

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

マウス表皮角化細胞における IL-24 発現調節を伴う HMGB1 の炎症制御における役割

氏名 仙田 尚之

HMGB1 は有核のほぼ全ての細胞に発現するタンパク質で、通常は核内に主に局在し、クロマチン構造の安定化や転写制御に関与していると考えられている。一方で、HMGB1 の特徴として、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide ; LPS) などの刺激で能動的に、あるいは細胞死に伴い受動的に細胞外に放出されるとその作用を大きく変え、炎症性サイトカインを誘導する damage-associated molecular pattern (DAMP) としての働きを持つ。細胞外に放出された HMGB1 は Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, receptor of advanced glycation end-product (RAGE) などの自然免疫系の受容体に認識され、NF- $\kappa$ B シグナルを介し、Interleukin (IL)-1 $\beta$  や Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  などの炎症性サイトカインの誘導、好中球遊走など多彩な作用を有する。近年、このような自己由来分子が炎症病態の増悪に関与することが多数報告され、その炎症誘導メカニズムの研究が注目されている。临床上は、HMGB1 は全身的には敗血症性ショックや播種性血管内凝固症候群のメディエーターとして作用し、また局所炎症で様々な疾患に関係しているとされる。皮膚疾患との関係では、尋常性乾癬の患者では血清 HMGB1 値が高値であり重症度と相関すると報告されている。

その一方で、HMGB1 の炎症促進作用に関して、生理的役割には不明な点が多い。最近、Cre-loxP 系を用いて種々の臓器において臓器特異的な HMGB1 コンディショナル欠損マウスが作製、解析されてきた。骨髄や肝臓、膵臓、および腸上皮細胞での HMGB1 欠損マウスでは、LPS などの各種刺激により臓器の炎症亢進を来すと報告されているが、一方で、肝臓での HMGB1 欠損マウスで薬剤誘導性肝炎の炎症が減弱したとの報告もあり、HMGB1 の炎症における役割は未だ議論が分かれている。HMGB1 の欠損による炎症増悪のメカニズムにはオートファジーの減弱や NF- $\kappa$ B シグナルの増強が考えられているが、不明な点が多く、確立された機構の提唱には至っていない。

IL-24 は IL-10 と構造や遺伝子座が類似し、IL-10 スーパーファミリーに属するサイトカインである。IL-24 はナチュラルキラー細胞やマクロファージを IL-2、IL-4、LPS で刺激、また表皮細胞を IL-4 刺激した際に発現が誘導される。生体内の IL-24 の機能は、多種の悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果の他、関節リウマチなどの自己免疫疾患との関連が報告されている。皮膚では IL-24 刺激は表皮の増生、肥厚を誘導し、乾癬様皮膚炎モデルでの炎症惹起への寄与が示され、また乾癬患者およびアトピー性皮膚炎の病変部皮膚で IL-24 の発現上昇が報告されている。皮膚は人体の諸臓器の中で IL-24 の受容体を構成する IL-

20R $\alpha$ ・IL-20R $\beta$ ・IL-22R の各サブユニットの発現が特に高く、IL-24 の標的臓器として重要と考えられる。また、IL-4 は代表的な Th2 (T helper type 2) サイトカインとして知られており、Th2 細胞や肥満細胞、好塩基球から分泌され、Th2 細胞の分化や増殖を誘導する。IL-4 は STAT6 を介したシグナル伝達経路を活性化し、表皮細胞に対して IL-4 は皮膚バリアに重要なフィラグリンや抗菌ペプチドの発現を低下させ、B 細胞での IgE 産生誘導と共に、アトピー性皮膚炎の病態形成に重要と考えられている。実際、IL-4 KO マウスや STAT6 KO マウスはマウス皮膚炎モデルの炎症の減弱が知られており、IL-4/STAT6 系は皮膚での炎症を促進すると考えられている。

本研究では皮膚炎症における HMGB1 の役割を明らかにするため、まず表皮細胞で HMGB1 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製した。この Keratin5 遺伝子のプロモーター下流で Cre リコンビナーゼを発現する表皮特異的 HMGB1 欠損マウス (K5-HMGB1 cKO マウス) では、形態学的な異常や皮膚炎および皮膚腫瘍の自然発症を認めなかった。また、定常状態において本マウスの耳皮膚から抽出した RNA を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったが特記すべき変化を認めなかった。次にこのマウスにおける炎症を、Th1 系を介した炎症を来す DNFB 誘発アレルギー性接触皮膚炎、Th17 系を介した炎症を来すイミキモド誘発乾癬様皮膚炎、獲得免疫を介さず惹起されるクロトン油誘発刺激性接触皮膚炎、Th2 系を介した炎症を来すオキサゾロン誘発接触皮膚炎の 4 つのモデルを用いて検討を行ったところ、本マウスではいずれの皮膚炎モデルにおいても耳厚の肥厚が亢進し炎症が増強することが明らかとなった。

次に、DNFB 誘発アレルギー性接触皮膚炎を用いてその制御メカニズムの検討を進めた。DNFB 誘発アレルギー性接触皮膚炎では、まず腹部への初回塗布によりマウスは感作され、次いで初回より低い濃度の同一抗原を耳に塗布することによって耳で炎症が惹起される。まず、表皮細胞中の HMGB1 の欠損により、DNFB への被刺激性が亢進した可能性を検討し、本モデルの惹起相に相当する低濃度での DNFB のみを塗布した場合について検討を行ったところ、炎症はコントロールマウスと同様に非常に低いレベルであった。したがって、HMGB1 は惹起相における直接的な DNFB 塗布による反応において機能しているわけではないことが明らかとなった。次に、本モデルの感作相および惹起相を区別して解析するため、リンパ節細胞の移入実験を行った。すると、レシピエントマウスが K5-HMGB1 cKO マウスであった際にコントロールマウスの場合と比べて耳厚の肥厚の増強がみられたが、ドナーマウスはいずれのマウスであっても耳厚の肥厚に差は認められなかった。これらのことから、細胞内 HMGB1 が感作相では作用せず惹起相において炎症抑制に寄与すると考えられた。

HMGB1 による炎症抑制メカニズムの詳細を明らかにするため、DNFB 誘発アレルギー性接触皮膚炎を生じたマウスの耳皮膚から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、K5-HMGB1 cKO マウスにおいて IL-24 やその他の炎症性サイトカイン

やケモカインの発現が増強されていることが判明した。qPCR の解析から IL-24、Chil3、Chil1、CXCL1 などが K5-HMGB1 cKO マウスにおいて発現が高値であった。それと合致して、フローサイトメトリーを用いた解析からも CD11b 陽性 Gr1 陽性の好中球の割合が有意に増加していた。K5-HMGB1 cKO マウスでの炎症亢進の理由として、この好中球の浸潤の増加がその一つと考えられ、表皮細胞中の HMGB1 が CXCL1 の遺伝子発現の制御に関与することが期待された。しかし、表皮と真皮を分けての qPCR の結果から、K5-HMGB1 cKO マウス由来の表皮では、CXCL1 の発現はむしろ低下していることが判明した。

一方で、耳皮膚由来 RNA を用いたマイクロアレイの解析から、IL-24 の発現が K5-HMGB1 cKO マウス由来サンプルにおいて増強していることが判明した。qPCR の結果から、IL-24 は DNFB 誘導性アレルギー性接触皮膚炎を誘導した K5-HMGB1 cKO マウス由来表皮においても発現が亢進していた。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルにおいても、K5-HMGB1 cKO マウスでは IL-24 を含め、IL-17a, IL-12p40 など乾癬の病態形成に重要な遺伝子の発現が塗布開始 2 日後で高値を示した。クロトン油誘発刺激性接触皮膚炎でも HMGB1 cKO マウスでは IL-24 の mRNA の発現が K5-HMGB1 cKO マウスで有意に高値であった。このように、IL-24 の発現増強は、メカニズムの異なる 3 つの炎症モデルで共通して見られたことから、HMGB1 は IL-24 の発現調節に関与している可能性が高いと考えられた。

そこで IL-24 に着目し、表皮細胞中で HMGB1 が IL-24 の発現制御に関わっているかを検討した。IL-24 は IL-4 刺激で誘導されることが報告されているが、マウス表皮細胞を単離培養し IL-4 で刺激した際の誘導遺伝子をマイクロアレイを用いて解析すると、IL-24 が最も高く誘導される遺伝子として挙がり、この誘導は K5-HMGB1 cKO マウス由来表皮細胞においてさらに増強していた。

HMGB1 と IL-24 の関係の解析をさらに進めるため、遺伝子編集技術を利用してマウス角化細胞の HMGB1 KO 細胞株を作製した。この細胞は無刺激時および IL-4 刺激にて K5-HMGB1 cKO マウスの耳皮膚から単離培養した表皮細胞と同様の動態を示した。IL-24 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイから、IL-4 刺激時の IL-24 プロモーター活性が HMGB1 KO 細胞株で上昇することが明らかとなった。したがって、HMGB1 は IL-24 のプロモーターに作用し、発現調節を行っている可能性が強く示唆された。IL-4 の刺激による IL-24 遺伝子の転写には、転写因子である STAT6 が関与している。その経路における HMGB1 の作用を更に解析したところ、IL-4 刺激時に HMGB1 KO 細胞株では HMGB1 WT 細胞株に比べ STAT6 のリン酸化が亢進していた。これらの結果から、HMGB1 には IL-4 刺激によるシグナル伝達とそれに伴う IL-24 の発現誘導を負に制御する役割があることが明らかとなった。

本研究において、表皮細胞中の HMGB1 は Th1 系、Th2 系、Th17 系など様々な刺激において共通して IL-24 遺伝子などの誘導を抑制し、また炎症の調節に重要な役割を

担っていることを明らかにした。本研究は種々の異なる刺激下において HMGB1 が特定の遺伝子 (IL-24) の発現調節に関与することを明らかにした初めての報告である。これまで細胞外に放出された HMGB1 が DAMPs として作用し、炎症の増大に関与することが注目され、解析が進められてきたが、本研究で見出された炎症関連分子の適切な制御、恒常性維持が HMGB1 本来の役割である可能性が示唆される。今後、そのメカニズムの詳細を明らかにしていくことで、これまであまり解析されてこなかった HMGB1 の恒常性維持機構における役割の全貌の解明に繋がると期待される。