

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16229

研究課題名（和文）遺伝子改変マウスを用いた乾癬病変部表皮角化細胞産生EBI3の病態関与の解析

研究課題名（英文）Analysis of pathological involvement of epidermal keratinocyte-producing EBI3 in psoriasis lesions using genetically engineered mice

研究代表者

野村 隼人（Nomura, Hayato）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40897873

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）： イミキモド外用下において、Ebi3KOマウスは野生型マウスと比較して、耳介及び表皮が厚くなる傾向があり、定量PCRにて皮膚組織でのTNF、IL-6、IL-17Aなどの炎症性サイトカインやp28、p19の遺伝子の発現が亢進したが、p35遺伝子は抑制された。

また、イミキモド外用下で表皮角化細胞特異的Ebi3欠損マウスは野生型マウスと比較して、耳介厚や皮膚組織でのTNF、IL-6、IL-17Aなどの炎症性サイトカインやp28、p35、p19の遺伝子の発現に差はみられなかった。

研究期間全体を通じて、表皮角化細胞ではなく免疫細胞発現のEBI3が乾癬病変に対して抑制的に作用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

本研究では、Ebi3 globalノックアウトマウスおよび表皮特異的Ebi3ノックアウトマウスを作成し、イミキモド誘発乾癬モデルを用いることで、表皮由来EBI3の乾癬病態形成への関与について検討した。その結果、表皮角化細胞ではなく免疫細胞発現のEBI3が乾癬病変に対して抑制的に作用していることが示唆された。本研究成果は乾癬の病態解明に貢献するのみならず、新規治療剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Under topical imiquimod application, Ebi3 knock-out mice tended to have thicker auricles and epidermis compared to wild-type mice, and quantitative PCR showed increased expression of genes for inflammatory cytokines such as TNF, IL-6 and IL-17A and genes for p28 and p19 in skin tissues, but suppressed p35 gene.

In addition, epidermal keratinocyte-specific Ebi3-deficient mice under topical imiquimod application showed no difference in auricular thickness and the expression of genes for inflammatory cytokines such as TNF, IL-6 and IL-17A and genes for p28, p35 and p19 in skin tissue compared to wild-type mice.

Throughout the entire study period, the results suggest that immune cell expression of EBI3, but not epidermal keratinocytes, has an inhibitory effect on psoriasis lesions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 EBI3

1. 研究開始当初の背景

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。Th1 および Th17 細胞は特に病態形成において重要な役割を果たすと考えられる。病変部表皮角化細胞も過剰な細胞増殖と免疫応答を示し、病態形成に深く関与する。

IL-23 (p19 と p40 のヘテロダイマー) は Th17 細胞の分化・増殖・維持に重要なサイトカインである。IL-23 の α サブユニットである p19 に対する抗体製剤 (リサンキズマブ、グセルクマブ、チルドラキズマブ) は臨床ですでに優れた有効性が示されている。

2006 年に表皮角化細胞も IL-23 を発現することが報告されているが (*J Immunol.* 2006;176(3):1908-15) 近年さらに同細胞由来の IL-23 の重要性を示唆する論文が報告された (*Nat Commun.* 2018;9(1):1420) 一方、2015 年に Ramnath らは表皮角化細胞における、これまでに報告されていないサイトカイン p19 と EBI3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) のヘテロダイマーの存在を報告した (*Immunol Cell Biol.* 2015;93(9):771-9) 翌年、そのサイトカインは IL-39 として、B リンパ球から産生され、好中球を活性化し、全身性エリテマトーデスの病態に関与する、と報告された (*Eur J Immunol.* 2016;46(6):1343-50) IL-39 の α サブユニットは p19 であり、p19 抗体製剤は IL-39 にも結合する可能性がある。

我々は乾癬の炎症を模倣し、正常ヒト表皮角化細胞を TNF- α + IL-17A + IFN- γ (すべて 50ng/ml) で刺激したところ、EBI3 の発現が転写レベルで強力に誘導されることを見出した。さらに、25 倍濃縮した培養上清から、ウエスタンブロット法にて EBI3 蛋白のバンド (55~70kDa) を確認した。TNF- α 、IL-17A、IFN- γ はすべて乾癬病変部で発現が増加しているサイトカインである。以上より、同病変部における表皮角化細胞産生 EBI3 含有サイトカインの発現およびその病態形成への関与が示唆される。

EBI3 を含むヘテロ二量体サイトカインとして前述の IL-39 (EBI3 と p19) の他に、IL-27 (EBI3 と p28) IL-35 (EBI3 と p35) が挙げられるが、乾癬病変部の表皮角化細胞が IL-27・IL-35・IL-39 を蛋白として発現するかについては未だ報告が無く、EBI3 のモノマー・ホモダイマー・新規ヘテロダイマーの存在様式についても詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は表皮特異的 Ebi3 トランスジェニックマウスおよび表皮特異的 Ebi3 ノックアウトマウスを作成し、そのフェノタイプを解析すること、さらにイミキモド誘発および IL-23 皮下注乾癬モデルを用いることで、表皮由来 EBI3 の乾癬病態形成への関与について検討することである。表皮特異的 Ebi3 トランスジェニックおよびノックアウトマウスを用いて表皮由来 EBI3 の乾癬病態形成における重要性を検討する点において本研究は独創的である。また、本研究は乾癬の病態解明に貢献するのみならず、新規治療剤の開発に繋がる可能性を有している。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作成

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、Ebi3-floxed マウス、Ebi3 global KO マウスを作成した。また、Cre/loxP システムを使用し表皮角化細胞特異的 Ebi3 欠損マウス (Keratin5 (K5)-Cre Ebi3 Floxed マウス) を作成した。

(2) Ebi3 global KO マウスのイミキモド誘発乾癬モデルを用いた病態解析

Ebi3 global KO マウスを 18 週齢まで飼育した。耳介にイミキモド 5% クリーム 25mg を 1 日 1 回 6 日間外用し乾癬モデルマウスとし、対象群にはワセリンを 6 日間外用した。外用中は連日耳介厚を測定し、6 日目夕方より絶食とし 7 日目に安楽死させ、耳介の組織学的解析と定量 PCR 解析を行った。

(3) K5-Cre Ebi3 Floxed マウスのイミキモド誘発乾癬モデルを用いた病態解析

K5-Cre Ebi3 Floxed マウスを 11 週齢まで飼育した。耳介にイミキモドを 1 日 1 回 5 日間外用し乾癬モデルマウスとし、対象群にはワセリンを 5 日間外用した。外用中は連日耳介厚を測定し、5 日目夕方より絶食とし 6 日目に安楽死させ、耳介の組織学的解析と定量 PCR 解析を行った。

4. 研究成果

(1) イミキモド外用下において、Ebi3 global KO マウスは野生型マウスと比較して、耳介及び表皮が厚くなる傾向があった (図 1)。また、定量 PCR にて、皮膚組織での TNF、IL-6、IL-17A などの炎症性サイトカインや p28、p19 の遺伝子の発現が亢進したが、p35 遺伝子は抑制された。

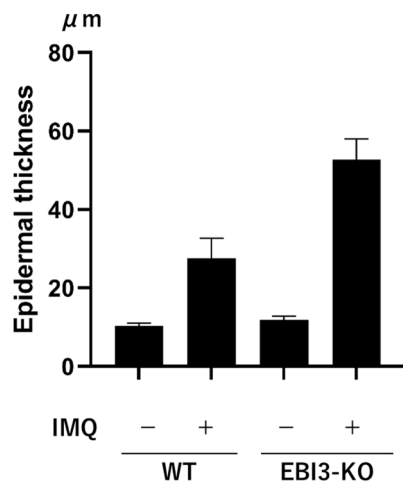


図 1

(2) イミキモド外用下において、K5-Cre Ebi3 Floxed マウスは野生型マウスと比較して、耳介厚や皮膚組織での TNF、IL-6、IL-17A などの炎症性サイトカインや p28、p35、p19 の遺伝子の発現に差はみられなかった。

研究期間全体を通じて、表皮角化細胞ではなく免疫細胞発現の EBI3 が乾癬病変に対して抑制的に作用していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------