

論文の内容の要旨

論文題目 皮膚発癌と皮膚炎におけるリンパ浮腫の影響

氏名 坊木 ひかり

皮膚リンパ系は体液バランス、脂質吸収、免疫機能の調整に重要な役割を果たしている。リンパ浮腫はリンパ流の需要が組織液を排液するリンパ管の機能を上回ることで生じ、様々な病態と関係している。临床上、リンパ液の貯留と組織腫脹はしばしば高齢者の下肢、また乳癌や婦人科系悪性腫瘍術後の女性の四肢に見られる。リンパ系の機能不全は、高タンパクの体液を間質に異常貯留させ、脂肪組織の肥大と線維化を引き起こす。リンパ浮腫は、悪性腫瘍の手術後によく見られる合併症であり、様々な厄介な合併症を引き起こすため、近年さらに注目されてきている。リンパ浮腫の最も多い合併症は細菌や真菌感染症であるが、血管肉腫、有棘細胞癌、悪性リンパ腫などの悪性腫瘍もリンパ浮腫を背景として生じ得る。

Interleukin (IL)-6、IL-1 β 、IL-17、IL-22 は腫瘍の発生や進行に関わる炎症性サイトカインである。リンパ管機能不全によるこれらのサイトカインの二次的な蓄積は、悪性腫瘍の発生メカニズムを説明するかもしれない。それに加え、蓄積したサイトカインはリンパ浮腫における炎症性皮膚疾患にも関係している可能性がある。しかしながら、リンパ灌流障害による組織炎症の生物学的効果について、マウスモデルを用いた研究報告は少ない。共同研究者の菅谷らはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの遺伝子である *k-cyclin* を vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) のプロモーターの下流に挿入してトランスジェニックマウスを作成した。このウイルス遺伝子はカポジ肉腫のリンパ内皮細胞で発現しており、病変部で浮腫と関連している可能性が高い。興味深いことに、ほとんどの *k-cyclin* トランスジェニック (*kCYC*^{+/+}) マウスが進行性に蓄積する乳糜胸水を呈する。また、皮膚では広範囲の浮腫が MRI で検出された。それに加え、これらのトランスジェニックマウスで注入された造影剤のリンパ排液が著しく障害されていた。しかしながら、腫瘍の発生と進行についてマウスを使っただけの検討は行われていない。本研究では 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) と 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いて

kCYC^{+/-}マウスに二段階発癌を誘発した。さらに、イミキモド誘発性乾癬様皮膚炎においてリンパ輸送の役割を解析した。

まず、DMBA と TPA を用いた二段階発癌モデルにおいて、腫瘍の最大径と腫瘍体積が *wild-type* (WT)マウスに比べ *kCYC*^{+/-}マウスで有意に増大した。*kCYC*^{+/-}マウスで腫瘍の組織学的悪性度が有意に増し、腫瘍部の細胞分裂数、個細胞壊死数、炎症細胞浸潤数、また非腫瘍部の表皮の厚さが増加していた。免疫組織染色を用いて検討したところ、CD4⁺ T 細胞、マクロファージ、好中球の数が増加し、CD8⁺ T 細胞の数が有意に減少していた。過去の報告では B16 メラノーマ細胞を皮下注射した *kCYC*^{+/-}マウスでは所属リンパ節での腫瘍抗原発現量が低下し、その結果 CD8⁺ T 細胞の細胞傷害性と機能活性の低下をもたらすことが示されている。本研究でも浸潤 CD8⁺ T 細胞数が *kCYC*^{+/-}マウスで有意に減少していたことから、リンパ管機能不全による抗原提示障害が皮膚発癌モデルにおける腫瘍形成促進の一因にもなっていると仮説を立てた。その仮説を示すために、所属リンパ節における移動性樹状細胞をフローサイトメトリーで解析した。移動性樹状細胞を langerin、CD103、CD11b の表現に基づいて 4 つのサブセットに分類したところ、20 週時点の *kCYC*^{+/-}マウスでは全ての樹状細胞のサブセット、すなわちランゲルハンス細胞 (langerin⁺CD103⁻)、CD103⁺ 真皮樹状細胞 (langerin⁺CD103⁺)、CD11b^{hi} 真皮樹状細胞 (langerin⁻CD11b^{hi})、CD11b^{low} 真皮樹状細胞 (langerin⁻CD11b^{low})において有意な低下を示した。それに加え、ランゲルハンス細胞の割合が *kCYC*^{+/-}マウスで有意に減少していた。*kCYC*^{+/-}マウスのランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の遊走が障害されていたことから、抗原提示障害が TPA に対する感受性の増強に寄与すると考えられた。

リンパ灌流障害下の腫瘍増殖における炎症性サイトカインを評価するため、初回の TPA 塗布 48 時間後における *kCYC*^{+/-}マウスと WT マウスの背部皮膚の炎症性サイトカインの mRNA 発現量を解析した。IL-17A、IL-22、IL-23p40、IL-23p19、IL-1β、IL-6、IL-10 の各炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、WT マウスと比較し *kCYC*^{+/-}マウスで同程度であったが、ウェスタンブロット解析による IL-17A、IL-22、IL-23、IL-6 の各炎症性サイトカインのタンパク発現は、*kCYC*^{+/-}

マウスで有意に亢進していた。貯留したサイトカインの機能を確認するため、それらのサイトカイン下のシグナル伝達経路を免疫組織染色で検討した。IL-22、IL-23、IL-6 によって誘導されるリン酸化 signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 は、初回の TPA 塗布 48 時間後の *kCYC*^{+/-}マウスの表皮角化細胞で有意に増加していた。さらに、IL-17 によって活性化される nuclear translocation of nuclear factor kappa B (NF-κB) p65 についても、表皮角化細胞の核の陽性数が初回の TPA 塗布 48 時間後に *kCYC*^{+/-}マウスで有意に増加していた。以上より、リンパ管機能不全は Th17 サイトカインや IL-6 の生成には影響を与えないが、TPA 塗布直後から炎症性サイトカインの蓄積と下流シグナル伝達の増強が生じており、これが DMBA/TPA 二段階皮膚発癌モデルの腫瘍増殖に寄与するものと考えられた。

リンパ浮腫によって生じる線維性硬化は、アトピー性皮膚炎、扁平苔癬、乾癬を含む炎症性皮膚疾患と関係している。これまでに乳房切除後のリンパ浮腫と同側に生じた乾癬の症例があり、これはリンパ灌流障害に起因したものと推察される、一般的に、リンパ浮腫の影響を受けやすい下肢病変は、乾癬患者において治療抵抗性であり、疣贅状外観を呈した下肢の乾癬例も報告されている。本研究の後半部分では、マウスの乾癬モデルとして広く使われているイミキモド誘発皮膚炎におけるリンパ管機能不全の影響について検討した。紅斑、浸潤、鱗屑の総和として定義される皮膚スコアは、イミキモド外用 3 日後から 6 日後に WT マウスと比較し *kCYC*^{+/-}マウスで有意に上昇していた。耳の厚さの変化も、*kCYC*^{+/-}マウスでイミキモド外用 4 日後から 6 日後に有意に増強した。組織学的解析によりイミキモド外用 3 日後と 6 日後に表皮が肥厚していることが確認された。炎症細胞浸潤について解析するため、イミキモド外用 6 日後に背部皮膚を採取し免疫染色を行なった。*kCYC*^{+/-}マウスで CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、マクロファージの数が有意に増加した。同様に、*kCYC*^{+/-}マウスの真皮と表皮の両方で major histocompatibility complex (MHC) class II⁺ 細胞数が増加した。以上の様に、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎は *kCYC*^{+/-}マウスにおいて増悪した。

二段階皮膚発癌モデルにおける検討と同様に、イミキモド外用 3 日後の interferon (IFN)-γ、

tumor necrosis factor (TNF)- α 、IL-17A、IL-22、IL-23p40、IL-23p19 の各炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、*kCYC*^{+/-}マウスと WT マウスで同程度であった。一方で、ウエスタンブロット解析による前述の各炎症性サイトカインのタンパク発現量は、WT マウスと比較し *kCYC*^{+/-}マウスで有意に増加していた。加えて、リン酸化した STAT3 と NF- κ B p65 の核転座も *kCYC*^{+/-}マウスで有意に増加していた。本研究で、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎が *kCYC*^{+/-}マウスで増悪し、その際 IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-22、IL-23 が皮膚に貯留することを示したが、これら全てのサイトカインが乾癬の発生に重要な役割を果たし、さらに下流経路を活性化させることが知られている。以上の結果より、リンパ灌流障害による炎症性サイトカインの蓄積が、*kCYC*^{+/-}マウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の増悪させることがわかった。

以上まとめると、二段階発癌モデルで *kCYC*^{+/-}マウスは同腹の WT マウスと比べて腫瘍体積と悪性度が増していた。TPA 塗布後の *kCYC*^{+/-}マウス皮膚において、炎症性サイトカインは mRNA レベルで差がなかったが、タンパクの発現が上昇した。さらに、リン酸化 STAT-3 と NF- κ B p65 の発現が *kCYC*^{+/-}マウスの表皮角化細胞で上昇した。同様に、イミキモド塗布後の *kCYC*^{+/-}マウスでも炎症性サイトカインが皮膚に貯留し、表皮角化細胞におけるリン酸化 STAT3 と NF- κ B p65 の発現が増加したため、皮膚炎症が増悪した。よって、*kCYC*^{+/-}マウスにおけるリンパ灌流障害が炎症性サイトカインの蓄積を生じさせ、二段階皮膚発癌とイミキモド誘発性乾癬様皮膚炎の増悪をもたらすことが明らかになった。これらの結果は、二次発癌や四肢リンパ浮腫に関連した炎症性皮膚疾患の臨床上の問題を解く手掛かりとなることが期待される。