

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791177

研究課題名(和文) 乾癬における T細胞の働き

研究課題名(英文) The role of gamma delta T cells in the pathogenesis of psoriasis

研究代表者

馬淵 智生 (MABUCHI, Tomotaka)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30408059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬病変部皮膚組織をホルマリン固定、パラフィン包埋後、組織切片を作成、抗 TCR抗体で免疫化学染色を行い、T細胞の発現、分布、そのサブセットの検討を試みたが、明確な染色像を得られなかった。乾癬病変部皮膚組織をトリプトシンを用いて表皮と真皮を剥離、表皮細胞と真皮細胞、および乾癬患者の末梢血リンパ球を採取し、各細胞を抗 TCR抗体およびV鎖、V鎖の異なる T細胞のサブセットに対する抗体で染色、フローサイトメトリーを行い、T細胞の発現、分布、そのサブセットの検討を試みたが、健常対象皮膚組織と比較して、有意な差が認められなかった。

研究成果の概要(英文)：There were no significant differences in expression of gamma delta T cells between psoriatic skin lesions and healthy control skins. There were no significant differences in the levels of serum gamma delta T cells between psoriatic patients and healthy controls.

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：T細胞

1. 研究開始当初の背景

乾癬は、慢性かつ難治性の経過をたどる皮膚疾患である。そして、遺伝的要因に多数の環境因子が加わって発症に至る複合遺伝性疾患であると考えられているが、その全容はいまだ解明されていない。

一方、乾癬の病変部では、リンパ球、樹状細胞、表皮細胞が種々のサイトカイン、ケモカインを産生することによって、その病態が形成、維持されている (Fitch et al. *Curr Rheumatol Rep* 9: 461-7, 2007.)。乾癬は TNF- α 、インターフェロン γ など Th1 細胞系が優位な疾患であると考えられてきたが、2000 年代半ばに Th17 細胞が発見されて以降は、IL-17、IL-22 など Th17 細胞系の乾癬における役割が次第に明らかになってきた (Fitch et al. *Curr Rheumatol Rep* 9: 461-7, 2007.)。Th17 細胞系では、その系の上流で IL-23 が重要な役割を担っていることが解明されてきた。すなわち、IL-23 刺激によって Th17 細胞で産生・分泌された IL-17 がケモカイン、炎症因子を惹起することで、また、同様に Th17 細胞で産生・分泌された IL-22 が表皮の分化異常を惹起し、表皮肥厚を促進することで、乾癬の病態が形成されていると考えられるようになった (Nograles et al. *Semin Cutan Med Surg* 29: 3-9, 2010.)。実際、この反応系の重要性は、抗 IL-12 と IL-23 の共通分子である p40 に対する抗体ウステキヌマブの乾癬への治療効果からも示されている (Leonardi et al. *Lancet* 371: 1665-74, 2008.)。

ヒトの乾癬の病態を解明するため、多くの研究機関で乾癬モデルマウス作成の工夫がなされてきた。そのひとつに、IL-23 をマウスの耳に皮内注射することで、病理組織学的に乾癬に類似した炎症反応を再現した実験系がある (Zheng et al. *Nature* 445: 648-51, 2007.)。研究代表者が 2009 年から 2011 年まで留学、研究活動を行ってきた米国 Medical College of Wisconsin 皮膚科の主任教授らのグループは、この実験系を使用し、IL-23 に誘発される乾癬様の炎症反応が生じるためには、CCR6 が必要不可欠であることを報告した (Hedrick et al. *J Clin Invest* 119: 2317-29, 2009.)。CCR6 はケモカインレセプターの 1 つであるが、そのリガンドは CCL20 のみであることが知られている (Schutysler et al. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 409-426, 2003.)。IL-22 によって刺激された角化細胞は異常分化するとともに、早期から CCL20 を産生、発現することが知られている (Hedrick et al. *J Clin Invest* 119: 2317-29, 2009.)。ここで、強固な CCR6/CCL20 のレセプター/リガンド関係から、真皮で増加した Th17 細胞などの CCR6 発現細胞が表皮へすみやかに移動すると推測されている。

一方、研究代表者は同じ実験系を用いて、IL-23 刺激の反応のごく初期の段階で T 細胞の一亜型が増加し、IL-23 による乾癬様

の炎症反応誘発において、重要な役割を担っていることを報告した (Mabuchi et al. *J Immunol.* 187: 5026-31, 2011.)。さらにこの T 細胞は、CCR6 を発現し、IL-17、IL-22 を産生、分泌していることも報告した。ここにおいて、Th17 細胞と称されている細胞は、これまで知られている T 細胞だけではなく、T 細胞の一部も同様の働きをしていることが解明された。

2. 研究の目的

これまでの報告から、乾癬における T 細胞の免疫学的役割は広く知られている一方で、T 細胞の働きに関しては研究されているものの、論文としての報告はきわめて少なく、本研究申請時点でもいまだ不明な部分が多い。乾癬における T 細胞の働きが解明できれば、世界的にも先駆的な研究と言える。乾癬の病態の形成、維持に関与する新規の反応系が解明されれば、多くの治療薬、治療方法が存在するものの、いまだ根治療法が存在しない乾癬治療において、新規の治療薬、治療法の発見が期待できる。

また、新規治療薬発見の基礎研究として、抗 CCL20 抗体が中和抗体として作用する可能性を考える。IL-23 誘発性乾癬モデルマウスで発見した IL-17、IL-22 産生 T 細胞は、ホーミングにより真皮から表皮へと移動している。このホーミングに、CCR6/CCL20 のレセプター/リガンド関係が関与していることを示すことを目的とし、抗 CCL20 抗体による中和、乾癬様皮疹の抑制を試みる。

3. 研究の方法

乾癬患者から、乾癬病変部皮膚組織を採取する。組織の一部を用いて、ホルマリン固定、パラフィン包埋後、組織切片を作成、免疫化学染色を行い、T 細胞の発現、分布、そのサブセットを検討する。組織の一部は、表皮と真皮を剥離、表皮細胞と真皮細胞を採取し、フローサイトメトリーを行い、また、各細胞から RNA を抽出、RT-PCR を行い、T 細胞の発現、そのサブセットを検討する。同時に、この T 細胞が発現しているサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターを検討することによって、T 細胞の乾癬の病態形成、維持における働きを検討する。

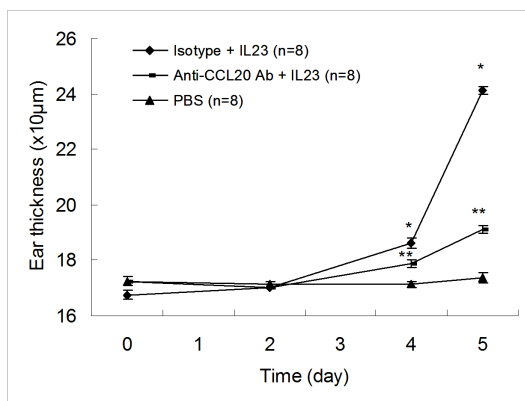
一方、乾癬モデルマウスを用いた研究も継続する。C57BL/6 WT マウスの耳に、(1) IL-23 + 抗 CCL20 抗体、(2) IL-23 + アイソタイプコントロール、もしくは(3) PBS を隔日皮内注射する。5 日目に皮膚組織を採取する。組織の一部を用いて、ホルマリン固定、パラフィン包埋後、組織切片を作成、免疫化学染色を行い、T 細胞の発現、分布、そのサブセットを検討する。組織の一部は、表皮と真皮を剥離、表皮細胞と真皮細胞を採取し、フローサイトメトリーを行い、また、各細胞から RNA を抽出、RT-PCR を行い、T 細胞の発現、そのサブセットを検討する。同時

に、この T細胞が発現しているサイトカイン、ケモカイン、ケモカインレセプターを検討する。

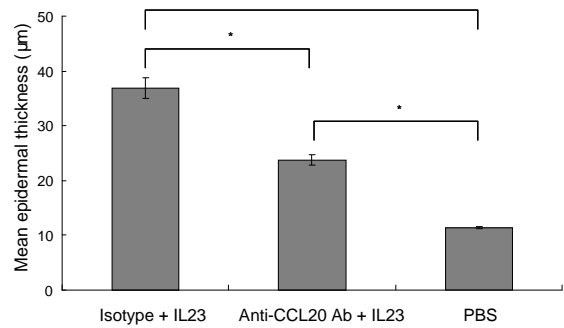
4. 研究成果

ヒトを対象とした研究に着手した。乾癬病変部皮膚組織をホルマリン固定、パラフィン包埋後、組織切片を作成、抗 TCR 抗体で免疫化学染色を行い、T細胞の発現、分布、そのサブセットの検討を試みたが、明確な染色像を得られなかった。乾癬病変部皮膚組織をトリプトシンで処理して表皮と真皮を剥離、表皮細胞と真皮細胞をそれぞれ採取し、各細胞を抗 TCR 抗体および V 鎖、V 鎖の異なる T細胞のサブセットに対する抗体で染色、フローサイトメトリーを行い、T細胞の発現、分布、そのサブセットの検討を試みたが、健常対象皮膚組織と比較して、有意な差が認められなかった。また、乾癬患者の末梢血リンパ球を採取し、同様の染色を試みたが、健常対象と比較して、有意な差が認められなかった。

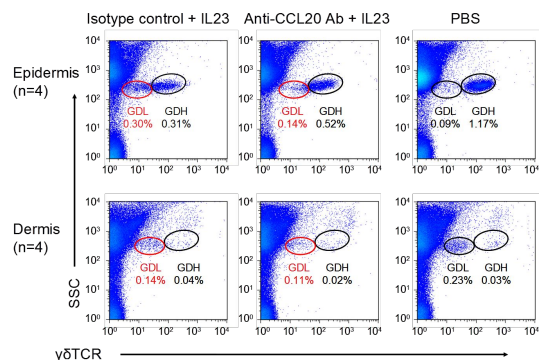
その一方で、乾癬モデルマウスを用いた研究も継続した。すなわち、抗 CCL20 抗体による中和実験である。IL-23 をマウスの耳に皮内注射することで、耳介が肥厚、角化し、乾癬様皮疹を呈する。IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では、耳介の肥厚が認められたが、IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では、耳介の肥厚が有意に抑制された。PBS 注射群では、耳介の肥厚は認められなかった。



さらに、HE 染色組織標本で角化の程度を計測すると、IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では、表皮の肥厚すなわち角化の亢進が認められた。IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では角化が有意に抑制された。PBS 注射群では、表皮の角化は亢進していなかった。



表皮と真皮を剥離、表皮細胞と真皮細胞を採取し、抗 TCR 抗体で染色、フローサイトメトリーを行った。真皮細胞では、IL-23 + アイソタイプコントロール、IL-23 + 抗 CCL20 抗体、PBS 注射のすべての群で、-low expressing T細胞(下図の赤丸)が観察された(下図の下段)。表皮細胞では、IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では、-low expressing T細胞が認められたが、IL-23 + アイソタイプコントロール注射群では、発現が抑制された。すなわち、抗 CCL20 抗体の中和による -low expressing T細胞のホーミングが抑制された。



以上から、抗 CCL20 抗体が乾癬の新規治療薬としての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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵智生 (MABUCHI, Tomotaka)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 30408059