

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 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659521

研究課題名（和文）Th17 経路関連遺伝子の突然変異と乾癬発症の関連

研究課題名（英文）Relationship between acquired mutations of Th17 pathway related genes and onset of psoriasis

研究代表者

塚本 利朗 (TSUKAMOTO TOSHIRO)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30236864

研究成果の概要（和文）：Th17経路関連遺伝子の突然変異が乾癬の病因であるという仮説の検証を試みた。患者皮膚には炎症細胞が多数存在するが、組織からの細胞回収率が低かったため、引き続き蛍光染色およびFACSにてTh17細胞を得られず、遺伝子解析は実施できなかった。凍結保存組織よりRNAを単離し、cDNAを次世代シーケンサーにより解析することで、本研究で計画した遺伝子変異を同定することは十分可能であり、患者試料の収集を継続している。

研究成果の概要（英文）：We tried to verify the hypothesis that mutations of Th17 pathway-related genes are responsible for the pathogenesis of psoriasis. Although there are many inflammatory cells in patients skin, we failed to obtain sufficient number of cells from isolated tissue. By subsequent immunofluorescence staining and FACS sorting, few Th17 cells were recovered and mutation analysis was impossible. We think that analysis of cDNA synthesized from RNA isolated from frozen tissue using new generation DNA sequencer enable us to identify mutations and still continue this study.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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：乾癬、Th17

1. 研究開始当初の背景

炎症関連遺伝子に『後天的』におきた突然変異の結果『機能が異常』となった細胞の出現が炎症性疾患の原因となるという仮説に基

づいた研究計画である。

乾癬をモデル疾患として、皮膚にホーミングしている免疫細胞での Th17 経路関連遺伝子の突然変異による自律的な Th17 経路の活性

化が病因となっているという可能性の検証を試みるものである。

本研究の学術的背景としては

- 臨床的にシクロスポリンなどの免疫抑制剤が効果を示すこと
- 乾癬では Th17 経路の活性化が報告され、病態の多くがこれにより説明可能であること
- 皮膚に寿命の長い T リンパ球が存在すること
- TNF α や IL-23 (IL-12 p40) などの起炎性サイトカインを阻害する生物学的製剤により症状の改善が劇的に得られること

などから、乾癬の病態に Th17 経路を中心とした炎症細胞の活性化が深く関与していることは疑いがない。しかし、単に免疫系ネットワークがバランスを崩しているだけならば乾癬は治癒可能な疾患であるはずだが、実際には寛解は得られるものの完治に至る例はほとんどなく再発を繰り返す。さらに、現時点において『なぜ Th17 経路が突然活性化するようになったか』という乾癬の病因については満足できる答えはない。

2. 研究の目的

これまで乾癬患者の家系解析や SNP 解析などで遺伝要因の研究が行われてきた。本研究はこれらとは全く異なる視点、すなわち患者の皮膚にホーミングしている免疫細胞に『後天的』におきた遺伝子突然変異により Th17 経路が活性化することが乾癬の病因であるという仮説を証明しようとするものである。具体的には、皮膚にホーミングする Th17 細胞の『一部』で IL-23 受容体遺伝子（あるいはその後のシグナル伝達系の遺伝子）に『後天的』に突然変異がおきる。この変異は IL-23

非存在下でもレセプターの恒常的な活性化（あるいはシグナル伝達系の活性化）を引き起こす機能獲得型変異である。これにより Th17 経路の『自律的』な活性化が『皮膚』でおき乾癬が発症する。

本研究計画は、期間 1 年の挑戦的萌芽研究であり、研究手法の確立、検出感度などを定量的に検討し、期間内に本仮説が正しいかどうかの証拠を得ることを目標とし、ポジティブなデータが得られた場合は 25 年度以降に再度研究計画を申請し、乾癬病態の詳細な解析につなげることを目的と、研究を遂行することとしていた。

3. 研究の方法

当初の研究計画では、乾癬患者の病変部皮膚生検組織を、3次元マトリックス存在下で培養(Clark R. et al. *J Invest Dermatol.* 126, 1059-1070, 2006)を行い、リンパ球を単離することとしていた。正常皮膚からで 4 mm パンチ生検より 1×10^4 程度のリンパ球が単離できるとされており、病変部からはさらに多くのリンパ球が得られると想定される。本仮説では、突然変異がおきているリンパ球は皮膚に局在していると考えているが、乾癬性紅皮症あるいは膿胞性乾癬においては、末梢血中に当該細胞が存在することも考えられ、これら患者の場合には末梢血も解析をする。

生検組織または末梢血から単離されたリンパ球を MACS Cytokine Secretion Assays(ミルテニーバイオテック社)で染色後、FACS でサイトカイン産生細胞 (IL-17 を染色することで Th17 細胞) を分取する。ゲノム DNA (または/および mRNA) 抽出後、PCR で増幅した DNA 断片をプラスミドにクローニング

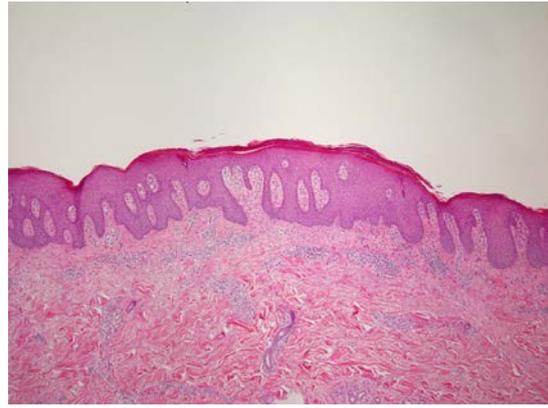
し、塩基配列を決定する。FACSで単離された細胞中に検出したい変異を有する細胞の割合は低いと予想され、かつその頻度は事前の予測が不可能である。50クローンを解析するとすれば、変異を有する細胞が5%程度の場合には容易に検出が可能であるが、解析するプール数を増やすことで、それ以下の陽性頻度であっても同定は可能である。以下の遺伝子(領域)について、変異の有無を確認する。

- a. Th17細胞で発現しているとされるサイトカインのプロモーター領域
- b. Th17細胞の分化、維持に必要とされているサイトカインレセプター遺伝子(IL-23 receptor)のコード領域(あるいはcDNA)
- c. サイトカインレセプターからサイトカイン遺伝子発現までに関与するシグナルトランスダクション系因子の遺伝子のコード領域(あるいはcDNA)

4. 研究成果

(1) 乾癬患者よりインフォームドコンセントにより同意を得、病変部組織を診断目的の生検時に採取した。一部を細分し、凍結保存し、残りを3次元マトリックス存在下で培養した。

下図は病変部の典型的な病理組織像である。乾癬の診断に重要な表皮肥厚、過角化、錯角の変化に加え、本研究で対象とする真皮の炎症細胞の増加を認めていた。



本法では4mmパンチ生検の正常組織から 1×10^4 程度のリンパ球が得られるとされており、患者組織では2桁は多いリンパ球が存在していると判断されるため、当初 1×10^6 程度のリンパ球が得られると期待した。しかしながら、得られた細胞数は 10^3 オーダーであった。組織からの遊走する細胞数の増加を狙い、培養時間の延長を試みたが、有意な増加は見られなかった。また、培地にIL2を添加し、その濃度を変化させたが、明らかな効果を認めなかった。

(2) 当該研究期間内に乾癬性紅皮症あるいは膿疱性乾癬など全身性の皮疹を有する重症型の患者の受診はなかったため、患者末梢血を対象とする研究は実施できなかった。

(3) 単離されたリンパ球数が少ないため困難が予想されたが、得られたリンパ球をMACS Cytokine Secretion Assays(ミルテニーバイオテック社)でIL17を染色後、FACSでサイトカイン産生細胞の分離を行った。染色時の洗浄操作で細胞が大部分失われ、FACSでBGレベルの細胞数しか得られなかった。

(4) これを改善するために、シリコンコートされた遠心チューブ、スイングローターによる遠心を行い、回収率の向上をこころみた。正常人の末梢血リンパ球で予備実験をおこ

なったが、実用レベルでの回収率の改善を認めなかった。

(5) IL-23 産生細胞(TIP-DC)のように染色キットが市販されていないサブセットを単離する場合には細胞をサイトカインの分泌を抑制するプレフェルジン A 処理後に固定し、膜透過処理後サイトカインに対する抗体で染色し、FACS で産生細胞を分取することを計画していたが、固定操作により DNA あるいは RNA に変異が入る可能性があり、本研究には向かないと判断し、これは実施を見送った。

(6) 本研究計画を行う上で最も重要なのは多数のクローンについてシーケンスを行うことである。当初の計画では、変異が存在すると予想される Th17 細胞を分離、濃縮し、そこから作成した cDNA を古典的な方法でクローニングし、十分な数のクローンをシーケンスする計画であった。本年度の研究によって、細胞の単離が困難であることが判明したが、近年実用化されてきた次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンスを行うことで、この問題は回避できると考えられる。次世代シーケンサーの処理能力を考慮すると、解析予定患者全例の解析予定遺伝子（研究の方法に述べた a-c）については、一度に解析することが可能である。よってすでに凍結保存した組織と、さらに引き続き採取・保存する患者試料が H25 年度以降、予定症例数に達したところでまとめて mRNA 単離、cDNA 合成、PCR をおこない、アンプリコンシーケンスにより遺伝子変異解析を施行する予定である。

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 0 件)

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 利朗 (TSUKAMOTO TOSHIRO)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30236864

(2) 研究分担者

鎌田 憲明 (KAMADA NORIAKI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00334186