

# ヘルパー T 細胞分化抑制作用を持つ卵黄成分の探索と 皮膚免疫疾患予防法開発

千葉科学大学薬学部・准教授 岡本 能弘

## ■ 緒 言

乾癬やアトピー性皮膚炎など皮膚の免疫疾患は難治性のものが多く、症状が皮膚という他人の目に見える形で現れるなどの理由で、差別の温床になりやすいため、精神的に不安を抱えている人が多く、社会的問題が大きい。近年、その治療法は、進歩してきてはいるものの十分ではない。皮膚の免疫疾患は、接触性皮膚炎やアトピー性皮膚炎のようにおもに外来物質が直接皮膚に作用して、発症する場合もあるが、じんましんやアナフィラキシーなど食品あるいは経口摂取された薬剤により起こるものもある。アトピー性皮膚炎患者が特定の食品摂取にて症状が増悪した症例の報告もある<sup>1)</sup>。これらのことは消化管と皮膚の免疫系の密接な関連を示唆している。そして、食品によって皮膚免疫応答を制御できる可能性がある。

乾癬患者皮疹部位では IL-17 が多量に検出されること<sup>2,3)</sup>、さらに皮疹部位、末梢血中で Th17 細胞が増加することが報告されている<sup>4)</sup>。これらのことから乾癬の病態形成に Th17 細胞が関わることが推察される。一方、Th17 細胞は普段から、消化管に大量に存在していることが報告されている<sup>5)</sup>。炎症のない通常の状態においては、消化管だけが Th17 細胞の存在場所と考えられる。著者は、乾癬病態モデルマウス皮膚における免疫応答の変化(Th17 細胞増加)は、その局所のみならず、脾臓や小腸の免疫機能に変動を引き起こすことをこれまでに確認している。この小腸粘膜固有叢における Th17 細胞の増加を何らかの方法で阻害することにより乾癬の症状を抑えることが可能と考えられる。

本研究ではまず始めに Th17 細胞分化抑制作用をもつ食品として鶏卵の Th17 分化抑制活性を検討することとした。さらに、卵黄部分に Th17 分化抑制、IL-17 産生抑制作用がみとめられたため、実際に卵黄を摂取することによって乾癬の病態を制御することが可能か否かを検討し、さらに卵黄中の活性成分について解析した。

## ■ 方 法

### 1. 卵黄含有飼料

乾燥卵黄 No.11(キューピータマゴ株式会社)を AIN-93G(オリエンタル酵母工業株式会社)に添加した飼料を調製した。粉末給餌器にて自由摂取させた。

### 2. イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作製

8-9 週齢の雄性 C57BL6J マウスの両耳介にイミキモド(IMQ, ベセルナクリーム 5%, 持田製薬株式会社)1日1回、計7日間塗布した(Day 0-6)。Day7にマウスを安楽死させ、実験に供した<sup>6)</sup>。IMQを7日間連続塗布した後、Day7に実験動物を安楽死させ、各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製した。

### 3. Th17 分化誘導とその評価

マウス脾細胞を抗 CD3 抗体を結合させたプレート中で IL-6(20ng/ml, PeproTech)、TGF- $\beta$ (1ng/ml; Peprotech)、更に鶏卵成分を添加し、5日間培養した。細胞を回収し、再度 PMA/ionomycin で刺激した。細胞は CD4 および、細胞内 IL-17 を蛍光標識抗体(BioLegend)にて染色し、フローサイトメーターにて測定した。

### 4. 卵白、卵黄サンプルの調製

鶏卵を卵白と卵黄部分に分割し、20% (W/V) となるように PBS で希釈した。その後、それぞれをビーカー中、室温 30 分間攪拌し、懸濁した。遠心分離(9600xg, 10 分間)し、上清画分を卵白、卵黄サンプルとした。

### 5. シグナル伝達分子(STAT3)リン酸化の解析

細胞を回収後、タンパク質を Lysis buffer (Cell Signaling) を用いて抽出し、SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜(Bio-Rad Laboratories, Inc.)に転写した。膜をブロッキング処理した後、一次抗体を加え 4°C で反応を行った。その後、TBS-T を用いて洗浄し、HRP 標識二次抗体を加え、4°C、5 時間で反応させた。反応終了後、PVDF 膜を TBS-T により洗浄した。化学発光基質には Immuno Star(和光純薬)を利用し、反応の検出と解析には、Bioimaging analyzer LAS3500(Fuji Film)を用いた。一次抗体として使用した抗体を以下に示した：rabbit polyclonal antibody for phosph-specific STAT3 (Tyr 705) (Cell

signaling; diluted to 1/1000 in TBS-T 0.02% BSA)、rabbit polyclonal antibody for STAT3 (BioLegend; diluted 1/500 in TBST 0.02% BSA)。

#### 6. リアルタイム qPCR を用いた遺伝子発現量解析

細胞から全 RNA を抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace- $\alpha$ - (東洋紡ライフサイエンス) を使用し、全 RNA (100ng) を鋳型として oligo dT primer (50pmol/ $\mu$ l) にて cDNA 合成を行った。つづいて IL-17A, RORgt の遺伝子発現量を特異的プライマー、SYBR Green Real time PCR Master Mix (東洋紡ライフサイエンス) を用いて定量した。リアルタイム PCR 装置には、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ) を用いた。IL-17A, RORgt mRNA 量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量で補正した。使用した primer を以下に示した。

GAPDH: Fw: 5'-CAAGATTGTCAGCAATGCATCC-3'  
Rv: 5'-CCTTCCACAATGCCAAGTTG-3'

IL-17 Fw: 5'-CTC CAG AAG GCC CTC AGA CTA C-3'  
Rv: 5'-GGG TCT TCA TTG CGG TGG-3';

RORgt-: Fw: 5'-CCG CTG AGA GGG CTT CAC-3'  
Rv: 5'-TGC AGG AGT AGG CCA CAT TAC A-3';

## ■ 結果

### 1. 鶏卵成分による Th17 分化の阻害

乾癬の病態形成には Th17 細胞が関わっている。Th17 細胞の分化を阻害するような物質は予防・治療効果が期待できる。TGF- $\beta$  および IL-6 により誘導される Th17 分化に及ぼす鶏卵成分の効果を明らかにするために CD4+ T 細胞を抗 CD3 抗体。抗 CD28 抗体を固相化したプレート中で TGF- $\beta$  および IL-6 存在下、鶏卵成分とともに 5 日間培養し、Th17 細胞を分化誘導した。Th17 細胞 (CD4+ IL-17+ 細胞) 頻度を解析した。Fig. 1 に示すように TGF- $\beta$  および IL-6 の添加により Th17 細胞数は増加した (5-10%)。卵白をこの系に最大 0.5% (w/v) 添加した場合でも明確な変化は見られなかった (Fig. 1A)。一方、卵黄サンプルをこの系に 0.125% 以上添加した場合、Th17 細胞数の低下がみられた (Fig. 1B)。これらの結果は、卵黄成分が、CD4+ T 細胞に作用し、Th17 分化を阻害する活性をもつが、卵白にはそのような作用は無いことを示す。これらの結果を確認するため、CD4+ T 細胞の培養上清中の IL-17A 産生量を ELISA 法にて測定した。その結果、卵白は IL-17 産生量に変化なく (Fig. 2A)、卵黄はその用量に依存して培養上清中の IL-17 量が減少していた (Fig. 2B)。

IL-6 が、T 細胞上の特異的受容体に結合すると、受容体細胞質領域に結合している転写因子 STAT3 のチロシン残基がリン酸化される。リン酸化された STAT3 は受容体から解離し、核内に移行し、標的遺伝子を活性化する。すなわち IL-6 誘導 Th17 分化には、STAT3 分子のリン酸化が必須である。そこで、著者は、IL-6 依存性 STAT3 リン酸化に及ぼす卵黄成分の影響をウエスタンブロット法にて調べた。Fig. 3 に示すように、IL-6 存在下で抗 CD3/CD28 抗体で刺激した場合 STAT3 のリン酸化が亢進した。しかしながら、卵黄の添加により、弱いながらもリン酸化が抑制される傾向が観察された。

### 2. 卵黄継続摂取のイミキモド誘発乾癬モデルマウスに及ぼす効果

健常マウスに卵黄粉末を混和した飼料 (5% あるいは 15%) を継続摂取させ、摂取開始 10 日後から IMQ を耳介に塗布し、乾癬様皮膚炎を誘導した。1 日あたりの餌摂取食量 (data not shown)、体重 (Fig. 4) に関して各群間に有意な差は見られなかった。Fig. 5 に示したように卵黄含有食を摂取させた群は、皮膚炎誘導 7 日目以降では有意に耳介の肥厚度が抑制された ( $p < 0.05$ )。しかしながら、明確な卵黄の用量依存性は検出されなかった。さらにこれら各群のマウスから脾細胞浮遊液を調製し、IL-17 産生量の変化を調べた。その結果、卵黄摂取群で IL-17 産生量が低下していた (Fig. 6)。

### 3. 卵黄構成成分ホスピチンの Th17 分化抑制作用と機序

前項で示した Th17 分化抑制活性を担う候補物質であることを想定し、Th17 分化過程に及ぼす効果を検討した。CD4+ T 細胞を抗 CD3 抗体。抗 CD28 抗体を固相化したプレート中で TGF- $\beta$  および IL-6 存在下、5 日間培養し、Th17 細胞 (CD4+ IL-17+ 細胞) をフローサイトメトリーにより解析した。Fig. 7 に示すようにホスピチンをこの系に添加した場合、最も低用量の 0.156mg/ml では抑制作用はみられないが、それ以上の用量では Th17 細胞数の低下がみられた。これらの結果は、ホスピチンが、CD4+ T 細胞に作用し、Th17 分化を阻害する活性をもつことを示す。これらの結果を確認するため、CD4+ T 細胞の培養上清中の IL-17A 産生量を ELISA 法にて測定した。卵黄はその用量に依存し

て培養上清中の IL-17 量が減少していた (data not shown)。さらに、このときの細胞中の IL-17 および Th17 特異的転写因子 ROR $\gamma$ t の遺伝子発現量について測定したところ、高用量では、双方の遺伝子発現が抑制されていたが、低用量では作用が無かった (Fig. 8)。

さらにこのホスピチンの Th17 分化抑制作用に IL-6 依存性 STAT3 リン酸化への影響をウエスタンブロット法にて調べた。Fig. 9 に示すように、IL-6 存在下で抗 CD3/CD28 抗体で刺激した場合 STAT3 のリン酸化が亢進した。ホスピチンの添加により、影響を受けていなかった。

## ■ 考 察

鶏卵成分の Th17 分化抑制作用について調べた結果、卵黄画分に Th17 細胞分化抑制作用に伴う IL-17 産生抑制作用が観察された (Fig. 1B & Fig. 2B)。これらの阻害作用は CD4 陽性 T 細胞画分に精製した細胞に対して見られたことから、T 細胞に直接作用している可能性がある。一方、卵白画分には全く阻害活性が見られなかった。Th17 分化には転写因子 STAT3 のリン酸化が関わっている。卵黄は弱いながら STAT3 リン酸化阻害作用を有していた (Fig. 3)。卵黄の Th17 分化抑制作用の機序の一部は、STAT3 のリン酸化阻害作用が寄与していると考えられる。

乾癬病態モデルマウスに卵黄を与えることにより皮膚炎症を予防あるいは軽減できるのかを検討した。皮膚炎誘導開始 10 日前から卵黄含有飼料を摂取させた。卵黄摂取群 (5, 15%) は、対照群に比較し、皮膚炎の軽減傾向がみられた。これまでに卵黄にはアトピー性皮膚炎の改善効果があり、これが卵黄に豊富に含まれるビオチンの作用に基づくとの報告がなされている<sup>7,8)</sup>。著者は、卵黄部分にのみ Th17 分化抑制作用があり、卵白には無かったことからビオチンでなく、卵黄特異的に存在するホスピチンに注目した。ホスピチンは、鳥類や魚類などの脊椎動物の卵黄中に含まれ、高度にリン酸化されているタンパク質である。その特異的な構造から鉄の貯蔵に関する機能が知られている。ホスピチンは、卵黄の特徴的な成分であり、卵白部分にはほとんど存在しない。ホスピチンの Th17 分化過程に及ぼす効果を検討し、今回初めて、ホスピチンに Th17 分化抑制作用・IL-17 産生抑制作用があることが判明した。今後抑制機序について検討する必要がある。

## ■ 要 約

Th17 細胞の増加を何らかの方法で阻害することにより乾癬の症状を抑えることを計画し、鶏卵成分について Th17 細胞分化抑制活性を評価した。その結果、卵黄画分に Th17 細胞分化抑制作用があることを見出した。卵黄を継続摂取させることにより乾癬病態モデルマウスの症状を軽減させることができた。この軽減作用は、IL-17 産生抑制作用が関与している。また、卵黄特異的な構成成分のホスピチンに Th17 分化抑制作用・IL-17 産生抑制作用があることが判明した。今後抑制作用発現機序について検討する必要がある。

## ■ 文 献

1. 食物アレルギーの発症要因の解明および耐性化に関する研究 厚免治：食物アレルギーの診療の手引き 2011.
2. Harper EG, et al.: Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2009, 129(9):2175-2183.
3. Lowes MA, et al.: Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008, 128(5):1207-1211.
4. Kagami S, et al.: Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010, 130(5):1373-1383.
5. Ivanov, II, et al.: Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009, 139(3):485-498.
6. van der Fits L, et al.: Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009, 182(9):5836-5845.
7. Iikura Y, et al.: Oral biotin treatment is effective for atopic dermatitis in children with low biotinidase activity. *Acta paediatrica Scandinavica* 1988, 77(5):762-763.
8. Kuroishi T, et al.: Biotin deficiency up-regulates TNF-alpha production in murine macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2008, 83(4):912-920.

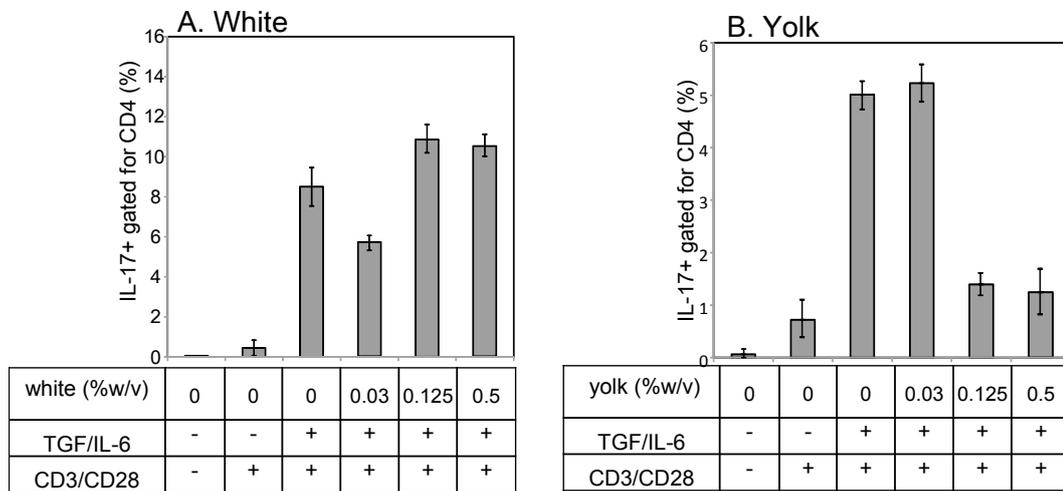


Fig. 1 鶏卵成分が Th17 分化に及ぼす作用

健常マウス脾臓細胞から CD4 陽性細胞を調製し、各種濃度の卵白溶液 (A)、あるいは、卵黄溶液 (B) を添加し Th17 細胞を分化誘導し、Th17 細胞頻度をフローサイトメーターにて測定した。(n=2)

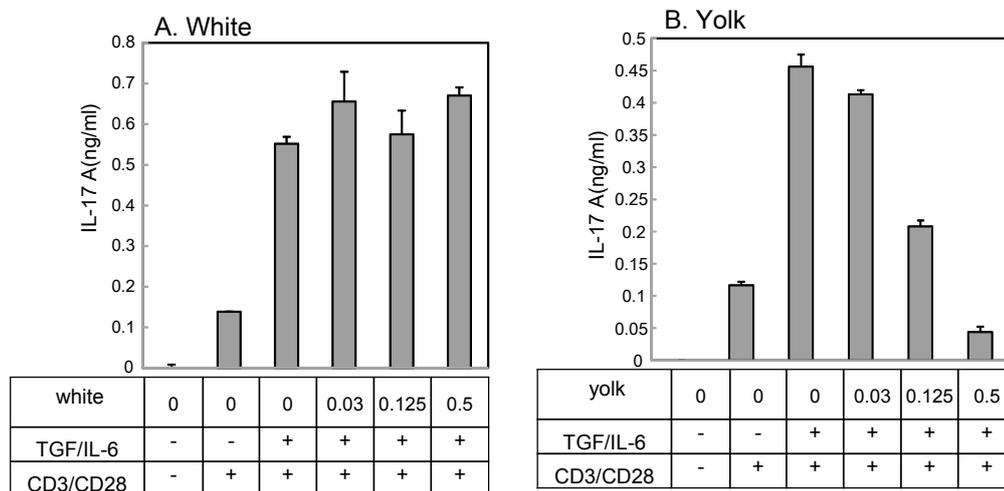


Fig. 2 鶏卵成分が IL-17 産生に及ぼす作用

健常マウス脾臓細胞に各種濃度の卵白溶液 (A)、あるいは、卵黄溶液 (B) を添加し Th17 細胞を分化誘導した際、培養上清中の IL-17 量を ELISA にて測定。(n=2)

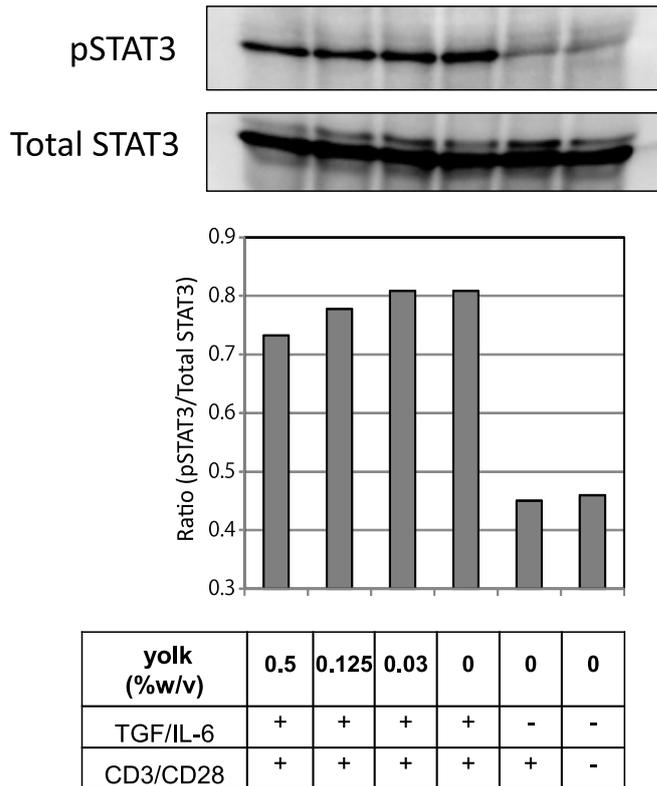


Fig. 3 STAT 3 リン酸化に及ぼす卵黄成分の影響

健康マウス脾臓細胞に各種濃度卵黄溶液を添加し Th17 細胞分化誘導条件で培養し、タンパク質を抽出した。ウエスタンブロットにてリン酸化 STAT3 (pSTAT3) および STAT3 を定量した。

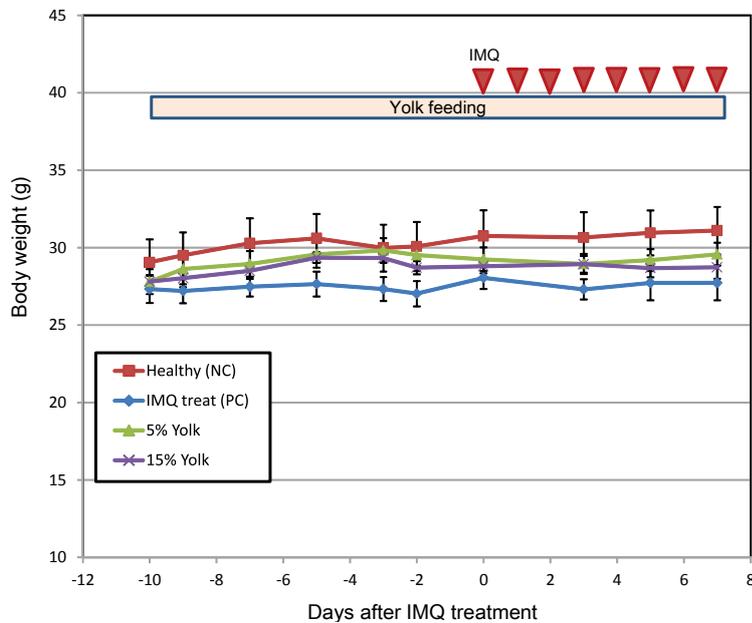


Fig. 4 卵黄含有飼料継続摂取の IMQ 誘発乾癬病態モデルマウス体重変動に及ぼす効果

8-9 週齢の雄性 C57BL6j マウスに IMQ 投与 10 日前から卵黄含有飼料 (5, 15%含有) を自由摂取させた。両耳介にイミキモド (ベセルナクリーム 5%。持田製薬株式会社) 毎日計 7 回塗布した。健康マウス (Healthy) および乾癬マウス (IMQ)、5%、10%卵黄含有飼料摂取群の体重を測定した。(n=4)

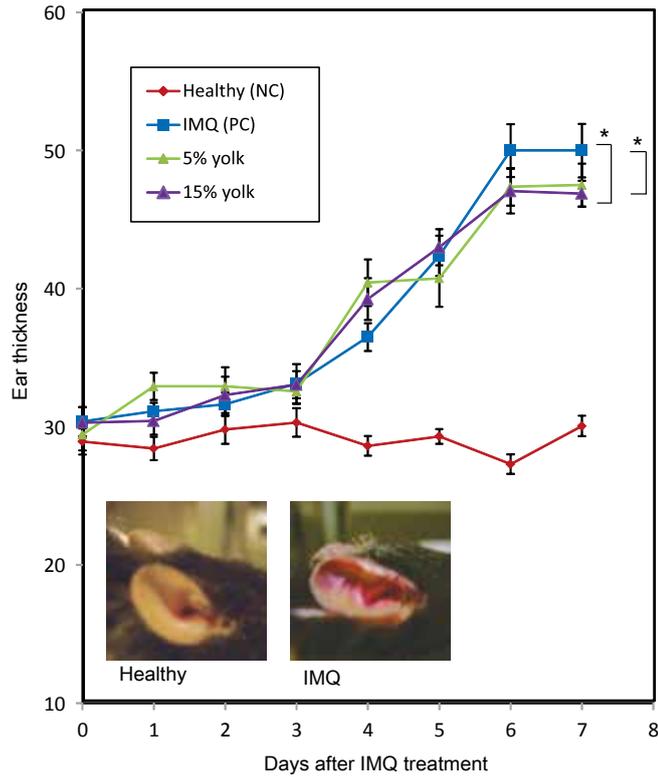


Fig. 5 卵黄含有飼料継続摂取のIMQ誘発乾癬病態モデルマウスに及ぼす効果  
 8-9週齢の雄性C57BL6jマウスにIMQ投与10日前から卵黄含有飼料(5, 15%含有)を自由摂取させた。両耳介にイミキモド(ベセルナクリーム5%。持田製薬株式会社)毎日計7回塗布した。健常マウス(Healthy)および乾癬マウス(IMQ)、5%、15%卵黄含有飼料摂取群の耳介の厚さを定圧厚み測定器で測定した。(n=8) \*p<0.05.

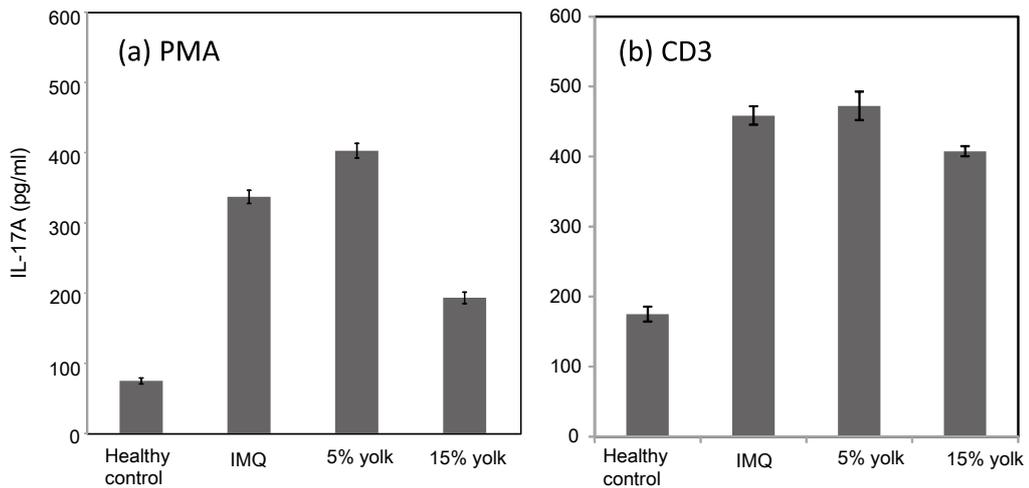


Fig. 6 卵黄含有飼料継続摂取のIMQ誘発乾癬病態モデルマウスに及ぼす効果  
 8-9週齢の雄性C57BL6jマウスにIMQ投与10日前から卵黄含有飼料(5, 15%含有)を自由摂取させた。両耳介にイミキモドを毎日計7回塗布した。健常マウス(Healthy)および乾癬マウス(IMQ)、5%、10%卵黄含有飼料摂取群から脾細胞を調製し、PMA (a)、あるいは抗CD3抗体 (b)にて刺激し、培養上清をELISAにて測定した。(n=3)

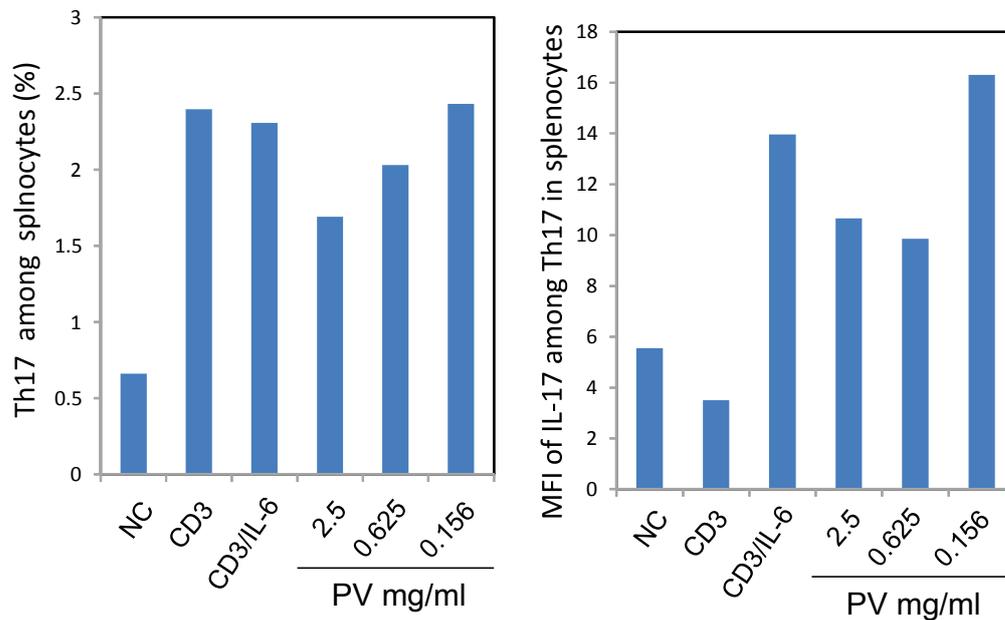


Fig. 7 卵黄成分ホスビチンが Th17 分化に及ぼす作用  
 健常マウス脾臓細胞から CD4 陽性細胞を調製し、各種濃度のホスビチン溶液を添加し Th17 細胞を分化誘導し、Th17 細胞頻度 (a) および PE-IL-17A に由来する蛍光強度 (b) をフローサイトメーターにて、測定した。(n=2) NC; negative control, CD3; anti-CD3, CD3/IL-6; anti-CD3+IL-6, PV; Phosvitin

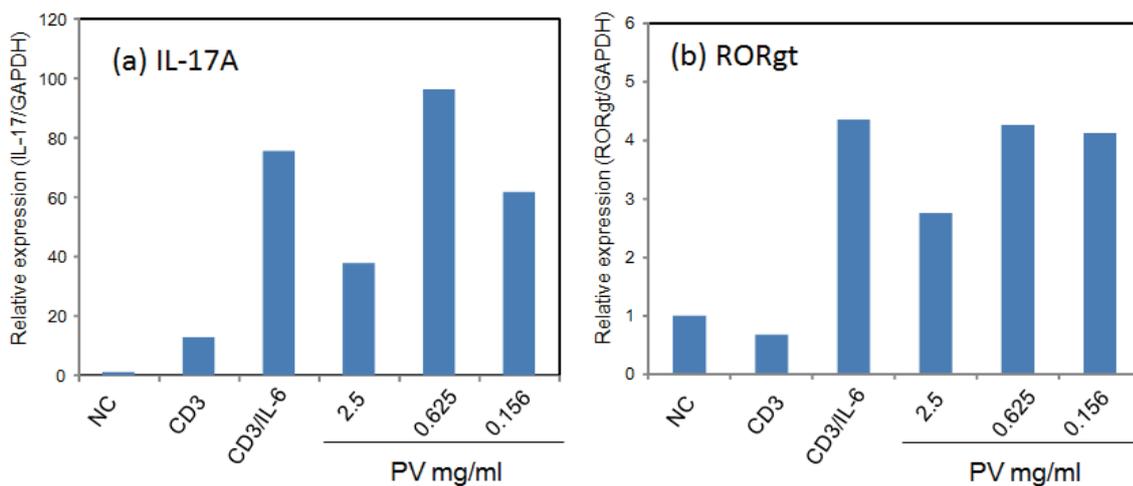


Fig. 8 卵黄成分ホスビチンが Th17 分化に及ぼす作用  
 健常マウス脾臓細胞から CD4 陽性細胞を調製し、各種濃度のホスビチン溶液を添加し Th17 細胞を分化誘導し、IL-17A (a) および RORgt (b) の mRNA 発現量をリアルタイム RT-qPCR にて測定した。(n=2) NC; negative control, CD3; anti-CD3, CD3/IL-6; anti-CD3+IL-6, PV; Phosvitin

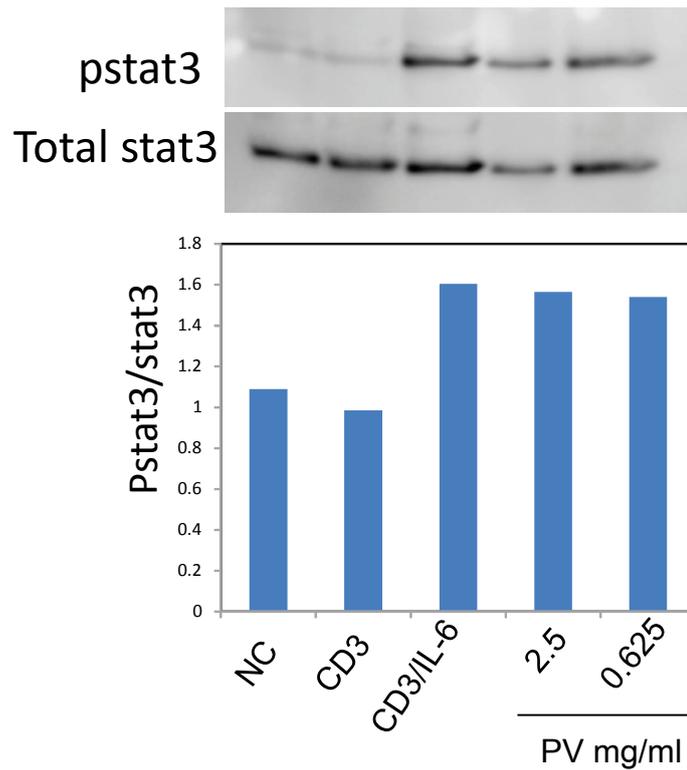


Fig. 9 STAT3リン酸化に及ぼすホスビチンの影響  
 健常マウス脾臓細胞に各種濃度のホスビチン溶液を添加し Th17 細胞分化誘導条件で培養し、タンパク質を抽出した。ウエスタンブロットにてリン酸化 STAT3 (pSTAT3) および STAT3 を定量した。NC; negative control, CD3; anti-CD3, CD3/IL-6; anti-CD3+IL-6, PV; Phosvitin