

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461695

研究課題名(和文) IL-36シグナルを介した表皮細胞-樹状細胞間クロストークによる乾癬発症機序解明

研究課題名(英文) Psoriasis like phenotype in K5.Stat3C transgenic mice depends on the IL-23/Th17 axis through interleukin 36R signals

研究代表者

大湖 健太郎 (OHKO, Kentaro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：90595274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：健康ヒト皮膚および、乾癬患者の非病変部/病変部皮膚を用いた定量RT-PCRでは乾癬皮膚では、IL-36 の発現が有意に亢進しており、IL-36 と、IL-36RNの発現も上昇傾向にあった。乾癬モデルマウスの1つであるK5.Stat3Cマウスに誘導した乾癬様皮疹でも、IL-36リガンドの発現が亢進していた。IL-36受容体ノックアウトマウスとK5.Stat3Cマウスを交配したマウスでは有意に耳介肥厚と表皮肥厚が抑制されており、乾癬遺伝子の発現が抑制されていた。ケラチノサイト、樹状細胞それぞれにIL-36で誘導したところ、抗菌ペプチドと、IL-23/Th17軸サイトカインの発現誘導が得られた。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disease. Recently, the IL-1 family members Interleukin-36, IL-36alpha, IL-36beta, IL-36gamma and the receptor antagonist IL-36Ra, constitute a novel signaling system that is poorly understood. First, we verified that psoriatic lesions showed increased levels of IL-36 ligands. Next, psoriasis like lesions in this K5.Stat3C mice showed increased transcriptional levels of the IL36A, IL36B, IL36G and IL36RN. To verify whether IL-36R deficiency attenuated psoriasis-like lesion of mice model, we generated IL-36R(-/-): K5.Stat3C mice. Strikingly, IL-36R deficiency markedly attenuated TPA-induced skin lesion, regarding ear thickness and histology. In addition, IL-23p19, and other signature molecules related with psoriasis were down-regulated. Finally, experiments using primary keratinocytes(KC), dendritic cells (DC) and bone marrow chimera mice, revealed that the IL-36 signalings of both KCs and DCs contributed to development of psoriatic lesion.

研究分野：乾癬

キーワード：乾癬 IL-36 膿疱

## 1. 研究開始当初の背景

乾癬は欧米で人口の 2-4%を占める頻度の高い皮膚疾患であり、本邦においても患者数が増加している。乾癬は、全身の皮膚に、銀白色の鱗屑を伴う角化性紅斑が多発し、病理組織学的には、角層下の好中球浸潤、表皮の肥厚および分化異常、炎症細胞浸潤、真皮内の毛細血管増殖を特徴とする慢性の炎症性皮膚疾患である。乾癬の発症機序は未だ不明な点が多いが、多遺伝子・多因子性の複合要因のもと、表皮と免疫担当細胞の相互作用が病態の中心であると考えられている。免疫細胞側としては、近年樹状細胞の活性化によるサイトカイン産生およびそれに引き続く、IL-23/Th17 軸の活性化が病態に関与することが明らかにされた(J Invest Dermatol 129; 1339, 2009)。その一方、表皮側から免疫細胞へのシグナル伝達や、逆に、免疫細胞側からのフィードバックに関しては不明な点が多い。

その経路を担う一候補として、乾癬表皮細胞から分泌されるインターロイキン 36(以下 IL-36)が挙げられている。IL-36 はインターロイキン-1 ファミリーに属しており、サブファミリーとして IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  の 3 分子を含むが、いずれも同じ生物活性を有する。これら 3 分子はいずれも IL-36 受容体に結合し、IL-1 受容体付属蛋白質である IL-1R accessory protein と共役し、シグナルが伝達され、NF- $\kappa$ B と MAP キナーゼが活性化する。また IL-36 受容体 antagonist(以下 IL-36Ra) は、IL-36 受容体と結合するが、IL-1 受容体付属蛋白質と共役しないことによって、IL-36 シグナルの負の調整因子として作用している。前述のとおり、IL-36 は乾癬病変部位、主に表皮角化細胞から過剰に発現していることが報告されている (J Immunol 167;1440-6, 2001)。さらにケラチン 14 プロモーター依存的に過剰発現させたマウス(K14.IL-36Tg マウス)において、生後一時的ではあるが皮膚炎症が誘導された(J Exp Med 204; 2603-14, 2007)。それに加え、乾癬の一亜型である膿疱性乾癬で IL-36Ra をコードする *IL-36RN* 遺伝子に変異が見つかっており、本邦でも報告が続いている。またヒト正常角化細胞を IL-1 $\alpha$  あるいは TNF- $\alpha$  で刺激すると 3 種類の IL-36 ファミリー分子、IL-36Ra、および抗菌ペプチドが産生されることが示された(J Immunol 186;2613-22, 2011)。逆に IL-36 刺激によって、角化細胞から、抗菌ペプチドの産生が誘導できることも報告されており、IL-36 を介するポジティブフィードバックによって、抗菌ペプチドが誘導されていることを意味している。このように、IL-36 シグナルは、自然免疫および IL-23/Th17 系とクロストークをしつつ、悪循環ループ

を形成し、乾癬発症・増悪に重要な働きをしていると推察される(図 1)。乾癬の病態形成には各種サイトカインが関与しており、それぞれの役割が明らかにされているが、表皮細胞から、樹状細胞へのシグナル伝達については不明であった。

しかし、表皮細胞から IL-23/Th17 系へ、どのようにシグナル伝達が行われているのか、IL-36 シグナルとの関連に関しても、未だ明らかになっていない点が多い。

このような研究背景の中で、応募者は、まず、IL-36 シグナル抑制が、乾癬病変を抑えられるかについて検討を行った。応募者らの研究室で開発した乾癬のモデルマウスである K5.Stat3C マウスは、表皮細胞特異的に活性化型 Stat3C を発現しているトランスジェニックマウスであり、このマウスは、ホルボールエステル外用後に乾癬様皮疹を呈することを見出した(Nat Med, 11, 43-49, 2005)。さらに、このマウスはヒト同様 IL-23/Th17 軸に依存した皮疹を発症し、この軸を標的とする抗体療法(抗 IL-12/23p40, 抗 IL-23p19, 抗 IL-17A)によって皮疹形成が抑制されることを報告した(J Immunol 186;4481-9,2011)。これは K5.Stat3C マウスが他の乾癬モデルマウスと比較して遺伝子発現プロファイルがヒト乾癬により近い、最も理想的な乾癬モデルマウスであると考えられる(PLoS One 6:e18266, 2011)。このマウスに誘導した皮疹では乾癬皮疹同様、IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  及び Ra の遺伝子が高発現することを確認した。しかし、このマウスにおける IL-36 によるシグナル伝達経路は不明であり、これを明らかにするために、我々は、Dr. JE Towne(Amgen, USA)より IL-36 受容体ノックアウトマウス(以下 IL-36R(-/-))の譲渡を受け、我々の有する K5.Stat3C マウスに、IL-36R(-/-)マウスを交配させた、IL-36R(-/-):K5.Stat3C マウスを作製し、耳介にホルボールエステル刺激を加えたところ、耳介肥厚が抑制された(図 2)。この結果より IL-36 シグナルの抑制が、乾癬病変の抑制に繋がると考えられた。以上を踏まえ、本研究は IL-36 シグナルの乾癬発症における機序の解析を目的とする。

## 2. 研究の目的

IL-36 サイトカインの乾癬病変形成へどのように寄与しているかを解明する。

## 3. 研究の方法

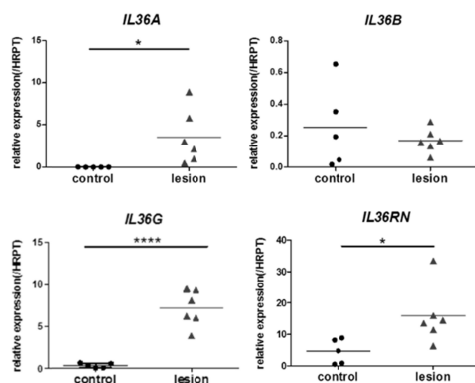
- 1) ヒトの乾癬病変で IL-36 シグナルが亢進しているかを検討した。健常ヒト皮膚および、乾癬患者の非病変部/病変部皮膚を用い、定量 RT-PCR を行う。
- 2) 乾癬モデルマウスと IL-36 受容体(R)ノックアウトマウスを交配したマウスを作成し、組織学的評価と遺伝子を評価した。
- 3) マウスの初代培養ケラチノサイトに、

- IL-36 リガンドを作用させる。
- 4) マウス脾臓より分離した樹状細胞に、IL-36 リガンドを作用させる。
  - 5) 骨髄キメラマウスを作成し、ケラチノサイト由来 IL-36、樹状細胞由来 IL-36 のそれぞれの乾癬病態形成への貢献度を評価する。

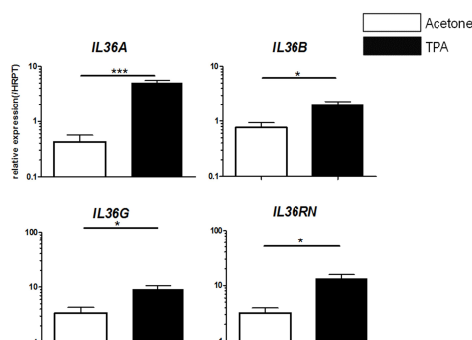
#### 4. 研究成果

IL-36 サイトカインが、膿疱性乾癬のみならず、尋常性乾癬を含めた乾癬全体の病態形成に寄与していることを明らかになった。

- 1) ヒト乾癬病変では、IL-36 $\gamma$  の発現が亢進していた。



- 2) K5.Stat3C 乾癬モデルマウスに、TPA により乾癬様病変を誘導した際には、IL-36 リガンドの発現が亢進していた。更に、IL-36RKO:K5.Stat3C マウスでは、IL-36R(+/-):K5.Stat3C マウスと比して、TPA による病変誘導時の耳介腫脹、表皮肥厚が抑えられており、乾癬関連遺伝子の発現も抑えられていた。



- 3) マウスの初代培養ケラチノサイトに IL-36 刺激を加えたところ、各種抗菌ペプチドの発現を認めた。
- 4) 樹状細胞より、IL-12/23p40、TNF- $\alpha$  の分泌を認めた。
- 5) IL-36 は、ケラチノサイト/樹状細胞由来、

共に乾癬病変に寄与することが明らかになった。

#### 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1件)

- 1) 大湖健太郎、中島喜美子、佐野栄紀、IL-36 シグナルを介した表皮細胞-樹状細胞間クロストークによる乾癬発症機序の解明、査読無、第29回角化症研究会記録集29; 2015. 112-115

[学会発表](計5件)

<国内>

- 1) 第114回日本皮膚科学会総会  
大湖健太郎、中島喜美子、砥谷和人、笹部衣里、杉浦一充、秋山真志、佐野栄紀  
「IL-36RN 遺伝子変異を持つ膿疱性乾癬患者に生じたメトトレキサート関連リンパ増殖症の1例」  
平成27年5月29日~31日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

- 2) 第113回日本皮膚科学会総会  
大湖健太郎、中島喜美子、佐野栄紀  
「IL-36 シグナルを介した表皮細胞-樹状細胞間クロストークによる乾癬発症機序の解明」  
平成26年5月30日~6月1日、国立京都国際会館(京都府京都市)

<国際学会>

- 1) SID2016  
OHKO Kentaro et al.  
Psoriasis development is required for cooperative IL-36R signal in dendritic cells and keratinocyte  
11-14 May 2016,  
SCOTTSDALE, ARIZONA

- 2) ESDR2015  
OHKO Kentaro et al.  
Keratinocyte-autonomous IL-36/IL-17C loop shapes the psoriasiform phenotype  
9-12 September 2015,  
Rotterdam, Netherlands

- 3) JSID2014  
OHKO Kentaro et al.  
IL-36 signaling is a gatekeeper for both keratinocytes and dendritic cells linking innate immunity to psoriatic nature  
12-14 Dec, 2014  
Hotel Hankyu Expopark(大阪府吹田市)

[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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

大湖 健太郎 (OHKO, Kentaro)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・助教  
研究者番号：90595274

(2)研究分担者

佐野 栄紀 (SANO, Shigetoshi)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授  
研究者番号：80273621

中島 喜美子 (NAKAJIMA, Kimiko)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・准教授  
研究者番号：20403892

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )