

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791183

研究課題名(和文) IL-27による炎症性皮膚疾患の治療的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the therapeutic role of the inflammatory skin disease by IL-27

研究代表者

今井 康友 (Imai, Yasutomo)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10529514

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)：CD8+Tc17細胞については、皮膚炎への関与およびメカニズムの解析はされていなかった。IL-27はIL-12/23と類似の構造をとるサイトカインである。本研究では、IL-27がin vitroでCD8+Tc17細胞によるIL-17などの炎症性サイトカイン分泌や転写因子の活性化を抑制できることを見いだした。In vivoでは、接触過敏においてTc17細胞が活性化していることが判明した。また、IL-27を過剰発現するマウスでは接触過敏が減弱することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The inhibitory effect or therapeutic role of IL-27 in the differentiation of Tc17 cells is unknown. IL-27 is a heterodimeric cytokine composed of p28 and Epstein-Barr virus induced gene 3. Previous studies showed that IL-27 has an inhibitory action for the development of Th2 cells and Th17 cells. Contact hypersensitivity (CHS) is a mouse model of allergic contact dermatitis. We found that increased IL-17 and IL-22 production from CD8+ T cells in hapten-induced CHS mice regional lymph nodes. We also found that IL-27 inhibited IL-17 and IL-22 production from Tc17 cells. In addition, IL-27 transgenic mice showed diminished ear swelling in vivo.

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：IL-27

1. 研究開始当初の背景

近年、乾癬に対する治療薬として抗 TNF 抗体、抗 IL-12/23p40 抗体、抗 IL-17 抗体が用いられるなどしており、アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚疾患における CD4 陽性 Th17 細胞に対する研究は飛躍的に進歩した。しかし、CD8 陽性 Tc17 細胞については、皮膚炎への関与およびメカニズムの解析は、国内外でも、ほとんどなされていない。IL-27 は IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily に属するサイトカインで、CD4 陽性 T 細胞抑制作用を持っており、IL-27 がナイーブ CD4 陽性細胞の Th2 細胞への分化を抑制することが知られていた。CD8 陽性 T 細胞については、IL-27 は CD8 陽性 Tc1 細胞への分化を促進することが知られているが、CD8 陽性 Tc17 細胞に対する IL-27 の役割は明らかではなく、IL-27 投与によって IL-17 依存性の皮膚炎が抑制できるのかも明らかではない。そこで、本研究では、IL-17 依存性のマウスモデルに対して、IL-27 の持続投与もしくは IL-27Tg マウスの表現型の検討により、IL-27 の役割について検討することとした。

2. 研究の目的

(1) CD8 陽性 Tc17 細胞の機能解明

ハプテンである DNFB などを用いた接触皮膚炎や、イミキモドで誘発される実験的な乾癬様皮膚炎は、IL-17 KO マウスでは起こらない。また、DNFB による接触皮膚炎は、CD4 ではなく CD8 陽性細胞が関与している。ヒトの乾癬では CD8 陽性細胞が表皮内に見られる。そこで、これらの皮膚炎モデルにおける Tc17 細胞の免疫学的検討を行う。サイトカインの産生プロファイルを明らかにするとともに、Tc17 細胞からのサイトカイン産生が IL-27 抑制されるかどうか *in vitro* と *ex vivo* で検討する。

(2) IL-27 による皮膚炎への影響の検討

IL-27 を過剰発現する IL-27Tg マウスを利用することによって、または IL-27 の持続投与によって、IL-17 が関与する皮膚炎における IL-27 の役割を明らかにする。

(3) ヒトの炎症性皮膚疾患における Tc17 サイトカインの解析

乾癬など炎症性皮膚疾患における炎症性サイトカインを解析する。ヒト血液中の Tc17 細胞の検討や、Tc17 細胞が分泌するサイトカインと皮膚炎の重症度について検討する。また、Tc17 サイトカインと、その他の既存のマーカーやサイトカインとの相関について検討する。

3. 研究の方法

野生型ならびに IL-27 トランスジェニック (Tg) B6 マウスを 0.5% DNFB で感作し 5 日後、耳介に 0.2% DNFB 外用にて惹起し 24、48 時間後の耳介肥厚を測定した。所属リンパ節の細胞から MACS で CD8 陽性細胞を単離し、抗 CD3/28 抗体で刺激して培養上清を回収し、ELISA 法によりサイトカインを測定し *in vivo* における Tc17 への分化を検討した。更に、IL-27 の Tc17 分化に対する影響を *in vitro* で検討した。イミキモドを連日塗布し、乾癬様皮膚炎の誘発を試みた。In vitro で Tc17 細胞を誘導し、IL-27 の添加によってサイトカイン産生能力に差が出るか検討した。乾癬患者における各種サイトカインの血中レベルを ELISA 法にて測定した。ヒトのサンプルを用いる実験に関しては、兵庫医科大学倫理委員会の了承のもと、文章でのインフォームドコンセントを得たうえで実施した。

4. 研究成果

(1) IL-27 の Tc17 分化に対する影響を *in vitro* で検討した。FACS Aria を用いて CD62L 陽性ナイーブ CD8 陽性 T 細胞のみをソーティングし、IL-6 と TGF を用いて Tc17 細胞への分化を誘導する実験系において、分化誘導時に IL-27 を加えると、IL-27 の濃度依存性に Tc17 への分化が抑制された。しかし、いったん Tc17 に分化させた後で IL-27 を *in vitro* で添加した場合は IL-17 の産生は抑制されなかった。このように、IL-27 が Th17 だけでなく Tc17 細胞への分化誘導も抑制することが判明した。

(2) マウス乾癬モデルにおいて IL-27 を持続投与する実験系については、他の研究者から先に報告があった (Shibata S, J Invest Dermatol. 133, 479-, 2013)。接触皮膚炎モデルにおいては、野生型マウスでは所属リンパ節 CD8 陽性細胞からの IL-17 産生が見られた。24、48 時間後の IL-27Tg マウスにおける耳介肥厚は野生型に比べて有意に減弱し、惹起 48 時間後の所属リンパ節 CD8 陽性細胞からの IL-17 ならびに IL-22 産生は著明に低下した。以上から、IL-27Tg マウスでは Tc17 への分化が抑制されていると考えられた。HE 染色像では組織学的にも、IL-27Tg マウスでは炎症細胞浸潤や浮腫が軽度であった。

(3) IL-17 や IL-22 については、乾癬患者でも血中サイトカインは上昇するが、特に膿疱性乾癬患者において Tc17 細胞の産生するサイトカインである血中 IL-17 ならびに血中 IL-22 の顕著な上昇がみられた。そこで、CRP や白血球、膿疱性乾癬重症度スコアといった既存のバイオマーカーとの相関を検討すると、Tc17 細胞の産生するサイトカインはこれ

ら既存のバイオマーカーと正の相関を示すことが判明した。

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4件)

1. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Futatsugi-Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K, Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice, *J Dermatol Sci*, 74, 159-161, 2014, 査読有
2. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Haneda T, Mizutani H, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 13921-6, 2013, 査読有
doi:10.1073/pnas.1307321110
3. Yamamoto M, Imai Y, Sakaguchi Y, Haneda T, Yamanishi K, Serum cytokines correlated with the disease severity of generalized pustular psoriasis, *Dis Markers*. 34, 153-161, 2013, 査読有
doi: 10.3233/DMA-120958
4. Imai Y, Aochi S, Iwatsuki K, Sano H, Yamanishi K, YKL-40 is a serum biomarker reflecting the severity of cutaneous lesions in psoriatic arthritis, *J Dermatol*. 40, 294-6, 2013, 査読有

[学会発表](計9件)

1. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Mizutani H, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K, Skin-specific expression of IL-33 causes atopic dermatitis-like inflammation with activation of group 2 innate lymphoid

cells in mice, 15th International conference on lymphocyte activation and immune regulation [the International Conference on Innate-Like cells in Irvine], California, USA, Feb 7-9, 2014.

2. 松井 聖, 今井康友, 横山雄一, 阿部武生, 荻田千絵, 吉川卓宏, 古川哲也, 石津 桃, 高田美樹, 田中克典, 斎藤篤史, 西岡亜紀, 関口昌弘, 東 直人, 北野将康, 角田慎一郎, 山西清文, 佐野 統, 多彩な臨床症状を示した乾癬性関節炎にインフリキシマブの点滴時間短縮でアナフィラキシーショックを起こしアダリムマブに変更し軽快した1症例. 日本脊椎関節炎学会第23回学術集会, 東京, 2013.9.14
3. 古川紗綾佳, 今井康友, 山本雅章, 夏秋優, 山西清文, 乾癬34例に対する生物学的製剤の治療効果の検討, 第28回日本乾癬学会学術大会, 東京, 2013.9.6-7
4. Imai Y, Haneda T, Yasuda K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K, IL-33 KO mice exhibit the reduced immediate type contact hypersensitivity, *International Investigative Dermatology 2013*, Edinburgh, UK, 5.8-11, 2013
5. 今井康友, 善本隆之, 中西憲司, 山西清文, 善本知広, IL-27はTc17誘導を抑制して接触過敏症を減弱させる, 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012.11.29-12.1
6. Imai Y, Yoshimoto T, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K, IL-27 ameliorates contact hypersensitivity via suppression of Tc17 differentiation in mice, 10th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Tokushima, Japan, 2012.11.14-17

7. Yamanishi K, Imai Y, Seiko A, Iwatsuki K, Sano H. Serum YKL-40 as a possible biomarker for psoriatic arthritis. The 42nd annual ESDR Meeting, Venice, Italy, 2012.9.19-22

8. 真鍋 蘭, 今井康友, 山西清文, 佐野 統, 青地聖子, 岩月啓氏(岡山大), 関節性乾癬の病勢と血中 YKL-40 (Chitinase 3-Like-1) 値の検討, 第 27 回日本乾癬学会学術大会, 新潟, 2012.9.7-8

9. 石村直也, 今井康友, 真鍋 蘭, 羽田孝司, 山西清文, ウステキヌマブを投与した乾癬の 6 例, 第 111 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012.6.1-3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 康友 (IMAI, YASUTOMO)

兵庫医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10529514