

課題番号 : 25指103  
研究課題名 : 新規モデルマウスを用いた乾癬の病因、病態の解析および新規治療法の開発  
主任研究者名 : 鈴木春巳  
分担研究者名 : 土肥多恵子、高木智

キーワード : 乾癬、慢性皮膚疾患、Th17 細胞

研究成果 : 我々はT細胞シグナル伝達に関わる因子である RhoH を欠損するマウスが、BALB/c 背景において乾癬様の慢性皮膚炎を自然発症することを見出した。本年度は、炎症部位の詳細な解析を行い、炎症部位に CD4-T 細胞が浸潤し、IL-17, IL-22, IL-6 などの炎症性サイトカインが過剰に産生されていること、CCR6 陽性の Th17 細胞が多数リクルートされていることを明らかにした。さらに、眼瞼の所属リンパ節である頸部リンパ節においても Th17 細胞および Tc1 細胞が激増していることがわかった。また、リンパ球が分化しない RAG2 欠損マウスと RhoH 欠損マウスを交配したところ、乾癬様慢性皮膚炎の発症が阻止されたことから、この病態形成にはリンパ球が必須であることが明らかとなった。また、IL-22BP-IgFc 融合蛋白質を培養細胞に遺伝子導入し、プロテイン A カラムを用いて培養上清より IL-22BP 蛋白質を調製した。この IL-22BP 蛋白質は電気泳動で主な単一バンドを示し、IL-22 と結合することを確認した。現在、この精製 IL-22BP を RhoH 欠損 BALB/c マウスに静脈投与し、疾患症状の軽減がみられるか検討中である。

Subject No. : 25-103

Title : Analysis of pathogenesis and progression of psoriasis by utilizing novel psoriasis mouse model.

Researchers : Harumi Suzuki, Taeko Dohi, Satoshi Takaki

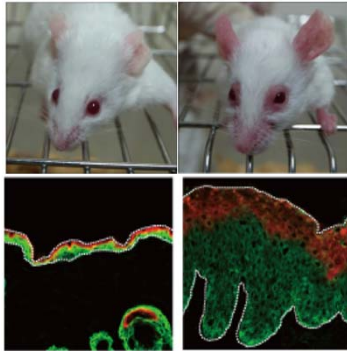
Key word : psoriasis, Th17 cells, chronic dermatitis

Abstract : RhoH, a hematopoietic lineage cell specific atypical small GTPase, functions as an adaptor for ZAP70, Syk, and lck, therefore plays an important role on development and activation of T cells. We found that RhoH deficient mice spontaneously developed psoriasis-like chronic dermatitis with age in BALB/c background. This year, we performed precise analysis of inflamed skin tissue, and found that a number of CD4-T cells were infiltrated. High titer of cytokines such as IL-17, IL-22, IL-6 were detected in the inflamed area, and CCR6 positive, activated Th17 cells were there. At the same time, massive increase of Th17 and Tc1 cells in draining lymph node was observed. The progression of chronic dermatitis was shown to be dependent on lymphocytes, because introduction of RAG deficiency into RhoH-deficient mice showed complete inhibition of the dermatoses. We prepared IL-22BP-Fc fusion protein by affinity purification, and confirmed the binding of IL-22 to the protein. Then, we are currently evaluating the effect of IL-22BP administration on the recovery of psoriasiform dermatoses in RhoH-deficient mice.

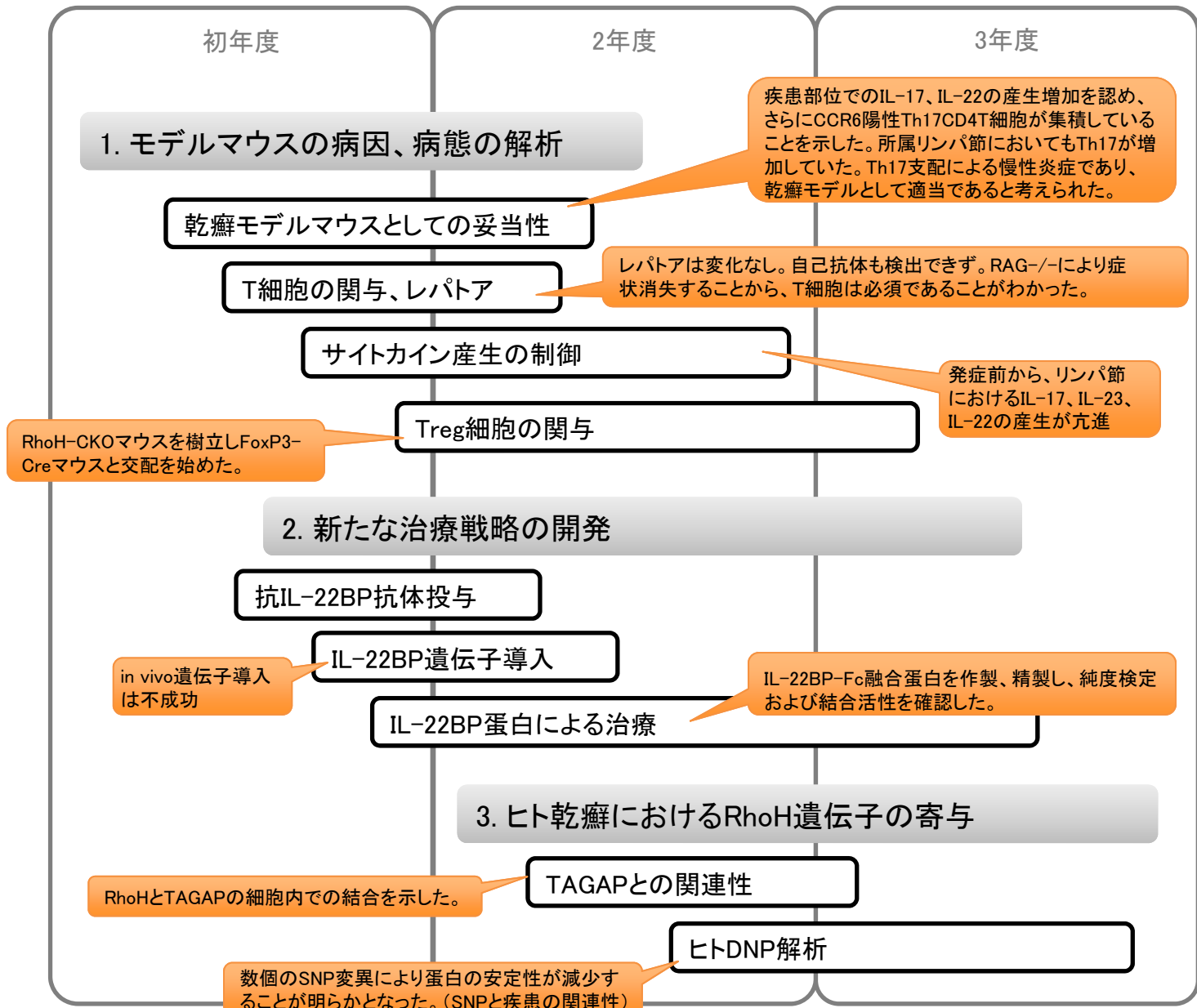
## 年次計画と達成状況

### RhoH欠損マウス

RhoH<sup>+/+</sup> RhoH<sup>-/-</sup>



乾癬症状を自然発症



## 初年度の成果

### 1. モデルマウスの 病因、病態の解析

炎症部位でTh17関連サイトカインが上昇、Th17細胞の浸潤を確認した。

皮膚炎発症がリンパ球に依存することを証明した。

### 2. 新たな治療戦略の 開発

IL-22BP-Fc融合蛋白を精製することに成功した。IL-22との結合活性も確認済。

### 3. ヒト乾癬における RhoH遺伝子の寄与

RhoHとTAGAPは細胞内で結合することを証明した。  
(TAGAPは乾癬の疾患関連遺伝子の1つ)

RhoHのヒトSNP変異体は蛋白の安定性が低下していた(ユビキチン依存性分解)

## 次年度以降の計画

皮膚炎発症以前にTh17優性が起こっているかを検討

Tregの関与を検討する  
(FoxP3-CKOマウス)

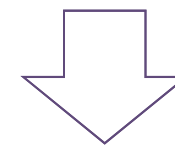
Th17細胞の移入で皮膚炎が再現できるか検討

IL-22BPの事前投与によって炎症は軽減されるか(予防)

乾癬発症後でのIL-22BP投与でも症状は軽減されるか(治療)

TA-GAP KOマウスの作製、表現型の解析

RhoHのSNPとT細胞免疫不全との関連を検討する。



乾癬発症機序の解明と新規治療法の開発

課題番号 : 25指103  
研究課題名 : 乾癬モデルマウスにおける T細胞分化、活性化の解析  
主任研究者名 : 鈴木春巳  
分担研究者名 : 鈴木春巳

キーワード : 乾癬、Th17、RhoH

研究成果 : 我々は T細胞シグナル伝達に関わる因子である RhoH を欠損するマウスが、BALB/c 背景において乾癬様の慢性皮膚炎を自然発症することを見出した。この慢性皮膚炎が自己免疫疾患なのか、皮膚炎以外に、他の自己免疫応答を起こしているかどうかをまず検討した。自己抗体の存在を検討したところ、肝臓組織に反応するような自己抗体の存在は認められなかった。腸炎、膵炎、肝炎などの症状も認められず、広範に自己免疫症状を呈していることはないことが明らかとなった。TCRV $\beta$ 鎖のレパトアについても解析したが、特に変化は見られなかった。Treg についても解析を進めているが、現在までのところ大きな変化はみられていない。組織特異的に RhoH を欠損させる RhoH-Flox マウスを作製し、Cre 特異的に RhoH を欠失させることが出来ることを確認した。現在、CD4-Cre、FoxP3-Cre を用いて、T細胞特異的 RhoH 欠失マウス、Treg 特異的 RhoH 欠失マウスを作製中である。

課題番号 : 25指103  
研究課題名 : 乾癬モデルマウスにおける慢性皮膚炎症の発症機序の解明  
主任研究者名 : 鈴木春巳  
分担研究者名 : 土肥多恵子

キーワード : 乾癬、炎症、RhoH

研究成果 : 我々はT細胞シグナル伝達に関わる因子である RhoH を欠損するマウスが、BALB/c 背景において乾癬様の慢性皮膚炎を自然発症することを見出した。本年度はまず炎症部位における詳細な解析を行った。炎症部位には多数の CD4-T 細胞が浸潤していたが、CD8T 細胞の浸潤は殆どみられなかった。また B 細胞、好中球などの浸潤はみられな  
いが、樹状細胞の真皮、表皮への浸潤は観察された。さらに、炎症皮膚組織において、IL-17, IL-22, IL-6 などの炎症性サイトカインが過剰に産生されていること、CCR6 陽性の Th17 細胞が多数リクルートされていることがわかった。同時に、眼瞼の所属リンパ節である頸部リンパ節においても Th17 細胞および Tc1 細胞が激増しており、乾癬に特徴的な Th17 応答が優勢になっていることが明らかとなった。RhoH 欠損マウスを RAG2 欠損マウスと交配し、リンパ球を欠失した状態にすると乾癬様慢性皮膚炎の発症が阻止されたことから、この病態形成にはリンパ球の存在が必須であることが明らかとなった。

課題番号 : 25指103  
研究課題名 : 乾癬モデルにおけるサイトカインを作用点とした治療戦略の開発  
主任研究者名 : 鈴木春巳  
分担研究者名 : 高木智

キーワード : 乾癬、IL-22BP、Th17 細胞

研究成果 : 本研究は RhoH 欠損マウスにおける乾癬様慢性皮膚炎モデルを対象として、乾癬の新規治療戦略の開発を目的とする。乾癬の病態形成において Th17 細胞による IL-23/IL-17/IL-22 軸の重要性が認識されている。実際に動物モデルにおいて抗 IL-17 抗体、抗 IL-22 抗体の治療効果は報告されており、実用に向けて治験が進んでいる。本研究では、IL-22 の可溶性デコイ受容体である IL-22BP (IL-22RA2) の治療効果について検討を行う。IL-22BP の乾癬治療についての報告はまだない。本年度は IL-22BP cDNA をクローニングし、IL-22 と結合しない変異体 (66A/118A) も作製した。これを IgFc との融合蛋白として発現させるベクターに組み込み、293 細胞に遺伝子導入した。この培養上清からアフィニティー精製により IL-22BP-Fc 蛋白を調製した。この精製 IL-22BP は電気泳動にてシングルバンドを示し、サンドイッチウエスタン法により、IL-22 との結合を確認した。精製 IL-22BP を毎週 25ug 静脈投与し、RhoH 欠損マウスの乾癬発症を抑制できるか検討中である。In vivo での遺伝子導入も検討したが、発現を確認できなかったため精製蛋白投与実験に集中することにした。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 25-103

研究課題名： 新規モデルマウスを用いた乾癬の病因、病態の解析および新規治療法の開発

主任研究者名： 鈴木春巳

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Microbiota derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice.	Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T.	Nature Communications	4	2013
TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice.	Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, Dohi T.	Mucosal Immunology	6	2013
Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers.	Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H, Hattori M.	DNA Research	21	2014
Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice.	Sugiura T, Kageyama S, Andou A, Miyazawa T, Ejima C, Nakayama A, Dohi T, Eda H.	J Crohns Colitis	7	2013
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H.	PLoS One	9	2014
Zfat-deficiency results in a loss of CD3ζ phosphorylation with dysregulation of ERK and Egr activities leading to impaired positive selection.	Ogawa M, Okamura T, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Tanaka Y, Ota T, Hayakawa K, Suzuki H, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S.	PLoS One	8	2013
Differential requirement for RhoH in development of TCRab CD8aa IELs and other types of T cells.	Hiroyo Oda, Norimasa Tamehiro, Michael S Patrick, Kunihiro Hayamakwa, Harumi Suzuki .	Immunol. Lett	151	2013



研究発表及び特許取得報告について

Complete genomic DNA sequence of the East Asian spotted fever disease agent <i>Rickettsia japonica</i> .	Matsutani M, Ogawa M, Takaoka N, Hanaoka N, Toh H, Yamashita A, Oshima K, Hirakawa H, Kuhara S, Suzuki H, Hattori M, Kishimoto T, Ando S, Azuma Y, Shirai M.	PLoS One	9	2013
Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation.	Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R.	Cell Metabolism.	18	2013
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha v \beta 3$ .	Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T.	Int J Hematol.	99	2014
Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis.	Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S.	Eur J Immunol.	2014 Feb 17. doi: 10.1002/eji.201343883	2014
A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum diagnostic and assessment approach to ulcerative colitis.	Kohashi M, Nishiumi S, Ooi M, Yoshie T, Matsubara A, Suzuki M, Hoshi N, Kamikozuru K, Yokoyama Y, Fukunaga K, Nakamura S, Azuma T, Yoshida M.	J Crohns Colitis.	doi: 10.1016/j.crohns.2014.01.024.	2014
Fukusaki E, Bamba T. Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling.	Yamada T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Nishiumi S, Yoshida M,	J Chromatogr A.	1301	2013

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model.	Otusbo T, Kawamura YI, Ishizaka Y, Dohi T. Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model.	DDW2013	Orlando	2013/5/20
TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis and fibrosis mediated by IL-13-TSLP axis.	Dohi T, Kawamura YI, Kawashima R, Son A, Oshio T, Wu P, Burkly LC.	Immunology 2013	Honolulu	2013/5/7

研究発表及び特許取得報告について

Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis.	Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T.	第42回日本免疫学会学術集会.	千葉	2013/12/1
消化管炎症の重症化・慢性化機構を担う因子.	土肥多恵子	第50回日本消化器免疫学会	東京	2013/8/1
メタボロミクスの医療応用	吉田 優	第61回 日本質量分析総合討論会	茨城	2013/9/12
Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
An altered T cell repertoire in mice lacking cortical thymic epithelial cells.	Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Harumi Suzuki	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Differential function of two CABIT domains in Themis.	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Hiroyo Oda, Michael S Patrick, Harumi Suzuki	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
A non-synonymous SNP variant of RhoH reduces TCR mediated signal transduction via proteasomal degradation	Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, and Harumi Suzuki	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
A missense mutation in Psmb11 impairs thymoproteasome assembly and T cell development”,	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	The 35th Naito Conference “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”.	Sapporo, Japan	2013.7.9-12
Novel mutant mice lacking cortical thymic epithelial cells”	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	Kyoto, Japan.	2013.6.3-7
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Kentaro Kaji, Hiroyo Oda, Michael Patrick, Harumi Suzuki	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	Kyoto, Japan	2013.6.3-7
Themis CABIT domains exert distinct functions in thymocyte positive selection	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Kentaro Kaji, Hiroyo Oda, Michael S Patrick and Harumi Suzuki	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月
Lnk/Sh2b3, an intracellular adaptor associated with celiac disease and autoimmune diabetes, regulates accumulation of inflammatory T cells and prevents intestinal villous atrophy.	Mori T, Katayama H, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Ikutani M, Yoshida N, Takatsu K, <u>Takaki S.</u>	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月

研究発表及び特許取得報告について

An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls production and functions of DC subsets and regulates inflammatory T cell differentiation.	<u>Mori T</u> , Seki Y, Iwasaki Y, Yamazaki-Suzuki N, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
IgE production and germinal center formation are regulated by the adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells.	<u>Iseki M</u> , Kudo F, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein prevents the accumulation of inflammatory CD8+ T cells and intestinal villous atrophy.	<u>Seki Y</u> , Katayama H, Mori T, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。