

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16217

研究課題名（和文）動物モデルに基づく乾癬における尿酸の作用およびその分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the action of uric acid and its molecular mechanism in psoriasis based on animal models

研究代表者

木村 佳貴 (Kimura, Yoshitaka)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90807843

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：低尿酸モデルマウスでは、イミキモド誘導性乾癬様皮疹の重症度が、臨床的・病理学的評価ともに有意な抑制をみとめ、尿酸が乾癬炎症を亢進させることが示唆された。また低尿酸モデルマウスでは、病変部へのIL-17産生T細胞の浸潤が抑制され、一方リンパ節、脾臓でのIL-17産生T細胞の割合には差が見られなかった。さらに低尿酸マウスでは皮膚でのケモカインの発現の低下がみられ、In vitroでは、ケラチノサイトにおいて、尿酸存在下でケモカイン発現の亢進が見られた。以上から尿酸は表皮におけるケモカイン発現を亢進させ、乾癬炎症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬に高頻度に合併する高尿酸血症が、表皮のターンオーバーの結果として生じる単なる併存疾患でなく、乾癬病態自体に関与している可能性を示した。乾癬患者における高尿酸血症のコントロールの重要性を示すとともに、尿酸および尿酸が関与する分子をターゲットとする新しい乾癬の治療方法の開発などに有用である。

研究成果の概要（英文）：In hypouricemic mice, the severity of skin lesions like psoriasis induced by imiquimod, was significantly suppressed clinically and pathologically, indicating that uric acid exaggerates psoriatic inflammation. The infiltration of IL-17 producing T cells into lesions was suppressed in hypouricemic mice; in contrast, the number of cells in the lymph nodes and spleen did not differ. Furthermore, chemokine expression in skin lesions decreased in hypouricemic mice and in vitro chemokine expression in keratinocytes increased in the presence of uric acid. These results show that uric acid promotes chemokine expression in the epidermis, which causes exaggerated psoriatic inflammation.

研究分野：自然免疫

キーワード：尿酸 乾癬 炎症

1. 研究開始当初の背景

乾癬は、全身に厚い鱗屑を伴う紅斑をみとめる炎症性皮膚疾患である。TNF α や IL-17、IL-23 などのサイトカインや Th17 系免疫反応が乾癬の病態形成に重要であり、これらのサイトカインに対する抗体や免疫抑制薬等が治療に有効である。しかし、いずれの治療にも抵抗性の乾癬患者が存在し、更なる治療法の開発が必要である。

近年、乾癬において、その病態や心血管イベントなどの合併症の発症にメタボリックシンドローム (MetS) が関与することが明らかとなった。MetS と関連する病態のうち、高尿酸血症は乾癬患者の約半数に合併する。高尿酸血症は慢性炎症を惹起することで、心血管イベントの発症に関与すると考えられており、これまでに申請者は尿酸が動脈硬化病変において AMP 活性化キナーゼを抑制し、mTORC1 を活性化することで慢性炎症を惹起することを報告した。

乾癬での高尿酸血症の合併は表皮のターンオーバーの亢進によりプリン代謝が亢進し尿酸産生が増加する結果と考えられてきた。一方で、尿酸が乾癬の病態に関与するかは明らかでない。乾癬病変部に尿酸結晶が存在すること、また尿酸結晶がインフラマソームの活性化やケラチノサイト P2Y6 受容体を介した炎症性サイトカインの分泌を誘導し炎症を惹起することが判っている。しかし、これまでのところ、乾癬に対する尿酸の作用は細胞レベルの報告にとどまり、動物モデルでの検討は行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿酸が乾癬の病態に直接関与しているか、またそれがどのようなメカニズムであるかを明らかにすることである。

尿酸の乾癬に対する作用について、従来、乾癬と高尿酸血症の臨床上的関連性についての報告および尿酸の乾癬に対する作用の細胞レベルの検討にとどまっていた。本研究では、これまで研究の進んでいない動物レベルにおいて、尿酸濃度や尿酸代謝の違いが乾癬病変の発症にどのような影響を与えるかを明らかにする。また動物モデルで尿酸がどのような細胞や液性因子などに作用しているかを検討し、分子メカニズムを解明することで、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

TLR7/8 リガンドであるイミキモドを皮膚に塗布し、乾癬様皮疹を誘導するイミキモド誘導性乾癬モデルを用いた。マウスには、C57BL/6 マウスを背景としたウリカーゼトランスジェニックマウス (uricase transgenic [UOXTg] mouse) およびウリカーゼノックアウトマウス (uricase knockout [UOX-KO] mouse) を用いた。ウリカーゼは尿酸代謝酵素であり、UOXTg マウスは全身にウリカーゼを発現させた低尿酸モデルマウスであり、UOX-KO マウスは通常マウス肝臓に発現している uricase 遺伝子を欠失させることによる高尿酸モデルマウスである。野生型には C57BL/6 を用いた。

(1). 低尿酸および高尿酸モデルマウスにおけるイミキモド誘導性乾癬モデルの検討

低尿酸モデルマウス (UOXTg)、高尿酸モデルマウス (UOX-KO) にイミキモドを背部皮膚に塗布し、乾癬様皮疹を誘導した。乾癬様皮膚炎の重症度評価として、病変部の発赤・肥厚・鱗屑の程度を半定量的に評価し (PASI スコア)、また病理学的に表皮の肥厚等を評価した。また皮膚病変におけるサイトカインの発現を RT-PCR で評価した。さらに、乾癬の皮疹に浸潤する細胞 (T 細胞、IL-17A 陽性 T 細胞等) の数を免疫染色、FACS で評価した。またリンパ節、脾臓における免疫細胞のプロファイルも検討した。

(2). WT、UOXTg マウス由来 T 細胞の増殖能、Th17 への分化能の検討

WT マウス、UOXTg マウスの脾臓から、EasySep Mouse Naïve CD4⁺ T cell isolation kit (Stemcell technologies) を用いて naïve CD4 陽性 T 細胞を採取した。増殖能の実験に用いる T 細胞は先に CFSE で染色を行った。CD4 陽性 T 細胞を、抗 CD3 刺激抗体でコートした 96 well プレートで培養し、培地に抗 CD28 刺激抗体を加えた。その後 Day2, Day4 に細胞を回収し、細胞分裂の程度を FACS で測定した。また分化能の実験では、CFSE で染色していない T 細胞を用い、前述の抗 CD3 抗体でプレコートした 96 well プレートに、抗 CD28 抗体と L-6, TGF β を加え、培養した。Day2, Day4 に細胞を回収し、PMA、ionomycin, brefeldin A で処理し IL-17 発現を誘導し、FACS にて IL-17A 陽性細胞数を測定した。

(3). 病変部での遊走因子発現の検討

病変部でのケモカイン発現について RT-PCR を用いて検討した。

(4). ケラチノサイトにおけるケモカイン発現への尿酸の作用の検討

野生型マウスの背部皮膚を採取し、毛包幹細胞を分離し、ケラチノサイト分化培地 (CnT-07, Cellntech) によってケラチノサイトに分化させた。分化させたケラチノサイトを 96 well プレートに播種し、0, 10 mg/dL uric acid 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養した。imiquimod で刺激し、ケモカイン発現を RT-PCR にて測定した。

4. 研究成果

(1). 低尿酸および高尿酸モデルマウスにおけるイミキモド誘導性乾癬モデルの検討

低尿酸モデルマウス (UOXTg マウス) にイミキモドを塗布し、乾癬様皮疹を誘導した。PASI score は Day3 以降 UOXTg マウスにおいて有意に炎症の抑制が見られた (図 1)。また病理学的にも、UOXTg マウスにおいて有意に表皮の肥厚が抑制された。

また Day2 での病変部皮膚の RT-PCR では IL-17A/F が UOXTg マウスで有意に抑制された。その他のサイトカイン (IL-22、IL-23p19、IL-12p40、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 等) について差は見られなかった。またマウス末梢血における白血球数及び分画に差は見られなかった。

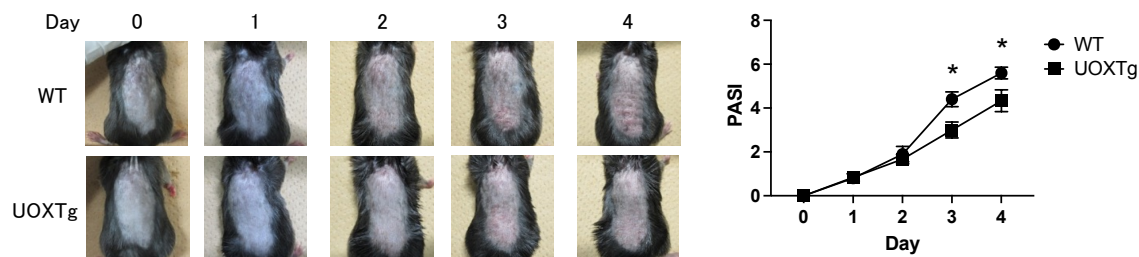


図 1. UOXTg マウスにおけるイミキモド誘導性乾癬様皮疹の抑制

病変部の細胞浸潤について検討した。病変部への CD3 陽性 T 細胞浸潤は UOXTg マウスにおいて少ない傾向にあった。IL-17A 陽性 CD3 陽性 T 細胞の割合を検討したところ、WT と比較し UOXTg マウスでは IL-17A 陽性 T 細胞の割合が有意に少なかった (図 2)。一方、リンパ節・脾臓における IL-17A 陽性 T 細胞の割合には差が見られなかった。

以上より低尿酸モデルマウスでは、病変部への IL-17A 陽性 T 細胞の浸潤が減少し、IL-17A・IL-17F の発現が低下し、乾癬炎症が抑制されていること示唆された。

一方、高尿酸モデルマウス (UOX-KO マウス) においては、明らかな差は認められなかった。しかし、まだサンプル数が少ないため、今後サンプル数を増やして検討を進めていく。

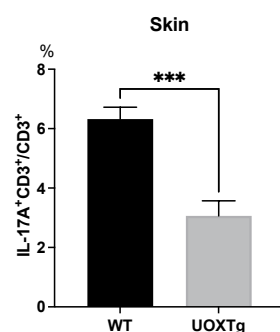


図 2. 病変部における IL-17A 陽性 T 細胞の割合

(2). WT, UOXTg マウス由来 T 細胞の増殖能, Th17 への分化能の検討

病変部への IL-17A 陽性 T 細胞の浸潤に差が見られたため、Th17 への分化能の違いを検討した。WT、UOXTg マウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を分取し、抗 CD3 刺激抗体、抗 CD28 刺激抗体存在下で増殖能を検討し、さらにそれらの抗体に加え、IL-6、TGF β を添加し、Th17 へと分化させた。増殖能と Th17 への分化能を FACS で評価した。Day 2, Day 4 で評価を行ったが、増殖能、Th17 分化能について差はみられなかった。

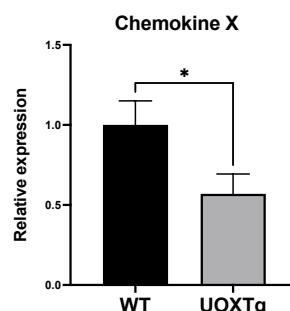


図 3. 病変部におけるケモカイン X の発現

(3) 病変部での遊走因子発現の比較

(1) の結果でリンパ節、脾臓で IL-17A 陽性 T 細胞に差がみられなかったこと、また (2) の結果から T 細胞の増殖能、Th17 への分化能に差がみられなかったことから、尿酸は T 細胞の病変部への遊走に作用しているのではないかと考えた。病変部のケモカイン発現について検討したところ、ケモカイン X の発現が有意に低下していた (図 3)。さらのその発現に関わる可能性の高い転写因子 Y についても発現が低下していた。

(4) ケモカイン X の発現への尿酸の影響

マウス皮膚から毛包幹細胞を採取・分化させ、ケラチノサイトを培養し、尿酸の有無によってイミキモドによって誘導されるケモカイン X の発現を比較した。

ケモカイン X は尿酸存在下において、イミキモドによって発現が強く誘導されることがわかった (図 4)。

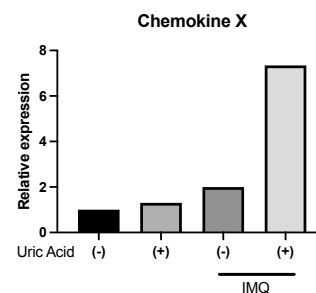


図 4. ケラチノサイトでの尿酸のケモカイン X の発現への作用

以上の結果から、低尿酸モデルマウスでは、病変部への IL-17A 陽性 T 細胞の浸潤が低下することによって乾癬様病変が抑制されることがわかった。また尿酸はケモカイン発現に影響を与えることで、病態に関与していることも明らかとなった。

これまで尿酸が乾癬に影響するかは明らかでなかったが、本研究の結果から尿酸が病態に関与している可能性が示唆され、またその作用のメカニズムの一部が明らかになった。これらの成果は、今後新たな乾癬の治療法の開発につながる可能性が高い。

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 0件）

1. 著者名 Kimura Yoshitaka, Tsukui Daisuke, Kono Hajime	4. 巻 22
2. 論文標題 Uric Acid in Inflammation and the Pathogenesis of Atherosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12394～12394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------