

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791927

研究課題名（和文）扁桃病巣疾患における Th17/制御性 T 細胞サブセットの役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of Th17/regulatory T cell subset in focal tonsillar disease

研究代表者

林 正樹 (HAYASHI MASAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30574230

研究成果の概要（和文）：

（対象と方法）扁桃摘を行った PPP 患者 11 名から採取した口蓋扁桃、末梢血リンパ球、足蹠皮膚（肉眼的正常部分）を用いた。足蹠皮膚を SCID マウス（CB-17 系）の背部に移植し、口蓋扁桃あるいは末梢血から分離したリンパ球をマウス腹腔内に移入し、移植 4 週間後、移植皮膚および血液を採取した。移植皮膚を用い、ヒト CD4, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, HSP60 の発現を免疫組織染色にて検討、また、血清中のヒト IL-6, IL-17, ヒト IFN- $\gamma$ , ヒト TNF- $\alpha$ , およびヒト抗 HSP60-IgG 抗体価を、ELISA 法にて測定した。（結果）PPP の扁桃リンパ球と皮膚を移植した SCID マウス群では、移植皮膚の真皮乳頭部に CD4 陽性 T 細胞の浸潤を多く認め、末梢血リンパ球移入群との間に有意差を認めた。浸潤 T リンパ球数と、SCID マウス末梢血中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価の間に有意な正の相関を認めた。移植皮膚に浸潤した T リンパ球のうち、IL-17 の発現を認める Th17 細胞が確認されたが、IFN- $\gamma$  や IL-10 を発現するリンパ球はほとんど認められなかった。また、これらの移植皮膚に T リンパ球浸潤が確認された症例では、確認されなかった症例に比べて、ヒト抗 HSP60-IgG 抗体価、IL-17、IL-6 が上昇していた。（結論）ヒト/SCID キメラ・マウスの移植実験で PPP 患者の扁桃リンパ球が移植した足蹠皮膚に直接反応し浸潤する現象は、PPP の無菌性膿疱発症の初期段階におこるリンパ球浸潤を反映していると考えられる。今回の結果は、PPP の発症において、扁桃リンパ球の HSP60 に対する自己免疫応答が重要であること、Th17 が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We transferred full-thickness human skin grafts onto SCID mice and simultaneously injected the PPP patients' tonsillar mononuclear cell (TMC) or peripheral blood mononuclear cells (PBL) intraperitoneally. Four weeks after the transfer, we analyzed the localization of the lymphocytes in the skin graft with immunohistochemical method. We also investigated the value of human IL-6, IL-17, human IFN- $\gamma$ , human TNF- $\alpha$ , the human anti-HSP60 antibody of lymphocytes in the murine sera. In the 63.6% of the SCID mice transplanted with the TMC of patients with PPP,

CD4+ T lymphocytes infiltrated the area around the papillary dermis of their skin grafts. But in the group of the mice injected with the PBL of patients with PPP, only a few or no infiltrating CD4+ T lymphocytes were showed around the papillary dermis of their grafts . We detected anti-HSP60 antibody and human IL-17, IL-6 more frequently and with higher levels in the serum of PPP TMC/PPP skin SCID mice and PPP TMC/SCID mice with HSP60 treatment than other controls.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：HSP60、SCID マウス、Th17

#### 1. 研究開始当初の背景

Th1 細胞は細胞性免疫に、Th2 細胞は液性免疫や感染防御に関与していると考えられており、2種類の細胞は互いを抑制するようなサイトカインを放出しあっている。そのため、例えば Th1 細胞への分化が優位になれば Th2 細胞による反応は抑制されるというようなことが起き、これを「Th1/Th2 バランス」と呼ぶ。免疫学の発展と共にこれまで免疫とは関係がないと考えられていた疾患も次々と Th1 細胞あるいは Th2 細胞の関与が認められるようになり、Th1/Th2 バランスで全ての病態の解釈は可能であるかのような誤解すらあった。しかし、2005 年に IL-17 産生性の T 細胞が実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症に関与していることが動物実験により示された。この T 細胞は「Th17 細胞」と名づけられ、新しい T 細胞サブセットとして認識されるようになった。Th17 細胞の発見は Th1/Th2 バランスの概念だけでは説明できない現象が存在するというを明らかにすると共に、これまでに説明がついていた現象であっても実は Th17 の関与があったのではないかという疑問も投げかけた。そして、現在 Th17 細胞が病態形成に関与しているといわれている疾患として、関節リウマチ、炎症性腸疾患 (クローン病、潰瘍性大腸炎)、多発性硬化症、乾癬などが報告され

ている。

掌蹠膿疱症は、以前から扁桃摘出により著明な改善がみられることから、扁桃と手掌足蹠皮膚に共通抗原が存在し、これらの間の自己免疫反応による発症機序が考えられてきた。その共通抗原として HSP60、ケラチン、コラーゲンなどが考えられている。われわれは、SCID マウスに PPP 患者の皮膚と扁桃リンパ球を移植し、4 週間後、移植した扁桃リンパ球が皮膚上皮に浸潤することを発見した。この動物モデルでは、扁桃リンパ球が皮膚浸潤する症例において、SCID マウス血清中にヒト抗 HSP60IgG 抗体が上昇することが確認された。以前から、PPP 患者の血清中で抗 HSP60IgG 抗体が上昇していることが報告されており、この動物モデルは、PPP の病態を反映していることが示唆された。これまで、掌蹠膿疱症は、主に Th1 により病態形成されると考えられてきたが、関節リウマチや乾癬同様に、Th17 が病態形成に関与している可能性がある。これまで、PPP と Th17 の関連についての報告はなく、また扁桃リンパ球の IL-17 産生能を研究した報告もない。本研究では、PPP の病態において従来からの Th1, Th2 に加え Th17, Treg といった新しい T 細胞サブセットがどのように関与しているのかを解明することが本研究のテーマである

#### 2. 研究の目的

掌蹠膿疱症(PPP)は、難治性の無菌性膿疱が手掌・足蹠に好発する代表的な扁桃病巣性疾患であり、扁桃を中心とする自己免疫反応の関与が考えられている。近年、新しい T 細胞サブセットである Th17 が同定され、これまで Th1/Th2 バランスのみでは説明のつかなかった自己免疫疾患における病態が解明されるようになってきた。尋常性乾癬などの慢性炎症性皮膚疾患において Th17 の産生する IL-17 や IL-22 は皮膚病変の形成や増悪に大きく関与することが報告されている。われわれは、

これまでヒト SCID キメラマウスを用いた PPP 疾患モデルを確立してきた。これらのモデルを用い、PPP の発症や増悪において Th17 が関与しているかどうか、またその具体的な役割について解明することが目的である

### 3. 研究の方法

PPP 足蹠皮膚を SCID マウス (CB-17 系, 6~8 週齢, 雌: 日本クレア社) の背部皮下に移植するとともに、PPP の口蓋扁桃あるいは末梢血から Ficoll 比重遠心法で分離したリンパ球  $1\sim 3\times 10^7$  個をマウス腹腔内に移入する。皮膚移植、リンパ球移入を行ってから 2 週間後、マウス背部の皮膚を開窓することで、皮膚の生着率が高くなる。移植 4 週間後に、移植皮膚片および血液を採取する。採取した足蹠皮膚のヒト CD4 免疫染色を行うと皮膚真皮乳頭部に CD4 陽性 T リンパ球の浸潤が確認できる。移植皮膚組織を用いて、ヒト CD4, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, HSP60 に対する免疫染色を行う。移植 4 週間後、移植皮膚および血液を採取した。また、SCID マウス血清中のヒト CD4, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-10, ヒト抗 HSP60-IgG 抗体価を、ELISA 法にて測定した。

### 4. 研究成果

PPP の扁桃リンパ球と皮膚を移植した SCID マウス群では、移植皮膚の真皮乳頭部に CD4 陽性 T 細胞の浸潤を多く認め、末梢血リンパ球移入群との間に有意差を認めた。浸潤 T リンパ球数と、SCID マウス末梢血中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価の間に有意な正の相関を認めた。移植皮膚に浸潤した T リンパ球のうち、IL-17 の発現を認める Th17 細胞が確認されたが、IFN- $\gamma$  や IL-10 を発現するリンパ球はほとんど認められなかった。また、これらの移植皮膚に T リンパ球浸潤が確認された症例では、確認されなかった症例に比べて、血清中のヒト抗 HSP60-IgG 抗体価、IL-17、IL-6 が上昇していた。ヒト/SCID キメラ・マウスの

移植実験で PPP 患者の扁桃リンパ球が移植した足蹠皮膚に直接反応し浸潤する現象は、PPP の無菌性膿疱発症の初期段階におこるリンパ球浸潤を反映していると考えられる。今回の結果は、PPP の発症において、扁桃リンパ球の HSP60 に対する自己免疫応答が重要であること、Th17 が PPP の皮膚病編形成に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 林正樹、玉川俊次、保富宗城、田村真司、山中昇 病巣扁桃の病態形成における Th17 の関与について 第 24 回日本口腔咽喉頭科学会 広島 2011 年 9 月 8 日
2. 林正樹、保富宗城、河野正充、戸川彰久、田村真司、山中昇 病巣扁桃の病態形成における Th17 の関与について 第 29 回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 大分 2011 年 2 月 11 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
特記事項なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

林 正樹 (HAYASHI MASAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号: 30574230

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: