担者

佐野 栄紀 (SANO SHIGETOSHI)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 80273621

高石 樹朗 (TAKAISHI MIKIRO)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 10303223

三好 研 (MIYOSHI KEN)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 20274392  
(H21→H22)