

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791161

研究課題名(和文) 乾癬患者と健常人末梢血におけるTh17誘導の差異について

研究課題名(英文) Difference of Th17 induction between psoriasis patients and healthy donors.

研究代表者

志賀 建夫 (SHIGA, Takeo)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70444768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬患者の血液ではTh17(リンパ球の1種)が増加していることが知られている。そこでTh17を誘導において乾癬患者と健常人の間で差異があるか検討した。結果、2者の間でIL-17とIFN- γ というサイトカインの産生バランスが異なっている可能性が示された。

また今回の研究では血液からT細胞のみを取り出した条件でも検討を行った。結果Th17誘導条件下でT細胞はTNFを産生し自身のIL-17産生を増強している可能性が示された。事実、本条件でのTNF阻害薬添加はT細胞のIL-17産生を抑制した。この結果より近年、乾癬の治療に使われているTNF阻害薬はT細胞にも直接的に作用している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent reports showed slight increase of Th17 in psoriasis patients. We studied about the difference of Th17 induction between psoriasis patients and healthy donors using peripheral blood mononuclear cells(PBMC). As a result, mRNA expression of IL-17A and IFN- γ were increased in both of the groups, however in psoriasis patients, mRNA expression levels of IFN- γ were lower than healthy donors. These results indicated that under Th17 polarized condition, the balance of each cytokine was different between psoriasis patients and healthy donors.

Next, we focused on T cells because marked infiltration of lymphocytes in the lesion is one of the important histological findings of psoriasis. Under Th17 polarized condition, T cells obtained from psoriasis patients and healthy donors produced not only IL-17A but also TNF- α and TNF inhibitors suppressed IL-17A production. These results suggested that TNF inhibitors directly target Th17 in the pathogenesis of psoriasis.

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 T細胞 Th17 IL-17 TNF阻害薬 TNF受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬は皮膚に生じる慢性炎症性疾患であり、多量の落屑を伴う紅斑が広い範囲に生じるため患者のQOLを著しく低下させる。これまでステロイドやビタミンD3の外用、エトレチナートやシクロスポリン内服、光線療法といった治療が行われているものの、十分な効果が得られないことも多く、患者満足度が高いとは言い難い状況であった。しかし近年、乾癬治療に生物製剤が導入され、高い臨床効果が示されている。生物製剤であるTNF阻害薬は乾癬の発症に関わるとされるTNF- α 、iNOS産生樹状細胞(Tip-DC)を中心に免疫応答を調整し効果を示すことが知られている。

(2) 一方、近年乾癬の発症に関わる免疫応答ではTip-DCが産生するTNF- α の下流でIL-23/Th17軸と言われる、サイトカインおよびTh細胞が重要な役割を果たしていることが知られるようになった。Th17細胞はIL-17のみならずIFN- γ をも産生することが報告されており、われわれもフローサイトメトリーによる検討の結果、Th17誘導を行った末梢血単核球がIL-17、IFN- γ のいずれをも産生することを確認した。これまでTh1病とされていた乾癬において、病態に深く関わるTh17がIFN- γ も産生していることは、興味深く、その病態を考える上で重要である。またTh細胞への分化誘導を行った後もある程度の可塑性を有すると考えられることから、各種サイトカインのプロファイルには差異がみられる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

健常人と乾癬患者の末梢血を用いた検討によってTh17細胞を分化誘導した場合、IL-17とIL-22、IFN- γ といったサイトカインの発現比率に差異がみられるかを検討する。Th17細胞への分化誘導における違いを検討することで、今後普及するであろう生物製剤(抗TNF- α 抗体や抗p40抗体)などの新しい薬剤を選択する基礎的な理論的根拠を提供する。

3. 研究の方法

(1) 健常人および乾癬患者より採血を行う。採血後、末梢血単核球を分離し、MACS beadsを用いてnaïve CD4陽性細胞のみを分離する。得られたnaïve CD4陽性細胞をIL-1およびIL-23を含む培地で培養し、回収した細胞におけるIL-17、IL-22、IFN- γ といった各種サイトカインのmRNA発現量をPCR法で測定する。

(2) 乾癬性紅皮症の患者にアダリムマブを投与したところ、投与部位に一致して皮疹が著明な改善を示した。そこで、乾癬患者よりアダリムマブ投与部位の皮膚を採取し、蛍光抗体直接法による検討を行った。アダリムマブはIgGであり、抗ヒトIgG-FITC抗体を用

いてアダリムマブを検出した。またその際に抗CD3抗体、抗F4/80抗体、抗CD11c抗体を用いることで、アダリムマブがT細胞、マクロファージ、樹状細胞のいずれに作用しているかを二重染色で検討した。

(3) 抗TNF- α 抗体がCD3陽性細胞に働いている可能性が示されたため、健常人から末梢血を採取し、末梢血単核球を分離し、ビーズ法を用いてCD3陽性細胞のみを分離した。分離したCD3陽性細胞をTh17誘導サイトカイン(IL-1 β 、IL-23)を添加した培地で培養し、その条件にTNF阻害薬であるエタネルセプトを添加することで、IL-17の発現に変動がみられるかをPCR法で検討した。また培養上清中のIL-17Aの濃度をELISA法を用いて検討した。

(4) 健常人および乾癬患者採取したCD3陽性細胞を用いてTh17誘導条件下でサイトカインプロファイルにどのような変化がみられるか、またその際にエタネルセプトといったTNF阻害薬がどのように作用するかをPCR法を用いたmRNA発現量での検討、ELISA法による培養上清中の各種サイトカイン濃度の測定、フローサイトメトリー法による各種サイトカイン産生細胞の比率を検討した。

4. 研究成果

(1) 健常人および乾癬患者のいずれから採取したnaïve CD4陽性細胞もIL-1 β 、IL-23の添加によってIL-17AのmRNA発現量が有意に増加した。しかしながらIL-22については有意な変動がみられなかった。また健常人においてはIL-17とともにIFN- γ のmRNA発現量も増加したが、乾癬患者においてはIFN- γ のmRNA発現量がやや低い傾向がみられた。またこの際にIL-4、IL-10、FOXP3といったTh2、Tregに関わるマーカーも検討したが、いずれも有意な変動はみられなかった。

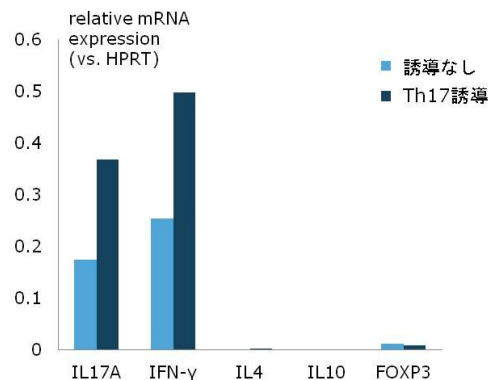


図 1a. 健常人における各種サイトカインのmRNA発現量の検討

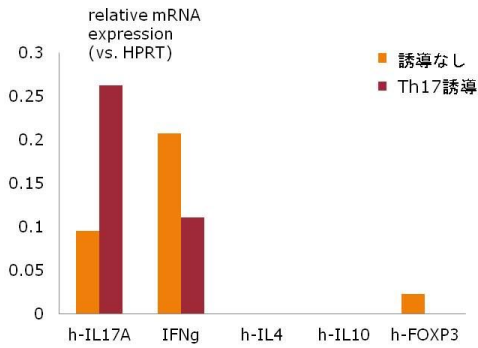


図1 b. 乾癬患者における各種サイトカインの mRNA 発現量の検討

(2) アダリムマブを投与した皮膚では病変の真皮内に多数、抗ヒト IgG 抗体陽性の細胞がみられた。これらは二重染色の結果、CD3 陽性細胞(T細胞)であることが確認できた。

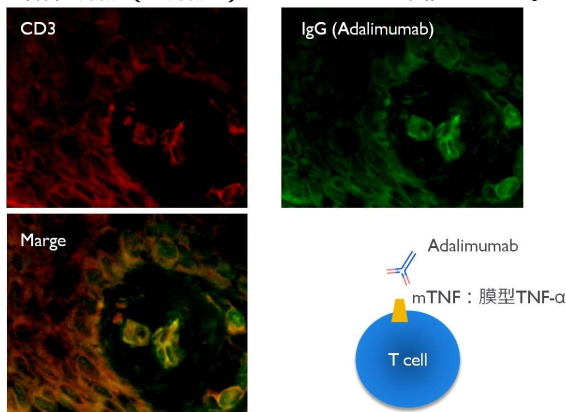


図2 .アダリムマブを投与した患者皮膚の免疫染色。アダリムマブと考えられる抗ヒト IgG 抗体陽性のシグナルは CD3 陽性シグナルと共染している。

(3) 健康人から採取した CD3 陽性細胞は、Th17 誘導条件下において IL-17A の mRNA 発現量が増加した。ここにエタネルセプト (TNF 阻害薬) が添加されることで増強した IL-17A の mRNA 発現量はいずれも低下した。

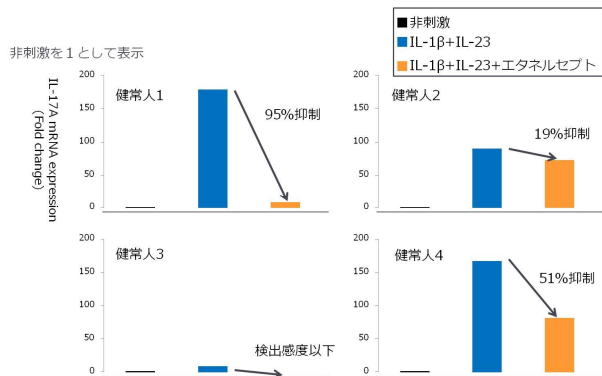


図3 .CD3 陽性細胞における IL-17A の mRNA 発現量の変化

また培養上清中の IL-17A の濃度は Th17 誘導条件で上昇し、エタネルセプト (TNF 阻害薬) を添加することによって抑制された。

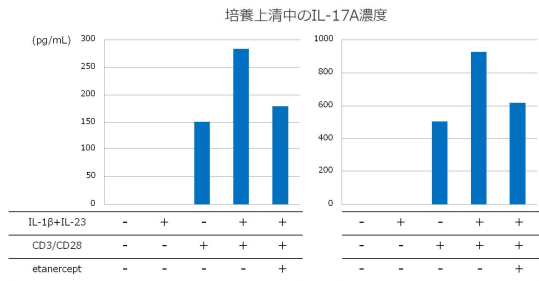


図4 .培養上清中の IL-17A の濃度変化。エタネルセプトの添加により IL-17A の濃度は低下している。

(4) 健康人から得られた CD3 陽性細胞は Th17 分化誘導条件下で IL-17A のみでなく TNF- も産生する。ELISA 法によって検討したところ、培養上清中の IL-17A および TNF- のいずれもの濃度が上昇していることが判明した。

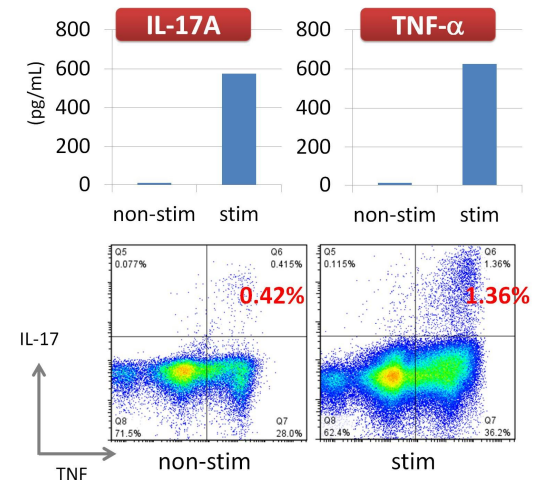


図5.CD3 陽性細胞を Th17 誘導条件 (Stim) で培養すると TNF- も産生する (上)。フローサイトメトリーによる検討では IL-17A および TNF- のいずれにも陽性を示す細胞群が増加している。

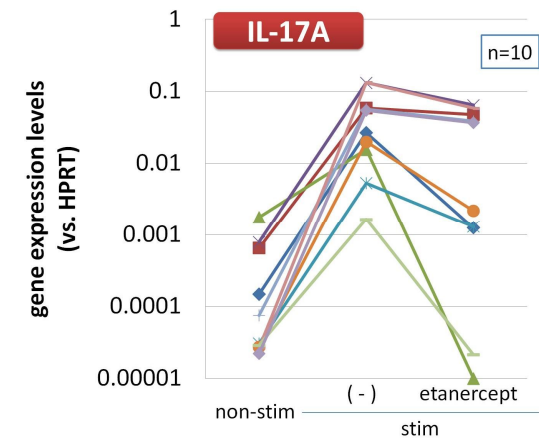


図6.健康人 10 例で検討を行ったところ IL-17A の mRNA 発現量は Th17 誘導条件 (Stim) によって増強し、エタネルセプト (TNF 阻害薬) によって抑制された。

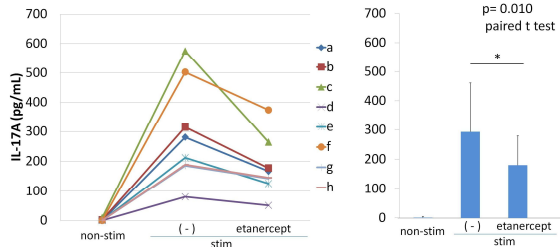


図7. 健常人 8 例の CD3 陽性細胞で検討したところ、全例で Th17 誘導条件において IL-17A の濃度上昇とエタネルセプトによる IL-17A 産生抑制がみられた。

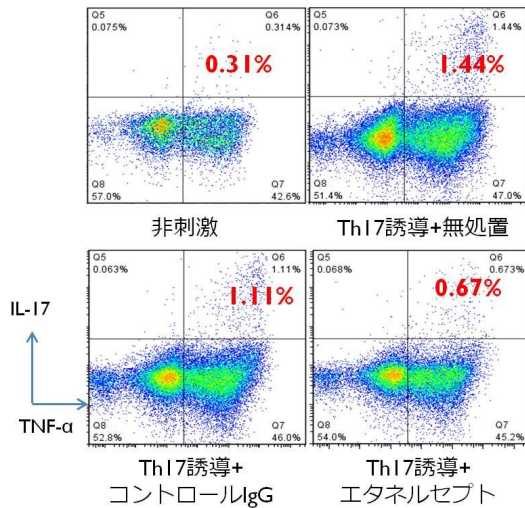


図8. 培養細胞をフローサイトメトリー法で検討したところ、IL-17A と TNF- α のいずれにも陽性を示す細胞群は Th17 誘導条件によって誘導され、エタネルセプト (TNF 阻害薬) の添加によって抑制された。コントロール IgG での低下はみられない。

これまで、乾癬の病態において TNF- α の主な産生細胞は Tip-DC と考えられてきた。しかしながら、乾癬の病変部に稠密に浸潤している細胞は T 細胞であり、これらが TNF- α を産生していることは、オートクラインあるいはパラクラインな IL-17 産生の増強が乾癬の病態形成に関わっている可能性を示唆している。事実、乾癬性紅皮症の患者ではアダリムマブ (抗 TNF- α 抗体) 投与部位に局所的な病変の改善がみられた。また CD3 陽性細胞のみを培養した条件において Th17 誘導でみられる IL-17A の産生が TNF 阻害薬で抑制されており、IL-17 産生に T 細胞自身が産生している TNF- α が関与していると考えられる。これらの結果は今後の生物製剤の使用あるいは創薬において、重要な理論的根拠になりうると考える。

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)

[学会発表](計 5 件)

志賀建夫, TNF 阻害薬の T 細胞に対する直接的な抑制効果, 第 28 回日本乾癬学会学術大会, 2013 年 9 月 6 日, 東京ドームホテル,

東京

志賀建夫, TNF 阻害薬は T 細胞に直接作用し IL-17 産生を抑制する, 第 20 回四国四大学皮膚科研究会, 2013 年 6 月 29 日, JR クレメント高松, 香川

志賀建夫, TNF 阻害薬は乾癬皮膚部の Th17 細胞を直接の標的とする, 第 112 回日本皮膚科学会総会, 2013 年 6 月 14 日, パシフィコ横浜, 横浜

Shiga, T, TNF inhibitors directly target Th17 cells in psoriasis, International Investigative Dermatology, 2013 年 5 月 8 日, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh(UK)

志賀建夫, アダリムマブの局所効果を示した 1 例, 第 27 回日本乾癬学会学術大会, 2012 年 9 月 7 日, 朱鷺メッセ, 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志賀 建夫 (SHIGA, Takeo)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 70444768