

論文の内容の要旨

論文題目 皮膚T細胞リンパ腫におけるTSLPの役割

氏名 高橋 菜穂美

皮膚 T 細胞リンパ腫は皮膚を原発とする非ホジキンリンパ腫である。菌状息肉症とセザリ－症候群に代表され、前者は異形リンパ球の表皮内浸潤を特徴とし緩徐に経過する症例が多いのに対し、後者は末梢血中の腫瘍細胞、紅皮症、表在リンパ節腫脹を特徴とし急速に進行する症例が多い。皮膚 T 細胞リンパ腫の病態はまだ不明な点が多いが、腫瘍細胞がメモリーCD4 陽性 T 細胞由来であること、Th2 型の微小環境を有することが知られている。Th2 型の免疫応答を示す皮膚疾患としてはアトピー性皮膚炎があり、その患者血清では IL-4、IL-13 などの Th2 型サイトカインが高値を示す。アトピー性皮膚炎の病勢マーカーとして報告されているケモカインには thymus and activation-regulated chemokine (TARC)、cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) があるが、これらは菌状息肉症やセザリ－症候群においても病期の進行とともに血清中の値が上昇することが報告されており、さらに CTCL の病勢マーカーである乳酸脱水素酵素 (LDH) や可溶性 interleukin (IL)-2 受容体と正の相関を示す。アトピー性皮膚炎と皮膚 T 細胞リンパ腫は炎症と腫瘍という異なる疾患ではあるが、その背景には一部共通した免疫学的側面があると考えられる。

今回我々が研究した Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) とペリオスチンは、いずれもアトピー性皮膚炎の病態への関与が報告されている。TSLP は Th2 型の免疫応答を誘導するサイトカインで皮膚ではケラチノサイトより産生される。アトピー性皮膚炎患者皮膚では TSLP が高発現し、Th2 優位の微小環境を誘導するケモカインや病勢マーカーと強い正の相関を示すことが知られている。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から産生される細胞外マトリックス蛋白の一種であり、アトピー性皮膚炎患者皮膚で高発現し、重症度と有意に相関することが報告された。アトピー性皮膚炎においてはペリオスチンが 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 型免疫応答を誘導し、炎症の慢性化・遷延化に寄与する可能性が示唆されている。今回我々はアトピー性皮膚炎と類似した側面を有する、皮膚 T 細胞リンパ腫において、TSLP とペリオスチンの役割を解明することを研究の目的とした。

最初に、CTCL 患者皮膚の TSLP とペリオスチンの発現を調べた。皮膚より抽出した mRNA を用いて TSLP とペリオスチンの発現を比較すると、健常者と比較し CTCL 患者皮膚では有意に高い値を示していた。さらに TSLP およびペリオスチンの mRNA は Th2 型サイトカインである IL-4 mRNA と有意な相関がみられた。免疫組織染色を用いて検討したところ、CTCL 病変皮膚では TSLP とペリオスチンが高発現していた。

次に線維芽細胞を用いて Th2 型サイトカインによるペリオスチンの産生を検討した。IL-4 で刺激した CTCL 病変皮膚由来線維芽細胞と健常皮膚由来線維芽細胞でペリオスチンの産生を比較すると、ペリオスチン mRNA、培養上清中のペリオスチンは前者で有意に高かった。IL-13 で刺激した場合も同様の結果であった。血清中のペリオスチンを比較すると、CTCL 患者では健常者と比較し有意に上昇しており、CTCL の病勢マーカーである LDH や TARC と正の相関を示していた。

次に TSLP の作用経路について検討した。TSLP 受容体についてはこれまでに樹状細胞に発現することが報告されており、TSLP は樹状細胞を介して T 細胞に作用することが知られていた。しかしながら、近年、TSLP が T 細胞に直接作用するという報告が出てきており、我々は腫瘍細胞に TSLP 受容体が発現している可能性について検討した。CTCL 細胞株の細胞表面ではセザリー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 TSLP 受容体の発現をみとめたが、aggressive CTCL の細胞株である HH 細胞では発現がみられなかった。この結果を受けて、Hut78 細胞と HH 細胞を用いて TSLP のシグナル伝達経路で重要とされる STAT5 のリン酸化を検討した。TSLP 受容体を発現する Hut78 細胞では TSLP 刺激による STAT5 のリン酸化をみとめ、TSLP 受容体を発現しない HH 細胞ではリン酸化はみとめられなかった。

次に TSLP 刺激による腫瘍細胞からの Th2 型サイトカインの産生について検討した。Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞を TSLP で刺激し、IL-4 および IL-13 mRNA の発現と培養上清中 IL-4、IL-13 タンパク量を解析した。Hut78 細胞と MJ 細胞では TSLP の用量依存的に IL-4、IL-13 mRNA の発現は高くなっていた。一方、HH 細胞では TSLP 刺激による変化はみられなかった。培養上清中では Hut78 細胞は TSLP 刺激により IL-4 と IL-13 の有意な上昇をみとめ、さらに STAT5 inhibitor 添加によって有意に抑制された。一方、HH 細胞では TSLP 刺激による IL-4、IL-13 の上昇はいずれもみられなかった。次にセザリー症候群患者 PBMC を用いて TSLP 受容体の発現および Th2 型サイトカインの産生について検討した。セザリー症候群患者 3 名中 2 名では TSLP 受容体の高発現をみとめ、残る 1 名では発現はわずかであった。これらの PBMC を TSLP で刺激すると IL-4、IL-13 mRNA は有意に上昇した。皮膚組織を用いた TSLP 受容体の免疫組織染色では菌状息肉症紅斑

期、扁平浸潤期、腫瘍期の病変部では真皮浸潤細胞の 30～50%が陽性を示し、セザリ一症候群の皮膚ではほぼすべての浸潤細胞が陽性を示していた。以上の結果より、TSLP 受容体を発現する CTCL 腫瘍細胞では、TSLP の刺激によって STAT5 リン酸化を介し、Th2 型サイトカインの産生が誘導される可能性が示唆された。

TSLP と腫瘍に関しては、皮膚リンパ腫以外の悪性腫瘍において TSLP 受容体が腫瘍細胞表面に発現することが報告されている。我々は TSLP 受容体が CTCL 腫瘍細胞表面に発現するという結果を受けて、さらに TSLP による腫瘍細胞の増殖への影響について検討した。CTCL 細胞株の Hut78 細胞、MJ 細胞、HH 細胞を TSLP で刺激後、その細胞数を計測すると、Hut78 細胞と MJ 細胞では無刺激と比較し TSLP 刺激による有意な増加をみとめ、さらに STAT5 inhibitor の添加によってこれらの細胞増殖は抑制された。一方、HH 細胞では TSLP 刺激による細胞数の変化はみられなかった。次にマウスリンパ腫細胞株を用いて TSLP による細胞増殖効果について検討した。マウスリンパ腫細胞株の EL-4 細胞、マウス T 細胞リンパ腫細胞株の MBL-2 細胞、マウス悪性黒色腫細胞株の B16 細胞より抽出した mRNA を用いて TSLP 受容体の発現を調べると、EL-4 細胞と MBL-2 細胞では TSLP 受容体 mRNA を高度に発現していた。これらの細胞を TSLP で刺激して細胞数を計測すると EL-4 細胞と MBL-2 細胞では無刺激と比較し TSLP 刺激による有意な細胞数の増加をみとめた。一方、B16 細胞では細胞数の変化はみられなかった。In vivo における実験では、野生型マウス C57BL/6 に EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞を皮下注射し、第 0、4、7、11 日目に抗 TSLP 抗体を腹腔内に注射し、腫瘍体積の変化を測定した。EL-4 細胞接種マウス、MBL-2 細胞接種マウスでは抗 TSLP 抗体群で腫瘍体積の有意な縮小がみられた。一方、B16 細胞接種マウスでは抗 TSLP 抗体群で腫瘍体積の増加をみとめた。それぞれの皮膚から抽出した mRNA では EL-4 細胞、MBL-2 細胞、B16 細胞すべての抗 TSLP 抗体群で IFN- γ mRNA が低い傾向がみられた。以上の結果からは、マウス皮膚では抗 TSLP 抗体が抗腫瘍免疫を抑制し、その結果、B16 細胞接種マウスでは腫瘍が増大したと考えた。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 TSLP の腫瘍細胞への直接的な増殖作用を抑制した結果であると考えた。

要約すると、CTCL 病変皮膚では TSLP とペリオスチンが高発現しており、Th2 型のサイトカインと有意な相関がみられた。CTCL 病変皮膚由来の線維芽細胞では IL-4、IL-13 の刺激によるペリオスチンの産生をみとめ、CTCL 患者血清中のペリオスチンは CTCL の病勢と有意に相関していた。TSLP 受容体は CTCL 腫瘍細胞

胞表面にも発現をみとめ、それらの腫瘍細胞を TSLP で刺激すると Th2 型のサイトカインが誘導された。さらに TSLP による CTCL 腫瘍細胞の増殖作用を検討すると、TSLP 受容体の発現をみとめた腫瘍細胞株では TSLP 刺激によって腫瘍細胞の増殖がみられた。*In vivo* では抗 TSLP 抗体によって腫瘍の縮小をみとめ、内因性 TSLP の直接的な作用による腫瘍増殖を抑制した結果であると考えた。以上のことから、CTCL において TSLP とペリオスチンが Th2 型の微小環境を誘導するとともに、TSLP が CTCL 腫瘍細胞の増殖に重要な役割をもつことが示された。TSLP は未だ完治が困難とされる CTCL の新たな治療の標的となり得る可能性がある。内因性の TSLP の抑制や TSLP 受容体に対するアンタゴニストの開発など、本研究が将来的に創薬へとつながることが期待される。