

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860935

研究課題名(和文) マウス乾癬様皮膚炎モデルにおけるアディポネクチンの役割の解明

研究課題名(英文) Possible roles of adiponectin in a mouse model of psoriasis

## 研究代表者

柴田 彩 (SHIBATA, Sayaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50613105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬患者にメタボリックシンドロームの合併が多いことはよく知られている。近年、アディポネクチンは従来の代謝機能を有するのみならず、免疫反応に関与することが注目されている。今回我々はアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて乾癬様皮膚炎が増悪し、その皮膚においてIL-17の産生が亢進していることを見出した。IL-17産生細胞は真皮内のVg4陽性gdT細胞であり、アディポネクチンはgdT細胞に作用し、IL-17の産生を抑制した。さらにアディポネクチンの腹腔内投与により、皮膚炎の改善が見られた。これらの結果からアディポネクチンがIL-17の産生を介して乾癬の病態形成に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating epidemiologic evidence has revealed that metabolic syndrome is an independent risk factor for psoriasis development and is associated with more severe psoriasis. Adiponectin, primarily recognized as a metabolic mediator of insulin sensitivity, has been newly drawing attention as a mediator of immune responses. Here we demonstrate that adiponectin regulates skin inflammation, especially IL-17-related psoriasiform dermatitis. Mice with adiponectin deficiency show severe psoriasiform skin inflammation with enhanced infiltration of IL-17-producing dermal gd T cells. Adiponectin directly acts on murine dermal gd T cells to suppress IL-17 synthesis via AdipoR1. We furthermore demonstrate here that exogenous adiponectin rescues exacerbated dermatitis in adiponectin knock-out mice. Our data provide a regulatory role of adiponectin in skin inflammation, which would imply a mechanism underlying the relationship between psoriasis and metabolic disorders.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 アディポネクチン

## 1. 研究開始当初の背景

以前より、乾癬患者には肥満の患者が多いと言われていたが、最近では肥満に限らず、メタボリックシンドロームの合併が多いことが多数、報告されている。脂肪組織は長年、エネルギー貯蔵庫としての役割を認識されてきたが、近年は代謝および免疫機能を担う臓器として注目されている。アディポカインは脂肪細胞から産生される生理活性物質の総称であり、マクロファージや T 細胞の分化、維持を介して、メタボリックシンドロームの病態形成に関与する。アディポネクチンは代表的なアディポカインの 1 つであり、近年、従来の代謝機能のみならず、様々な組織において免疫機能を有することが報告されている。乾癬の病態形成を理解するにあたり、肥満やメタボリックシンドロームといった全身の炎症性疾患との関連を解明することは重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

以前、我々はアディポネクチンが乾癬の病態に関与していることを乾癬患者の血清、ヒト皮膚角化細胞、THP-1 細胞(ヒト単球系細胞株)を用いて検討し、報告した(Shibata S et al. J Dermatol Sci. 55: 62, 2009, Shibata S et al. Br J Dermatol 164: 667, 2011)。本研究の目的は乾癬の病態形成においてアディポネクチンが関与していることをさらにイミキモド誘発乾癬モデルを用いて検討し、乾癬および随伴するメタボリックシンドロームに共通した病態形成の基盤を探ることである。

## 3. 研究の方法

イミキモド外用乾癬様皮膚炎モデルを用い、アディポネクチン遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスにおいて、肉眼的、組織学的に乾癬様皮膚炎の評価を行う。免疫組織学的検討において、浸潤している細胞の種類について検討する。また、皮膚炎を生じている皮膚において、乾癬に関係しているサイトカインの mRNA 発現について real-time PCR 法により

評価する。さらに、表皮と真皮を分離し、発現に差が見られるサイトカインにつき、細胞内フローサイトメトリー解析を行う。最終的にはリコンビナントアディポネクチンの投与により、皮膚炎の改善が見られるかどうか、また、今後、実臨床においても使用が期待される抗 IL-17 抗体の投与により皮膚炎が改善するか、さらに皮膚炎の改善に必要な抗体量について各アディポネクチン遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスにおいて検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) イミキモド外用乾癬様皮膚炎モデルにおける肉眼的、組織学的評価

平成 25 年度において、イミキモド外用乾癬様皮膚炎モデルを用い、アディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて野生型マウスに比して、肉眼的、組織学的に乾癬様皮膚炎の増悪がみられることを確認した。肉眼的にアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて、紅斑、鱗屑、皮膚の厚さの増悪がみられた。また、組織学的にアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて、より強い表皮の肥厚および炎症細胞浸潤がみられた。免疫組織学的検討において、浸潤している細胞は CD3 または MHCII 陽性細胞であり、T 細胞や樹状細胞の浸潤が考えられた。

### (2) イミキモド外用乾癬様皮膚炎モデルにおける各種サイトカインの mRNA 発現量

次に、皮膚炎を生じている部位の mRNA の発現について real-time PCR 法により検討したところ、アディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40、IL-23p19、IL-17A、IL-17F、IL-22 などの乾癬の病態形成に関与するサイトカインの発現が有意に上昇していた。そこで、もう一つの代表的な乾癬モデルである IL-23 投与乾癬様皮膚炎モデルを用いて更なる検討を加えた。IL-23 の局所皮下投与により、アディポネク

チン遺伝子欠損マウスにおいて、耳の厚さの増悪および IL-17A, IL-17F および IL-22 の mRNA 発現上昇がみられた。

### (3) イミキモド外用乾癬様皮膚炎モデルにおける IL-17 の細胞内フローサイトメトリー解析

平成 26 年度には皮膚炎を生じている部位に浸潤している細胞および乾癬の病態形成における主たるサイトカインである IL-17 の産生についてフローサイトメトリー解析を行った。具体的には皮膚炎を生じている部位の皮膚の表皮と真皮を分離し、真皮からコラゲナーゼなどを用いて細胞を分離し、brefeldin A 存在下で細胞を刺激後、細胞内フローサイトメトリー解析を行った。皮膚炎を生じている皮膚ではアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいて野生型マウスに比して、CD3 陽性細胞が有意に多くみられた。また、IL-17 陽性細胞もアディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいてより多くみられ、両マウスにおいて、IL-17 を産生している細胞の 85-90% は $\gamma\delta$ T 細胞であった。皮膚における $\gamma\delta$ T 細胞には V $\gamma$ 4 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞および V $\gamma$ 5 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞があることが知られており、IL-17 産生に関与している細胞がどちらの細胞であるかをさらに検討した。まず、乾癬様皮膚炎を生じている皮膚を表皮および真皮に分離し、それぞれに浸潤している $\gamma\delta$ T 細胞が V $\gamma$ 5 陽性および V $\gamma$ 4 陽性であることを RT-PCR 法を用いて確認した。次に、細胞内フローサイトメトリー解析を行ったところ、乾癬様皮膚炎が生じている皮膚において、V $\gamma$ 4 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞および V $\gamma$ 5 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の両者が存在することを確認したが、IL-17 を産生している細胞は V $\gamma$ 4 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞であった。これらのことから乾癬様皮膚炎モデルにおける IL-17 の産生細胞は真皮内の V $\gamma$ 4 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞であり、アディポネクチンの欠損により、これらの細胞の浸潤および IL-17 産生の増加がみられることが示唆された。

### (4) アディポネクチン投与による皮膚炎の改善の評価

そこで、次にアディポネクチンの投与によりこれらの皮膚炎の改善がみられるかを検討した。リコンビナントアディポネクチンについては、His タグを付けたアディポネクチン遺伝子を挿入したベクターを大腸菌に導入し、宿主大腸菌を大量培養することにより精製した。アディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいてはアディポネクチンの腹腔内投与により、皮膚炎の改善が見られた。一方、野生型マウスにおいてはアディポネクチンの投与を行っても皮膚炎の改善はみられず、アディポネクチンが作用する濃度に関与している可能性が考えられた。

### (5) 皮膚炎の改善に必要な抗 IL-17 抗体の投与量についての検討

さらに、実臨床において、今後、使用が期待される抗 IL-17 抗体の投与により皮膚炎が改善するか、また皮膚炎の改善に必要な抗体量について検討した。野生型マウスにおいては低用量 (10  $\mu$ g/マウス) の抗体投与により、皮膚炎の改善がみられたが、アディポネクチン遺伝子欠損マウスにおいては低用量 (10  $\mu$ g/マウス) の抗体投与では皮膚炎の改善はみられず、高用量 (80  $\mu$ g/マウス) の抗体投与により、皮膚炎の改善がみられた。

## 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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

柴田彩 他、乾癬におけるアディポネクチンの役割、日本乾癬学会 2014 年 9 月 20 日、高知

Shibata S et al. Adiponectin deficiency exacerbates psoriasiform skin inflammation by promoting IL-17 production from  $\gamma\delta$  T cells. Adiponectin deficiency exacerbates psoriasiform skin inflammation by promoting IL-17 production from  $\gamma\delta$  T cells. *International Investigative Dermatology Meeting*. May 8-11, 2013. Edinburgh, Scotland

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 彩 (SHIBATA, Sayaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50613105

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：