

論文の内容の要旨

論文題目 Critical roles of mast cells and their Stat5 activity in allergic skin inflammation

(マスト細胞とその Stat5 活性のアレルギー性皮膚炎症における重要性)

氏名 安藤 智暁

アトピー性皮膚炎は、慢性もしくは慢性に繰り返す炎症性皮膚疾患であり、その発症には免疫調節の異常と皮膚バリア機能の障害の両者が関わっていると考えられている。患者の多くはアトピー素因を持つことが知られており、これまでのゲノムワイド関連解析の結果、表皮のバリア機能や、自然免疫、獲得免疫、神経系に関わる遺伝子群が関連遺伝子として報告されている。

マスト細胞は皮膚や気道、腸管など主に外界に面する組織に存在する骨髄由来の免疫細胞である。細胞表面に高親和性 IgE 受容体である $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を発現しており、これに結合した IgE が抗原を認識すると、ヒスタミンやロイコトリエン C4 などの脂質メディエーター、 $\text{T}_\text{H}2$ サイトカインなどを放出することから、アレルギー性炎症に関わる最も重要な細胞種の一つであると考えられている。実際に、抗アレルギー薬の標的の多くはマスト細胞に関連する分子である。しかし一方で、マスト細胞を欠損したヒト症例の報告はなく、マスト細胞やマスト細胞に発現する分子の役割を機能的に調べるには、マスト細胞欠損マウスや、マスト細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスなどを用いた動物モデルが不可欠である。

アトピー性皮膚炎のマウスモデルとしては、皮膚炎を自然発症する自然発生的なマウスの系統や、遺伝子改変によって自然発症するようになったもの、あるいは、抗原や化学物質の投与により皮膚炎を発症するようになったものがある。川上らは以前、マウスの皮膚にダニ抗原(Der f)と黄色ブドウ球菌由来毒素(Staphylococcal enterotoxin B, SEB)を反復塗布することにより誘導するアトピー性皮膚炎モデルを確立した。本モデルにおいては、マスト細胞と T 細胞が重要な役割を果たしており、 $\text{T}_\text{H}2$ 炎症に

関わる Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)受容体や、Fc ϵ RI がその重症度に関わっていた。また、網羅的遺伝子発現解析によりヒトのアトピー性皮膚炎との有意な類似性が認められ、高い疾患関連性を持つモデルである。

ところで、ホスホリパーゼ C (PLC)はホスファチジルイノシトール 4,5-ビスホスフェイトを加水分解し、ジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸を生じる酵素群である。このうち PLC- β 3 はその酵素活性とは独立に、Stat5 (Signal transducer and activator of transcription 5)と SHP-1 (SH2 domain-containing protein phosphatase 1)と複合体を形成することにより骨髄幹細胞や骨髄球系の白血球の増殖を抑制している。この SHP-1-PLC- β 3-Stat5 (SPS)複合体は SHP-1 が Stat5 を脱リン酸化する作用を増幅し、Stat5 の過剰な活性化を抑制する働きを担っている。マスト細胞の増殖に関わるサイトカインの一つである IL-3 や、T_H2 炎症に関わる TSLP、あるいは顆粒球単球コロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)は、その受容体のシグナル経路に Stat5 を用いていることから、PLC- β 3 を欠損したマウスにおいては、マスト細胞の増殖やアレルギー性炎症が増幅される可能性が考えられる。

そこで私は、PLC- β 3 欠損マウスを長期間飼育し、その表現型を観察した。10週齢程度の若いマウスには異常を認めなかったが、老齢のマウスにおいては眼周囲、頬部、耳介、後頸部、体幹などに脱毛や湿疹様病変を発症した。組織学的には、角化亢進と表皮、真皮の肥厚が認められ、T 細胞、マスト細胞、マクロファージ、好酸球などが増加していた。血清学的には、IgE、IgG₁ の増加が認められた。病変部の経表皮水分喪失は皮膚炎発症後に増加しており、皮膚のバリア異常は皮膚炎発症に先行していなかった。また、PLC- β 3 欠損マウスを、マスト細胞を欠損した Kit^{W-sh/W-sh} マウスや、 α β T 細胞を欠損した TCR $\beta^{-/-}$ マウス、B 細胞を欠損した μ MT/ μ MT マウスと掛け合わせたところ、マスト細胞を欠損すると自然発症が認められないのに対し、 α β T 細胞、B 細胞の欠損では発症が認められ、マスト細胞が必須であることが示唆された。

さらに、Der f/SEB 誘導性皮膚炎を PLC- β 3 欠損マウスに惹起したところ、野生型マウスに比べて

皮膚炎の増悪が認められた。マスト細胞欠損 $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ との掛け合わせでは皮膚炎スコアの低下が認められ、骨髓由来培養マスト細胞を移植した $\text{PLC-}\beta 3^{-/-}; \text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ マウスではスコアが回復したことから、マスト細胞が $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マウスの自然発症のみならず抗原誘導性のアトピー性皮膚炎モデルにも関わっていることが示された。

そこで、 $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マスト細胞の特性を調べるため、 $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マウスから骨髓由来マスト細胞を培養した。IL-3 による増殖は野生型に比べ著明に増加しており、IL-3 に対する走化性も増加していた。マスト細胞上の IL-3 受容体の発現には差が認められなかったが、IL-3 で刺激した $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マスト細胞では、Stat5 のリン酸化が亢進していたことから、IL-3 に対する反応性の増加が $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マウスにおけるマスト細胞の増加に関わっているものと考えられた。この原因が、SPS 複合体の欠損によるものであるのかを調べるため、ドミナントネガティブ変異型 Stat5、あるいは野生型 SHP-1 をマスト細胞の前駆細胞である MCP (mast cell progenitor) にレトロウイルスにより強制発現したところ、ドミナントネガティブ変異型 Stat5、SHP-1 いずれも $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損 MCP の増殖を野生型とほぼ同等に抑制した。また、SHP-1 を導入することにより、Stat5 のリン酸化レベルも低下した。これらの結果から、IL-3 など Stat5 を活性化する因子が SPS 複合体の欠損を介して $\text{PLC-}\beta 3$ 欠損マスト細胞の増殖や走化性を亢進し、皮膚炎症の自然発症や増悪につながっている可能性が考えられる。

そこで、マスト細胞の Stat5 や SHP-1 の活性がアトピー性皮膚炎の発症に関わるのかどうかを、より直接的に検証するため、マスト細胞特異的に Stat5 あるいは SHP-1 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、Der f/SEB 誘導性皮膚炎の重症度を調べた。すると、マスト細胞で Stat5 を欠損させると皮膚炎スコアは減少し、SHP-1 を欠損させると増加した。また、Stat5 を活性化する Jak2 の阻害剤 TG101348 を塗布したところ、皮膚炎が著明に抑制された。これらの結果から、マスト細胞の Stat5 活性が、抗原誘導性皮膚炎に重要な働きをしていることが明らかになった。

次に、アトピー性皮膚炎に関わるとされる他の因子の関与について検討した。TSLP はアトピー性皮膚炎患者のケラチノサイトで発現が著増していることが知られており、ケラチノサイトで TSLP を過剰発

現したマウスではアトピー性皮膚炎様の皮膚炎が自然発症する。TSLP 受容体は Stat5 を活性化することから、PLC- β 3 欠損マウスの自然発症皮膚炎、抗原誘導性皮膚炎における TSLP の関与について検討した。TSLP の発現量はこれらの皮膚炎で増加しており、自然発症皮膚炎は TSLP 受容体欠損マウスと掛け合わせると発症しなくなった。また、抗原誘導性皮膚炎もスコアが低下した。従って、TSLP とその受容体が両者において重要な役割を果たしていることが示唆される。

また、ペリオスチンは、アトピー性皮膚炎患者の重症度と関連し、Der f で誘導される皮膚炎モデルに重要であることが最近報告された分子である。T_H2 サイトカインの刺激により線維芽細胞から分泌され、ケラチノサイトからの TSLP 分泌を促すことから、T_H2 サイトカイン (T_H2 細胞)-ペリオスチン (線維芽細胞)-TSLP 等 (ケラチノサイト) からなる悪循環があるのではないかと指摘されていた。ペリオスチンは、PLC- β 3 欠損マウスの自然発症皮膚炎や Der f/SEB 誘導性皮膚炎においても発現の増加が認められた。面白いことに、マスト細胞が欠損したマウスで皮膚炎を誘導すると、野生型に比べペリオスチンの産生が低下した。線維芽細胞と、IgE と抗原で刺激したマスト細胞を共培養すると、線維芽細胞からのペリオスチン産生が増加した。また、IL-13 刺激時のペリオスチン産生を調べると、PLC- β 3 欠損マウス由来の線維芽細胞では野生型に比べて増加していた。さらに、PLC- β 3 を欠損したケラチノサイトでは、TSLP の発現が増加していた。これらの結果は、マスト細胞を前述の悪循環の経路に加えるばかりでなく、PLC- β 3 が悪循環経路の複数の要素を制御する可能性を示唆している。

さらに、ヒトのアトピー性皮膚炎における PLC- β 3、STAT5、SHP-1 の一塩基多型を調べたところ、いくつかの一塩基多型とアトピー性皮膚炎、ヘルペス性湿疹、IgE 値に関連が認められた。また、アトピー性皮膚炎患者の罹患部位ではマスト細胞が増加していたが、その核内のリン酸化 STAT5 シグナルが一部の患者では増加しており、PLC- β 3 の発現量と逆相関を示した。これらの結果は、少なくとも一部の患者において、SPS 複合体の調節異常が STAT5 の活性化を来し、アトピー性皮膚炎の病態に関わっている可能性を示唆している。このような患者では、JAK-STAT 系を標的とした薬剤が新規治療薬となる可能性がある。