

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860889

研究課題名(和文) 乾癬の病態における制御性T細胞とIL-17産生細胞の役割

研究課題名(英文) The role of regulatory T cell and IL-17producing cell in pathology of psoriasis

研究代表者

西田 絵美(Emi, Nishida)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80597534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬の病態については多くの知見が得られているが、皮膚局所における制御性T細胞とTh17細胞の局在、それらの細胞間の作用機序についてはまだ解明されていないことが多い。そこで本研究では乾癬患者の病変部におけるTregとTh17細胞の局在、また末梢血でのIL-17の割合がどのように皮膚症状に関わるかを調べた。局所皮膚については、凍結標本をCD4, Foxp3, IL-17で染色し、蛍光顕微鏡にてその局在、数を調べた。また患者血清の各種サイトカイン濃度を測定し、乾癬の重症度のPASIに関わる因子を公式化した。PASI score=0.31×IL-17+1.62×TNF- α +11.4 (p=0.028)。

研究成果の概要(英文)：Recently, a lot of study have been reported about the pathology of psoriasis. It remains unclear that the localization of Treg and Th17 cell in the local skin and the mechanism of action among these cells. Therefore, in this study, we examined how the localization of regulatory T cells and Th17 cells in the lesional skin of psoriasis patients and the proportion of IL-17 in the peripheral blood are related to psoriasis severity. Regarding local skin, skin biopsy was performed to prepare a frozen specimen, which was then stained with CD4, Foxp3, IL-17 and its localization and number were examined with a fluorescence microscope. The serum cytokine were determined by Cytometric Bead Array system. We analysed these factors using multiple regression analysis and finally obtained the formula: PASI score=0.31×IL-17+1.62×TNF- α +11.4 (p=0.028).

研究分野：皮膚免疫

キーワード：乾癬 制御性T細胞 Th17細胞 IL-17

1. 研究開始当初の背景

当施設では、PUVA バス、ナローバンド UVB 他、多くの光線治療が行える設備が整っており、毎年新規乾癬患者数は 100 例を超え、生物製剤投与患者も非常に多い環境にある。このため乾癬患者研究を行うには非常に望ましい環境であり、我々にとって乾癬の病態メカニズムを考えていくことは必須と考える。

尋常性乾癬の病態として現在知られていることとして、Th1 サイトカインである IFN- γ がケラチノサイト増殖を認めないことから、IL-22 を産生する Th17 細胞がケラチノサイト増殖に関わると考えられるようになった。Th17 細胞は、もともと生体防御において重要な役割を果たすが、その機能が過剰となると、IL-17 と IL-22 を産生し、ケラチノサイトに存在する IL-22 受容体に作用し、STAT3 を活性化することでケラチノサイトの増殖や、S100A、defensin、LL-37 などの抗菌ペプチドの分泌に関わる。また Th17 細胞の機能増殖維持には、IL-23 が重要であり、これらは tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthetase-producing dendritic cell (TIP-DC) により産生される。生物学的製剤の開発が進むことで、抗 TNF- α 抗体、抗 IL-12/IL-23p40 抗体が臨床的に効果があることから、TNF- α 、IL-12、IL-23 などのサイトカインが病態と関与が高いと考えられるようになった。また自己免疫性疾患を抑制し、末梢性の免疫寛容に重要とされている制御性 T 細胞 (Treg) は、IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインを分泌したり、細胞間接着などにより抑制作用を示す、Foxp3 を転写因子とした population である。しかし 2011 年 Bovenschen らは、Foxp3 陽性制御性 T 細胞が乾癬患者の局所皮膚において、IL-17A 産生細胞へ分化することを報告している。(Bovenschen et al. *J Invest Dermatol* 131:1853-60, 2011)

これまで我々は、PUVA バスによる免疫抑制効果に関して、乾癬患者の末梢血において FoxP3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、この制御性 T 細胞の誘導が患者の臨床症状と反比例していることを明らかにした。(Saito C et al. *J Dermatol Sci*. 2008) またその後、光線療法により末梢血中の Th17 細胞を減少させ、Treg の機能を回復することも報告している。(Furuhashi et al. *Plos One* 2013)

次に、乾癬患者皮膚局所における Treg 細胞の局在を調べるため、免疫染色を行った。また二重染色にて CD4 中の Foxp3 陽性細胞の割合も調べたところ、重症度スコアである PASI スコアと逆相関を示すことがわかった。

乾癬の皮膚局所において、制御性 T 細胞の割合が健常皮膚に比べ増加している報告は多くあるが、実際に乾癬の病態にどのように作用するかについてはわかっていない。

2. 研究の目的

尋常性乾癬の病態については、近年様々な分子メカニズムが報告される中、Th17 が注目され、さらには IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が病態形成に関わるとされている。本研究においては、以前より研究を続けている乾癬患者の病変部皮膚における Foxp3 陽性細胞と IL-17 陽性細胞との相互関係を見出し、それら細胞群のうち、どれが重症度と関連があるかを調べる。そして末梢血での各細胞の同定を行うことで、局所から末梢での乾癬の病態の解明を目的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 乾癬の病変部における Treg, Th17 細胞

当院の外来もしくは入院中の尋常性乾癬患者に対し、研究目的を説明の上、同意を得られた患者から乾癬の病変部より皮膚生検を行い、凍結標本作製後、切片を、CD4, Foxp3, IL-17 で蛍光染色し多重染色にも対応可能なコンフォーカル顕微鏡を用いて分布をみる。

(2) 末梢血の IL-17 細胞

当院の外来もしくは入院中の尋常性乾癬患者に対し、研究目的を説明の上、同意を得られた患者から採血を行う。20cc のヘパリン加採血を行い、ficoll-paque density gradient centrifugation によって末梢血単核球 PBMC を抽出し、MACS マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて CD3⁺ T cell に分離した後、PMA、Ionomycin にて 2 時間培養した後、brefeldin A (GolgiStop, BD, San Jose, CA) を注入し、2 時間培養する。その後 anti-CD3 (BD Bioscience)、で染色した後、Cytotfix / Cytoperm (BD Bioscience)、anti-IL-17A (eBioscience, San Diego, CA) にて細胞内染色し、FACS にて CD3⁺CD4⁺IL-17⁺T 細胞の population を解析する。

(3) 血清 IL-17 の測定

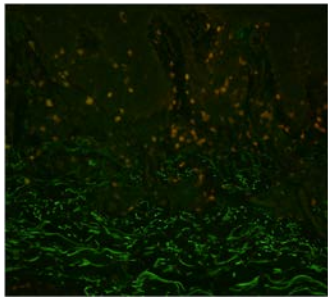
患者血清の IL-17, IL-10, IL-4, IL-2 and IFN- γ を BD™ Cytometric Bead Array system を用いて FACS にて解析する。

4. 研究成果

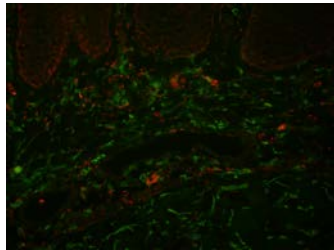
(1)

乾癬の病変皮膚を染色すると下記のように 2 重染色することができ、500×500 μ m あたりの CD4⁺Foxp3⁺細胞数をカウントした。

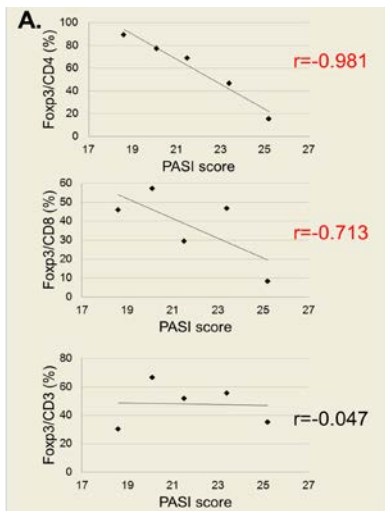
乾癬病変皮膚 : CD4 (緑色), Foxp3 (赤)



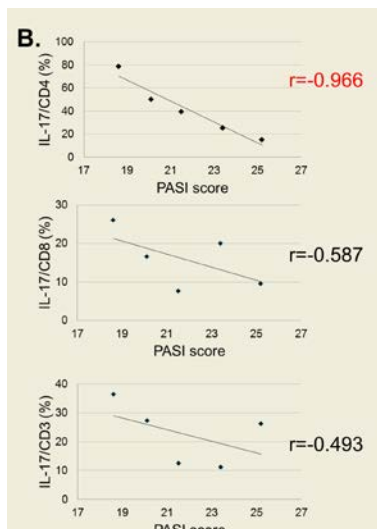
また下図のように、CD4(緑色)、IL-17A (赤色)でも染色は可能であったが、3重染色をすることはできなかった。



乾癬患者5名の The Psoriasis Area Severity Index (PASI) と乾癬病変部の CD4 中の Foxp3 T⁺細胞数は逆相関することが分かった ($r=-0.981$).

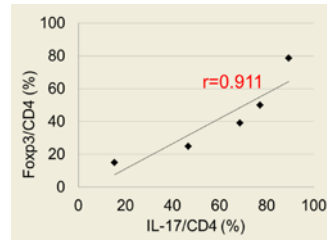


また IL-17 においても同様に行ったところ、



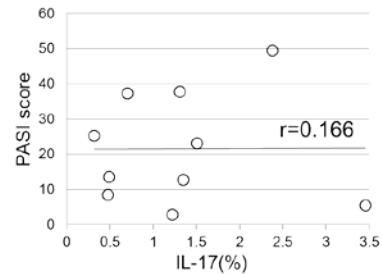
上記結果となり、PASI と CD4 中の IL-17 陽性細胞数は逆相関することが分かった ($r=-0.966$).

さらに Foxp3 陽性細胞と IL-17 陽性細胞の割合は相関していた。 ($r=0.911$)



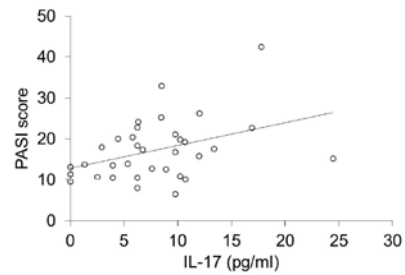
(2)

次に乾癬患者の末梢血中の CD4 陽性細胞中の Th17 細胞についても FACS を用いてその割合を解析した。すると末梢血の IL-17 細胞は PASI スコアと相関を認めなかった。 ($r=0.166$)

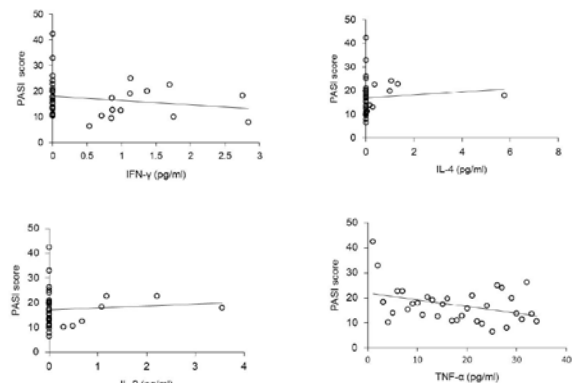


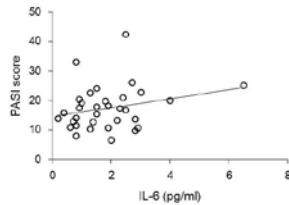
(3)

PASI スコアは血清 IL-17A と弱い相関を認めた ($r=0.348$).



他のサイトカインについては、下記のように PASI との相関はみとめなかった。 ($r=-0.197, 0.238, 0.028, 0.063, 0.232$).





だが IL-17 と TNF- α について重回帰分析を行ったところ PASI を導くための下記公式を得ることができた。

$$\text{PASI score} = 0.31 \times \text{IL-17} + 1.62 \times \text{TNF-}\alpha + 11.4 \quad (p=0.028).$$

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 3 件)

① Quantifying of serum IL-17A and TNF- α to estimate the formation of psoriatic skin: PASI formula

Emi Nishida, Kan Torii, Saori Kasuya, Kyoko Ikumi, Shinnosuke Muramatsu, Akimichi Morita

The 76th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology
26-29 April, 2016. Portland (USA)

② Circulating central memory T cells are negatively correlated with lesional Foxp3+ regulatory T cells in psoriasis patients

Emi Nishida, Saori Kasuya, Akiko Nishioka, Takuya Furuhashi, Akimichi Morita

The Society for Investigative Dermatology
7-10 May, 2014. Albuquerque (USA)

③ Circulating central memory T cells might be precursor of tissue resident memory T cells (TRM) in psoriasis

Emi Nishida, Saori Kasuya, Shinnosuke Muramatsu, Akimichi Morita

The Society for Investigative Dermatology
6-9 May, 2015. Atlanta (USA)

[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 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 絵美 (NISHIDA, Emi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80597534

(2) 研究分担者

森田 明理 (MORITA, Akimichi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30264732

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

粕谷 沙織 (KASUYA, Saori)

名古屋市立大学大学院医学研究科・加齢環境皮膚科学・実験助手