

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3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659207

研究課題名（和文） ノトバイオームを用いた腸管皮膚細菌フローラ誘導Th17細胞による乾癬の発症

研究課題名（英文） Involvement of microflora-induced Th17 cells in psoriasis

研究代表者

佐山 浩二 (SAYAMA KOJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80187286

研究成果の概要（和文）：

無菌マウスの解析。無菌マウスを通常の SPF 環境下で飼育したマウスをコントロールとして比較検討した。耳介、および剃毛後の背部皮膚を採取後、パラフィン切片を作成し、HE 染色で病理組織学的に検討した。その結果、無菌マウスの表皮は病理組織学的には SPF マウスと比較してやや萎縮傾向であった。また、真皮浸潤細胞はほとんどなく明らかな差異はなかった。さらにケラチンをはじめとする通常分化の分化マーカー、および異常分化のマーカーの発現を免疫組織学的に確認した。黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌を熱処理し不活化後、培養ヒト角化細胞に添加した。その結果、サイトカイン、抗菌ペプチド発現増強が認められた。乾癬モデルマウスの作成には感染症に関わる自然免疫を活性化するイミキモドを用いた。病理組織学的にも臨床的にも乾癬病変を誘発することを確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Skin phenotypes of germ-free mice were compared with those of control SPF mice. The epidermis of germ-free mice was atrophic compared to SPF mice. Markers for keratinocyte differentiation such as keratins were histologically stained. Next, we studied whether pathogens can be a trigger for the development of psoriasis. *S. aureus* and *S. epidermidis* were heat-inactivated and added to the cultured keratinocytes. Cytokines and anti-microbial peptides were induced. Imiquimod, an activator of innate immunity, was used for the development of psoriatic skin lesions. Back skin of the mice was shaved and imiquimod was topically applied for the five consecutive days. One week after the application, erythema and scales appeared on the skin. Histological analyses confirmed the development of psoriasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

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：無菌マウス、SPF、自然免疫、Th17、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、TLR

1. 研究開始当初の背景

乾癬の発症機序に関しては表皮細胞の異常に原因とする考え方と、免疫異常により惹起されるとの考え方がある。しかし、近年は両方を融合させた考え方が有力になりつつある。

我々は尋常性乾癬において、病変部表皮角化細胞が IL-22 receptor を強く発現しており、Th17 細胞が産生する IL-22, -17 が角化細胞の IL20 subfamily, ケモカイン、HB-EGF の産生を促し、さらに STAT3 のリン酸化を引き起こすことにより乾癬病変の形成に関わっていることを明らかにしてきた(Eur J Immunol. 2009,10:2779-88)。しかし、Th17 細胞の誘導に関しては不明な点が多い。

一方、スーパー抗原、あるいは溶連菌感染誘発の滴状乾癬のように何らかの細菌が乾癬発症に関与しているのではないかとこの考え方が古くからある。近年、腸管において、特定の細菌 (segmented filamentous bacterium; SFB)、および細菌の産生する ATP が Th17 誘導に必須であることが明らかにされた (Nature 455; 808-812, 2008, Mucosal Immunol. 2; 187-96, 2009)。そこで、我々は病原体が、乾癬発症に関与しているのではないかと考えた。しかし従来の SPF 環境下では、実験動物にさまざまな病原体がすでに体内外に定着しており、特定の細菌の影響を検討することは困難であった。そこで、我々は無菌状態で特定の細菌を定着させたマウスに着目した。

尋常性乾癬・アトピー性皮膚炎の発症には環境が深く関わっており、腸管・皮膚細菌フローラも重要な役割を担っていると考えられる。また、民間療法として乳酸菌あるいはキノコ類を用いた尋常性乾癬・アトピー性皮膚炎の治療などがあり、皮膚免疫、腸管免疫、

腸管・皮膚細菌フローラとの関係は従来さまざまな憶測がなされてきた。しかし、実際には科学的な裏付けがなされていない。その理由としては、多種類の細菌による多彩な免疫反応の関与があり、単純な解析が困難であったことがあげられる。

腸内フローラと常に接する腸管粘膜はユニークな免疫システムを形成している。中でも Th17 細胞は消化管粘膜固有層に恒常的に多数存在する。Th17 細胞が産生する IL-17 や IL-22 が自己免疫性の炎症とも深く関わりがあることが示されており、非常に注目されている。この Th17 細胞の分化には、腸内細菌の存在が必須であることが無菌マウスを用いて明らかにされた (Mucosal Immunol. 2; 187-96, 2009)。さらに、Th17 細胞分化を極めて強力に誘導するメディエーターとして細菌由来 ATP (Nature 455; 808-812, 2008)、セグメント細菌 (segmented filamentous bacterium; SFB) が同定されている。これらの報告をもとに本研究は、細菌あるいはその生成物が乾癬発症に関与するのではないかと着想した。

2. 研究の目的

病原体が乾癬病変を形成に関与するかどうか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスの表現型の観察

皮膚臨床学的な解析

皮膚びらん、潰瘍、皮膚肥厚などの外観上の異常がないかどうか確認する。

病理組織学的解析

組織学的にはパラフィン切片を用いた HE 染色で乾癬病変の有無を確認する。さらに凍結切片を用いて抗菌ペプチド (β -defensin, CRAMP) の発現を検討する。

(2) 病原体による表皮角化細胞の反応

使用する病原体

生菌としては、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌を用いる。65度40分熱処理し不活化する。

培養角化細胞の刺激

培養角化細胞に不活化した細菌を添加し、mRNAの発現はRT-PCR、タンパク発現はELISA、Western blot法にて検討する。

(3) 乾癬モデルマウスの作成

感染症に関わる自然免疫を活性化する因子としてイミキモドを用いる。生後6~8週令のマウス背部皮膚を脱毛し、イミキモドを5日間連続塗布し、病変の形成を試みる。外用後経時的に観察し、病理組織標本サンプルを採取する。

(4) 皮膚病変の組織学的検討

上記のモデルで組織学的検討を行う。

HE染色

乾癬病変の特徴である表皮肥厚、rete ridgeの延長、顆粒層の消失、錯角化、表皮への好中球の浸潤、真皮上層の網細血管の増生などの有無を検討する。

免疫組織染色

a) STAT3

STAT3は乾癬病変部の表皮細胞で増加し、また、リン酸化STAT3の核内での増加も報告されている。抗STAT3抗体、抗リン酸化STAT3で病変部の免疫染色を行う。特に、抗リン酸化抗体による染色で、リン酸化STAT3の核内移行がみられるかどうかを活性化の示標として検討する。

b) 抗菌ペプチド

抗菌ペプチドは乾癬病変部で多量に発現しており、乾癬の発症そのものにも関与しているとされる。そこで、乾癬病変部において抗菌ペプチドの発現を検討する。

c) Ki67

Ki67は細胞増殖のマーカーとして知られ、乾癬病変部の表皮細胞で核内染色が増加していることが報告されている。病変部表皮における核内Ki67染色の増加を検討す

る。

4. 研究成果

無菌マウスの解析。従来のSPF環境下では、実験動物にさまざまな病原体がすでに体内外に定着しており、皮膚における細菌の影響を検討することは困難であった。そこで、無菌状態で飼育された無菌マウスにまず着目した。C57/BL6バックグラウンドの無菌マウスを無菌室で飼育した。この8週齢の無菌マウスと、通常のSPF環境下で飼育したC57/BL6マウスをコントロールとして比較検討した。

皮膚臨床学的な解析。皮膚びらん、潰瘍、皮膚肥厚などの外観上の異常がないかどうか確認した。その結果、無菌マウスはSPFマウスと比較して明らかな皮膚の異常は認めなかった。病理組織学的解析。耳介、および剃毛後の背部皮膚を採取後、パラフィン切片を作成し、HE染色で病理組織学的に検討した。その結果、無菌マウスの表皮は病理組織学的にはSPFマウスと比較してやや萎縮傾向であった。また、真皮浸潤細胞はほとんどなく明らかな差異はなかった。

尋常性乾癬では表皮の分化異常がみられるので、さらにパラフィン切片を用いた免疫染色で表皮の分化異常を確認した。ケラチンをはじめとする通常分化のマーカー、および異常分化のマーカーの発現を免疫組織学的に確認した。その結果、無菌マウスの表皮では、SPFマウスの表皮と比べて明らかな差異はなく、正常に分化していると考えられた。さらに、増殖に関しては、Ki67染色にて確認した。

尋常性乾癬は感染に関わるTh17細胞を中心とした免疫異常と考えられている。本研究では、病原体が乾癬発症に関わっているかどうか明らかにすることを目的とし、特定の細菌を用いて表皮角化細胞を刺激し乾癬発症

に関わるかどうか明かにした。

黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌それぞれ3株を65度40分熱処理し不活化後、培養のヒト角化細胞に添加し、タンパクの発現はWestern blot法、mRNA発現はRT-PCR法にて検討した。その結果、サイトカイン、抗菌ペプチド発現増強は認められたものの、明かなLC3-IIの発現増強は認められなかった。ついで、TLR-2, TLR-4のリガンドであるペプチドグリカン、LPSで角化細胞を刺激し、Western blot法にて検討した。これらの刺激により、LC3-IIの発現増強が認められた。

乾癬モデルマウスの作成。感染症に関わる自然免疫を活性化するミキモドを用いた。具体的な皮膚病変としては、紅斑、鱗屑、皮膚肥厚を示標とした。生後6~8週令のマウス背部皮膚を脱毛し、イミキモドを5日間連続塗布し、病変の形成を試みた。その結果、塗布1週間で紅斑が生じ、鱗屑も伴うようになった。さらに経時的に皮膚病理組織標本を作製したところ、1週間で炎症所見がみられ、2週間で表皮肥厚が正常のほぼ倍となり、病理組織学的にも臨床的にも乾癬病変を誘発することを確認できた。培養角化細胞をイミキモドで刺激し、ELISAで検討した。その結果、イミキモド刺激によりインフラマソームが形成されcaspase-1が活性化され、IL-1 IL-18が産生された。

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5件) 全て査読有り

1. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.

Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. PLoS One; 5: e11275, 2010.

2. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, and Hashimoto K. E2 polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. J Biol Chem; 285: 30042-30049, 2010.
3. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K. PPAR γ mediates innate immunity by regulating the 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes J Dermatol Sci; 60: 179-186, 2010.
4. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of the inflammasome in keratinocytes J Allergy Clin Immunol; 127: 806-814, 2011.
5. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shiraishi K, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, and Sayama K. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced lymphatic endothelial cell migration and

tube formation.

Biochem Biophys Res Commun; 412:
441-445, 2011.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Sayama K, Dai X, Shirakata Y, Tohyama M, Miyawaki S, Hirakawa S, and Hashimoto K.
Mite allergen is a danger signal for the skin
40th Annual ESDR Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland 9/8-11, 2010.

2. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K.
Mite allergen activates inflammasome in epidermal keratinocytes resulting in the production of IL-1beta and IL-18
22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 5/24-29, 2011.

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐山 浩二 (SAYAMA KOJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80187286