

論文の内容の要旨

論文題目 ブレオマイシン誘発皮膚線維化モデルにおける CD103 陰性真皮樹状細胞の役割

氏名 三浦 俊介

皮膚線維化は全身性強皮症、慢性移植片対宿主病 (cGvHD) といった全身性疾患や限局性強皮症、ケロイド、および肥厚性瘢痕などの皮膚限局性疾患の間で共通の病態である。皮膚線維化に対してはステロイドや免疫抑制薬が一定の治療効果を示すことから免疫細胞がそのプロセスにおいて中心的な役割を担うと考えられるが、これら治療薬の有効性は個々の症例によって様々である。このように皮膚線維化と免疫異常を解明することは、新たな治療につながる知見が得られる可能性があると考えられる。

樹状細胞 (DC) は生体において分化系列、成熟段階の異なる多様なサブセットとして末梢非リンパ組織やリンパ組織に広く存在している。その抑制系作用に注目すると、特定の DC サブセットがさまざまな Treg 細胞の誘導、増幅を介して免疫寛容を誘導することが明らかになりつつある。例えば CD103⁺腸管 DC と真皮 CD103⁺CD11b⁺ DC は RALDH2 発現を介してレチノイン酸産生を亢進し、iTreg への分化を促進する。これら DC の免疫疾患での役割が注目されているが、疾患状態から得られた DC の多面的な性状解析が、免疫疾患の発症・増悪機構の解明につながることを期待される。

ビタミン A 代謝産物レチノイン酸は、免疫細胞の機能や分化・増殖に影響を与え、免疫系の構築、免疫反応の促進・制御に関与する。レチナルからレチノイン酸への反応を触媒する酵素、RALDH の発現は DC を含むごく一部の細胞に限られており、この酵素の発現がレチノイン酸産生能力の鍵を握るとされている。前述の内容と総合して、CD103 陰性分画の DC が線維性皮膚疾患の疾患制御に寄与している可能性は十分に考えられる。

本研究は、*Cd103*^{-/-}マウスを用いてブレオマイシン (BLM) 誘発線維化モデルマウスを作成し、皮膚線維化の病態における真皮樹状細胞の役割について検討した。また得られた結果をもとに線維性皮膚疾患のヒト皮膚組織でも検討することにより、皮膚線維化に対する新しい治療法に結びつけることを目的とした。

CD103 欠損が皮膚線維化に及ぼす影響を検討した。CD103 欠損は BLM 投与による真皮肥厚と皮膚のコラーゲン含有量が有意に抑制した。また CD103 欠損は細胞外基質に関連した遺伝子である *Coll1a1*、*Coll1a2*、*Col3a1*、および *Col5a1* 遺伝子および線維化を促進する細胞成長因子である *Tgfb1* および *Ctgf* 遺伝子の mRNA 発現量を有意に抑制し、また免疫染色に

において CTGF 陽性細胞数を減少させた。以上の結果から、CD103 は細胞成長因子の発現を調節し、またコラーゲンの発現を抑制することで BLM 依存性皮膚線維化の過程に重要な役割を担うことが示された。

CD103 欠損が炎症に及ぼす影響を評価した。CD3、B220、および F4/80 の免疫染色とトルイジンブルー染色においては、浸潤する T 細胞、B 細胞、マクロファージ、および肥満細胞数に有意差はみられなかった。しかし BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウスは BLM を投与した WT と比較して *Il4* 遺伝子の mRNA 量を有意に抑制し、*Il10* 遺伝子の mRNA 量を有意に亢進した。また有意差は得られなかったものの、*Ifng* 遺伝子および *Il17a* 遺伝子量の平均値は、BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウスにおいて BLM を投与した WT と比較して低下していた。以上より CD103 の欠損により、CD4⁺エフェクター T 細胞の働きがおそらく Treg の作用を介して広く抑制され、炎症抑制を介して BLM 誘発の皮膚線維化を抑制することが示唆された。

さらに我々は CD4⁺T 細胞に着目し、CD103 欠損が Th1/Th2 および Th17/Treg 環境に及ぼす影響をフローサイトメトリーで検討した。皮膚所属リンパ節においては CD4⁺T 細胞中の IFN- γ 、IL-4、IL-17A 産生細胞の割合に変化はみられなかったが、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞の割合は BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウスで有意に増加した。一方で真皮においては CD4⁺T 細胞中の IFN- γ 、IL-4、IL-17A 産生細胞の割合は、BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウスで有意に減少した一方で、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T 細胞の割合は *Cd103*^{-/-}マウスで有意に増加した。この結果から、BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウスの皮膚、および皮膚所属リンパ節において iTreg への分化が促進されていることが示唆されたが、特に皮膚において Treg が CD4⁺エフェクター T 細胞の働きを強く抑制していることが考えられた。

我々は DC 分画に注目した。BLM 投与は皮膚所属リンパ節において CD11b⁺CD103⁻分画の細胞数を有意に増加させた。また、BLM 投与は真皮において CD11b⁻CD103⁻分画の細胞数を有意に増加させ、CD11b⁻CD103⁺分画の細胞数を有意に減少させた。注目すべきことに、CD103 欠損はこれら細胞分画に強く影響していた。PBS を投与したマウスの皮膚所属リンパ節において、CD103 欠損は CD11b⁻CD103⁻DC 数を有意に減少させ、CD11b⁺CD103⁻の細胞数を有意に増加させた。また PBS を投与したマウスの真皮において、CD11b⁻CD103⁻分画の細胞数を有意に増加させた。さらに重要なことに、BLM を投与した WT と *Cd103*^{-/-}マウスとで比較すると、CD103 欠損は CD11b⁻CD103⁻DC 数を有意に増加させ、CD11b⁺CD103⁻分画の DC 数を有意に減少させた。CD103 欠損は BLM 刺激などの要因によって修飾・影響を受けて DC 分画を顕著に変化させることが示されたが、BLM 投与下における Treg の誘導には、BLM を投与した *Cd103*^{-/-}マウス真皮において特に増加していた、CD11b⁻CD103⁻分画の DC が関与している可能性が示唆された。

RALDH の主要なアイソフォーム RALDH1、RALDH2、および RALDH3 について、BLM を投与したマウス皮膚における mRNA 発現量を検討した。*Raldh2* 遺伝子の mRNA 量は WT および *Cd103*^{-/-}マウス両者において、BLM 投与によって有意に抑制された。RALDH2 は CD11b⁺CD103⁻DC より産生されるが、この結果から、BLM を投与したマウスにおいては、この DC 分画は皮膚における iTreg の誘導にあまり関与していないことが示唆された。一方

で、*Raldh1* 遺伝子の mRNA 量は BLM を投与した *Cd103*^{-/-} マウスで有意に増加していたが、BLM を投与した WT では変化がなかった。さらに、*Raldh3* 遺伝子の発現量は BLM を投与した WT も *Cd103*^{-/-} マウスも変化がみられなかった。フローサイトメトリーでは、RALDH を産生する DC の割合は、BLM を投与した *Cd103*^{-/-} マウスにおいて WT と比較して有意に増加していた。さらに、RALDH を産生する DC の 90% 以上は CD11b⁺CD103⁻ 分画の DC であった。加えて、RALDH1 と CD11c の蛍光 2 重免疫染色を施行したところ、RALDH1 陽性 DC 数は BLM を投与した *Cd103*^{-/-} マウスの背部皮膚組織において WT と比較して有意に増加していた。BLM を投与した *Cd103*^{-/-} マウス真皮において CD11b⁺CD103⁻ 分画の DC が増加していたが、以上の結果から、BLM 投与下の皮膚においては、CD11b⁺CD103⁻ 分画の DC が RALDH1 発現を介して iTreg を誘導することが示唆された。

我々はさらに、WT および *Cd103*^{-/-} マウスに対して BLM 投与前に *Raldh1* siRNA を投与し、RALDH1 が iTreg の誘導に及ぼす影響を検討した。*Raldh1* siRNA 投与下において、BLM を投与した WT および *Cd103*^{-/-} マウスの両群とも、*Raldh1* siRNA 非投与群と比較して RALDH 活性が有意に低下した。フローサイトメトリーにおける RALDH 活性の測定は RALDH1、RALDH2、RALDH3 の 3 つのアイソフォームを区別できないが、以上の結果より、BLM 誘発皮膚線維化モデルにおける RALDH 活性は RALDH1 依存性であることが示された。さらに *Raldh1* siRNA 投与群では、BLM を投与した WT および *Cd103*^{-/-} マウスの両群とも、*Raldh1* siRNA 非投与群と比較して Treg の割合が有意に低下した。以上より、BLM 誘発の皮膚線維化の過程において、真皮 DC の産生する RALDH1 による iTreg の誘導が中心的な役割を担っていることが示唆された。

最後に、ヒト線維性皮膚疾患組織に対して、RALDH1 と CD11c の蛍光 2 重免疫染色を行った。RALDH1 陽性 DC 数は、健常人コントロールと比較してこれら線維性皮膚疾患において低下していた。全身性強皮症患者皮膚組織においては、びまん皮膚硬化型全身性強皮症の皮膚組織の方が、限局皮膚硬化型全身性強皮症の皮膚組織と比較して RALDH1 陽性 DC 数が低下していた。以上より、RALDH1 陽性 DC 数は皮膚線維化の程度と負の相関を持つことが示唆された。

本研究は CD11b⁺CD103⁻ 分画の真皮 DC が RALDH1 を発現する役割をもつことを初めて報告し、また線維化における DC の関与を報告した初の研究である。本研究より皮膚線維化をきたす皮膚疾患の治療として、真皮 DC、特に CD11b⁺CD103⁻ DC が治療のターゲットになりうることを示された。