

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293243

研究課題名(和文) VEGF-Aを起点とするIL-17産生T細胞の誘導：乾癬病態のパラダイムシフト

研究課題名(英文) Induction of IL-17-producing T cells by VEGF-A as starting molecule: Paradigm shift of psoriasis pathogenesis.

研究代表者

戸倉 新樹 (Tokura, Yoshiki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：VEGF-A-K5トランスジェニックマウスを用いて、主なIL-17A産生細胞はCD4+ T細胞、すなわちTh17ではなく、T細胞であることを示した。さらにこのT細胞が病態的に働きを示すには、形質細胞様樹状細胞(pDC)が関わり、VEGF-AがpDCの走化性因子として働いていることを示した。これは従来pDCのケモカインがケメリンであることが知られていたが、VEGF-Aもそれと同等の走化活性を示すことを明らかにした。またpDCのIFN-産生能やケメリンに対する走化性はビタミンD3で抑制されることも明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In VEGF-A-K5 transgenic mice, a mouse model of psoriasis, we confirmed that the major IL-17A-producing cells were T cells, but not CD4+ T cells, in mice. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) were involved in the mechanism underlying IL-17A-producing T cells, which stimulate keratinocytes to produce VEGF-A. We found that VEGF-A is a strong chemotactic factor whose activity is comparable to that of chemerin, suggesting that VEGF-A is not only a downstream enhancer but also upstream activator in the psoriasis pathogenesis. We also demonstrated that vitamin D3 depresses the interferon- production and the chemerin-directed chemotaxis in pDC.

研究分野：皮膚科学

キーワード：免疫学 発現制御 細胞・組織 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの乾癬の病態において重要な T 細胞は IL-17A 産生性の Th17 細胞である。Th17 細胞は IL-17A と IL-22 を産生することにより、表皮角化細胞の増殖、サイトカイン・ケモカインの産生、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) を放出させる。また Th17 細胞の上流には IL-23 産生性の炎症性樹状細胞 inflammatory DC (TIP-DC) がある。乾癬マウスモデルにおいては、主な IL-17A 産生細胞は Th17 細胞ではなく、T 細胞であることがいくつかのモデルにおいて知られている。一方では、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell, pDC) は、I 型インターフェロン (IFN) である IFN- $\alpha$  などを産生し、乾癬病変を誘発することが知られている。

### 2. 研究の目的

VEGF-A は Th17 細胞の働きによって、表皮角化細胞が産生するが、この VEGF-A が乾癬病態の上流である pDC に作用する可能性がある。つまり、乾癬では下流因子と考えられているものが、上流の細胞に働き掛け、病態の悪循環を形成している可能性がある。またこの pDC の活性に対してビタミン D3、シクロスポリンがどのような作用を及ぼすかということについても明らかにする。

### 3. 研究の方法

乾癬モデルマウスである VEGF-A-K5 トランスジェニックマウスを用いた。自然に現れる皮膚病変あるいはテープストリッピングした皮膚病変について解析した。またイミキモドを塗布した病変についても乾癬様の病変として解析の対象とした。pDC はマウス脾細胞から isolate し、in vitro の実験に供した。

### 4. 研究成果

VEGF-A-K5 トランスジェニックマウスを用いて、主な IL-17A 産生細胞は CD4+ T 細胞、すなわち Th17 ではなく、T 細胞であることを示した。さらにこの T 細胞が病態的に働きを示すには、pDC が関わり、VEGF-A が pDC の走化性因子として働いていることを示した。これは従来 pDC のケモカインがケメリンであることが知られていたが、VEGF-A もそれと同等の走化活性を示すことを明らかにした。乾癬病態に関わる樹状細胞には inflammatory DC と pDC とがある。inflammatory DC は CD11c 陽性で IL-23 を産生し、IL-17 産生性 T 細胞を維持する。この inflammatory DC と pDC の活性化状態が IL-17 産生性 T 細胞さらには乾癬病態を促進させる。そこで、pDC の活性化を inflammatory DC と比較しながら検討した。この際、pDC と inflammatory DC の活性化を制御する薬剤を検討することによって、乾癬治療の展開に結びつけた。乾癬モデルマウスである VEGF-A Tg マウスにおいて、耳翼に浸潤する細胞中に

pDC と inflammatory DC が存在することをフローサイトメトリー (FACS) で確認した。次に、野生型マウスの脾臓細胞から、pDC を isolate し CpG-ODN で刺激し、IFN- $\gamma$  の産生を促した。一方、脾臓細胞中 inflammatory DC を刺激することにより、TNF- $\alpha$  産生性 CD11c+ CD11b int 細胞が存在することを細胞内サイトカイン染色で確認した。上記の培養系を用いて、野生型マウスの脾臓細胞を CpG-ODN で刺激する際、カルシポトリオール、シクロスポリン A (CyA)、トリウムシノロンアセトニド (TA) を添加することにより、pDC の IFN- $\gamma$  産生を検討した。IFN- $\gamma$  産生は、CyA では抑制されなかったが、他の 2 剤では抑制された。これは、T 細胞の IFN- $\gamma$  産生が CyA、TA で抑制され、カルシポトリオールでは抑制されないことと対比された。TNF- $\alpha$  の添加は、pDC の CpG 刺激 IFN- $\gamma$  産生を約 30% 抑制した。これらのことは活性型ビタミン D3 が乾癬の治療薬として、pDC の観点からユニークな効果発現をしていることが示唆された。活性型ビタミン D3 は、Th17 反応を Treg 反応へ、Th1 反応を Th2 反応へ偏重させることが知られているが、pDC への作用も乾癬病態では関わっていることが示唆された。野生型マウスの脾臓細胞を CpG-ODN で刺激する際、カルシポトリオール、シクロスポリン A (CyA)、トリウムシノロンアセトニド (TA) を添加することにより、pDC の IFN- $\gamma$  産生のみならず、Inflammatory DC の TNF- $\alpha$  産生も同様にこれらの薬剤の存在下で検討した。加えて、カルシポトリオールの pDC への影響をシグナル伝達レベルも調べた。pDC のケメリンに対する走化性において、カルシポトリオールが明確に抑制することも明らかにし、ビタミン D3 の pDC 抑制を介した治療効果を示した。

### 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 10 件)

- 1). Shimauchi T, Hirakawa S, Suzuki T, Yasuma A, Majima Y, Tatsuno K, Yagi H, Ito T, Tokura Y: Serum interleukin-22 and vascular endothelial growth factor serve as sensitive biomarkers but not as predictors of therapeutic response to biologics in patients with psoriasis. *J Dermatol* 40: 805-812, 2013.
- 2). Suzuki T, Hirakawa S, Shimauchi T, Ito T, Sakabe J, Detmar M, Tokura Y: VEGF-A promotes IL-17A-producing  $\gamma\delta$  T cell accumulation in mouse skin and serves as a chemotactic factor for plasmacytoid dendritic cells. *J Dermatol Sci* 74(2): 116-124, 2014.
- 3). Sakabe J, Umayahara T, Hiroike M, Shimauchi T, Ito T, Tokura Y: Calcipotriol increases hCAP18 mRNA expression but

- inhibits extracellular LL37 peptide production in IL-17/IL-22-stimulated normal human epidermal keratinocytes. *Acta Derm Venereol* 94(5): 512-516, 2014.
- 4). Ito T, Furukawa F, Iwatsuki K, Matsue H, Shimada S, Takigawa M, Tokura Y: Efficacious treatment of psoriasis with low-dose and intermittent cyclosporine microemulsion therapy. *J Dermatol* 41(5): 377-381, 2014.
  - 5). Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y, Nakamura M: IL-23 from Langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing  $\gamma\delta$  T cells. *J Invest Dermatol* 134(7): 1912-1921, 2014.
  - 6). Ito T, Aoshima M, Sugiura K, Fujiyama T, Ito N, Sakabe J, Akiyama M, Maekawa M, Tokura Y: Pustular psoriasis like lesions associated with hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency without interleukin-36 receptor antagonist mutation: Long-term follow-ups of two cases. *Br J Dermatol* 172(6): 1674-1676, 2015.
  - 7). Kasuya A, Ohta I, Tokura Y: Structural and immunological effects of skin cryoablation in a mouse model. *PLoS One* 10: e0123906, 2015.
  - 8). Hashizume H, Fujiyama T, Tokura Y: Reciprocal contribution of Th17 and regulatory T cells in severe drug allergy. *J Dermatol Sci* 81: 131-134, 2016.
  - 9). Lovato P, Norsgaard H, Tokura Y, Røpke MA: Calcipotriol and betamethasone dipropionate exert additive inhibitory effects on the cytokine expression of inflammatory dendritic cell-Th17 cell axis in psoriasis. *J Dermatol Sci* 81(3): 153-164, 2016.
  - 10). Fujiyama T, Ito T, Umayahara T, Ikeya T, Tatsuno K, Funakoshi A, Hashizume H, Tokura Y: Topical application of vitamin D3 analogue and corticosteroid to psoriasis plaques additionally depresses skin infiltration of Th17 cells and their ex vivo expansion. *J Allergy Clin Immunol* (in press).
- 〔学会発表〕(計 9 件)
- 1). 鈴木健晋, 戸倉新樹: Plasmacytoid dendritic cell の IFN- $\alpha$  産生及び inflammatory DC の TNF- $\alpha$  産生に対する各種乾癬治療薬の影響. 第 21 回分子皮膚科学フォーラム. 2014.4.11. 京都市
  - 2). Suzuki T, Hirakawa S, Shimauchi T, Ito T, Detmar M, Tokura Y: VEGF-A promotes IL-17A-producing  $\gamma\delta$ T cell accumulation in mouse skin and serves as a chemotactic factor for plasmacytoid dendritic cells. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.8. Albuquerque, United States of America.
  - 3). Suzuki T, Ito T, Sakabe J, Michael D, Tokura Y: VEGF-A promotes IL-17A-producing  $\gamma\delta$ T cell accumulation in mouse skin and serves as a chemotactic factor for plasmacytoid dendritic cells. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2014.12.10. Kyoto, Japan.
  - 4). Tokura Y: Pathogenic mechanism of psoriasis obtained from treatment with Ustekinumab. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12. Suita, Japan.
  - 5). Suzuki T, Tokura Y: Vitamin D3 analogue depresses cutaneous inflammation-inducing activities of plasmacytoid dendritic cells (DCs) but not inflammatory DCs. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12-13. Suita, Japan
  - 6). Suzuki T, Tokura Y: Distinctive downmodulation of plasmacytoid dendritic cell by vitamin D3 analogue in its interferon- $\alpha$  production and chemotactic activity. Society for Investigative Dermatology 74th Annual Meeting. 2015.5.8. Atlanta, United States of America.
  - 7). Suzuki T, Tokura Y: Vitamin D3 analogue calcipotriol downmodulates interferon-production and chemotactic activity of murine plasmacytoid dendritic cells. 23rd World Congress of Dermatology 2015.6.10. Vancouver, Canada.
  - 8). Suzuki T, Tatsuno K, Ito T, Tokura Y: Distinctive downmodulation of plasmacytoid dendritic cell functions by vitamin D3 analogue calcipotriol. 14th International Workshop on Langerhans Cells. 2015.11.7. Kyoto, Japan.
  - 9). Suzuki T, Tatsuno K, Ito T, Tokura Y: Distinctive downmodulation of plasmacytoid dendritic cell functions by vitamin D3 analogue. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015.12.11. Okayama, Japan.
- 〔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〕

浜松医科大学医学部皮膚科学講座ホームページ

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/derm/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

戸倉 新樹 (Tokura Yoshiki)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00172156

### (2)研究分担者

平川 聡史 (Hirakawa Satoshi)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50419511  
H26年度まで

### (3)連携研究者

善本 隆之 (Yoshimoto Takayuki)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80202406

位高 啓史 (Itaka Keiji)  
東京大学・医学(系)研究科(研究院)・  
特任准教授  
研究者番号：60292926