



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

皮膚疾患における炎症に関与するサイトカイン産生細胞および線維化に関わる遺伝子発現についての研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-08-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 増子, 峻矢 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/74897">http://hdl.handle.net/20.500.12099/74897</a>

氏名（本籍）	増子 峻矢（福島県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位授与番号	乙第 3 号
学位授与日付	平成 29 年 12 月 26 日
専攻	医療情報学専攻
学位論文題目	皮膚疾患における炎症に関与するサイトカイン産生細胞および線維化に関わる遺伝子発現についての研究  (Identification of cytokine producing cells associated with inflammation, and evaluation of gene expression associated with fibrosis in skin diseases.)
学位論文審査委員	(主査) 教授 稲垣 直樹 (副査) 教授 上田 浩 (副査) 准教授 田中 宏幸

#### 論文内容の要旨

乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性強皮症は免疫異常を伴う皮膚疾患である。乾癬は IL-23/Th17 細胞経路の活性化を特徴とし、アトピー性皮膚炎は 2 型免疫応答を伴う疾患と考えられているが、両疾患において共通のサイトカイン産生が確認されている。それ故、これらの疾患に対する治療効果を向上させるためには、両疾患における免疫反応の相違を明確にすることが重要である。一方、全身性強皮症は病態形成に関与する Th サブセットが不明な難治性の疾患である。強皮症患者において線維化を促進させる作用を有するトロンビンの上昇が報告されていることから、血液凝固因子が強皮症の病態に関与している可能性が考えられる。本研究では乾癬ならびにアトピー性皮膚炎患者における末梢血中および皮膚病変部の免疫細胞の分布やサイトカイン産生細胞を検討した。また、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの意義ならびに抗トロンビン薬であるダビガトランの本モデルへの影響を検討した。

第 1 章では、乾癬患者の皮膚病変部における IL-17/IL-22 の産生細胞を検討した。病変部で集積がみられた CD3<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup> 細胞はマスト細胞であり、このマスト細胞が主要な IL-22 陽性細胞であることを初めて明らかにした。また、マスト細胞は IL-17 陽性に加え、IL-17 受容体も発現していることを示した。さらに、乾癬における主な IL-17 陽性細胞として、T 細胞が病変部に浸潤していることを明らかにした。次いで、乾癬の有効な治療薬である IL-23p40 (IL-12p40) に対する抗体医薬品である、ウステキヌマブに抵抗性を示した病変部における mRNA 発現およびサイトカイン産生を検討した。抵抗性病変部では治療前と同様に、IL-23/Th17 細胞経路に関する mRNA 発現の亢進が認められた。一方、治療前に比し抵抗性病変部において非 T 細胞による IL-17 陽性細胞率が増加しており、自然免疫細胞による IL-17 産生が抵抗性病変の形成に関与していることが示唆された。

第 2 章では、アトピー性皮膚炎患者と乾癬患者における末梢血および皮膚病変部の細胞分布ならびに培養刺激前後の IL-4/IL-13 産生を検討した。両患者群における末梢血の細胞分布およびサイトカイン陽性細胞率に差はみられなかった。一方、皮膚病変部では、乾癬患者に比しアトピー性皮膚炎患者にお

いて、Th2 細胞および ILC2 の割合が著しく高く、IL-4/IL-13 陽性 T 細胞率は刺激前においても有意に高値を示した。また、乾癬患者と同様にアトピー性皮膚炎患者のマスト細胞においても IL-22 陽性細胞が確認され、T 細胞由来の IL-4/IL-13 およびマスト細胞由来 IL-22 が炎症性皮膚疾患に関与していることが示唆された。アトピー性皮膚炎患者の病変部で特異的に検出された FcεRI<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> 細胞は好塩基球であり、刺激による IL-4 陽性細胞率の増加がみられた。さらに、病変部好塩基球比率と末梢血、あるいは病変部 ILC2 比率がそれぞれ負の、あるいは正の相関性を示したことから、好塩基球が循環性 ILC2 の皮膚病変部への誘導に関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞を用いてマウス強皮症モデルを作成し、ヒト病態モデルとしての意義を検討した。また、強皮症の新たな治療薬として考えられている抗トロンビン薬であるダビガトランの本モデルへの影響も併せて検討した。トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導した強皮症モデルは、汎発性強皮症において炎症および線維化と関連が報告されている IL-13 遺伝子の mRNA 発現の増加を伴う線維化を呈し、ヒトと近い病態を示した。したがって、ヒトの強皮症の病態形成の解析ならびに新規治療薬の薬効を評価する上で有用なマウスモデルであると考えられる。また、予想に反し、ダビガトランは炎症時の投与により、Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞依存的な炎症を生じさせ、さらに線維化、脈管障害ならびに炎症に関与する遺伝子発現の上昇を介し、むしろ線維化を促進させる作用を有することが明らかとなった。

本研究で得られた知見は、これらの皮膚疾患の病態解明や新規治療薬の開発に寄与するものと思われる。

#### 論文審査結果の要旨

乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性強皮症は免疫異常を伴う皮膚疾患である。一般に、乾癬は interleukin-23 (IL-23) 依存性に分化した T helper (Th) 17 細胞の活性化を特徴とし、アトピー性皮膚炎は IL-4、IL-5 あるいは IL-13 などの Th2 サイトカインを起点とする 2 型免疫応答を伴う疾患と考えられてきたが、近年、両疾患において共通に産生されるサイトカインが見出されている。したがって、それぞれの疾患に対し適切な治療を行うためには、両疾患の症状発現あるいは病態形成に関与する細胞や機能分子など、免疫反応の相違を明らかにすることが重要と思われる。一方、全身性強皮症は病因が不明であり、有効な治療薬もない致死性の皮膚疾患である。指定難病であることから、臨床サンプルも十分に得ることができず、病態形成に関与する Th サブセットも不明である。これまでの報告では、強皮症患者において線維化を促進させるトロンビンの上昇が認められていることから、血液凝固因子が強皮症の病態に関与している可能性が考えられる。

申請者は、本研究において乾癬ならびにアトピー性皮膚炎患者における末梢血中および皮膚病変部の免疫細胞の分布やサイトカイン産生細胞を検討している。また、マウスを用いて、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞による強皮症モデルを作製し、モデル動物としての意義ならびに抗トロンビン薬であるダビガトランの本モデルへの影響を検討している。

まず、申請者は乾癬患者の皮膚病変部における IL-17 ならびに IL-22 の産生細胞を検討した。すなわち、病変部では CD3<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup> のマスト細胞が認められ、主要な IL-22 陽性細胞かつ IL-17 受容体発現細胞であることを示した。さらに、T 細胞が乾癬病変部に浸潤する主たる IL-17 陽性細胞であることを明らかにした。次いで、乾癬治療薬である抗 IL-23p40 (IL-12p40) 抗体 (ウステ

キヌマブ)に抵抗性を示した病変部における mRNA 発現およびサイトカイン産生を検討した。その結果、抵抗性病変部では治療前と同様に、Th17 免疫応答に関連する mRNA 発現の亢進が認められたが、治療前に比し抵抗性病変部では非 T 細胞による IL-17 陽性細胞率が増加しており、自然免疫細胞による IL-17 産生が抵抗性病変の形成に関与する可能性を見出している。

次に、アトピー性皮膚炎患者と乾癬患者における末梢血および皮膚病変部の細胞分布ならびに培養刺激前後の IL-4 および IL-13 産生を検討した。その結果、末梢血の細胞分布およびサイトカイン陽性率については両患者群で差はみられなかったが、皮膚病変部では、乾癬患者に比しアトピー性皮膚炎患者において、Th2 細胞および 2 型自然リンパ球 (ILC2) の割合が著しく高く、IL-4 および IL-13 陽性 T 細胞率は活性化刺激前においても有意に高値を示した。また、乾癬患者と同様にアトピー性皮膚炎患者のマスト細胞においても IL-22 陽性細胞が確認され、T 細胞由来の IL-4 および IL-13、ならびにマスト細胞由来 IL-22 がそれぞれ炎症性皮膚疾患に関与していることを見出した。さらに、アトピー性皮膚炎患者の病変部では好塩基球が特異的に検出され、刺激により IL-4 陽性細胞率の増加がみられた。加えて、好塩基球が循環性 ILC2 の皮膚病変部への誘導に関与している可能性を見出した。

最後に、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞を用いてマウス強皮症モデルを作製し、病態モデルとしての意義を検討した。また、強皮症の新たな治療薬として考えられている抗トロンビン薬であるダビガトランの本モデルへの影響も併せて検討した。その結果、本モデルでは、汎発性強皮症において炎症および線維化と関連が報告されている *Il13* mRNA 発現の増加を伴う線維化を呈したことから、本モデルはヒトの強皮症の病態形成の解析ならびに新規治療薬の薬効を評価する上で有用なマウスモデルであると考えられる。一方、予想に反し、ダビガトランは Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞依存的な炎症を惹起させ、むしろ線維化を促進させる作用を有することが明らかにした。

以上のように、本研究で得られた知見は、乾癬、アトピー性皮膚炎ならびに強皮症の病態解明や新規治療薬の開発に寄与することが期待されることから、本論文の有用性は極めて高いと判断される。したがって、審査の結果、本論文は学位論文として価値あるものと判定した。

#### 学力確認結果の要旨

増子峻矢氏の学位論文の主要部分は、下記の審査付き学術論文雑誌に公表済みの5編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

また、公聴会において学位論文の内容を中心に、また、これに関する事項、すなわち今回新規に開発した皮膚サンプルの採取および解析方法ならびに臨床的意義、炎症性皮膚疾患に位置づけられる乾癬およびアトピー性皮膚炎の発症機序および病態に関する基礎的知識、両疾患の病変部におけるサイトカイン産生細胞の同定、各疾患における特徴や差異、さらに今後の展開や本研究の将来性などに関して諮問を行った。その結果、申請者から十分な内容の回答が得られたため、博士(薬科学)の学位にふさわしいと判断し、最終試験にも合格したと判定した。

## 論文リスト

1. Mashiko S, Bougeurmouh S, Baba N, Bissonnette R and Sarfati M. Human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 136: 351-9, 2015. 【Impact Factor: 12.485】
2. Mashiko S, Mehta H, Bissonnette R, and Sarfati M. Increased frequencies of basophils, type 2 innate lymphoid cells and Th2 cells in skin of patients with atopic dermatitis but not psoriasis. *J Dermatol Sci.* (Accepted) 【Impact Factor: 3.739】
3. Jack C, Mashiko S, Arbour N, Bissonnette R, Sarfati M. Persistence of IL-17A+ T lymphocytes and IL-17A expression in treatment-resistant psoriatic plaques despite ustekinumab therapy. *Br J Dermatol.* 2016 Sep 6 (doi: 10.1111/bjd.15029). 【Impact Factor: 4.137】
4. Mehta H, Mashiko S, Goulet PO, Desjardins J, Koenig M, Sénécal JL, Sarfati M. Dabigatran aggravates topoisomerase I peptide-loaded dendritic cells-induced lung and skin fibrosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2017 Feb 8 (Epub ahead of print). 【Impact Factor: 2.495】
5. Mehta H\*, Goulet PO\*, Mashiko S, Desjardins J, Pérez G, Koenig M, Sénécal JL, Constante M, Santos MM, Sarfati M (\* co-first author). Early life antibiotic exposure causes intestinal dysbiosis and exacerbates skin and lung pathology in experimental systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* (Accepted). 【Impact Factor: 6.915】