

博士論文

皮膚 T 細胞リンパ腫における TSLP の役割

高橋 菜穂美

# 皮膚 T 細胞リンパ腫における TSLP の役割

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

外科学専攻

指導教員 佐藤伸一 教授

高橋 菜穂美

## 目次

1)	要旨.....	4
2)	序文.....	5
3)	研究方法 .....	9
1)	ヒト皮膚組織	
2)	ヒト血清	
3)	細胞株	
4)	細胞培養	
5)	RNA 抽出	
6)	定量 PCR	
7)	組織切片と免疫染色	
8)	ELISA	
9)	細胞表面 TSLP 受容体の発現解析	
10)	タンパク抽出と免疫ブロット法	
11)	細胞カウント	
12)	Intracellular flow cytometric analysis	
13)	抗 TSLP 抗体による抗腫瘍効果の検討	
14)	統計解析	
4)	結果.....	18
1)	皮膚組織 mRNA における TSLP、ペリオスチンの発現	
2)	Th2 型サイトカインによるペリオスチンの誘導	
3)	血清ペリオスチンの解析	

4) 腫瘍細胞表面の TSLP 受容体発現の解析	
5) TSLP による腫瘍細胞からの Th2 型サイトカインの誘導	
6) TSLP による腫瘍細胞増殖の検討	
5) 考察.....	27
6) 結論.....	37
7) 謝辞.....	39
8) 文献.....	40
9) 図表.....	50

## 1. 要旨

皮膚悪性リンパ腫 (CTCL) はアトピー性皮膚炎と血液学的、免疫学的側面から多くの類似点が報告されている。Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) はアトピー性皮膚炎において T helper (Th) 2 型の免疫応答を誘導する働きをもつ。CTCL 患者では皮膚に TSLP が高発現し、TSLP を誘導するペリオスチンは患者皮膚および血清中で高いレベルで発現し、病勢と相関していた。さらに CTCL 患者の腫瘍細胞表面に TSLP 受容体が発現し、TSLP の直接的な作用によって腫瘍細胞が増加した。よって CTCL の病態では TSLP が直接的・間接的に腫瘍形成に寄与していると考えた。

## 2. 序文

皮膚 T 細胞リンパ腫 (cutaneous T-cell lymphoma, CTCL) は皮膚に原発する非ホジキンリンパ腫で、菌状息肉症とセザリー症候群に代表される(1)。菌状息肉症は年の単位で皮疹が存在し次第に増悪する。皮膚病変は、明らかな盛り上がりのない、類円形から馬蹄形の皮疹を呈する紅斑期、盛り上がりや浸潤を呈する扁平浸潤期、1cm 以上の結節病変や深部への増殖を呈する腫瘤期と、数年から十年以上をかけて進行していくが、紅斑期や扁平浸潤期のまま進行しない症例も多い。一方、セザリー症候群は末梢血中の腫瘍細胞、紅皮症、表在リンパ節腫脹を主症状とし、急速な進行を呈する症例が多い(2)。皮疹は体表面積の 80%以上を皮疹が占める、紅皮症を呈する。菌状息肉症とセザリー症候群は、腫瘍細胞の形質が類似していること、菌状息肉症の経過中に紅皮症をきたし、セザリー症候群に進展する症例があることから、同一の疾患群と考えられている。

アレルギー疾患や悪性腫瘍の発生の背景として T helper (Th) 1/Th2 バランスという観点がある。T 細胞は CD4 陽性の Th 細胞と CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, Tc) とに大別される。Th 細胞は表面に CD4 を持ち、これを介して MHC class II と接着する性質があるため、MHC class II をもつ抗原提示細胞や B 細胞と反応する。その際に Th 細胞は周囲環境に存在するサイトカインの種類によ

って、Th1 か Th2 のどちらかに分化する。Th1 は interleukin (IL)-2 や interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) などのサイトカインを分泌して組織球などを活性化させ、さまざまな炎症反応を惹起することで細胞性免疫を誘導する。一方、Th2 は IL-4 や IL-5などを分泌し、B 細胞を活性化して抗体を産生させ、液性免疫を誘導する。Th1 と Th2 は互いに抑制するサイトカインを放出しており、一種の均衡状態を保っているとされるが、このバランスの不均衡がアレルギー疾患や悪性腫瘍の発生に関与する可能性が示唆されている。

多くの CTCL 患者では、IL-4 や IL-13 の上昇を認め、Th2 型の免疫応答が優位であることが示唆されている(3,4)。Th1 型サイトカインの IFN- $\gamma$ は抗腫瘍免疫反応を示し、現在、CTCL の治療薬として臨床応用されている。よって、CTCL の局所における Th2 型優位の微小環境は腫瘍細胞にとって有利であると考えられる。

Th2 型優位の皮膚疾患としてはアトピー性皮膚炎が挙げられる。アレルギー疾患の一つであるアトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする。ほとんどの患者がアトピー素因と呼ばれる、家族歴・既往歴 (気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患)、または IgE 抗体を産生しやすい素因を有し、幼少期から青年期までの発症が多く、高齢者での発症は少ない(5)。発症機序は、先天的な皮膚のバリア機能の低

下、IgE を産生しやすい体質に加え、後天的な刺激因子が作用して慢性的な湿疹病変を形成する。

CTCL とアトピー性皮膚炎は悪性腫瘍とアレルギー疾患という異なる疾患群でありながらも、いくつかの類似性が指摘されている。臨床的側面では両疾患とも紅皮症を呈する例があり、また、初期の CTCL の紅斑はアトピー性皮膚炎の湿疹と鑑別が困難な例がある。免疫学的側面では両疾患とも Th2 型優位の免疫応答を呈すること、IgE や好酸球の上昇がみられること、chemokine (C-C motif) ligand 17 (CCL17) の上昇など、ケモカインの類似性が挙げられる。

近年、アトピー性皮膚炎の病態形成に重要な役割を持つサイトカインとして Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が注目されている。TSLP は Th2 型の免疫応答を誘導するサイトカインの一種で、皮膚ではケラチノサイトより産生される。Th2 型優位となる複数のアレルギー性疾患において、TSLP が病態形成に関与している可能性が示唆されているが、近年、アトピー性皮膚炎患者の病変皮膚において、TSLP が高発現していることが報告された(6)。その後、TSLP とアトピー性皮膚炎の病勢マーカーが強い正の相関を示すことが明らかとなり、TSLP がアトピー性皮膚炎の増悪に重要な役割をもつことが推測されている。



ペリオスチンは Th2 型サイトカインの誘導により線維芽細胞細胞から産生される細胞外マトリックスタンパクの一種である(7)。ペリオスチンは細胞外マトリックスとしての機能のみならず、ケラチノサイトの増殖を促進すること、直接的に TSLP の産生を誘導することが報告されている(8)。更に、ペリオスチンがアトピー性皮膚炎患者の病変皮膚で高発現し、重症度と有意に相関することが報告され(9)、アトピー性皮膚炎ではペリオスチンが TSLP の産生を誘導し、TSLP が樹状細胞などの免疫担当細胞を介して Th2 型の免疫応答を誘導し、炎症の慢性化・遷延化に寄与している可能性が示唆されている(7)。

近年、この TSLP が菌状息肉症患者の病変皮膚や CTCL 患者血清において高発現することが報告され、腫瘍細胞の皮膚への浸潤に TSLP が関与している可能性が示唆されている(10,11)。これらの背景を受けて、申請者は、アトピー性皮膚炎と同様に、CTCL の局所における Th2 型優位の微小環境の形成に、TSLP やペリオスチンが何等かの関与をしている可能性がある」と推測した。以上より、本研究では CTCL の病態における TSLP とペリオスチンの役割について検討した。

### 3. 研究方法

#### 1) ヒト皮膚組織

皮膚組織は東京大学医学部附属病院皮膚科を受診した皮膚 T 細胞リンパ腫患者 25 名の病変部より採取した。皮膚 T 細胞リンパ腫患者 25 名は ISCL/EORTC 分類(12)に基づき、紅斑期 10 名、扁平浸潤期 8 名、腫瘤期 3 名、紅皮症・セザリー症候群 4 名に分類された。TNM 分類では IA 期 8 名、IB 期 5 名、IIB 期 7 名、IVA 期 5 名であった。対照群として 6 名の日本人健常人より皮膚組織を採取した。皮膚組織採取にあたっては、ヘルシンキ宣言に基づき、患者に説明、同意、署名を得て行った。すべての実験プロトコールは東京大学の倫理委員会の承認を得た。

#### 2) ヒト血清

ヒト血清は東京大学医学部附属病院皮膚科を受診した皮膚 T 細胞リンパ腫患者 47 名より取得した。皮膚 T 細胞リンパ腫患者 47 名は ISCL/EORTC 分類に基づき、紅斑期 14 名、扁平浸潤期 11 名、腫瘤期 10 名、紅皮症・セザリー症候群 12 名に分類された。TNM 分類では IA 期 14 名、IB 期 11 名、IIB 期 9 名、III 期 2 名、IVA 期 11 名であった。そのほか 16 名のアトピー性皮膚炎患者、および対照群として 16 名の健常人より取得した。全ての血清は採取後-80℃で保存した。ヒト末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cell: PBMC) はセザリー症候群患者 3 名より取得した。

セザリ－症候群患者 3 名の PBMC 中の腫瘍細胞の割合は 74～78%であった。採取した血液を Ficoll-Paque (GE Healthcare, Waukesha, WI) を用いて比重遠心で単核細胞を分離し、10% fetal bovine serum (FBS) を添加した RPMI 1640 (Millipore, Billerica, MA) で培養した。PBMC は human recombinant TSLP (R&D Systems, Minneapolis, MN) で刺激し 24 時間培養した後、全 RNA 抽出を行った。全 RNA 抽出には TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。血清・PBMC 採取にあたってはヘルシンキ宣言に基づき、患者に説明、同意、署名を得て行った。すべての実験プロトコールは東京大学の倫理委員会の承認を得た。

### 3) 細胞株

Hut78 細胞株 (ヒトセザリ－症候群細胞株)、MJ 細胞株 (ヒト菌状息肉症細胞株)、HH 細胞株 (進行性ヒト T 細胞リンパ腫細胞株) はいずれも岡山大学皮膚科藤井和康先生よりご提供いただいた。細胞株はいずれも BEX 社 (Tokyo, Japan) の Short Tandem Repeat (STR) 解析を用いた細胞認証検査で遺伝子照合を得た。EL-4 細胞株 (マウスリンパ腫細胞株) と B16 細胞株 (マウス悪性黒色腫細胞株) はいずれもウイスコンシン医科大学の Dr. Sam T. Hwang よりご提供いただいた。MBL-2 細胞株 (マウス T リンパ腫細胞株) は東京大学免疫治療学の垣見和宏先生よりご提供いただいた。ヒト細胞株および MBL-2 細胞株はいずれも 10% FBS を添加した RPMI 1640 で

培養した。EL-4、B16 細胞株は 10% FBS を添加した Eagle's minimum essential medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) で培養した。

#### 4) 細胞培養

CTCL 患者 6 名の皮膚組織より線維芽細胞を分離培養した。対照群として健常者 5 名の皮膚組織より線維芽細胞を分離培養した。

#### 5) RNA 抽出

皮膚組織より分離した線維芽細胞を 75 cm<sup>2</sup> の細胞培養フラスコにコンフルエントになるまで培養した後、recombinant IL-4 (10 µg/mL、R&D systems) と recombinant IL-13 (10 µg/mL、R&D systems) で刺激し 24 時間後に RNA 抽出を行った。RNA 抽出には TRIZOL Reagen (Invitrogen) を使用した。

#### 6) 定量 polymerase chain reaction (PCR)

抽出した RNA は iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories、Berkeley、CA) を用いて逆転写を行い cDNA にした。プライマーは以下の配列ものをデザインした。

TSLP

forward, 5'- CCCAGGCTATTCGGAAACTCA-3',

reverse, 5'- ACGCCACAATCCTTGTAATTGTG-3',

ペリオスチン

forward, 5'-GAACCAAAAATTAAGTGATTGAAGG-3',

reverse, 5'-TGACTTTTGTAGTGTGGGTCCT-3',

IL-4

forward, 5'-CACAGGCACAAGCAGCTGAT-3',

reverse, 5'-CTCTGGTTGGCTTCCTTCACA-3',

IL-13

forward, 5'-CGAGAAGACCCAGAGGATGCT-3',

reverse, 5'-GGGCCACCTCGATTTTGG-3',

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

forward, 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3',

reverse, 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'。合成した cDNA に SYBR Green

PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を加え、定量 PCR は過去の報

告に従って、以下の条件で Step One Plus real-time PCR System (Applied Biosystems) を

用いて行った(13)。95°C20 秒間を 1 サイクル、95°C3 秒間の後に 60°C30 秒間という

サイクルを 40 サイクル行い、GAPDH を用いて mRNA を標準化した。GAPDH PCR

産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を  $\Delta\Delta Ct$  method にて算出し

た。つまり、fold induction は  $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$  と定義され、ここで Ct は threshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。計算は次の式に基づいて行った。Ct = [ターゲットとなる遺伝子の Ct (発現量不明のサンプル) - GAPDH の Ct (発現量不明のサンプル)] - [ターゲットとなる遺伝子の Ct (キャリブレーションのサンプル) - GAPDH の Ct (キャリブレーションサンプル)]。

## 7) 組織切片と免疫染色

東京大学医学部附属病院皮膚科を受診した皮膚 T 細胞リンパ腫患者 14 名より皮膚組織を取得した。皮膚 T 細胞リンパ腫患者 14 名は ISCL/EORTC 分類に基づき、紅斑期 4 名、扁平浸潤期 4 名、腫瘍期 2 名、紅皮症・セザリー症候群 4 名に分類された。TNM 分類では IA 期 5 名、IB 期 2 名、IIB 期 2 名、IVA 期 4 名、IVB 期 1 名であった。対照群として健常者 8 名より皮膚組織を取得した。採取した皮膚組織は 10%ホルマリンで固定しパラフィン包埋した。パラフィン切片は脱パラフィン処理を行った後、マイクロウェーブ法にて賦活処理を行った。ブロッキングを行った後、一次抗体として抗 TSLP 抗体 (Abcam, Cambridge, MA)、抗ペリオスチン抗体 (Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA) を使用し、4°Cで一晩、反応させた。次いで、ビオチン標識二次抗体と室温で 20 分間反応させた後、VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いてアビディン-ビオチン複合体と 1 時間反

応させた。DAB で発色させた後、マイヤー・ヘマトキシリンで染色した。

また、凍結組織から 6  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作り、抗 TSLP 受容体抗体に対する染色を行った。切片をアセトン固定し、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。ブロッキングを行った後、一次抗体として抗 TSLP 受容体抗体 (Abcam) を使用し、4°C で一晩、反応させた。パラフィン切片と同様に、VECTASTAIN ABC Kit を用いて免疫組織学的検討を行った。

#### 8) Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)

ヒト血清中のペリオスチン、IL-4、IL-13 の発現を ELISA kit を使用して測定した。ELISA kit は human periostin ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA)、human IL-4 ELISA kit (R&D Systems)、human IL-13 ELISA kit (R&D Systems) を使用した。これらはいずれもサンドイッチ酵素免疫反応法の手順に基づき行った。

#### 9) 細胞表面 TSLP 受容体の発現解析

健康者 2 名、セザリール症候群患者 3 名より取得した PBMC および Hut78、MJ、HH 細胞株を 10% FBS を添加した RPMI 1640 中に  $1 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度で浮遊させた。Alexa Fluor 488 標識抗 TSLP 受容体抗体 (R&D systems) または Alexa Fluor 488 標識 IgG1 抗体 (R&D systems) を用いて染色し、TSLP 受容体の発現を BD FACScan flow cytometer および Cell-Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA) にて解析した。

## 10) タンパク抽出と免疫ブロット法

Hut78 細胞株と HH 細胞株を 12 ウェルプレートに培養し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 100 ng/mL; Sigma-Aldrich) および ionomycin (1  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) で前処理を行った後、recombinant TSLP (10 ng/mL; R&D systems) で 10 分間または 30 分間刺激した。細胞から抽出液を精製した後、BCA protein assay kit (Thermo) プロトコールに従ってタンパク定量を行った。総蛋白量を一定にした細胞溶解液を sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; Invitrogen) で電気泳動を行った。泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、スキムミルクにてブロッキング後、4°Cで一晩、一次抗体を反応させた。一次抗体には signal transducer and activator of transcription (STAT) 5, phosphorylated STAT5, STAT3, phosphorylated STAT3, MAPK, phosphorylated MAPK, Akt, phosphorylated Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を使用した。Tris-buffered saline (TBS) に 0.1%Tween20 を加え、洗浄後、室温で 1 時間、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体を反応させ、再度洗浄した。得られたバンドは Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL) で検出した。

## 11) 細胞カウント



Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞をそれぞれ 6 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  /ml を 1 ウェルあたり 1ml で分注した。recombinant TSLP 50 ng/ml で刺激し、24 時間反応させた。対照群は TSLP 無刺激群とした。24 時間後に回収した細胞をトリパンブルーで染色し生存細胞数をカウントした。次に、STAT5 inhibitor による細胞増殖への影響を検討した。Hut78 細胞、MJ 細胞をそれぞれ 6 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  /ml を 1 ウェルあたり 1ml で分注した。STAT5 inhibitor (100  $\mu$ M; Calbiochem, Darmstadt, Germany) で前処理をした群と、未処理の対照群をそれぞれ recombinant TSLP 50 ng/ml で刺激し、24 時間反応させた。回収した細胞をトリパンブルーで染色し生存細胞数をカウントした。

## 12) Intracellular flow cytometric analysis

Hut78 細胞株 ( $1 \times 10^5$ /200  $\mu$ L) を recombinant TSLP 50 ng/mL で 24 時間刺激した後、SYTOX Red Dead Cell Stain (Invitrogen) を用いて染色した。次に BD Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) を用いて細胞内染色を行った。一次抗体、二次抗体はそれぞれ anti-phosphorylated STAT5 monoclonal antibody (BD Biosciences), Alexa Fluor 488–conjugated secondary antibody (Invitrogen) を使用した。

## 13) 抗 TSLP 抗体による抗腫瘍効果の検討

EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L of PBS) を剃毛した C57BL/6 マウスの左腹部に皮下注射した。第 0、4、7、11 日目に 200  $\mu$ L の PBS に溶解したマウス抗 TSLP 抗体 (10  $\mu$ g/mL; MAB5551, R&D systems) を腹腔内に注射した。対照群には 200  $\mu$ L の PBS に溶解した isotype IgG (R&D systems) を腹腔内に注射した。第 4、7、11、14 日目に腫瘍の体積を次の計算式を用いて算出した。 $V = \pi (L1 \times L2^2)/6$ , where  $V =$  volume ( $\text{mm}^3$ ),  $L1 =$  longest diameter (mm), and  $L2 =$  shortest diameter (mm)。

#### 14) 統計解析

データは Mann-Whitney の U 検定および Student の t 検定を用いて 2 群間を比較した。3 群間以上の平均の比較には、Dunnet 検定、Tukey-kramer 検定を使用した。相関は Spearman 検定を使用した。 $P < 0.05$  を統計学的な有意差と判断した。

## 4. 結果

### 1) 皮膚組織における TSLP、ペリオスチンの mRNA 発現

TSLP が様々な腫瘍で高発現しているという報告を受けて(14-16)、申請者はまず CTCL 患者および健常者の皮膚組織より抽出した mRNA を用いて TSLP、ペリオスチン、Th2 型サイトカイン、IL-22 の発現を検討した。IL-22 は Th22 細胞から産生され、慢性期アトピー性皮膚炎の患者皮膚や血清中で上昇することが報告されており(17)、Th2 型サイトカインと同様にアトピー性皮膚炎の病態形成に関与すると推測されている。TSLP、ペリオスチン、IL-22 の mRNA 発現はいずれも健常皮膚と比較し、CTCL 病変皮膚で有意に高かった (図 1-A)。IL-4 は健常皮膚と比較し、CTCL 病変組織で高い傾向を示したが有意差はみられなかった。次に TSLP、ペリオスチンと IL-4、IL-22 の相関について検討した。TSLP はペリオスチン、IL-4、IL-22 と正の相関をみとめ、ペリオスチンは IL-4 と正の相関をみとめた (図 1-B)。Th2 型サイトカインの一つである IL-4 は CTCL 病変皮膚、とりわけ菌状息肉症腫瘍期の病変皮膚で高い発現がみられることが報告されている(3)。申請者らも過去に進行期の CTCL 病変皮膚で IL-4、IL-22 が高い発現を示すことを報告した(18,19)。以上のことから、TSLP とペリオスチンが CTCL の増悪に関与している可能性が示唆された。

### 2) Th2 型サイトカインによるペリオスチンの誘導

次に免疫組織染色法を用いて、CTCL 病変皮膚および健常皮膚のペリオスチン、TSLP の発現を検討した。ペリオスチンは健常皮膚と比較し、CTCL 病変皮膚の表皮真皮境界部で発現をみとめた (図 2-A、上段左：健常者、上段中央：CTCL 表皮-真皮、上段右：CTCL 強拡大像)。さらに CTCL 病変皮膚の真皮内の線維芽細胞も一部染色されていた (図 2-A、上段右図)。アトピー性皮膚炎の皮膚組織を用いた過去の報告においても、ペリオスチンは表皮基底膜部を中心に強い発現をみとめ、申請者の結果とおおむね一致していた(9)。一方、TSLP は健常皮膚と比較し、CTCL 病変皮膚の表皮で強く染色された (図 2-A、下段左：健常者、下段右：CTCL)。このように CTCL 病変皮膚では TSLP とペリオスチンが高発現し、その分布はアトピー性皮膚炎と類似していた。

次に皮膚線維芽細胞からのペリオスチンの産生について検討した。皮膚ではペリオスチンは主に線維芽細胞から産生されることがわかっている(9)。肺の線維芽細胞では IL-4、IL-13 の刺激によってペリオスチンの産生が誘導されたとの報告を受けて(20)、申請者は CTCL 病変皮膚および健常皮膚より培養した線維芽細胞を IL-4 または IL-13 で刺激した後、細胞より抽出した mRNA と培養上清を用いて、ペリオスチンの産生を比較検討した。まず IL-4 または IL-13 刺激後のペリオスチン mRNA の発現について、CTCL 病変皮膚線維芽細胞と健常皮膚線維芽細胞で比較すると、IL-4

刺激後、IL-13 刺激後のいずれも前者で有意に高かった (図 3-A)。CTCL 病変皮膚線維芽細胞について、IL-4 または IL-13 刺激後と無刺激との間でペリオスチン mRNA の発現を比較すると、IL-4、IL-13 刺激後で有意に高かった。次に IL-4 または IL-13 で刺激した線維芽培養上清中のペリオスチンタンパク量を比較すると、mRNA の結果と一致して、CTCL 病変皮膚由来線維芽細胞培養上清中で有意に上昇していた (図 3-B)。以上の結果より、CTCL 病変皮膚ではアトピー性皮膚炎と同様に、Th2 型サイトカインによって線維芽細胞からのペリオスチン産生が誘導されている可能性が示唆された。

### 3) 血清ペリオスチンの解析

アトピー性皮膚炎患者血清ではペリオスチンが上昇しており、病勢と正の相関を示すとの報告を受けて(9)、申請者は CTCL 患者血清におけるペリオスチン濃度を解析した。CTCL 患者血清のペリオスチン値は  $1404.6 \pm 1770.1$  ng/mL、アトピー性皮膚炎患者血清では  $474.5 \pm 34.9$  ng/mL であり、CTCL 患者血清のペリオスチン値は、健常者の血清ペリオスチン値  $313.9 \pm 156.8$  ng/mL と比べて、有意に上昇していた (図 4-A)。CTCL 皮膚病変別に比較すると、紅斑期、扁平浸潤期は健常者と比較し高い傾向があり、腫瘍期、紅皮症は有意に上昇していた(図 4-B)。CTCL 病期別の比較では、II-III期、IV期で有意に上昇していた (図 4-C)。次に CTCL の各種病勢マーカー

とペリオスチンの相関について検討した。血清ペリオスチンは lactate dehydrogenase (LDH)、および CTCL の新たな病勢マーカーとして報告されている CCL17(21,22)と正の相関がみられた (図 4-D)。以上の結果より、CTCL 患者血清ではペリオスチンが上昇しており、病勢とともに増加していることが示唆された。

#### 4) 腫瘍細胞表面の TSLP 受容体発現の解析

TSLP による Th2 型免疫応答の誘導機序として、樹状細胞を介して T 細胞に作用する間接的経路が提唱される一方で、近年、TSLP が T 細胞に直接作用する新たな経路が提唱されている(23)。申請者は TSLP が CTCL 腫瘍細胞に直接作用する可能性について検討するため、CTCL 腫瘍細胞株を用いて、TSLP 受容体の発現について解析した。フローサイトメトリーを用いて、細胞表面の TSLP 受容体の発現を調べたところ、セザリ-症候群の細胞株である Hut78 細胞と菌状息肉症の細胞株である MJ 細胞では発現をみとめる一方、aggressive CTCL 細胞株である HH 細胞では発現が見られなかった (図 5-A)。次に TSLP によるシグナル伝達経路について検討した。TSLP は複数の腫瘍細胞において、STAT5 のリン酸化を誘導することが報告されている(24-26)。申請者は免疫ブロット法にて STAT5、STAT3、MAPK、Akt の TSLP によるリン酸化について検討した。細胞は先の結果で TSLP 受容体の発現をみとめた Hut78 細胞と発現のみられなかった HH 細胞を使用した。Hut78 細胞では TSLP による

STAT5 のリン酸化をみとめ、過去の報告と一致していた (図 5-B)。一方、TSLP 受容体のない HH 細胞株では STAT5 のリン酸化はみられなかった。STAT5 以外のシグナル伝達活性化因子 STAT3、MAPK、Akt については Hut78 細胞、HH 細胞いずれも TSLP によるリン酸化はみられなかった。

#### 5) TSLP による腫瘍細胞からの Th2 型サイトカインの誘導

CTCL 腫瘍細胞が TSLP 受容体を発現し、TSLP 刺激によって STAT5 のリン酸化が誘導された。これらの結果を受けて、次に申請者は TSLP 刺激を受けて CTCL 腫瘍細胞からの Th2 型サイトカインの産生が誘導されるかを検討した。CTCL 細胞株は先の実験で TSLP 受容体の発現を確認した、Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞を使用した。PMA と ionomycin (100 ng/mL, 1 µg/mL)を加えた後、TSLP 0 ng/mL、TSLP 10 ng/mL、50 ng/mL で 24 時間刺激し、mRNA を回収した。Hut78 細胞および MJ 細胞では TSLP の用量依存性に IL-4、IL-13 の mRNA の発現が有意に上昇した (図 6-A)。一方、HH 細胞では TSLP 刺激による IL-4、IL-13 の mRNA の発現の変化はみられなかった。次に、細胞培養上清中の IL-4、IL-13 のタンパク量について解析した。

TSLP 50 ng/mL で 12、24、36 時間刺激し、培養上清を回収した。細胞株は Hut78 細胞、HH 細胞を使用した。Hut78 細胞では TSLP 刺激後 36 時間で IL-4、IL-13 共に TSLP 無刺激群と比較し有意に上昇していた (図 6-B)。一方、HH 細胞では TSLP 刺

激による IL-4、IL-13 の上昇はみられなかった。以上、TSLP 受容体の発現がみられた Hut78 細胞では IL-4、IL-13 の mRNA の発現および培養上清中のタンパク量が TSLP 無刺激群と比較して有意に高く、TSLP 受容体の発現がない HH 細胞では IL-4、IL-13 の mRNA の発現およびタンパク量は無刺激群と差がないという結果であった。次に TSLP が STAT5 のリン酸化を介して IL-4、IL-13 を誘導していることを確認するために STAT5 inhibitor を用いた実験を行った。Hut78 細胞、HH 細胞に STAT5 inhibitor で前処理を行った後、TSLP 50 ng/mL で 36 時間刺激した。培養上清を回収し、STAT5 inhibitor 群、無添加群で IL-4、IL-13 のタンパク量を比較した。その結果、Hut78 細胞の STAT5 inhibitor 群の培養上清では STAT5 inhibitor 無添加群と比較し、IL-4、IL-13 の産生が有意に抑制されていた (図 6-C)。HH 細胞では STAT5 inhibitor による変化はみられなかった。これらの結果から、TSLP 受容体を発現する CTCL 細胞では TSLP 刺激によって STAT5 のリン酸化を介して Th2 型の免疫応答を誘導している可能性が示唆された。

次に、健常者およびセザリ－症候群患者より取得した PBMC を用いて TSLP 受容体の発現について解析した。セザリ－症候群患者 3 名中 2 名では TSLP 受容体の高い発現をみとめ、残りの 1 名ではわずかな発現をみとめた (図 7-A)。一方、健常者では TSLP 受容体の発現はみられなかった。次に、セザリ－症候群患者の PBMC を



TSLP 50 ng/ml で刺激し、IL-4、IL-13 の mRNA の発現を解析した。TSLP 刺激によって IL-4、IL-13 の mRNA 発現は無刺激と比較し有意に上昇していた (図 7-B)。さらに、CTCL 患者皮膚組織の免疫組織染色を行い、TSLP 受容体の発現を検討した。菌状息肉症の紅斑期、扁平浸潤期、腫瘍期の皮膚組織では真皮の浸潤細胞のうち、約 30%~50%の細胞が染色され、セザリ一症候群の皮膚組織ではほぼ全ての腫瘍細胞が染色された (図 7-C)。以上の結果より、CTCL 患者腫瘍細胞においても TSLP 受容体が発現し、TSLP 刺激によって IL-4、IL-13 の産生が誘導されると考えた。

#### 6) TSLP による腫瘍細胞増殖の検討

先の実験にて TSLP 受容体が CTCL 腫瘍細胞に発現していることが示された。過去にも他の腫瘍細胞において TSLP 受容体が発現することが報告されており(15)、これらの結果から、TSLP が CTCL 腫瘍細胞に直接的に働き、腫瘍増殖に関与すると推測し、その検討を行った。まず TSLP の CTCL 細胞株に対する細胞増殖効果を検討した。Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞を TSLP 50 ng/mL で 24 時間刺激後、生存細胞数をカウントした。対照群は TSLP 無刺激群とした。その結果、Hut78 細胞、MJ 細胞の TSLP 刺激群では無刺激群と比較し有意な増加をみとめる一方、HH 細胞では増加がみられなかった (図 8-A)。これらの結果は、細胞株の TSLP 受容体の発現の有無と一致していた。次に STAT5 のリン酸化を抑制することによって、TSLP 刺激に

よる細胞増殖に影響があるかを検討した。TSLP 刺激による細胞増殖がみられた、Hut78 細胞、MJ 細胞を用いて STAT5 inhibitor を TSLP と同時に添加し、24 時間後に細胞数をカウントした。対照群は STAT5 inhibitor 未処理群とした。Hut78 細胞では TSLP 50ng/ml で刺激した細胞において、STAT5 inhibitor 群は対照群と比較し細胞数は有意に低いという結果であった (図 8-B)。MJ 細胞は TSLP 10ng/mL および 50ng/mL で刺激した細胞において、STAT5 inhibitor 群は対照群と比較して細胞数が有意に低かった。以上の結果より、TSLP による細胞増殖は STAT5 inhibitor によって有意に抑制されることが示された。さらにフローサイトメトリーを用いて、STAT5 の核内リン酸化と死細胞染色を行った。Hut78 細胞を TSLP 50 ng/mL で 24 時間刺激し、anti-phosphorylated STAT5 monoclonal antibody と alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody で染色し STAT5 の核内リン酸化を検討した。TSLP 刺激した細胞では STAT5 のリン酸化が誘導された (図 8-C)。さらに Hut78 細胞を TSLP 50 ng/mL で 24 時間刺激し、SYTOX Red Dead Cell Stain Kit を用いて死細胞染色を行った。TSLP 刺激群は無刺激群と比較し、死細胞は減少していた (図 8-D)。以上の結果より、TSLP は直接的に CTCL 腫瘍細胞を刺激し、STAT5 リン酸化を介して、腫瘍細胞の増殖および生存に寄与していると考えた。

次にマウスリンパ腫細胞株を用いて TSLP の効果を検討した。マウスリンパ腫細胞株である EL-4 細胞、マウス T 細胞リンパ腫細胞株である MBL-2 細胞、マウス悪性黒色腫細胞株である B16 細胞を使用した。まずそれぞれの細胞より mRNA を抽出し、TSLP 受容体 mRNA の発現を検討した。EL-4 細胞と MBL-2 細胞では B16 細胞と比較し有意に TSLP 受容体 mRNA の発現が高かった (図 9-A)。次に、細胞を TSLP 10 ng/mL または 50 ng/mL で刺激し、24 時間後の細胞数をカウントした。EL-4 細胞、MBL-2 細胞の細胞数は無刺激群と比較し、TSLP 10 ng/mL 刺激群、50 ng/mL 刺激群で有意に増加していた (図 9-B)。一方、B16 細胞では細胞数の増加はみられなかった。この結果は TSLP 受容体 mRNA の発現の結果と一致していた。さらに *in vivo* での TSLP の効果を検討した。野生型マウス C57BL/6 の腹部に 3 種の細胞株をそれぞれ皮下注射し、第 0、4、7、11 日目に 200  $\mu$ l の PBS に溶解した抗 TSLP 抗体 10  $\mu$ g/m または isotype IgG 抗体を腹腔内に注射した。第 4、7、11、14 日目に腫瘍体積を測定し、第 14 日目に病変皮膚より mRNA を抽出した。EL-4 細胞接種マウスの腫瘍体積はコントロール群と比較し、抗 TSLP 抗体群で有意に縮小していた (図 10-A)。MBL-2 細胞接種マウスも EL-4 細胞接種マウスと同様に抗 TSLP 抗体群で有意に縮小していた。一方、B16 細胞接種マウスではコントロール群と比較し、抗 TSLP 抗体群で有意に腫瘍が増大した。この結果を受けて、抗 TSLP 抗体が抗腫瘍免疫に何

等かの影響を及ぼした可能性を推測し、Th1 型サイトカインの一種で CTCL においては抗腫瘍免疫反応を示すことが明らかとなっている IFN- $\gamma$  について検討することとした。EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞接種マウスそれぞれの皮膚病変部から抽出した mRNA を用いて、IFN- $\gamma$  の発現を調べた結果、3 種のマウスすべてにおいて、抗 TSLP 抗体群ではコントロール群と比較し、IFN- $\gamma$  の発現が低い傾向を示した (図 10-B)。TSLP 受容体を発現しない B16 細胞を注射したマウスの皮膚では抗 TSLP 抗体が抗腫瘍免疫を抑制し、その結果、腫瘍が増大したと考えた。TSLP 受容体を発現する EL-4 細胞、MBL-2 細胞を注射したマウスでみられた抗 TSLP 抗体の腫瘍抑制効果は、抗 TSLP 抗体が、サイトカインによる抗腫瘍免疫を抑制する間接的な作用経路よりも、TSLP が腫瘍細胞を刺激し増殖を促進する直接的な作用経路を遮断した結果であると考えた。

## 5. 考察

申請者は CTCL の病態において、TSLP によって腫瘍に優位な Th2 型の微小環境が誘導されること、TSLP が腫瘍細胞に直接作用し腫瘍を増殖させることを明らかにした。CTCL 患者皮膚では健常者皮膚と比較し、ケラチノサイトから産生される TSLP、および線維芽細胞から産生されるペリオスチンの発現が有意に亢進してい

た。CTCL 細胞株および CTCL 患者 PBMC の細胞表面に TSLP 受容体が発現し、TSLP 刺激によって IL-4 と IL-13 の産生が上昇した。さらに TSLP は *in vitro* と *in vivo* で CTCL 腫瘍細胞の増殖を促進した。これらの結果はペリオスチンによってケラチノサイトから産生された TSLP が Th2 型優位の免疫応答を誘導して腫瘍に優位な微小環境を誘導するのみならず、腫瘍細胞の増殖においても重要な役割もつことを示している。

はじめに、申請者は CTCL 病変皮膚における TSLP とペリオスチンの発現を検討した。CTCL 病変皮膚より抽出した mRNA では健常皮膚と比較し、TSLP とペリオスチンの mRNA の発現が有意に高かった (図 1)。免疫組織染色においても CTCL 病変皮膚では TSLP、ペリオスチンが強く発現していた (図 2)。皮膚のケラチノサイトより産生される TSLP は、アトピー性皮膚炎の患者皮膚および血清中で上昇していることが報告され、その後の研究でアトピー性皮膚炎の病態形成において、ケラチノサイトより産生された TSLP が起点となり、樹状細胞、肥満細胞、CD4 陽性 T 細胞を介した Th2 型の免疫応答が誘導され、炎症を慢性化・遷延化させることが明らかとなった (6,27)。ケラチノサイトからの TSLP の産生を誘導するものとしては、物理的ストレスのほか、Toll 様受容体リガンドや IL-4、IL-13、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが報告されている(28-30)。今回の結果では、CTCL 患者病変皮膚

で TSLP が高発現しており、さらに Th2 型サイトカインである IL-4 と相関がみとめられた。以上の結果からは、アトピー性皮膚炎と同様に、CTCL の皮膚における Th2 型優位の微小環境の誘導においても TSLP が重要な役割をもつことが推測される。

次に CTCL 病変皮膚由来の線維芽細胞を IL-4、IL-13 で刺激し、ペリオスチン mRNA と培養上清中のペリオスチンタンパクを検討したところ、健常皮膚由来線維芽細胞と比較し、CTCL 病変皮膚由来線維芽細胞では各刺激後のペリオスチンの発現がいずれも有意に上昇していた (図 3)。過去の報告として、病変皮膚から採取した線維芽細胞は、採取後の培養過程においても生体内での形質を維持することが知られている(31)。CTCL 患者病変皮膚から採取した線維芽細胞を用いた研究においては、その表面形質、各種 mRNA の発現が健常者皮膚線維芽細胞と異なること、さらに病期の進行とともに変化することが報告されている(18,32)。本研究で用いた CTCL 患者皮膚線維芽細胞についても、生体内での形質を反映していると考えられる。IL-4、IL-13 に対する反応性の違いからは、CTCL 患者皮膚において線維芽細胞が何らかのエピジェネティクスな変化を受けた結果、IL-4、IL-13 の刺激によって、より多くのペリオスチンの産生が誘導されたと推測される。

さらに CTCL 患者血清中のペリオスチンは健常者と比較し有意に高く、CTCL の病勢マーカーである LDH、CCL17 と相関していた (図 4)。これまでにペリオスチン

は喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患で上昇していることが報告されている。喘息の病態では、IL-4 と IL-13 によって肺の線維芽細胞と気道上皮細胞からペリオスチンの産生が誘導され、その結果、気道の伸展性の低下や線維化が増悪することが報告されている(33)。マウスのアレルギー性皮膚炎においてもペリオスチンが炎症の増幅と慢性化、遷延化に寄与することが報告された(9)。さらに白石らによって、アトピー性皮膚炎の病態形成における TSLP とペリオスチンの関連が報告された(8)。上述のように、アトピー性皮膚炎の病態形成において、その慢性的な炎症は様々なサイトカインによって誘導されるが、その起点となるのが TSLP である。

皮膚のバリア機能の破綻に伴う物理的ストレス等によってケラチノサイトより誘導された TSLP は樹状細胞、肥満細胞、CD4 陽性 T 細胞を介して Th2 細胞を分化・誘導し、Th2 型優位の微小環境を形成する(6,27)。ペリオスチンはその Th2 型サイトカインによって線維芽細胞から誘導され、ケラチノサイトに直接作用することで、強力に TSLP を誘導する働きをもつ。この TSLP とペリオスチンの作用によって、炎症が慢性化・遷延化することが示唆されている(8)。CTCL においても、Th2 型優位の微小環境を形成し、その環境は腫瘍に優位に働くことが知られている。進行期の CTCL では皮膚や血清中で IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 といった Th2 型サイトカインが高い値を示すことが報告されており(3,4)、申請者の結果でも CTCL 病変皮膚 mRNA

では健常皮膚と比較して進行期の CTCL 患者数名で IL-4 の mRNA が高い発現を示していた (図 1-A)。本研究で得られた CTCL 患者の血清中ペリオスチン濃度の上昇(図 4-A)は、アトピー性皮膚炎と同様に Th2 型サイトカインによって誘導されたのち、ケラチノサイトへの直接作用によって TSLP の産生を誘導することで、Th2 型優位の環境形成、維持に寄与していることが推測される。

TSLP はこれまでに樹状細胞や単球などの抗原提示細胞に対して作用することが報告されてきた。TSLP が抗原提示細胞を介して CCL17 のような Th2 型サイトカインの産生を促し、さらに樹状細胞の分化・成熟に関与するという報告(6)や、TSLP が肥満細胞の骨髄前駆細胞からの分化・増殖に関与するとの報告もある(34)。これまで TSLP 受容体は樹状細胞に発現するが CD4 陽性 T 細胞には発現せず、よって樹状細胞を介して CD4 陽性 T 細胞に作用し分化・増殖を促すというメカニズムが提唱されていた(35,36)。しかし、近年、TSLP が CD4 陽性 T 細胞にも直接作用するという説が報告されている(37)。マウスでは TSLP が抗原提示細胞を介さずに OVA 特異的マウス CD4 陽性 T 細胞に直接作用し、IL-4、IL-13 産生を誘導することが明らかになった(38)。さらに TSLP 受容体がアトピー性皮膚炎患者の CD4 陽性 CCR4 陽性 CLA 陽性 T 細胞に発現し、TSLP が直接作用し、IL-4 の産生を促す可能性も示唆されている(39)。これらの報告を受けて、申請者は CTCL の細胞株を用いて TSLP 受容



体の発現を調べた結果、Hut78 細胞と MJ 細胞の細胞表面に TSLP 受容体が発現することを明らかにした (図 5-A)。さらに TSLP のシグナル伝達経路に関しては STAT5 のリン酸化が関与することが複数の細胞で報告されており(24-26)、これを受けて本実験においても、Hut78 細胞と MJ 細胞が TSLP の刺激を受けた後、STAT5 のリン酸化を介して IL-4 と IL-13 の産生を促進することを明らかにした (図 5-B、図 6)。さらにセザリー症候群患者 3 名の PBMC を用いて細胞表面に TSLP 受容体が発現することを示した (図 7-A)。使用したセザリー症候群患者 3 名の PBMC 中の腫瘍細胞割合は 74~78%といずれも高く、腫瘍細胞表面マーカーによる腫瘍細胞の特定はできなかったものの、その腫瘍細胞の比率からは腫瘍細胞表面に TSLP 受容体が高発現していたと考えられる。しかし、PBMC における TSLP 受容体の発現には患者個人差がある可能性は否定できない。そこで申請者は免疫組織染色によって CTCL 患者皮膚組織で TSLP 受容体の発現を確認した (図 7-C)。セザリー症候群患者の腫瘍細胞に TSLP 受容体が発現するという結果を受けて、セザリー症候群患者の PBMC を TSLP で刺激した結果、IL-4 と IL-13 の産生は有意に増加した (図 7-B)。以上の結果からは TSLP が樹状細胞を介して T 細胞に働く間接的作用のみならず、CTCL 腫瘍細胞に発現する TSLP 受容体を介して腫瘍細胞に直接作用し Th2 型サイトカインの産生を誘導している可能性が示唆された。

過去に複数の腫瘍において、TSLP および TSLP 受容体が腫瘍形成に何らかの重要な役割をもつ可能性が示唆されている(14-16,40-42)。マウスでは乳癌の腫瘍細胞から産生された TSLP が CD4 陽性 T 細胞に作用し Th2 細胞への分化を誘導すること、さらに IL-10 や IL-13 など腫瘍免疫抑制に働く Th2 型サイトカインが産生され、腫瘍が進行、増悪する機序が示されている(15)。子宮頸癌の組織では腫瘍細胞が TSLP を発現し内皮細胞は TSLP 受容体を発現していた(16)。Recombinant TSLP および子宮頸癌の細胞株より産生された TSLP はいずれも臍静脈内皮細胞の増殖を誘導し、TSLP が腫瘍の増生に関与することが示唆されている。別の研究では子宮頸癌の腫瘍細胞から産生された TSLP がオートクラインに作用し腫瘍細胞からの CCL17 の産生を誘導したとの報告もある(40)。腫瘍細胞からの CCL17 と TSLP が抗炎症性サイトカインの産生を誘導することで腫瘍の増殖を促す機序が示唆されている。また、肺癌では TSLP が制御性 T 細胞を誘導することが報告されている(42)。制御性 T 細胞はリンパ球の活動を抑制し、腫瘍細胞が宿主の免疫から逃れるのを助ける働きをもつが、肺癌の組織では TSLP が高発現し、TSLP と制御性 T 細胞が有意に相関することから、TSLP が制御性 T 細胞の誘導に関与している可能性が指摘されている。さらに膀胱癌では、患者腫瘍細胞において、腫瘍内の腺管やリンパ管に非腫瘍性組織ではみられない TSLP 受容体陽性の樹状細胞が存在し、腫瘍や腺管には Th2 型のケモアトラクタ

ントが発現することから、腫瘍から産生されたサイトカインが TSLP の産生を誘導し TSLP 依存的に Th2 型の免疫応答が誘導されることが推測されている(14)。以上のように、これまでも複数の腫瘍において TSLP がその腫瘍形成に関与する可能性が示唆されている。今回の結果では、CTCL において TSLP が Th2 型の微小環境を誘導することが示唆され、この Th2 型優位の環境が腫瘍の進行に寄与すると推測される。その理由として、Th1 型優位の微小環境では IFN- $\gamma$ をはじめとするサイトカインが産生され、抗腫瘍作用を示すことがわかっている。実際に、IFN- $\gamma$ は臨床においてすでに CTCL の治療薬としてその効果が証明されている(43,44)。つまり、逆に Th2 型優位の微小環境は腫瘍細胞にとって有利に働くのである。以上の結果から、CTCL において、線維芽細胞から産生されたペリオスチンがケラチノサイトからの TSLP の産生を誘導し、Th2 型の微小環境を形成することで腫瘍を促進させるという一連の機序が考えられ、この機序を標的として新たな創薬の可能性が期待される。

さらに申請者は TSLP が直接的に腫瘍細胞に作用し、その増殖を促進させることを明らかにした。過去にも TSLP の刺激によって急性リンパ性白血病の腫瘍細胞が増殖することが報告されており、B 細胞に TSLP 受容体が発現している可能性が指摘されていた(41)。申請者の研究では新たに CTCL の腫瘍細胞が TSLP 受容体を発現することを免疫組織染色及びセザリ一症候群患者の PBMC、CTCL 細胞株を用いたフ

ローサイトメトリーで明らかにした (図 5-A, 7-A, C)。TSLP のシグナル経路についてはマウス樹状細胞では STAT1、STAT3、STAT5、Jak1、Jak2 がリン酸化されるとの報告がある一方、STAT5 欠損樹状細胞では TSLP 特異的遺伝子が誘導されなかったとの報告があり、TSLP のシグナル経路では STAT5 が重要な役割の担うことが予想された(24-26)。申請者は TSLP 受容体の発現を確認した Hut78 細胞を用いて各種シグナル伝達物質のリン酸化を調べた結果、TSLP の刺激で STAT5 がリン酸化される一方、STAT3、MAPK、Akt のリン酸化はみられず (図 5-B)、過去の報告と矛盾しない結果であった。さらに興味深い結果として、B 細胞性急性リンパ性白血病の報告と同様、TSLP の直接刺激によって Hut78 細胞と MJ 細胞の細胞増殖が促進された (図 8-A, D)。申請者はマウスリンパ腫細胞株 EL-4 細胞、MBL-2 細胞においても *in vitro*、*in vivo* での TSLP による腫瘍細胞の増殖を明らかにした (図 9-B)。さらに野生型マウスに EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞をそれぞれ接種し、腹腔内に抗 TSLP 抗体することで内因性 TSLP を抑制し、腫瘍増殖への影響を検討した。先の実験で TSLP 受容体の発現が高かった EL-4、MBL-2 接種マウスでは、抗 TSLP 抗体群の腫瘍増殖はコントロール群と比較し有意に抑制された (図 10-A)。一方、B16 接種マウスでは抗 TSLP 抗体群では腫瘍増殖が亢進を示していた。

TSLP の腫瘍の増殖効果について過去の報告をみると、肺転移性乳癌では TSLP 受容体ノックアウトマウスで腫瘍の形成が有意に抑制され、Th2 型免疫応答も抑制されていた(45)。一方、マウス皮膚腫瘍に関しては、TSLP が腫瘍促進的に作用するという報告、腫瘍抑制的に作用するという報告のいずれもある。ケラチノサイトからの TSLP を過剰発現させたマウスモデルを用いた研究では TSLP 媒介性の炎症が CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞に作用し皮膚発癌から保護する作用を示した(46)。さらに別の研究では TSLP 受容体欠損マウスでは真皮の炎症が減少し腫瘍形成が促進され、野生型マウスの皮膚における TSLP の誘導は腫瘍形成を阻害した(47)。これらの結果からは皮膚における TSLP の発現は腫瘍免疫を増強させる働きをもつことが推測される。申請者の研究において、マウス悪性黒色腫細胞株の B16 細胞を用いた実験では抗 TSLP 抗体によって B16 細胞接種マウスに形成された腫瘍の増殖はコントロール群と比較して亢進を示し、マウスリンパ腫細胞株 EL-4 細胞、MBL-2 細胞接種マウスと逆の結果を示した (図 10-A)。その理由について、B16 細胞では TSLP 受容体の発現が乏しいことが前の実験から示されており、内因性 TSLP の腫瘍細胞への直接的影響は少ないと推測された。そこで、抗 TSLP 抗体が腫瘍免疫に何等かの影響を及ぼした可能性を考えた。IFN- $\gamma$ は上述のとおり、Th1 型サイトカインの一種で CTCL においては抗腫瘍作用を示すことが明らかとなっており、現在、

CTCL 治療薬として臨床応用されている。抗 TSLP 抗体による腫瘍免疫への影響を調べるため、EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞接種マウスそれぞれの皮膚から mRNA を抽出し、IFN- $\gamma$  の発現を調べた結果、3 種のマウスすべてにおいて、抗 TSLP 抗体群ではコントロール群と比較し、IFN- $\gamma$  の発現が低い傾向を示していた (図 10-B)。以上の結果から、B16 細胞接種マウスでは抗 TSLP 抗体が腫瘍に対する免疫作用を抑制し、その結果、腫瘍増殖が亢進したと考えた。一方、TSLP 受容体を発現する EL-4 細胞、MBL-2 細胞接種マウスでは、抗 TSLP 抗体がサイトカインによる抗腫瘍作用を抑制する間接的な作用経路よりも、内因性 TSLP による腫瘍細胞への直接的な腫瘍増殖経路を遮断したことで、腫瘍が縮小したと考察した。

このように組織や腫瘍細胞の種類によって TSLP-TSLP 受容体の相互作用は異なる働きをもつ可能性があり、その意義は大変興味深い。

## 6. 結論

本研究では、CTCL の病態における TSLP とペリオスチンの役割について検討した。CTCL 病変皮膚では TSLP とその産生を誘導するペリオスチンが高発現していた。CTCL 腫瘍細胞では TSLP 受容体が発現し、TSLP によって腫瘍細胞からの IL-4 と IL-13 の産生が誘導された。さらに TSLP の直接刺激によって、腫瘍細胞の増殖が

促進された。TSLP は Th2 型の免疫応答を誘導するのみならず、腫瘍増殖に関しても重要な役割をもつと考えられた。いまだ根治療法のない治療困難な CTCL にとって、内因性の TSLP の抑制や TSLP 受容体アンタゴニストの開発など、TSLP-TSLP 受容体経路を標的とした、新たな治療法の開発へとつながることが期待される。

## 7. 謝辞

大学院での4年間にわたり、御指導賜りました東京大学医学部皮膚科学教室佐藤伸一教授に深謝致します。そして東京大学医学部皮膚科学教室菅谷誠准教授には本研究を通して、研究の基礎から臨床にわたるまで御指導賜りました。研究という側面からみた皮膚科学の世界は広く、その可能性に満ちた世界は私に新たな興味と今後につながる探求心を与えてくれました。また最後になりましたが、細胞培養や免疫染色等、多方面にてサポートして下さった加賀玉美さん、**実験**助手の方々に心より感謝申し上げます。



## 8. 文献

1. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet* 2008;371(9616):945-57 doi 10.1016/S0140-6736(08)60420-1.
2. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005;105(10):3768-85 doi 10.1182/blood-2004-09-3502.
3. Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, et al. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 1994;103(5):669-73.
4. Asadullah K, Döcke WD, Haeussler A, Sterry W, Volk HD. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 1996;107(6):833-7.
5. Saeki H, Furue M, Furukawa F, Hide M, Ohtsuki M, Katayama I, et al. Guidelines for management of atopic dermatitis. *J Dermatol* 2009;36(10):563-77 doi 10.1111/j.1346-8138.2009.00706.x.

6. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;3(7):673-80 doi 10.1038/ni805.
7. Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal* 2008;2(1-2):9-17 doi 10.1007/s12079-008-0023-5.
8. Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Taniguchi K, et al. Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. *Allergol Int* 2012;61(4):563-72 doi 10.2332/allergolint.10-OA-0297.
9. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, et al. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* 2012;122(7):2590-600 doi 10.1172/JCI58978.
10. Tuzova M, Richmond J, Wolpowitz D, Curiel-Lewandrowski C, Chaney K, Kupper T, et al. CCR4+T cell recruitment to the skin in mycosis fungoides: potential contributions by thymic stromal lymphopoietin and interleukin-16. *Leuk Lymphoma* 2015;56(2):440-9 doi 10.3109/10428194.2014.919634.

11. Miyagaki T, Sugaya M, Fujita H, Saeki H, Tamaki K. Increased serum thymic stromal lymphopoietin levels in patients with cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Dermatol* 2009;34(4):539-40 doi 10.1111/j.1365-2230.2008.02990.x.
12. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007;110(6):1713-22 doi 10.1182/blood-2007-03-055749.
13. Sugaya M, Kuwano Y, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kadono T, et al. Lymphatic dysfunction impairs antigen-specific immunization, but augments tissue swelling following contact with allergens. *J Invest Dermatol* 2012;132(3 Pt 1):667-76 doi 10.1038/jid.2011.349.
14. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2011;208(3):469-78 doi 10.1084/jem.20101876.

15. Olkhanud PB, Rochman Y, Bodogai M, Malchinkhuu E, Wejksza K, Xu M, et al. Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J Immunol* 2011;186(10):5656-62 doi 10.4049/jimmunol.1100463.
16. Xie F, Meng YH, Liu LB, Chang KK, Li H, Li MQ, et al. Cervical carcinoma cells stimulate the angiogenesis through TSLP promoting growth and activation of vascular endothelial cells. *Am J Reprod Immunol* 2013;70(1):69-79 doi 10.1111/aji.12104.
17. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(6):1244-52.e2 doi 10.1016/j.jaci.2009.03.041.
18. Miyagaki T, Sugaya M, Fujita H, Ohmatsu H, Kakinuma T, Kadono T, et al. Eotaxins and CCR3 interaction regulates the Th2 environment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2010;130(9):2304-11 doi 10.1038/jid.2010.128.
19. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Kamata M, Ohmatsu H, Fujita H, et al. IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(24):7529-38 doi 10.1158/1078-0432.CCR-11-1192.

20. Agrawal S, Townley RG. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14(2):165-81 doi 10.1517/14712598.2014.859673.
21. Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, et al. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2003;48(1):23-30 doi 10.1067/mjd.2003.132.
22. Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, et al. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(3):592-7.
23. Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 2008;181(11):7699-705.
24. Isaksen DE, Baumann H, Trobridge PA, Farr AG, Levin SD, Ziegler SF. Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J Immunol* 1999;163(11):5971-7.
25. Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, Sakamoto K, Gomez-Rodriguez J, Wagner KU, et al. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1

- and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(45):19455-60 doi 10.1073/pnas.1008271107.
26. Wohlmann A, Sebastian K, Borowski A, Krause S, Friedrich K. Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. *Biol Chem* 2010;391(2-3):181-6 doi 10.1515/BC.2010.029.
27. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(4):845-52 doi 10.1016/j.jaci.2012.07.010.
28. Lee HC, Ziegler SF. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(3):914-9 doi 10.1073/pnas.0607305104.
29. Kato A, Favoreto S, Avila PC, Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007;179(2):1080-7.
30. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, Yoon BR, Brewer A, Chartier S, et al. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 2007;204(2):253-8 doi 10.1084/jem.20062211.

31. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Impaired Smad7-Smurf-mediated negative regulation of TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2004;113(2):253-64 doi 10.1172/JCI16269.
32. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Ohmatsu H, Fujita H, et al. Low herpesvirus entry mediator (HVEM) expression on dermal fibroblasts contributes to a Th2-dominant microenvironment in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2012;132(4):1280-9 doi 10.1038/jid.2011.470.
33. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, et al. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(32):14170-5 doi 10.1073/pnas.1009426107.
34. Han NR, Oh HA, Nam SY, Moon PD, Kim DW, Kim HM, et al. TSLP induces mast cell development and aggravates allergic reactions through the activation of MDM2 and STAT6. *J Invest Dermatol* 2014;134(10):2521-30 doi 10.1038/jid.2014.198.
35. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 2001;167(1):336-43.

36. Ziegler SF, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat Immunol* 2006;7(7):709-14 doi 10.1038/ni1360.
37. Rochman I, Watanabe N, Arima K, Liu YJ, Leonard WJ. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2007;178(11):6720-4.
38. He R, Oyoshi MK, Garibyan L, Kumar L, Ziegler SF, Geha RS. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(33):11875-80 doi 10.1073/pnas.0801532105.
39. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y. TSLP Directly Interacts with Skin-Homing Th2 Cells Highly Expressing its Receptor to Enhance IL-4 Production in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 2015 doi 10.1038/jid.2015.318.
40. Xie F, Liu LB, Shang WQ, Chang KK, Meng YH, Mei J, et al. The infiltration and functional regulation of eosinophils induced by TSLP promote the proliferation of cervical cancer cell. *Cancer Lett* 2015;364(2):106-17 doi 10.1016/j.canlet.2015.04.029.
41. Brown VI, Hulitt J, Fish J, Sheen C, Bruno M, Xu Q, et al. Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors,



- suggesting a role for interleukin-7/Ralpha signaling. *Cancer Res* 2007;67(20):9963-70 doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-4704.
42. Li H, Zhao H, Yu J, Su Y, Cao S, An X, et al. Increased prevalence of regulatory T cells in the lung cancer microenvironment: a role of thymic stromal lymphopoietin. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(11):1587-96 doi 10.1007/s00262-011-1059-6.
43. Kaplan EH, Rosen ST, Norris DB, Roenigk HH, Saks SR, Bunn PA. Phase II study of recombinant human interferon gamma for treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(3):208-12.
44. Sugaya M, Tokura Y, Hamada T, Tsuboi R, Moroi Y, Nakahara T, et al. Phase II study of i.v. interferon-gamma in Japanese patients with mycosis fungoides. *J Dermatol* 2014;41(1):50-6 doi 10.1111/1346-8138.12341.
45. Erdmann RB, Gartner JG, Leonard WJ, Ellison CA. Lack of functional TSLP receptors mitigates Th2 polarization and the establishment and growth of 4T1 primary breast tumours but has different effects on tumour quantities in the lung and brain. *Scand J Immunol* 2013;78(5):408-18 doi 10.1111/sji.12106.

46. Demehri S, Turkoz A, Manivasagam S, Yockey LJ, Turkoz M, Kopan R. Elevated epidermal thymic stromal lymphopoietin levels establish an antitumor environment in the skin. *Cancer Cell* 2012;22(4):494-505 doi 10.1016/j.ccr.2012.08.017.
47. Di Piazza M, Nowell CS, Koch U, Durham AD, Radtke F. Loss of cutaneous TSLP-dependent immune responses skews the balance of inflammation from tumor protective to tumor promoting. *Cancer Cell* 2012;22(4):479-93 doi 10.1016/j.ccr.2012.08.016.

## 9. 図表

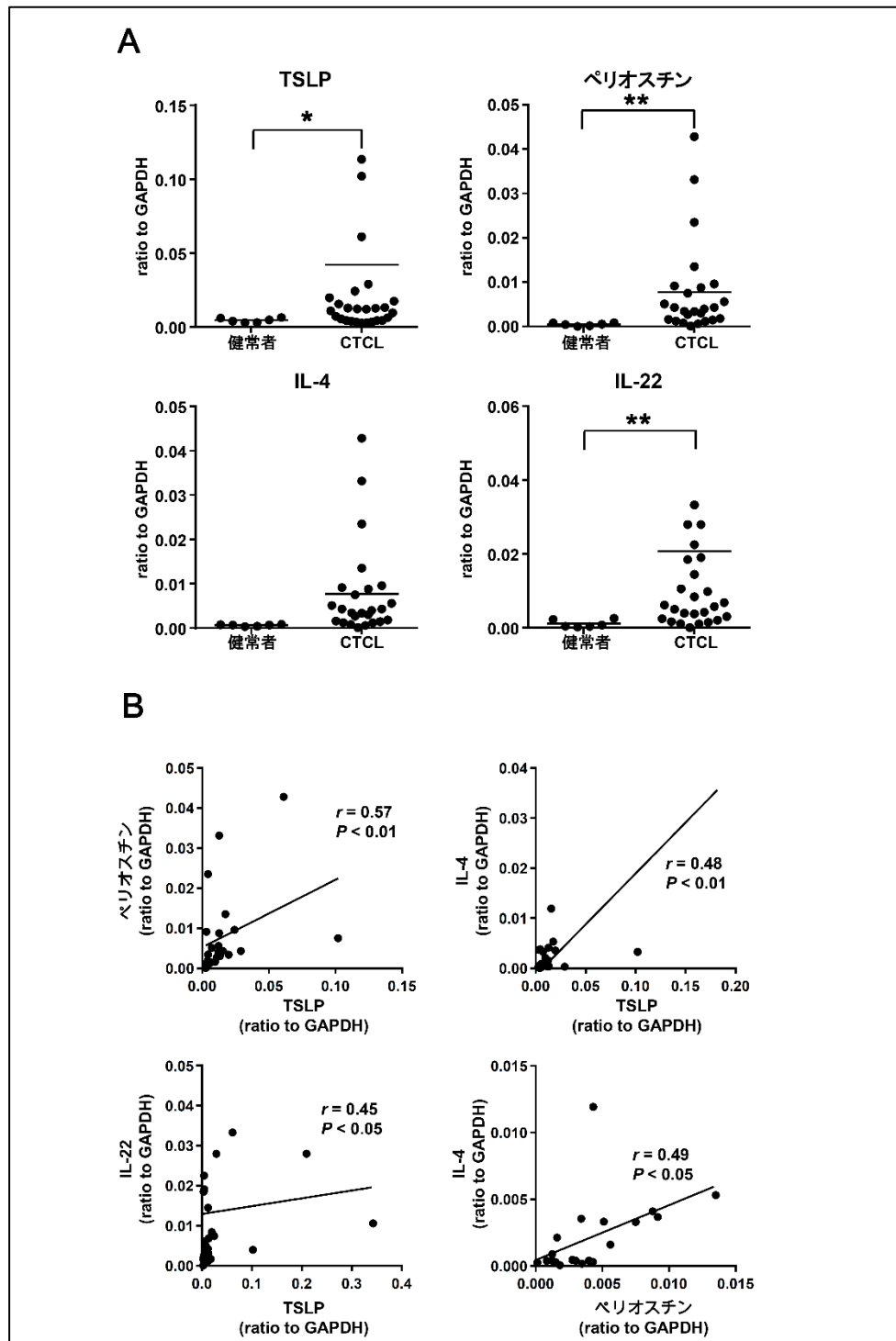
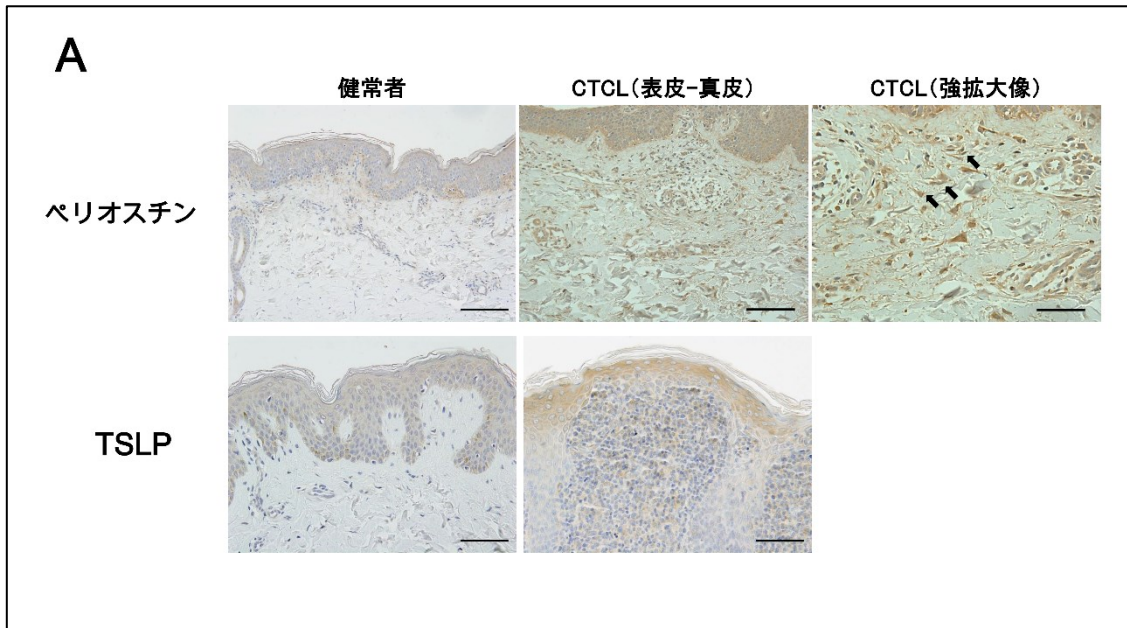


図1 CTCL 病変皮膚における各種 mRNA の発現

(A) CTCL 病変皮膚および健常皮膚における TSLP、ペリオスチン、IL-4、IL-22 の mRNA の発現。データは平均値±SD を用いて表した。(B) CTCL 病変皮膚の各種 mRNA の相関。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。



## 図2 皮膚のペリオスチンと TSLP の免疫組織染色

(A) CTCL 病変皮膚および健常皮膚の免疫組織染色。代表的な組織像を示す。CTCL 病変皮膚 n = 14、健常皮膚 n = 8。上段：ペリオスチンの免疫組織染色。矢印はペリオスチン陽性の線維芽細胞を示す。bar は左と中央は 100  $\mu$ m、右は 50  $\mu$ m を示す。下段：TSLP の免疫組織染色。bar は 50  $\mu$ m を示す。

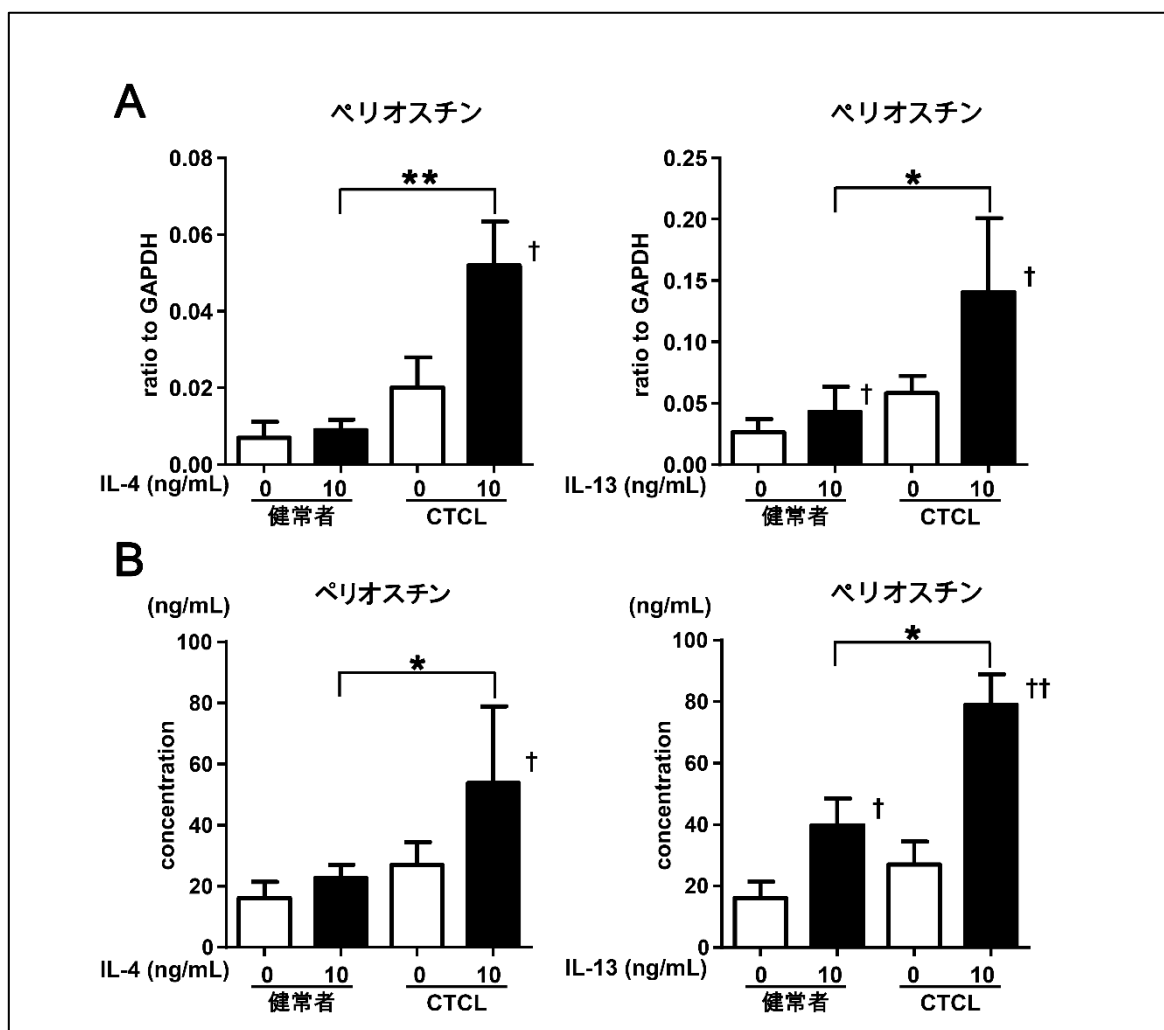


図3 IL-4、IL-13 刺激後の線維芽細胞からのペリオスチンの発現

(A, B) CTCL 病変皮膚および健常皮膚から培養した線維芽細胞を IL-4 (10 ng/mL)、または IL-13 (10 ng/mL) で 24 時間刺激した。CTCL 病変皮膚 n = 6、健常皮膚 n = 5。(A) 24 時間刺激後の線維芽細胞におけるペリオスチン mRNA の発現。(B) 培養上清中のペリオスチンタンパク量。データは平均値±SD を用いて表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (健常者線維芽細胞との比較) † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  (無刺激線維芽細胞との比較)。

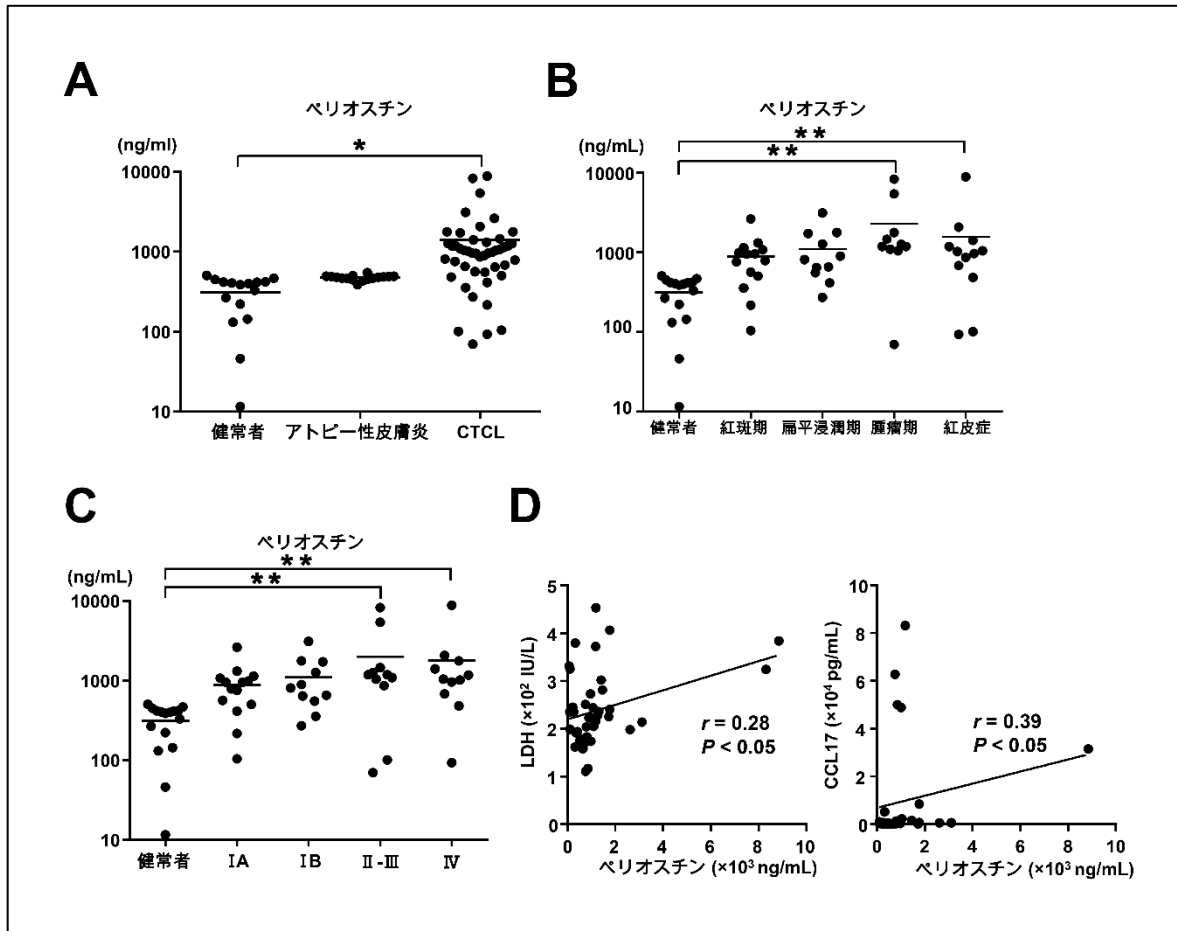


図4 血清中のペリオスチンタンパク量。

(A) 血清中のペリオスチンの比較。CTCL患者  $n = 47$ 、アトピー性皮膚炎患者  $n = 16$ 、健常者  $n = 16$ 。(B) CTCL 皮膚病変別の血清ペリオスチンの比較。紅斑期  $n = 14$ 、扁平浸潤期  $n = 11$ 、腫瘍期  $n = 10$ 、紅斑期  $n = 12$ 、健常者  $n = 16$ 。(C) CTCL 病期別の血清ペリオスチンの比較。IA 期  $n = 14$ 、IB 期  $n = 11$ 、II 期および III 期  $n = 11$ 、IV 期  $n = 11$ 、健常者  $n = 16$ 。(D) 血清ペリオスチンと病勢マーカーの相関。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

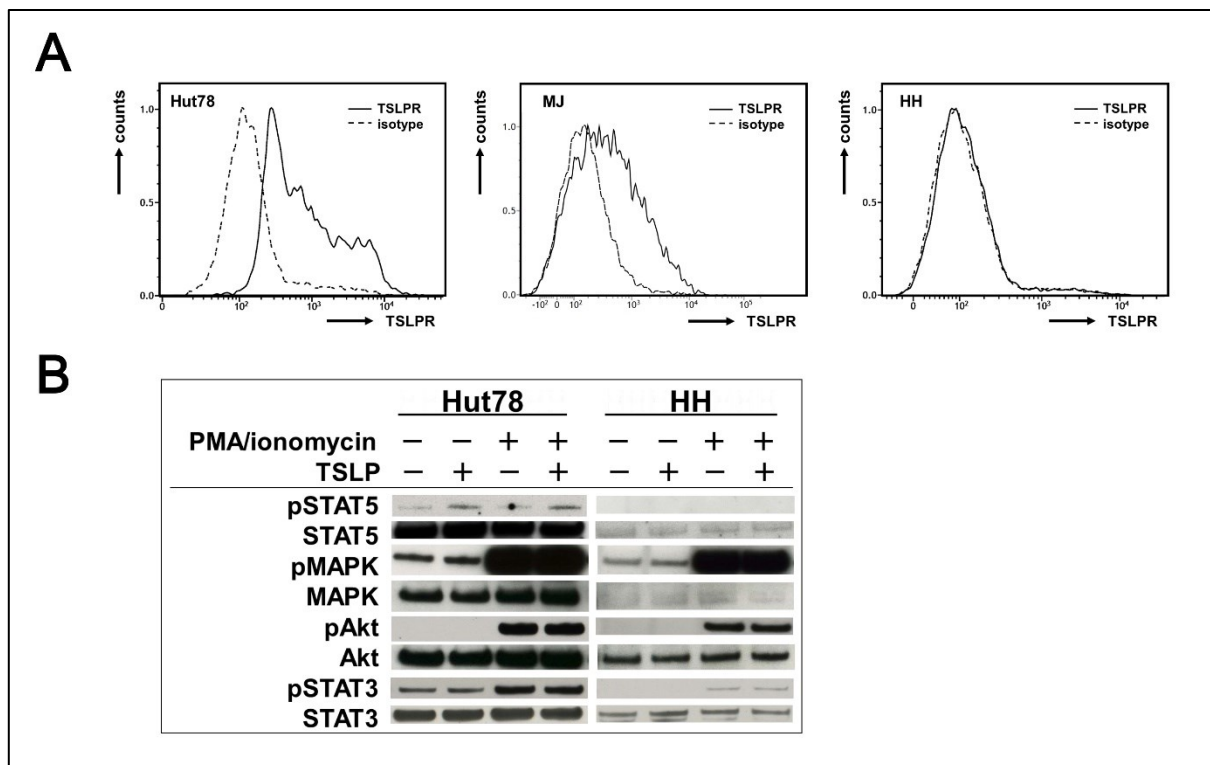


図5 CTCL 腫瘍細胞の TSLP 受容体発現と TSLP 直接刺激による STAT5 のリン酸化。(A) Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞の TSLP 受容体の発現。ヒストグラムの実線は TSLP 受容体、点線はアイソタイプを示す。代表的な結果を示す。(B) Hut78 細胞と HH 細胞ライセートの各種シグナル伝達物質のリン酸化。細胞は PMA/ionomycin (100 ng/mL, 1  $\mu$ g/mL) で前処理し recombinant TSLP (10 ng/mL) で 30 分間刺激した。

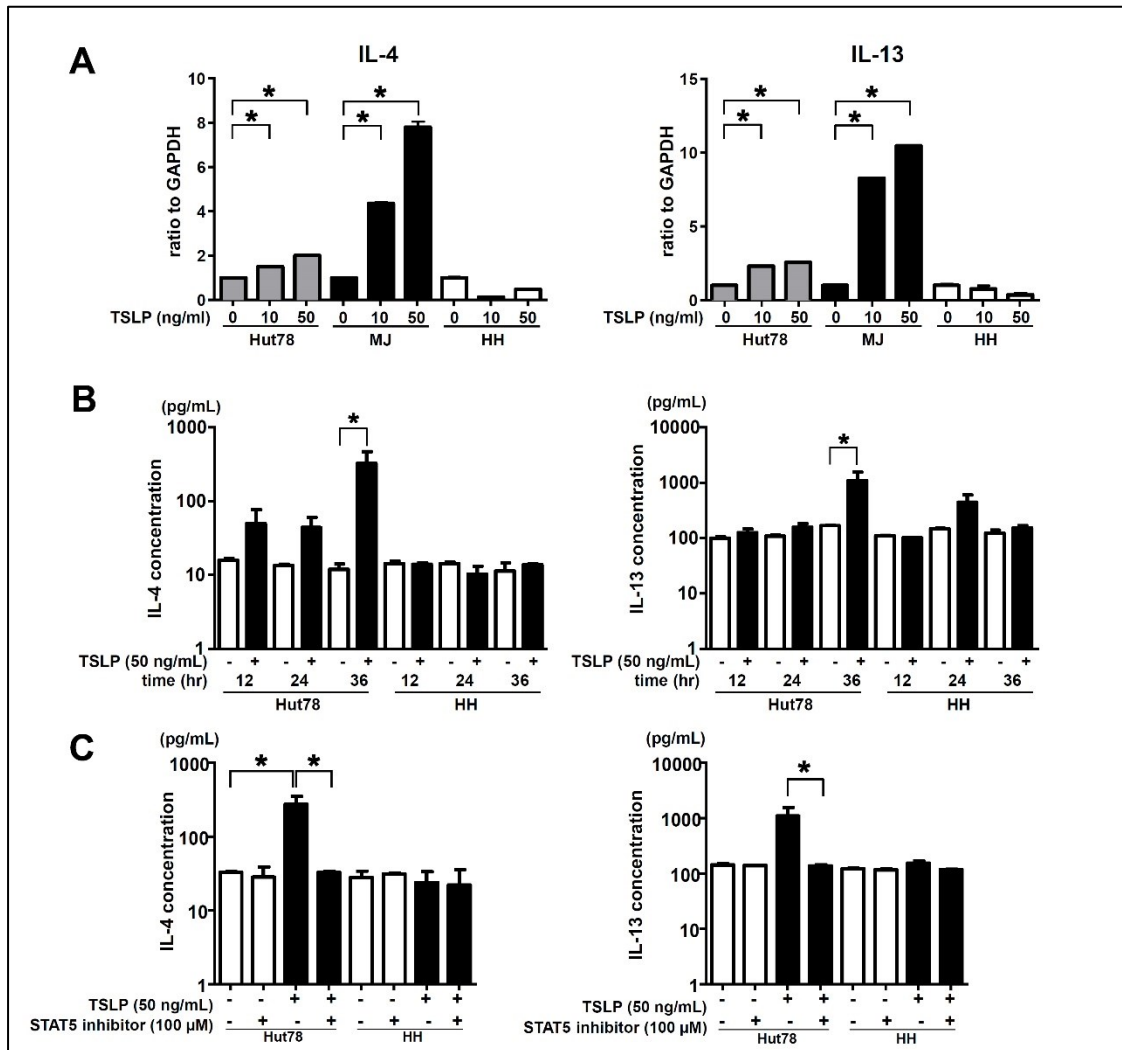


図6 TSLP 直接刺激による腫瘍細胞からの IL-4、IL-13 の発現

(A, B) Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞を PMA/ionomycin で前処理し TSLP で 12 時間から 36 時間刺激した。(A) TSLP で 24 時間刺激後の IL-4、IL-13 mRNA の発現。(B) TSLP 刺激後の細胞培養上清中の IL-4、IL-13 タンパク量。(C) STAT5 inhibitor で前処理し TSLP で 36 時間刺激した細胞培養上清中の IL-4、IL-13 タンパク量。データは平均値±SD を用いて表した。\* $P < 0.05$ 。



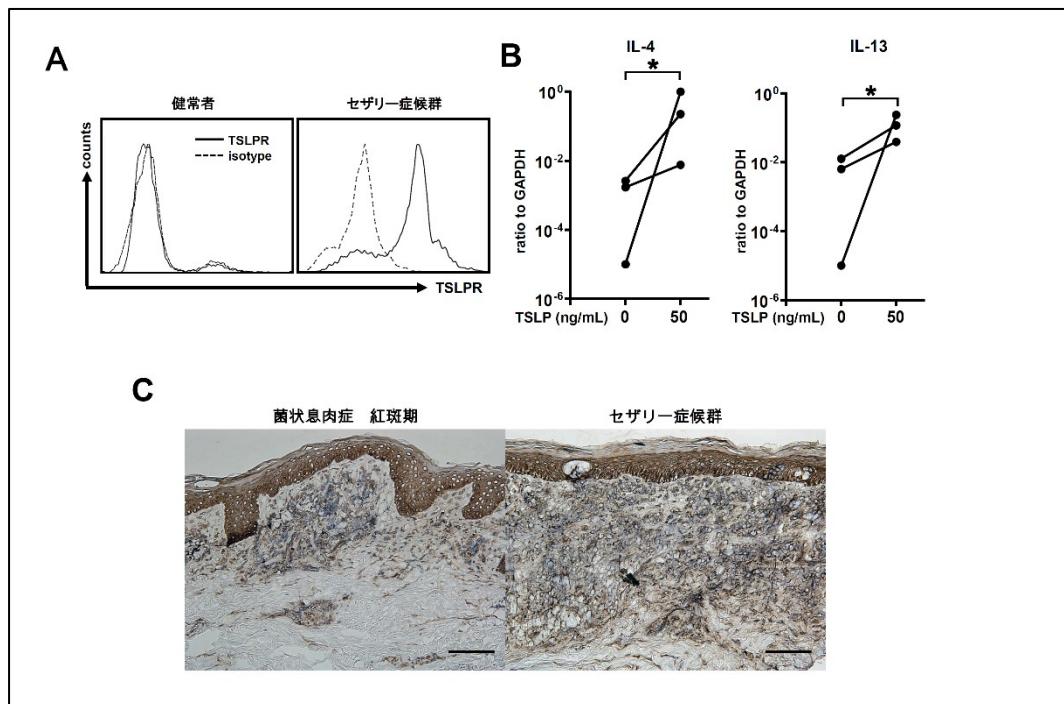


図7 セザリ-症候群患者腫瘍細胞の TSLP 受容体の発現

(A) 健常者およびセザリ-症候群患者 PBMC を用いた TSLP 受容体の発現。実線は TSLP 受容体、点線はアイソタイプを示す。代表的な結果を示す。(B) PBMC を TSLP で 24 時間刺激した。刺激後の IL-4 および IL-13 mRNA の発現。\* $P < 0.05$ 。(C) CTCL 病変皮膚の TSLP 受容体の免疫組織染色。左：菌状息肉症紅斑期、右：セザリ-症候群。bar は 50 μm を示す。

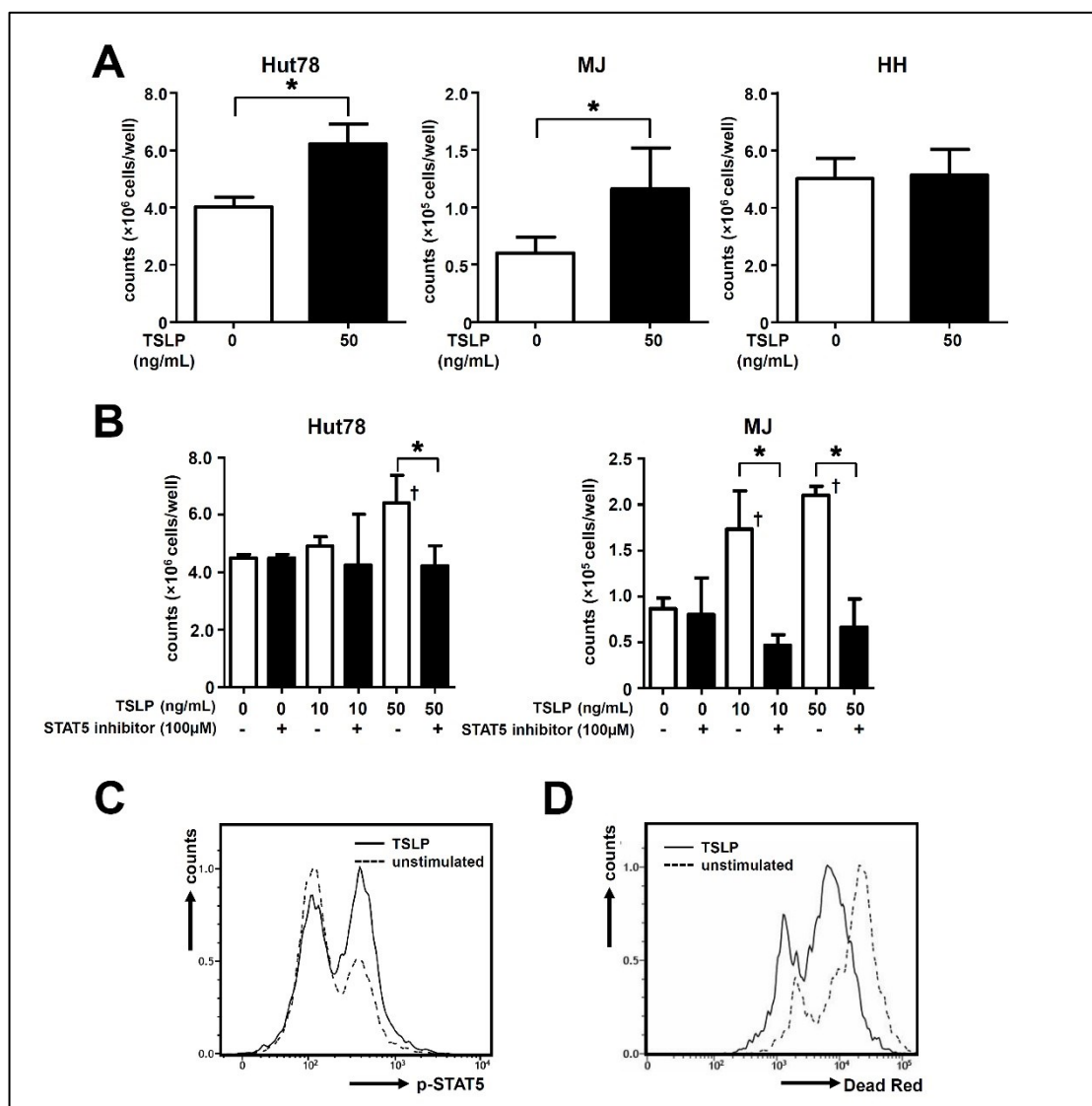


図8 TSLP 刺激後の腫瘍細胞の増殖と STAT5 のリン酸化

(A) TSLP (50 ng/mL)で24時間刺激後の Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞の細胞数の変化。(B) STAT5 inhibitor (100  $\mu$ M)で前処理した Hut78 細胞と MJ 細胞を TSLP (10 ng/mL、50 ng/mL)で24時間刺激した後の細胞数の変化。データは平均値 $\pm$ SD を用いて表した。 $*P < 0.05$  (STAT5 inhibitor 未処理群との比較)。 $\dagger P < 0.05$  (TSLP 無刺激群との比較)。(C, D) Hut78 細胞を TSLP (50 ng/mL)で24時間刺激した。(C) STAT5 のリン酸化の細胞内染色。(D) SYTOX Red Dead Cell Stain Kit を用いた死細胞染色。代表的な結果を示す。

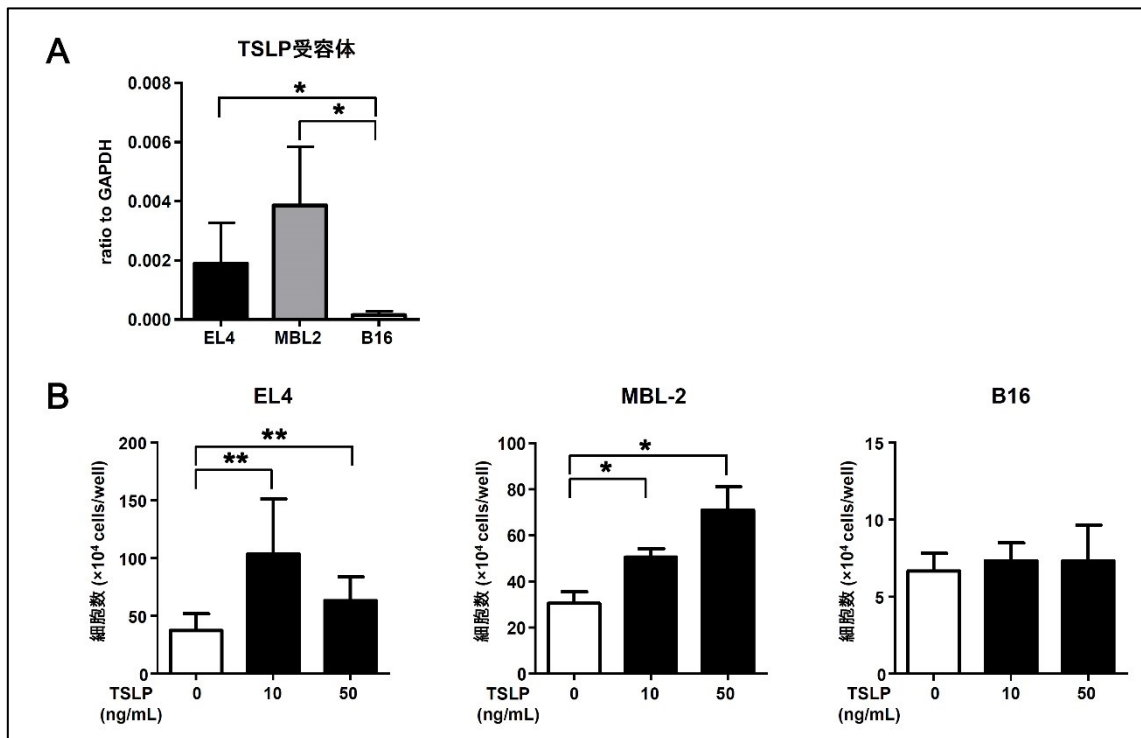


図9 in vitro における TSLP の腫瘍増殖効果

(A) EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞の TSLP 受容体 mRNA の発現。(B) TSLP (10 ng/mL, 50 ng/mL) で 24 時間刺激後の EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞の細胞数の変化。データは平均値 $\pm$ SD を用いて表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

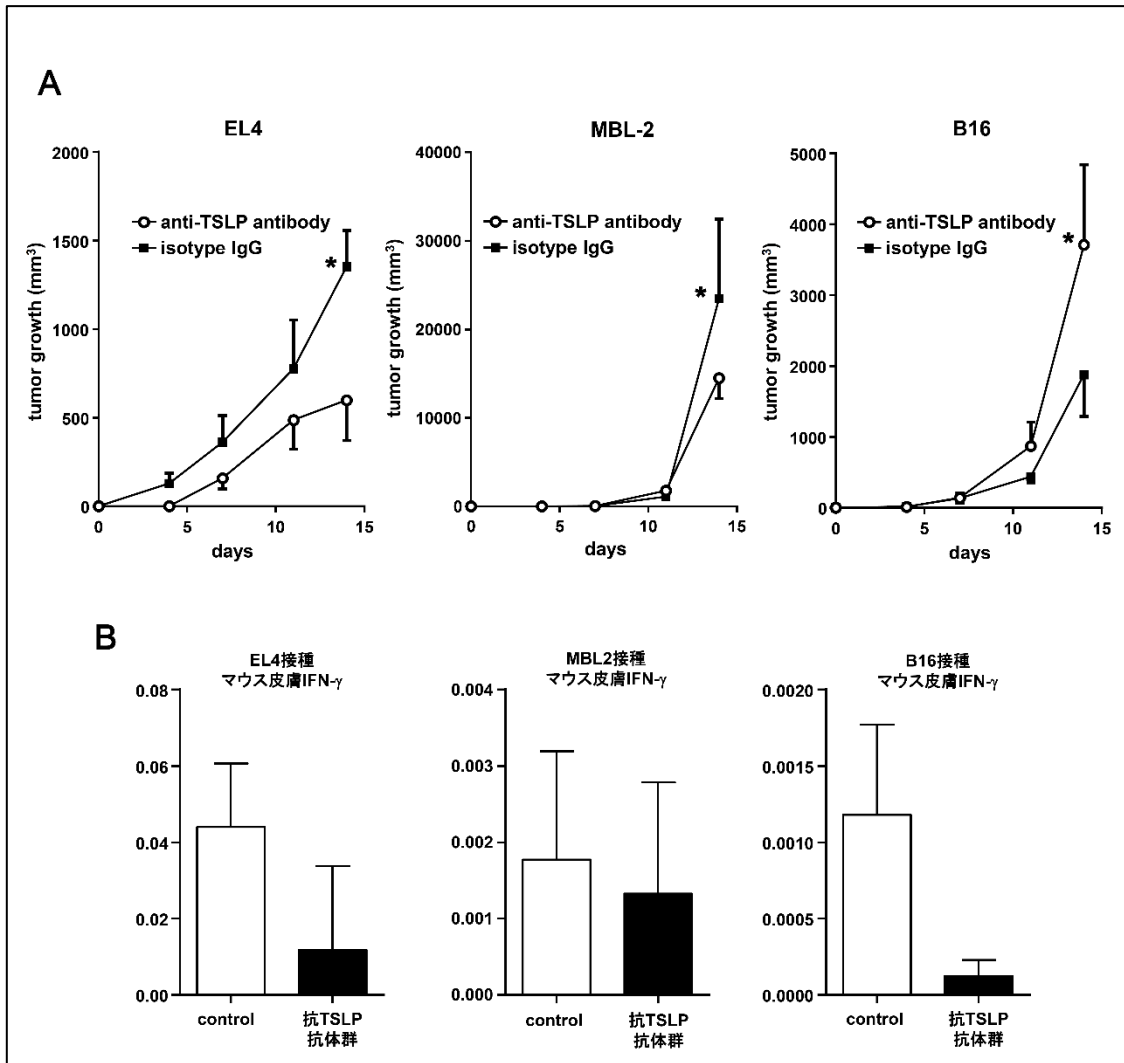


図 10 in vivo における TSLP の腫瘍増殖効果

(A) C57BL/6 マウスの腹部に EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞を皮下注射した。PBS (200  $\mu$ l) に溶解した抗 TSLP 抗体 (10  $\mu$ g/mL) またはアソタイプ IgG を腹腔内に第 0、4、7、11 病日の計 4 回注射し腫瘍体積を次の式を用いて計算した。  $V = \pi (L1 \times L2^2) / 6$ , where  $V =$  volume ( $\text{mm}^3$ ),  $L1 =$  longest diameter (mm), and  $L2 =$  shortest diameter (mm)。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。(B) マウス病変皮膚における IFN- $\gamma$  mRNA の発現。

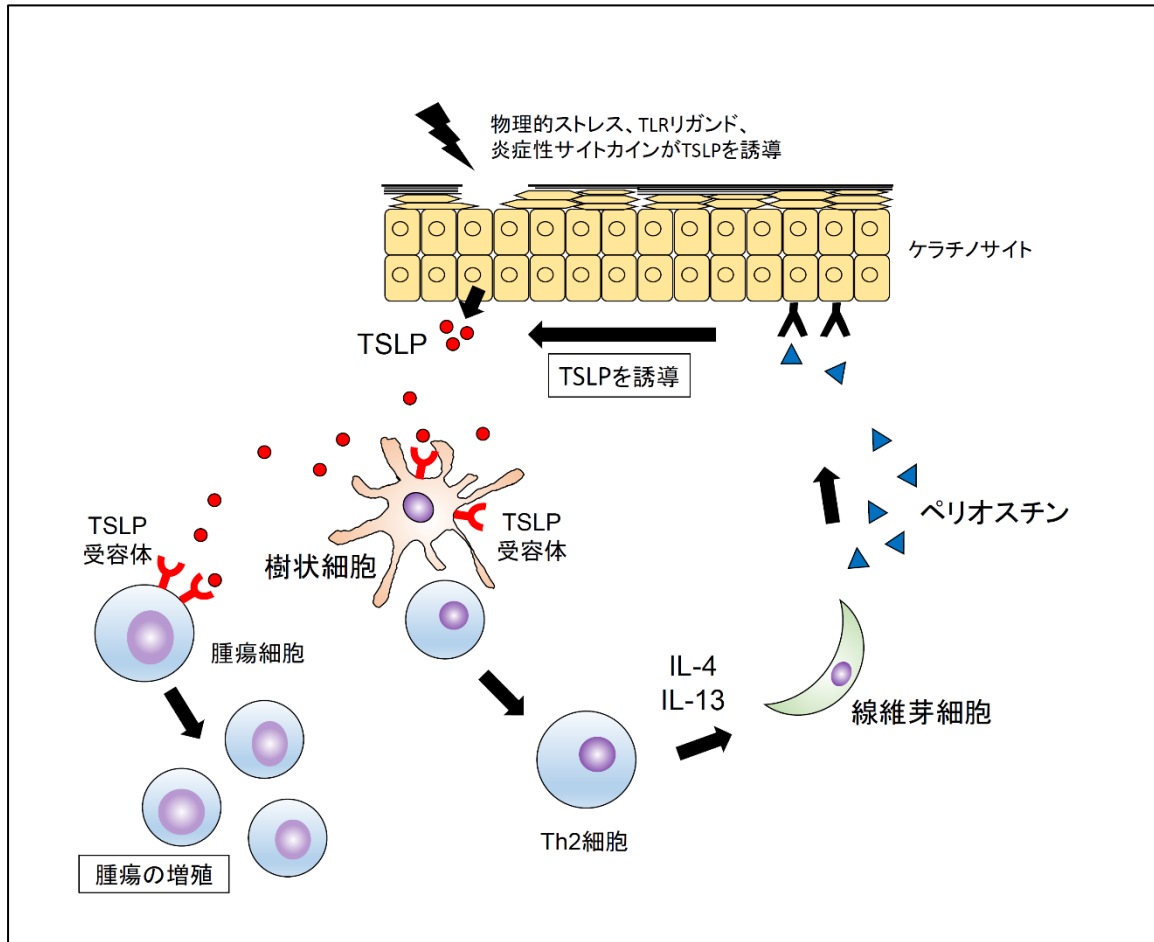


図 11 CTCL における TSLP、ペリオスチンの作用

ケラチノサイトより産生された TSLP は樹状細胞を介して Th2 細胞の分化・増殖を誘導し、Th2 型優位の微小環境を形成する。Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 の刺激を受けた線維芽細胞よりペリオスチンが産生され、ケラチノサイトからの TSLP 産生を一層増強させる。一方、TSLP は CTCL 腫瘍細胞にも直接作用し腫瘍細胞からの Th2 型サイトカインの誘導、さらには腫瘍細胞の生存・増殖に寄与する。