

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 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890043

研究課題名（和文）イミキモド誘発乾癬モデルマウスを用いた乾癬における IL-27 の役割

研究課題名（英文）Possible roles of IL-27 in the imiquimod-induced psoriasis like skin inflammation

研究代表者

柴田 彩 (SHIBATA SAYAKA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50613105

研究成果の概要（和文）：IL-27 はTh1 の誘導とTh17 の抑制に重要なサイトカインである。マウス背部皮膚へのイミキモド連日外用により、乾癬様皮膚炎が誘導され、その過程でIL-27が産生されており、病態に関与していることが示唆された。IL-27持続的投与下においてイミキモド誘発乾癬様皮膚炎が肉眼的、組織学的に増悪した。IL-27およびPBS投与イミキモド誘発乾癬マウスにおけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現の定量的解析を行ったところ、IL-27投与により、Th1サイトカイン/ケモカイン、TNF- α の発現が亢進した。一方、Th17サイトカインおよびケモカインはIL-27投与群、PBS投与群で発現に差がなかった。次にIL-27中和抗体投与により、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎が改善するかを調べたところ、肉眼的および組織学的に抗体投与群において有意な皮疹の改善がみられ、real-time PCR法による遺伝子発現解析においてはIL-27中和抗体の投与により、Th1サイトカインおよびケモカイン、TNF- α の発現が抑制された。Th17サイトカインおよびケモカインは抗体投与群、非投与群で発現に差はみられなかった。以上より、IL-27は乾癬の病態形成において、増悪因子であることが分かった。IL-27抗体投与により、皮膚炎が改善し、IL-27抗体投与は乾癬の治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：IL-27, a member of IL-12 cytokine family, primes Th1 cell differentiation, while it suppresses Th17 cell development. We have previously reported that serum IL-27 levels are elevated in psoriatic patients and that IL-27 greatly induces *in vitro* production of Th1-type chemokines through STAT1 activation. In this study, to further investigate the *in vivo* role of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis, we induced psoriasis-like inflammation on mouse back skin with topical application of imiquimod, and continuously injected IL-27 or PBS subcutaneously. Imiquimod-treated skin showed the increase of IL-27 mRNA levels and the infiltration of IL-27-producing cells in the papillary dermis. The injection of IL-27 to the imiquimod-treated skin exacerbated the disease compared with PBS injection. The IL-27 injection further augmented mRNA levels of IFN- γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11, and TNF- α , without altering those of IL-17A, IL-17F, IL-22, and CCL20. Finally, IL-27 antagonism attenuated the upregulation of IFN- γ , CXCL9, CXCL10, CXCL11 and TNF- α mRNA levels, and induced clinical and histological improvement in the imiquimod-treated skin. These results indicate that IL-27 would act in a

proinflammatory manner, and thereby exacerbates the psoriasis-like skin inflammation induced by imiquimod.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：乾癬

1. 研究開始当初の背景

乾癬はIFN- γ を分泌するTh1細胞が重要なTh1系疾患とされてきたが、近年、IL-17およびIL-22を分泌するTh17細胞が重要とされている。最近発見されたIL-27はTh1の誘導とTh17の抑制に重要なサイトカインであり、乾癬の病態に関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

乾癬の病態形成におけるIL-27が重要なことをイミキモド誘発乾癬モデルを用いて検討し、乾癬に対する新規治療法に結び付けることである。

3. 研究の方法

(1) イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作成およびIL-27産生誘導の評価
 剃毛したマウスの背部皮膚にイミキモド（商品名：ベセルナクリーム、持田製薬株式会社）を125mg/日で、6日間連日外用し、皮疹を誘導し、イミキモド誘発乾癬モデルマウスを作成する。免疫染色を行い、IL-27産生細胞の浸潤について評価する。mRNAレベルでのIL-27発現

の評価については、イミキモド外用開始前、2日後、4日後、6日後において、IL-27p28およびEBI3のmRNAの発現をreal-time PCR法によって経時的に評価する。

(2) IL-27およびPBS投与イミキモド誘発乾癬マウスの皮疹の評価

IL-27もしくはPBSの持続皮下注下でイミキモドの連日外用を開始し、乾癬皮疹を誘導する。皮疹は乾癬重症度のスコア法であるPASI (Psoriasis Area and Severity Index) スコアに準じて、スコアリングで評価する。また、イミキモド連日外用が終了時点で各群における皮疹の組織学的評価を行う。

(3) IL-27 およびPBS 投与イミキモド誘発乾癬マウスにおけるサイトカイン、ケモカインのmRNA 発現の定量的解析

IL-27 およびPBS 投与下のイミキモド誘発乾癬マウス皮膚におけるサイトカイン、ケモカインのmRNA 発現をreal-time PCR 法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、①Th1 サイトカインであるIFN- γ 、CXCL9、CXCL10、CXCL11、②Th17 サイトカインおよび

ケモカインであるIL-17A、IL-17F、CCL20、③乾癬の病態形成に関与している各種サイトカインであるTNF- α を測定する。

(4) IL-27 中和抗体投与によるイミキモド誘発乾癬マウスの皮疹の評価

IL-27 中和抗体をマウスに投与し、乾癬皮疹が改善するかを評価する。抗IL-27p28 ポリクローナル抗体をマウスに腹腔内投与し、その後、イミキモド連日外用により、乾癬皮疹を誘導し、抗IL-27p28 抗体非投与群を比較する。皮疹の評価についてはPASI スコアに準じて紅斑、浸潤、鱗屑の程度をスコアリングする。また、遺伝子発現においても解析する。

4. 研究成果

(1) イミキモド外用にて乾癬様皮疹が誘導され、IL-27 の発現が上昇した

剃毛した BALB/c マウスの背部皮膚にイミキモド (125mg/日) を 6 日間連日外用したところ、浸潤に触れる紅斑および鱗屑といった乾癬様皮疹が肉眼的に誘導されることを確認した。また、組織学的にも表皮肥厚、錯角化、真皮炎症細胞浸潤といった乾癬に特徴的な所見が誘導された。次に、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、IL-27 が関与しているかどうかを検討するため、イミキモド連日外用後のマウスの背部皮膚の凍結切片を用いて、抗IL-27p28 抗体の免疫染色を施行したところ、真皮に浸潤している細胞の一部に IL-27p28 が陽性であった。さらに、染色された細胞の種類を同定するため、IL-27p28 染色と樹状細胞のマーカーCD11c または単球のマーカーMHCII との 2 重染色を行った。IL-27p28 陽性細胞は CD11c および MHCII 陽性であり、IL27 産生細胞は真皮樹状細胞であることを確認した。次に、イミキモド連日外用における IL-27 産生能について、real-time PCR 法を用いて、

定量的に評価した。イミキモド外用開始前、2 日後、4 日後、6 日後において、IL-27 のサブユニットである IL-27p28 および EBI3 の mRNA の発現を経時的に検討したところ、両サブユニットとも経時的に発現の上昇がみられた。これらの結果から、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、IL-27 が誘導され、その病態形成に関与していることが示唆された。

(2) IL-27 投与により乾癬様皮疹が増悪した次に IL-27 持続的投与下におけるイミキモド誘発乾癬皮疹を検討した。IL-27 (40 ng/日) もしくは PBS を注入した浸透圧ポンプをマウス背部皮下に埋め込み、持続皮下注を開始し、翌日からイミキモドの連日外用を 6 日間行った。その結果、IL-27 投与群において、PBS 投与群に比べて、肉眼的に有意に乾癬皮疹が増悪がみられた。また、組織学的検討も加えたところ、表皮肥厚、炎症細胞浸潤とも IL-27 投与群において、PBS 投与群より増悪がみられ、IL-27 投与により、イミキモド誘発乾癬皮疹が増悪することが確認された。

(3) IL-27投与によりTh1系サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現が上昇した

IL-27およびPBS投与イミキモド誘発乾癬マウスにおけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現の定量的解析を行った。その結果、IL-27投与により、Th1サイトカイン/ケモカイン、TNF- α の発現が亢進した。一方、Th17サイトカインおよびケモカインはIL-27投与群、PBS投与群で発現に差がなかった。

(4) IL-27抗体投与により乾癬様皮疹が改善した

次にIL-27中和抗体投与により、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎が改善するかを調べた。その結果、肉眼的および組織学的に抗体投与群に

において有意な皮疹の改善がみられた。また、real-time PCR法を用いて、上記で測定したサイトカイン、ケモカインの発現を調べたところ、IL-27中和抗体の投与により、Th1サイトカインおよびケモカイン、TNF- α の発現が抑制された。Th17サイトカインおよびケモカインは抗体投与群、非投与群で発現に差はみられなかった。以上より、IL-27は乾癬の病態形成において、増悪因子であることが分かり、抗体投与により、皮膚炎が改善し、IL-27抗体投与は乾癬の治療につながる可能性が示唆された。

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1件)

Sayaka Shibata, Yayoi Tada, Yoshihide Asano, Koichi Yanaba, Makoto Sugaya, Takafumi Kadono, Naoko Kanda, Shinichi Watanabe and Shinichi Sato.
IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. J Invest Dermatol. 33(2):479-88. 2013.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 彩 (SHIBATA SAYAKA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50613105

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：