



様々な生理活性物質が共存する炎症環境下で インターロイキン 17A が誘導する遺伝子群を同定 —乾癬の病態形成機構解明へ前進—

研究成果のポイント

- ・ 正常表皮由来の角化細胞^{※1}に 6 種類のサイトカイン^{※2}を同時添加して培養する手法で、^{かんせん}乾癬の病変部皮膚に類似した遺伝子群発現変動を体外で再現できる。
- ・ 6 種のサイトカインのうちインターロイキン 17A (IL-17A) ^{※3}が角化細胞内で誘導する遺伝子群は、乾癬病変部で変動する遺伝子群と高い一致率を示し、そこに含まれる遺伝子の一つ I κ B- ζ が角化細胞の IL-17A 応答に役割をもつことを発見。
- ・ 乾癬治療薬開発や病態を反映するバイオマーカーの同定につながることを期待。

研究成果の概要

炎症性皮膚疾患である乾癬の病態形成には、病変部で高発現する様々な炎症性サイトカインが関わり、その中でも IL-17A というサイトカインが特に重要な寄与をしています。しかし、病変部に同時に存在する多様な生理活性物質^{※4}の中で特に IL-17A が、病態形成に支配的な役割をもつことを説明づける分子機構の実態はよく分かっていません。室本講師、松田教授らの研究グループは、多数のサイトカインが複雑な炎症環境を構成している状況下で IL-17A が角化細胞内に発現誘導する特徴的な遺伝子群を、網羅的な遺伝子発現解析で同定しました。また、それらの IL-17A 誘導性遺伝子のうち、I κ B- ζ (アイカッパビーゼータ) が、乾癬病態を特徴づける角化細胞の IL-17A 応答に必要とされることを明らかにしました。これらの結果は乾癬の病態形成機構の理解を深めるとともに、新たな治療法やバイオマーカーの開発につながることを期待されます。

論文発表の概要

研究論文名: IL-17A plays a central role in the expression of psoriasis signature genes through induction of I κ B- ζ in keratinocytes (IL-17A は角化細胞における I κ B- ζ 誘導を通じて乾癬病態に特徴的な遺伝子群の発現に中心的役割をはたす)

著者: 室本竜太¹, 平尾 徹¹, 多和佳佑¹, 平島洸基¹, 今 重之¹, 鍛代悠一¹, 松田 正¹

(¹北海道大学大学院薬学研究院)

公表雑誌: International Immunology (免疫学分野の専門雑誌)

公表日: 英国時間 2016 年 3 月 3 日 (木) (オンライン公開), 冊子掲載 近日中

研究成果の概要

(背景)

乾癬は慢性の炎症性皮膚疾患であり、皮膚が赤く腫れ、その表面から白い皮がフケのように剥がれ落ちることを特徴とします。日本では人口の 0.3% (約 43 万人) が罹患していると報告され、世界では人口の約 3% (約 1 億 2500 万人) が罹患しているともいわれる患者数の多い疾患です。患者さんにとっては症状が人目につきやすい部位に表れると精神的なストレスが大きく、QOL (Quality of Life: 生活の質) に著しい影響を与えることがあります。乾癬の病態形成のもととなっているのは、皮膚の表皮を構成する角化細胞の分化成熟異常と過剰増殖であり、それらは様々な環境要因や免疫学的な要因によって引き起こされます (図 1)。完全な治療法は確立されていませんが、特に近年の研究で、T リンパ球等の免疫細胞が産生する炎症性サイトカインである IL-17A が乾癬の皮膚炎症反応において重要な役割を果たしていることが分かり、治療ターゲットとして注目されています。IL-17A の機能を阻害する抗体は、従来治療薬として用いられてきた TNF- α 阻害薬よりも高い有効性を示すことが臨床試験で示されています。しかしながら、性質の異なる様々な細胞や生理活性物質が混在する、病変部の複雑な炎症環境のなかで、どのようなメカニズムで IL-17A が病態形成に重要な役割をもつのかはよく分かっていません。たった 1 種類のサイトカイン、IL-17A を阻害するだけで、目覚ましい治療効果が得られるという事実は、乾癬病変部において同時に存在する多様な生理活性物質の中で、特に IL-17A が病態形成において何らかの細胞応答を引き起こすことを示唆していますが、その実態は分かっていません。

(研究手法)

IL-17A の直接の作用標的である角化細胞の応答を調べることで、病態形成機構の理解につながると考えられます。乾癬病態を解析したこれまでの研究では、多様な細胞から構成される病変部皮膚組織をまるごと用いたトランスクリプトーム^{※5}解析がなされており、そのような手順での解析では角化細胞以外の細胞に由来する遺伝子発現シグナルも検出されてデータに含まれるため、角化細胞に純粋に由来する固有の応答パターンの解明が妨げられていました。一方、単離された角化細胞を体外で培養し、IL-17A を添加して遺伝子発現パターンを解析した先行研究 (このような手順で角化細胞のみに由来する IL-17A 応答を検出できる) では、IL-17A を単独で用いた場合には少数の遺伝子発現にしか影響を及ぼすことができず、他の炎症性サイトカイン (TNF- α など) との共存下で多数の遺伝子の発現を誘導できることが分かってきています。つまり、IL-17A の強力な作用が顕在化するためには、IL-17A 以外の他のサイトカインの共存が重要であることが示唆されています。

今回私たちは、乾癬の病変部のような多数の炎症性サイトカインが混在する状況下において、IL-17A が引き起こす角化細胞応答や、IL-17A と他のサイトカインの協調により起こる角化細胞応答、また、それらと乾癬病態形成機構との関わりをさらに明らかにする目的で研究を進めました。

(研究成果)

多数の炎症性サイトカインが混在する状況と、そこから IL-17A のみを取り除いた状況を設定して実験し結果を比較することで、複雑な炎症環境における IL-17A の役割が理解できると考えました (図 2)。まず、乾癬病変部で発現増加し、病態形成への寄与が示唆されている 6 種類のサイトカイン (IL-17A, TNF- α , IL-17C, IL-22, IL-36 γ , IFN- γ) をヒトの正常表皮角化細胞の培養中に同時に添加することで、乾癬患者の皮膚のような複雑なサイトカイン環境を模倣することを試みました。角

化細胞の応答を DNA マイクロアレイ^{※6}を用いた網羅的遺伝子発現解析で調べた結果、6種サイトカインのミックスは角化細胞内の4,000を超える多数の遺伝子の発現変動を引き起こし、その遺伝子発現変動は乾癬患者の病変部皮膚で起こる変化とよく類似したものであることをデータ解析により見出しました。次に、多様なサイトカインが混在する状況下においてそれぞれのサイトカインが果たす役割を調べるために、6種類のサイトカインミックスから1種類ずつをそれぞれ除いた5種サイトカインのミックスで刺激する実験を行いました。例えば IL-17A を除いた5種サイトカインのミックスで刺激した角化細胞での網羅的遺伝子発現変動データを、6種類のサイトカインミックスで刺激した場合のデータと差異を比較すれば、複雑なサイトカイン環境で誘導される遺伝子の発現変化が、他のサイトカインではなく IL-17A により影響を受けるものであるかを判別できます(図2)。こうした解析により、炎症環境におかれた角化細胞内での発現が IL-17A に依存する37遺伝子を同定しました。また、IL-17A 以外の各サイトカイン (TNF- α や IFN- γ など) について、それら個々のサイトカインに依存する遺伝子群を同様に同定し、すべてリスト化しました。IL-17A や他のサイトカインに依存して変動する遺伝子群のリストを、先行研究で報告されていた乾癬患者の病変部皮膚でのトランスクリプトーム解析結果と比較したところ、特に IL-17A によって誘導される遺伝子群は、その数自体は多くないものの、乾癬患者の病変部皮膚で発現上昇する遺伝子群や、IL-17A 抗体での患者治療時に治癒に伴い発現低下する遺伝子群と、非常に高い割合で一致することが分かりました。

さらに、IL-17A により角化細胞内で発現誘導されることが分かった37遺伝子のうち I κ B- ζ (アイカッパビーゼータ) という遺伝子転写調節機能をもつタンパク質に着目し、IL-17A 応答における役割を調べました。遺伝子ノックダウン^{※7}の手法を用いて角化細胞における I κ B- ζ 発現を低下させると、角化細胞の IL-17A 応答性が低下し、 β ディフェンシンなど乾癬病変部で特徴的に発現増加する遺伝子の誘導が顕著に低減することが分かりました。このことは I κ B- ζ が IL-17A による角化細胞活性化応答の鍵を握るタンパク質の一つであることを示唆するものです。

(今後への期待)

本研究の手法で同定された IL-17A 誘導性遺伝子群は、I κ B- ζ の例で示されるように角化細胞の IL-17A 応答に重要な役割をもつものが含まれています。I κ B- ζ の働きを阻害する手法の開発は、将来的に乾癬の新たな治療法の提案につながる可能性があります。また、I κ B- ζ 以外にも角化細胞活性化応答に重要な遺伝子や、乾癬病態を反映するバイオマーカーとして利用できる遺伝子を含む可能性があり、今後の研究によって乾癬病態形成機構の理解を深めるさらなる発見が期待できます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 講師 室本竜太 (むろもと りゅうた)

TEL: 011-706-3245 FAX: 011-706-4990 E-mail: muro@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

北海道大学大学院薬学研究院 教授 松田 正 (まつだ ただし)

TEL: 011-706-3243 FAX: 011-706-4990 E-mail: tmatsuda@pharm.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/eisei/index.html>

[用語説明]

1. 角化細胞：表皮を構成する細胞。ケラチノサイトとも呼ばれる。
2. サイトカイン：免疫細胞同士、あるいは免疫細胞と非免疫細胞がお互いに交信するための可溶性のタンパク質。サイトカインは微量で強い生理活性を有し、様々な生理現象や病態形成に深く関与する。
3. IL-17A：ヘルパーT細胞サブセット Th17 細胞などの免疫細胞が産生するサイトカインで、様々な病態や感染防御に関わる。IL-17A~F までの 6 種からなる IL-17 ファミリーサイトカインの一つ。
4. 生理活性物質：生体に作用し、種々の生体反応を制御する化学物質の総称。特異的な反応に関与しており、わずかな量で十分な反応がみられる。生体が自ら産生するホルモンや神経伝達物質、サイトカインなどのタンパク性因子等が含まれる。
5. トランスクリプトーム：RNA はゲノム DNA からの転写によって生じるため転写産物 (transcript) とも呼ばれる。ある細胞や生物個体内にて様々な量で存在する RNA 発現の包括的情報のことを、「転写産物の全体」という意味でトランスクリプトーム (transcriptome) という。
6. DNA マイクロアレイ：核酸同士が相補的に結合する性質（この場合は RNA と DNA の相補的な結合）を利用した遺伝子発現解析技術の一つで、数万遺伝子にも及ぶ個々の遺伝子の発現状況を一度に網羅的に解析することができる。様々な実験条件の細胞などから調製したサンプルとその対照となるサンプルから RNA を抽出し蛍光色素で標識することで、DNA を検出するためのプローブ（探り針）を作製する。スライドガラス上に配列が既知の DNA 配列をスポット状に多数貼りつけたものを用意しておく。各スポットは一つひとつの遺伝子に対応しており、蛍光標識プローブをふりかけると、その RNA 配列に相補的な DNA 配列をもつスポットに結合する。蛍光シグナル強度を基に結合量を解析することで、結果として、数万遺伝子の遺伝子発現状況を一度に網羅的に把握することができる。
7. 遺伝子ノックダウン：ここでは siRNA (small interfering RNA) を用いた遺伝子ノックダウンを指す。siRNA とは 21-23 塩基対から成る低分子 2 本鎖 RNA で、RNA 干渉と呼ばれる現象に関与している。RNA 干渉においては mRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現が抑制される。そのため、興味のある特定の遺伝子の発現量を大きく減少させた上で、細胞の機能に及ぼす影響を解析することができる。

【参考図】

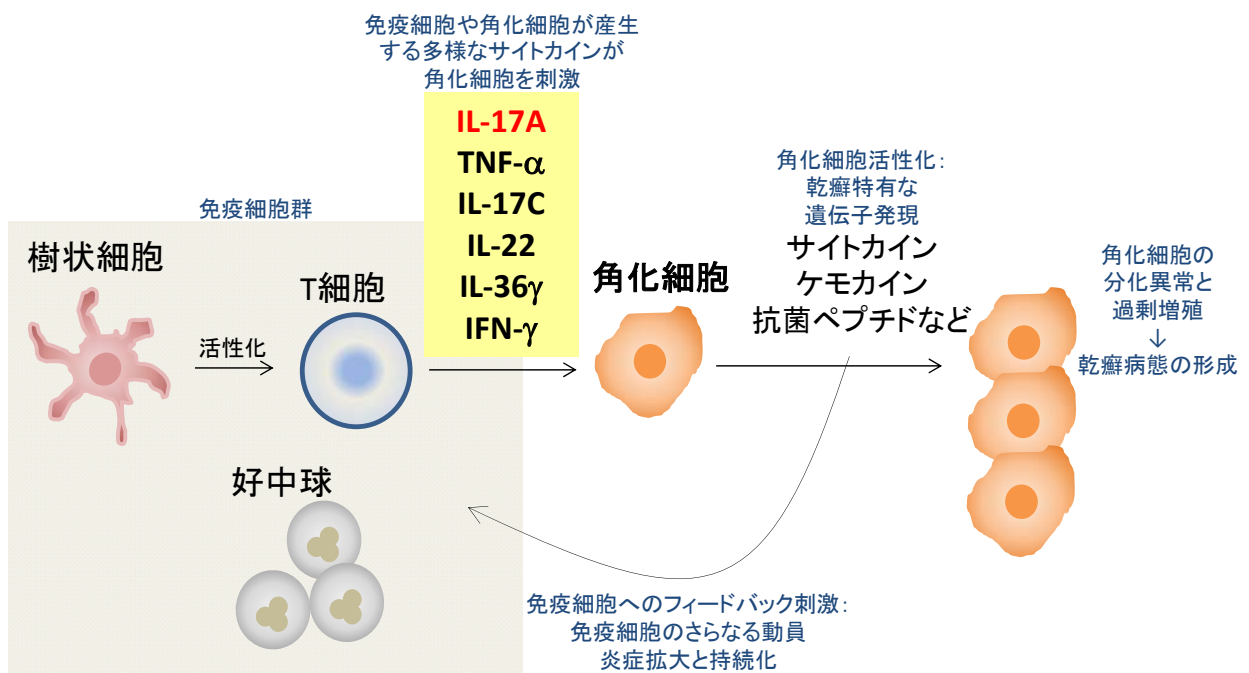
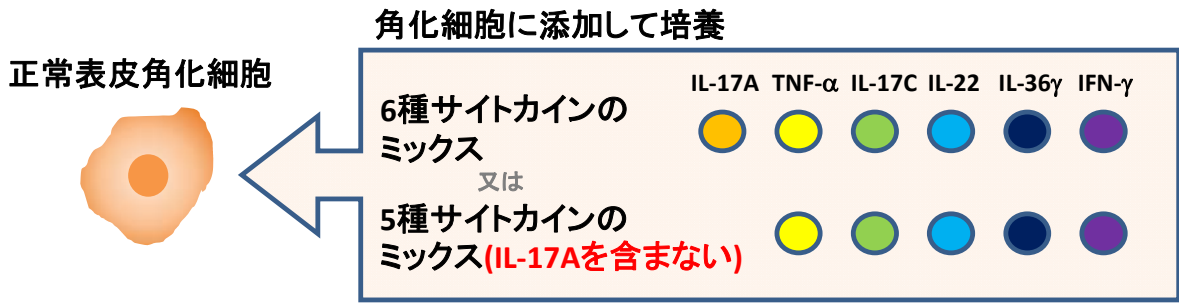
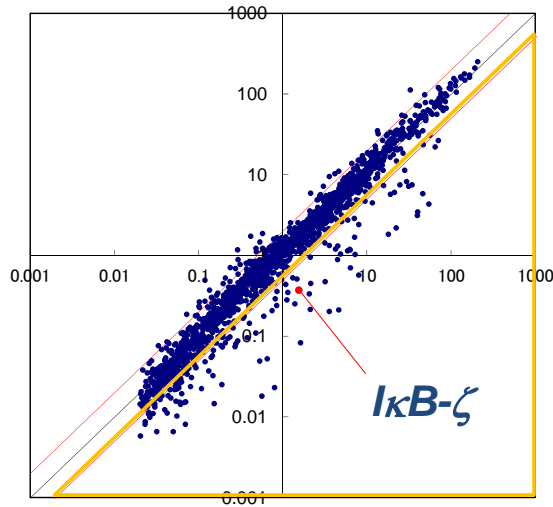


図1 サイトカインによる角化細胞活性化は乾癬病態形成に関与する



DNAマイクロアレイで得た網羅的な遺伝子発現データの比較解析

縦軸: IL-17Aを含まない5種サイトカインのミックスを添加した場合の遺伝子発現量



横軸: 6種サイトカインのミックスを添加した場合の遺伝子発現量

IL-17Aを含む場合と含まない場合の遺伝子発現量を縦軸と横軸にとってプロットすると、発現差が大きい遺伝子は対角線上から離れて検出される

↓
黄色の三角の枠内に存在するものが、他の炎症サイトカインの共存条件下にIL-17Aによって発現誘導される遺伝子

この手法で同定されたIL-17A依存性遺伝子群は、乾癬病変部で発現増加する遺伝子群と90%を超える高い割合で一致
IkB- ζ が角化細胞のIL-17A応答に役割をもつことも判明

図2 複雑なサイトカイン環境条件下でのIL-17A誘導性遺伝子の同定