

博士論文

CXCL17 は骨髄由来免疫抑制細胞と制御性 T 細胞を誘導し  
てイミキモト誘発乾癬様皮膚炎を抑制する

岡知徳

CXCL17 は骨髄由来免疫抑制細胞と制御性 T 細胞を誘導してイミキモト誘発乾癬様皮膚炎を抑制する

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

岡 知徳

## 目次

1) 要旨.....	4
2) 序文.....	6
3) 研究方法 .....	10
1) マウス	
2) 皮膚組織	
3) 細胞培養	
4) RNA 抽出と RT-PCR	
5) イミキモド誘発乾癬様皮膚炎	
6) マウス皮膚の組織学的解析	
7) ヒト皮膚検体の組織学的解析	
8) 蛍光免疫染色	
9) ELISA	
10) フローサイトメトリー解析	
11) MDSC と Treg の単離	
12) ケモタキシスアッセイ	
13) Gpr35 の発現の確認	
14) MDSC、Treg の depletion	
15) 統計学的解析	
4) 結果.....	21
1) 乾癬病変部皮膚における CXCL17 の発現	
2) サイトカイン刺激後の角化細胞の CXCL17 の発現の解析	
3) イミキモド誘発乾癬様皮膚炎への CXCL17 の影響の解析	

4)	CXCL17 投与の MDSC、Treg への影響の解析	
5)	MDSC、Treg の Gpr35 の発現と CXCL17 への走化性の解析	
6)	CXCL17 の効果に対する抗 CCL5 抗体、抗 CCL4 抗体投与の影響の解 析	
7)	CXCL17 の効果に対する抗 Gr-1 抗体、抗 CD25 抗体投与の影響の解析	
5)	考察.....	<b>28</b>
6)	結論.....	<b>34</b>
7)	謝辞.....	<b>35</b>
8)	文献.....	<b>36</b>
9)	図表.....	<b>43</b>

## 1. 要旨

CXCL17は様々な腫瘍に発現し、myeloid-derived suppressor cell (MDSC) を誘導して腫瘍増殖を促進することが知られている。MDSCはCCL5を介して腫瘍部位にregulatory T cell (Treg) を誘導して腫瘍免疫を抑制する機能が知られている。乾癬患者皮膚のmRNAでCXCL17の発現が健常皮膚と比べて上昇していた。アトピー性皮膚炎や皮膚T細胞リンパ腫では同様の傾向は見られなかった。免疫染色でCXCL17は乾癬皮膚の主に表皮に発現していた。In vitroにおいてヒト表皮角化細胞をIFN- $\gamma$ で刺激すると濃度依存的にCXCL17の発現が上昇した。乾癬動物モデルであるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎においてもCXCL17の発現は上昇していたため、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎におけるCXCL17の役割を検討した。イミキモド外用開始前と開始後にCXCL17タンパクを耳に皮下注射したところ、コントロールであるPBSのみの注射と比べて、耳の厚さの変化が減弱し、乾癬に関わる炎症性サイトカインの発現が低下し、組織学的に真皮に浸潤する細胞の数が低下した。皮膚に浸潤する細胞をフローサイトメトリーで評価したところ、CD11b陽性Gr-1陽性のMDSCとCD4陽性CD25陽性のTregの数がコントロールと比べて増えており、蛍光免疫染色でもCD11b陽性Gr-1陽性のMDSCとFoxp3陽性のTregの数がコントロールと比べて増えていた。In vitroにおいてMDSCはCXCL17に遊走したがTregは遊走しなかった。MDSCはCXCL17

の受容体である Gpr35 の mRNA を発現したが、Treg は発現しなかった。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎に CXCL17 を皮下注射すると同時に抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体を同時に注射したところ、CXCL17 のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を抑制する効果は打ち消されて、PBS とコントロール IgG を同時に皮下注射した群と耳の厚さや炎症性サイトカインの発現は同程度になった。この結果は CCL5 や CCL4 が CXCL17 の抗炎症作用において重要な役割を果たしていることを示唆する。これらをまとめると、CXCL17 は MDSC と Treg を誘導することでイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を抑制することがわかった。この機能は乾癬における過剰な免疫応答を抑制するのに重要である可能性が考えられた。

## 2. 序文

CXCL17は新しく発見された119のアミノ酸からなるCXCケモカインファミリーの一つで、構造由来タンパク分析と相補的DNAマイクロアレイ解析により発見された(1, 2)。CXCL17は気管、胃、大腸などの粘膜組織に発現し(1, 3)、上皮細胞や血管内皮細胞に強く発現すると報告されている(1)。一方でCXCL17は悪性腫瘍でも発現が報告されている。肝細胞癌ではCXCL17は腫瘍浸潤性好中球に主に産生され、時に腫瘍細胞自体でも産生される(4)。CXCL17の受容体は最近GPR35/CXCR8と同定され、これは消化管や肺を含む粘膜組織に発現するとされている(5)。GPR35はマクロファージや樹状細胞、顆粒球に発現するとされている(5)。

CXCL17は単球、マクロファージ、成熟または未熟樹状細胞に対する細胞走化因子として作用する(1, 6)。複数の研究によりCXCL17が腫瘍増殖を促進することが報告されている(1, 4, 6, 7, 8)。CXCL17は乳癌、肺癌、肝細胞癌、大腸癌など複数の腫瘍細胞で発現する(1, 4, 6, 7, 8)。肝細胞癌ではCXCL17の発現が予後不良の独立した予測因子となる(4)。さらにCXCL17は動物モデルでmyeloid-derived suppressor cell (MDSC)を腫瘍部位に誘導し、血管新生を誘導することで腫瘍増殖を促すとされている(7)。一方でCXCL17は初期の膵臓癌の腫瘍新生において、腫瘍部位に樹状細胞の集積を促すことで抗腫瘍効果に関わることも報告されてい

る(9)。過去の報告では CXCL17 の腫瘍以外の疾患との関連も報告されており、CXCL17 はマウスのマクロファージ由来の炎症性サイトカインの発現を抑制し、抗炎症作用を発揮した(10)。CXCL17 は間質性肺炎における粘膜において抗菌活性を持つケモカインとして重要であるとも報告されている(3)。

乾癬は表皮角化細胞の異常な増殖、血管増殖、表皮と真皮の炎症細胞浸潤により特徴づけられる、厚い鱗屑を伴う紅斑を呈する頻度の高い慢性炎症性皮膚疾患である。乾癬には皮膚症状を主体とした尋常性乾癬以外に、関節炎を伴う関節症性乾癬、紅皮症を呈する乾癬性紅皮症、発熱などの全身症状を伴う膿疱性乾癬などの病型もあり、症状や必要とする治療の強度は様々である。病因は不明であるが、遺伝的素因と環境因子のどちらも関与する多因子疾患と考えられており、肥満やメタボリック症候群の合併が多いことがよく知られている。重症例では心血管疾患や虚血性脳血管障害のリスクも高いと推定されており、疫学調査では乾癬患者の寿命は非乾癬患者と比べて低かったという報告もされている(11)。

乾癬は一生涯にわたって続き、根治的治療がなく、皮膚症状は患者の生活の質に大きく影響する疾患である。治療は従来から使われてきたステロイドやビタミン D3 の外用薬、紫外線治療、レチノイド内服、シクロスポリン内服に加えて、近年では抗 TNF- $\alpha$  抗体、抗 IL-12/23p40 抗体、抗 IL-17 抗体などの生物学的製剤が開発され、皮膚症状の程度や関節症状などの合併症の有無により使い分けら



れる。生物学的製剤は乾癬に対して非常に有効であるが、薬剤費が非常に高価であることや感染症などの副作用が問題になることもあり、現在も病態解明、新規治療が必要とされている。

Regulatory T cell (Treg) は自己または非自己に対する免疫応答を抑制する役割を持つ T 細胞のサブセットで、表面マーカーとして CD4 と CD25 を発現する。転写因子 Foxp3 がマスター制御因子で、Treg の増殖と機能に関わる(12)。IL-10 は炎症性腸疾患などの自己免疫疾患の抑制に関わり(13)、IL-10 と Foxp3 はそれぞれ Treg の活性化マーカーとして知られる(14, 15)。Treg の量的減少や機能低下がヒトやマウスで重篤な自己免疫異常を起こすとされる(16)。乾癬患者の末梢血では Treg の数に変化はないが、Treg の機能異常があると報告されている(17)。MDSC は腫瘍の微小環境において免疫抑制に関与する(18, 19)、未分化な前駆骨髄細胞の複数の細胞からなる細胞であり(20)、T 細胞の増殖とサイトカイン産生を強力に抑制する。マウスにおいて MDSC は CD11b 陽性 Gr-1 陽性が特徴とされる(21)。Arginase 1 は MDSC の活性化マーカーとして報告されている(22)。最近、MDSC は乾癬において病変部皮膚に存在することが報告された(23)。

乾癬の病態を理解し、新たな治療戦略を見つけるため、動物モデルが重要である。Toll-like receptor 7 と 8 のリガンドであるイミキモドの局所外用はヒトの乾癬の皮疹によく似た皮膚炎を誘導することができる(24, 25)。イミキモド誘発乾

癬様皮膚炎モデルでは Th17 細胞と、IL-17/IL-22 産生  $\gamma\delta$ T 細胞が重要な役割を果たすことが知られている(26)。

本研究で乾癬とイミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスにおける CXCL17 の役割を検討することを目的とした。CXCL17 がイミキモド誘発乾癬様皮膚炎において、炎症を抑制する役割を果たしているかと仮説を立てた。

CXCL17 は乾癬の病変部皮膚の表皮で強発現していた。IFN- $\gamma$  刺激は濃度依存的にヒト表皮角化細胞の CXCL17 の発現を上昇させた。CXCL17 の皮下注射によりイミキモド誘発乾癬様皮膚炎は減弱し、同時に MDSC と Treg の皮膚への浸潤が増加していた。MDSC は GPR35 の mRNA を発現していたが、Treg は発現していないことを確認した。また *in vitro* において MDSC は CXCL17 に対して遊走したが、Treg は遊走しなかった。さらに CXCL17 の皮下注射と同時に抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体を同時に皮下注射すると CXCL17 の抗炎症作用が抑制された。これらの事実から CXCL17 は MDSC を誘導し、MDSC が CCL5 や CCL4 を介して Treg の遊走を起こしたと考えられる。CXCL17 は乾癬表皮における過剰な免疫応答を抑制するうえで重要な役割を果たしている可能性がある。

### 3. 研究方法

#### 1) マウス

C57BL/6 マウスを SLC ジャパンより購入し、Specific Pathogen Free 環境で維持、継代し、7 週から 11 週齢のマウスを実験に使用した。すべての動物実験は東京大学の動物実験委員会の承認（医-P10-134）を受けて行った。

#### 2) 皮膚組織

乾癬 20 名、アトピー性皮膚炎 10 名、皮膚 T 細胞リンパ腫 28 名の患者の病変部皮膚と正常コントロール 11 名から皮膚組織を回収し、mRNA を回収した。また乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫、各々 10 名ずつの病変部皮膚と正常コントロール 10 名からの皮膚組織を回収し、免疫染色を行った。正常コントロールは良性腫瘍の周囲の皮膚を用い、アレルギー、乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫の既往はなかった。すべての検体は日常の臨床業務で採取されたものである。東京大学の医学倫理委員会により本研究は承認され（承認番号 0695-(12)）、また本研究はヘルシンキ宣言の原則に則って行われている。すべての患者検体、正常コントロール検体を回収する際にインフォームドコンセントを得ている。

#### 3) 細胞培養

ヒト角化細胞の cell line である HaCaT 細胞は 75cm<sup>2</sup> の培養容器に抗菌薬入り 10%FBS 入り MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を培地として 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養、継代した。J774 細胞は 75cm<sup>2</sup> の培養容器に抗菌薬入り 10%FBS 入り RPMI (Thermo Fisher Scientific) を培地として 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養、継代した。正常表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte: NHEK) (KURABO industries, Osaka, Japan) は 75cm<sup>2</sup> の培養容器にヒト角化細胞増殖因子セットを混ぜた専用培地 Humedia-KB2 (KURABO industries) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養された。セミコンフルエントになったところで細胞はトリプシンで処理され、洗浄し、5 x 10<sup>5</sup> cells/ml で 2ml ずつ 6-well のプレートにまかれた。細胞がセミコンフルエントになったところで、培地は完全に除去し、血清無しの培地を加えた。同時に recombinant human IL-4、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-22、IL-17A (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を加えるかまたは何も加えないで、再度 37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境で培養された。IL-4 と TNF- $\alpha$  の濃度は 10 ng/ml、IFN- $\gamma$ 、IL-22、IL-17A の濃度は 0.1、1、10 ng/ml とした。24 時間後に上清を回収し、遠心して細胞破片を除去し、-80°C で凍結保存した。細胞は TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて製造者の指示通りに RNA を回収した。

#### 4) RNA 抽出と RT-PCR

mRNA はヒトおよびマウスの皮膚検体は RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて、細胞は Trizol Reagent を用いて回収した。相補的 DNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いた定量的 RT-PCR 法で ABI Prism 7000 sequence detector(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、CXCL17、IL-17A、IL-22、TNF- $\alpha$ 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19、IL-10、Foxp3、CCL5、Arginase 1 の mRNA の発現を測定した。すべての検体は GAPDH を内在性コントロールとして用いて、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法で相対的発現を測定した。それぞれの Primer の配列は以下のものを用いた。

murine GAPDH *forward*, 5'- CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3', *reverse*, 5'- TGT CAT CAT ACT GGC AGG TTT CT-3'; human GAPDH *forward*, 5'-ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA -3', *reverse*, 5'-CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA-3'; murine CXCL17 *forward*, 5'-TGT TGC TTC CAG TGA TGC TC-3', *reverse*, 5'-GCT GTG CTT TTC TCT TTG G-3'; human CXCL17 *forward*, 5'-ACC GAG GCC AGG CTT CTA-3', *reverse*, 5'-GGC TCT CAG GAA CCA ATC TTT-3'; murine IL-17A *forward*, 5'-CAG CAG CGA TCA TCC CTC AAA G-3', *reverse*, 5'-CAG GAC CAG GAT CTC TTG CTG-3'; murine IL-22 *forward*, 5'-AGC TTG AGG TGT CCA ACT TC-3', *reverse*, 5'-GGT AGC ACT CAT CCT TAG CAC TG-3'; murine TNF- $\alpha$  *forward*, 5'-CCA CCA CGC TCT

*TCT GTC TAC-3'*, reverse, *5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT-3'*; murine IL-12p35 forward, *5'-ACT CTG CGC CAG AAA CCT C-3'*, reverse, *5'-CAC CCT GTT GAT GGT CAC GAC-3'*; murine IL-12/IL-23p40 forward, *5'-CTC ACA TCT GCT GCT CCA CAA G-3'*, reverse, *5'-AAT TTG GTG CTT CAC ACT TCA GG-3'*; murine IL-23p19 forward, *5'-TGT GCC TAG GAG TAG CAG TCC TGA-3'*, reverse, *5'-TTG GCG GAT CCT TTG CAA GCA GAA -3'*; murine IL-10 forward, *5'-TTT GAA TTC CCT GGG TGA GAA-3'*, reverse, *5'-ACA GGG GAG AAA TCG ATG ACA-3'*; murine Foxp3 forward, *5'-CAC CCA GGA AAG ACA GCA ACC-3'*, reverse, *5'-GCA AGA GCT CTT GTC CATTGA-3'*; murine CCL5 forward, *5'-CAC TCC CTG CTG CTT TGC-3'*, reverse, *5'-CAC TTG GCG GTT CCT TCG-3'*; murine Arginase 1 forward, *5'-ATG GAA GAG ACC TTC AGC TAC-3'*, reverse, *5'-GCT GTC TTC CCA AGA GTT GGG-3'*。

##### 5) イミキモド誘発乾癬様皮膚炎

In vivo での CXCL17 の乾癬における役割を検討するために、7 週から 11 週齢の C57BL/6 野生型マウスに 31.25 mg のイミキモドクリーム (5% Beselna Cream; Mochida Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) を 6 日連続で外用してイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を誘発した(25)。25%イソステアリン酸 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan) を含有したワセリンをイミキモドクリームのコ

ントロールとして用いた。麻酔下でマウスに 20  $\mu$ l の PBS に 100 ng の recombinant mouse CXCL17 (R&D systems) を加えたもの、または PBS のみを 27 ゲージの注射器を用いて、イミキモド外用開始日、外用開始 2 日後と 4 日後の合計 3 回、イミキモドを外用する直前に右耳に皮下注射で投与した。イミキモドを外用する前から外用中に耳の厚さを dial thickness gauge 0.01mm (OZAKI MFG, CO.)を用いて過去の報告を参考に(27)経時的に測定した。抗 CCL3 抗体 (R&D systems)、抗 CCL4 抗体 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、抗 CCL5 抗体 (PeproTech) を CXCL17 と同時に皮下投与する際にはマウスは 3 群に分けられた。第一群は 2  $\mu$ g のコントロール IgG のみを含む 20  $\mu$ l の PBS、第二群は 100 ng の CXCL17 と 2  $\mu$ g のコントロール IgG を含む 20  $\mu$ l の PBS、第三群は 100 ng の CXCL17 と 2  $\mu$ g の抗 CCL3 抗体、抗 CCL4 抗体、抗 CCL5 抗体のどれかを含んだ 20  $\mu$ l の PBS を投与された。イミキモド外用を開始 7 日後にマウスの耳の皮膚組織を回収し、mRNA 回収、ヘマトキシリン・エオジン染色、蛍光免疫染色、フローサイトメトリーの解析に用いた。

#### 6) マウス皮膚の組織学的解析

マウスの耳の皮膚検体を 10%ホルマリンで固定して、パラフィン包埋した。6  $\mu$ m の厚さの切片を作り、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。浸潤する

リンパ球数と好中球数を光学顕微鏡の 400 倍の高倍率視野で計測した。リンパ球と好中球の評価は HE 染色において細胞と核の形態から、分葉した核を持つ細胞を好中球、クロマチンが濃く N/C 比の高い細胞をリンパ球と評価した。

#### 7) ヒト皮膚検体の組織学的解析

乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫の病変部の皮膚検体を用いて CXCL17 の免疫組織染色を行った。良性腫瘍の周囲の正常な皮膚を正常コントロールとして用いた。10%ホルマリンで固定され、パラフィン包埋された検体から 5  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成し、脱パラフィン処理した。これらの切片を anti-human CXCL17 抗体 (R&D systems) で染色し、ABC staining (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) で染色した。Diaminobenzidine を用いて反応させて発色し、その後マイヤー・ヘマトキシリンで核染色を行った。染色の程度を-、+、++の 3 段階で評価し、代表的な組織像を図 1-B に示し、またその結果を表 1 にまとめた。

#### 8) 蛍光免疫染色

イミキモド皮膚炎を起こした耳の皮膚に浸潤する MDSC と Treg を評価するため CD11b、Gr-1、Foxp3 の蛍光免疫染色を行った。6  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作成



し、アセトンで 20 分間固定した。rat anti-mouse Ly-6G (Gr-1) Ab (eBioscience, San Diego, CA, USA)を載せて 1 時間静置し、その後 FITC-conjugated goat anti-rat IgG (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)でさらに 1 時間静置した。さらに PE-conjugated anti-mouse CD11b Ab (BioLegend, San Diego, CA)で染色した。FITC-conjugated anti-mouse Foxp3 Ab (eBioscience)は Treg を同定するため用いた。核染色は 6-diamino-2-phenylindole (Vector Lab)を用いて 4°Cで行った。400 倍の視野を 4 か所で皮膚に浸潤する陽性細胞数を計測し、平均した。

#### 9) ELISA

NHEK の培養上清中の CXCL17 タンパク量を CXCL17 human ELISA kits (MyBioSource, Inc, San Diego, CA, USA)を用いて測定した。Optical densities を 450 nm とし、correction wavelength を 570 nm とし、Bio-Rad Model 550 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて吸光度を測定した。製造者の指示にあるようにスタンダードカーブを作成して濃度を計算した。

#### 10) フローサイトメトリー解析

皮膚に浸潤する細胞を回収するため、イミキモド外用し、CXCL17 または PBS を投与したマウスの耳の皮膚を採取し、脂肪組織を除いて表皮、真皮を含んだ

検体を Liberase TL (Roche, Basel, Switzerland)を含んだ RPMI に入れて 1 時間 15 分 37°C で静置し、その後 0.1% DNase I (Sigma-Aldrich) を最終濃度が 0.05% になるように加えてさらに 15 分間静置した。得られた細胞懸濁液を 100、70、40  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュのフィルターを順番に通過させ、過去に報告されているように(28)、1000 g、室温で 20 分間遠心分離した。FACS buffer で 2 回洗浄し、APC-conjugated mAb against CD11b と PE/Cy7-conjugated mAb against Gr-1 または APC-conjugated mAb against CD4 と PE/Cy7-conjugated mAb against CD25 (BioLegend)を用いて 30 分間 4°C で染色した。最後に FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、FACSuite (BD Biosciences)を用いて解析した。

#### 1 1) MDSC と Treg の単離

C57BL/6 マウスの脾臓から、MDSC の単離は Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて、Treg の単離は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec)を用いて、製造者の指示に従って行った。Treg の単離と同時に CD4 陽性 CD25 陰性細胞も単離した。

## 1 2) ケモタキシスアッセイ

C57BL/6 マウスの脾臓から回収した MDSC と Treg をケモタキシスアッセイに用いた。ケモタキシスアッセイは 48-Well Micro Chemotaxis Chamber と filters with 5- $\mu$ m pore (Neuro Probe, Inc, Gaithersburg, MD, USA)を用いておこなった。

MDSC または Treg (5 x 10<sup>3</sup> cells/48 well-plate) を含んだ細胞懸濁液は 5- $\mu$ m pore のフィルターの上に 8 well ずつ置かれ、一方でフィルターの下のチャンバーに recombinant mouse CXCL17 protein (R&D Systems)を含む RPMI1640 と何も含まない RPMI1640 のみをそれぞれ入れた。CXCL17 の濃度は 10、100、200 ng/ml とした。37°C で 18 時間培養したあと、CXCL17 に遊走して下のチャンバーに落ちた細胞数を顕微鏡下で計測した。細胞数はフィルターの孔の中心を含む 200 倍の視野を 25 か所で計測した。

## 1 3) Gpr35 mRNA の発現確認

MDSC、Treg、CD4 陽性 CD25 陰性細胞、マウスのマクロファージの cell line である J774 を TRIzol Reagent (Invitrogen)で処理して、total RNA を回収した。

相補的 DNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて合成し

た。Murine *Gpr35* primers は *forward*, 5'-GGG GTA CTG GCT CTC CCT AC -3' and *reverse*, 5'-CCC AAG AGT CAA CGT GCT TT-3'を用いた。Thermal Cycler-Life

ECO (Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd, Hangzhou, China) を用いて PCR で増幅した。PCR は 94°C 2 分、94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 2 分を 35 サイクルやり、最後に 72°C 2 分で伸長を行った。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide で可視化し、UV light 下で確認した。

#### 1 4) MDSC、Treg の depletion

イミキモド外用を開始する前日に腹腔内に抗 Gr-1 抗体、抗 CD25 抗体、またはコントロール IgG を 500 µg/ml の濃度に PBS で希釈し 500 µl を腹腔投与した。

イミキモド外用開始後は CXCL17 を投与した他の実験と同様に day0、day2、day4 のイミキモド外用直前に CXCL17 または PBS のみを投与し、耳の厚さを経時的に記録した。MDSC と Treg の depletion の確認のために抗 Gr-1 抗体投与、抗 CD25 抗体投与、またはコントロール IgG 投与 1 日後に血液を採取した。採取した血液を FACS buffer で 2 回洗浄し、MDSC については FITC-conjugated mAb against CD3、PE-conjugated mAb against CD19、APC-conjugated mAb against CD11b、PE/Cy7-conjugated mAb against Gr-1 (BioLegend)を用いて、Treg については FITC-conjugated mAb against CD3 と PE-conjugated mAb against CD4 と PE/Cy7-conjugated mAb against CD25 (BioLegend)を用いて 30 分間 4°C で染色し、lysis buffer で 2 回洗浄し、赤血球を除去した後に FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences)、FACSuite (BD Biosciences)を用いて解析した。

MDSC は CD3 陰性 CD19 陰性細胞の中で CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞の割合を評価した。Treg はリンパ球をゲートし、CD3 陽性細胞の中で CD4 陽性 CD25 陽性細胞の割合を評価した。

#### 1.5) 統計学的解析

統計学的解析は Prism Version 6 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。Mann-Whitney U-test を 2 群間の平均の有意差の検出に用い、多群間解析に Kruskal-Wallis test を用いた。P 値は 0.05 未満を統計学的有意とみなした。

## 4. 結果

### 1) 乾癬病変部皮膚における CXCL17 の発現

皮膚疾患における CXCL17 の関与を調べるため、最初にアトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫、乾癬の病変部皮膚と正常皮膚における CXCL17 の mRNA の発現を測定した。CXCL17 の発現量は乾癬において正常皮膚と比べて有意に上昇していた (図 1-A)。一方で、アトピー性皮膚炎と皮膚 T 細胞リンパ腫の病変部皮膚における CXCL17 の発現は正常皮膚と同等であった。アトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫、乾癬、正常皮膚で CXCL17 の免疫染色を行い、乾癬の表皮角化細胞が CXCL17 を強く発現していることを確認した (図 1-B、表 1)。このように CXCL17 の発現は乾癬病変部皮膚において亢進していた。

### 2) サイトカイン刺激後の角化細胞の CXCL17 の発現の解析

表皮角化細胞における CXCL17 の発現の制御を調べるため、HaCaT 細胞とヒト正常表皮角化細胞を IL-4、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-22、IL-17A の刺激を加えた培養液、または何も加えていない培養液のみで 24 時間培養したあとに CXCL17 の発現量を real-time RT-PCR で測定した。IFN- $\gamma$  は HaCaT 細胞の CXCL17 の発現を有意に上昇させた (図 2-A)。IL-4 (10 ng/ml)、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) でそれぞれ刺激をしても CXCL17 の発現に変化はなかった (図 2-A)。IFN- $\gamma$  刺激で

HaCaT 細胞の CXCL17 の発現が有意に上昇したため、IFN- $\gamma$  同様に乾癬において表皮で発現が上昇し、乾癬の病態に関わる IL-22、IL-17A についても検討した。IL-22 (0.1, 1, 10 ng/ml)、IL-17A (0.1, 1, 10 ng/ml) で HaCaT 細胞を刺激しても CXCL17 の発現に有意な変化はなかった (図 3-A、3-B)。ヒト正常表皮角化細胞を IFN- $\gamma$  で刺激して培養すると、CXCL17 の mRNA の発現量は培養液のみで培養したもの比べて有意に上昇していた (図 2-B)。IFN- $\gamma$  の濃度を振って確認したところ、IFN- $\gamma$  はヒト正常表皮角化細胞の CXCL17 の mRNA の発現量を濃度依存的に上昇させていた (図 2-C)。さらに IFN- $\gamma$  はヒト正常表皮角化細胞の培養上清における CXCL17 の蛋白量を濃度依存的に上昇させていた (図 2-D)。このように IFN- $\gamma$  刺激は角化細胞における CXCL17 の発現を上昇させた。

### 3) イミキモド誘発乾癬様皮膚炎への CXCL17 の影響の解析

イミキモド誘発乾癬様皮膚炎はマウスの乾癬動物モデルとして広く使われている(26)。イミキモド外用 2 日後のマウスの耳における CXCL17 の mRNA の発現は基剤のみを外用した場合に比べて有意に上昇していた (図 4-A)。この結果はヒト乾癬患者皮膚における CXCL17 の発現の亢進と一致する (図 1)。マウスの耳に recombinant CXCL17 投与をしても臨床的、組織学的な変化は起こさな

かった。そこで、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における CXCL17 の効果を確認するため、イミキモド外用前と外用中に recombinant CXCL17 または PBS を耳に注射した。Recombinant CXCL17 投与は PBS 投与と比べてイミキモド外用 4 日後、7 日後の耳の厚さの変化を有意に減弱させた (図 4-B)。組織学的検討でもイミキモド外用 7 日後の CXCL17 を投与した耳は PBS を投与した耳と比べて組織学的に厚さが薄く、浸潤するリンパ球と好中球数が PBS 投与と比べて有意に減少していた (図 4-C、D)。

CXCL17 を投与した耳では IL-17A、IL-22、TNF- $\alpha$ 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19 といった乾癬の病態に関与する炎症性サイトカインの mRNA の発現レベルが低下していた (図 5-A)。一方で CXCL17 の投与は IL-10、Foxp3 の mRNA の発現レベルを上昇させており (図 5-B)、この結果から皮膚に Treg が活性化ないし数が増えていることが考えられた。CXCL17 を投与した群において Arginase 1、CCL5 の mRNA の発現量も PBS を投与したコントロール群と比べて同様に上昇しており (図 5-C)、MDSC の遊走が増加していることを示唆していた。このように CXCL17 の注射は、耳の厚さの変化やサイトカインの発現量、浸潤する細胞数から評価して、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の炎症を減弱させていた。CXCL17 は同時に Treg や MDSC に関与するマーカーの mRNA の発現量を増加させていた。



#### 4) CXCL17 投与の MDSC、Treg への影響の解析

CXCL17 を注射した耳で Treg、MDSC に関与するマーカーの mRNA の発現量が上昇していたため、これらの細胞の存在を皮膚において確認するため、蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色により CD11b 陽性 Gr-1 陽性 (MDSC) の細胞数が CXCL17 を注射した耳において PBS を注射した耳に比べて有意に増加したことが確認された (図 6-A、6-B)。Foxp3 陽性細胞 (Treg) の数も同様に CXCL17 注射群で有意に増加していた (図 6-A、6-B)。さらに皮膚に浸潤する CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞 (MDSC) と CD4 陽性 CD25 陽性細胞 (Treg) の細胞数をそれぞれフローサイトメトリーで評価した。CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞数、CD4 陽性 CD25 陽性細胞数は CXCL17 を注射した群において有意に増加していた (図 7-A、7-B)。このように CXCL17 の投与は皮膚に浸潤する MDSC、Treg の数を増加させた。

#### 5) MDSC、Treg の Gpr35 の発現と CXCL17 への走化性の解析

マウスのマクロファージの cell line である J774 と MDSC が Gpr35 mRNA を発現したが、Treg や CD4 陽性 CD25 陰性細胞はどちらも Gpr35 mRNA を発現しなかった (図 8-A)。次にケモタキシスアッセイで MDSC と Treg の CXCL17

に対する遊走能を確認した。CXCL17 (10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) に対して走化性を示した MDSC の細胞数は CXCL17 の濃度依存的に上昇し、培養液のみと比べて CXCL17 に対して有意に遊走した (図 8-B)。一方で Treg は CXCL17 に走化性を示さなかった (図 8-B)。このように MDSC は CXCL17 の受容体を発現し、CXCL17 に遊走したが、Treg は受容体を発現せず、CXCL17 に遊走しなかった。

#### 6) CXCL17 の効果に対する抗 CCL5 抗体、抗 CCL4 抗体投与の影響の解析

CCL5 は MDSC により産生され、Treg の遊走を促すのに重要である(29)。CXCL17 により誘導される抗炎症作用に対する CCL5 の役割を検討するため、recombinant CXCL17 と同時に抗 CCL5 抗体をイミキモド外用前と外用中に注射した。CXCL17 とコントロール IgG を注射したときには、PBS とコントロール IgG と同時に注射した群に比べて耳の厚さが優位に減弱した (図 9-A)。この結果は本研究の別の結果と一致する (図 4-B)。CXCL17 と同時に抗 CCL5 抗体を同時に注射すると PBS とコントロール IgG を同意に注射した群と耳の厚さが同等であった (図 9-A)。この結果は抗 CCL5 抗体でブロックすることで CXCL17 により誘導される抗炎症作用が弱まったことを示唆する。また CXCL17 と同時に抗 CCL5 抗体を注射することでコントロール IgG を同時に注

射した群と比べて IL-17A、IL-22、TNF- $\alpha$ 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19 の mRNA 発現量が増加した (図 9-B)。CCL5 と同じく CCR5 の ligand である CCL3、CCL4 も MDSC に産生され、Treg の誘導に関与する(27)ため、抗 CCL3 抗体と抗 CCL4 抗体も同様の方法で注射した。CXCL17 と抗 CCL4 抗体を同時に注射すると PBS とコントロール IgG を注射した群と耳の厚さが同程度となった (図 9-D)。一方で抗 CCL3 抗体は CXCL17 の抗炎症作用には変化を起さなかった (図 9-C)。抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体を recombinant CXCL17 と同時に注射するとコントロール IgG と CXCL17 を同時に注射した群と比べて IL-10 と Foxp3 の mRNA 発現量が低下しており、コントロール IgG と PBS を同時に注射した群と同程度となった (図 9-E)。このように抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体はイミキモド誘発乾癬様皮膚炎における CXCL17 の抗炎症作用を減弱させた。

#### 7) CXCL17 の効果に対する抗 Gr-1 抗体、抗 CD25 抗体投与の影響の解析

本研究ではイミキモド誘発乾癬様皮膚炎において CXCL17 が MDSC、Treg を介して抗炎症作用を発揮していることを確認するために抗 Gr-1 抗体、抗 CD25 抗体を投与して MDSC、Treg を deplete することで、CXCL17 の抗炎症作用に影響が出るかを検討した。MDSC、Treg の depletion の確認のために抗 CD25 抗体

投与または抗 Gr-1 抗体投与 1 日後に血液を回収し、フローサイトメトリーで解析した。抗 Gr-1 抗体投与 1 日後で CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞 (MDSC) はコントロール IgG と比較して deplete されていた (図 10-A)。抗 CD25 抗体投与 1 日後でも CD4 陽性 CD25 陽性細胞 (Treg) はコントロール IgG 投与と比較して deplete されていた (図 10-B)。抗 Gr-1 抗体投与により MDSC が、抗 CD25 抗体投与により Treg が deplete されたことが確認できた。

抗 Gr-1 抗体の腹腔内投与は CXCL17 投与の有無に関わらずに皮膚炎を減弱させた (図 11-A)。抗 Gr-1 抗体投与下では CXCL17 の有無で皮膚炎に有意差はなかったが、抗 Gr-1 抗体のみで皮膚炎が減弱したため、抗 Gr-1 抗体投与下の CXCL17 の効果は評価困難であった。抗 CD25 抗体の腹腔内投与で Treg を除去すると、CXCL17 の有無に関わらず皮膚炎は増悪した (図 11-B)。抗 CD25 抗体投与下では CXCL17 の有無で耳の厚さに有意差はなかった (図 11-B)。

## 5. 考察

本研究で乾癬病変部皮膚の表皮において CXCL17 が高発現していることを示した。In vitro では IFN- $\gamma$  が濃度依存的にヒト角化細胞の CXCL17 の発現を増加させた。CXCL17 はイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させ、皮膚に浸潤する MDSC と Treg の数を増加させた。MDSC は Gpr35 の mRNA を発現し、in vitro で CXCL17 に遊走した一方で、Treg は Gpr35 を発現せず、CXCL17 に遊走しなかった。さらに、抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体を CXCL17 と同時に注射することで、CXCL17 の抗炎症作用を減弱させた。本研究の結果から IFN- $\gamma$  により誘導される CXCL17 は MDSC を誘導し、その MDSC が CCL5 や CCL4 を介して Treg を誘導し、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させたと考えた。

IFN- $\gamma$  刺激は HaCaT 細胞またはヒト正常表皮角化細胞の CXCL17 の mRNA 発現量を上昇させたが、IL-4、TNF- $\alpha$ 、IL-22、IL-17A は変化を起さなかった (図 2-A、2-B、図 3-A、3-B)。乾癬患者の血清や病変部皮膚において IFN- $\gamma$  の発現は亢進している(30, 31, 32)。これは CXCL17 が乾癬病変部皮膚に高発現していたことと一致する (図 1-A、1-B)。Th2 優位な疾患として知られるアトピー性皮膚炎や皮膚 T 細胞リンパ腫(33, 34, 35, 36, 37, 38)の病変部皮膚では CXCL17 は高発現していなかった (図 1-A)。

CXCL17 の投与は耳の厚さ、耳の組織、浸潤する細胞数、サイトカイン発現で評価してイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させた（図 4-B、4-C、4-D、5-A）。IL-10、Foxp3 の mRNA 発現量は上昇し（図 5-B）、皮膚に浸潤する Treg の数が増えていた（図 6-A、6-B、7-A、7-B）ことは Treg が CXCL17 により誘導される抗炎症作用に重要であることを示唆する。しかしながら、CXCL17 が別の経路で免疫応答を抑制した可能性も考えられる。例えば、CXCL17 はマウスマクロファージからの炎症性サイトカインや因子の産生を抑制する、抗炎症性因子として作用することも報告されている(10)。本研究でマウスのマクロファージの cell line である J774 を CXCL17 で刺激してサイトカイン産生を調べたが、CXCL17 はサイトカイン産生を有意に抑制しなかった。よって CXCL17 の抗炎症作用は主に皮膚に Treg を浸潤させることにより起こっている可能性がある。

MDSC は腫瘍を持つマウスにおいて CD11b 陽性 Gr-1 陽性の細胞として同定された(21)。健常人において MDSC は樹状細胞、顆粒球、マクロファージに分化する未分化骨髄細胞から構成される。腫瘍環境下では分化できず腫瘍組織に遊走され、そこで T 細胞由来の腫瘍免疫を抑制する(39, 40)。CXCL17 を投与した皮膚において Arginase 1 の mRNA 発現量が上昇し(図 5-C)、MDSC の数が増えていたこと（図 6-A、6-B、7-A、7-B）は MDSC が CXCL17 の抗炎症作用に

関わっていることを示唆する。さらに、本研究で MDSC が Gpr35 の mRNA を発現し、MDSC が CXCL17 に遊走することを示した (図 8-A、8-B)。この結果は CXCL17 に対してヒト単球の cell line である THP-1 やマウス単球の cell line である J774 が走化性を示したとする過去の報告(5, 10)や、マウスの脾臓細胞の中で CXCL17 に遊走した細胞が CD11b 陽性 Gr-1 陽性 F4/80 陰性であったとする過去の報告(7)とも一致する。同時に MDSC は CCR5 のリガンドである CCL3、CCL4、CCL5 を強く産生し、CCR5 に依存して Treg を直接的に誘導する(41)。本研究で抗 CCL5 抗体が CXCL17 のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を抑制する効果を中和した (図 9-A、9-B)。加えて抗 CCL4 抗体の注射もイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を抑制する CXCL17 の効果をブロックした (図 9-D)。抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体の注射は IL-10、Foxp3 の mRNA の発現量を低下させた (図 9-E)。一方で別の CCR5 の ligand である、CCL3 をブロックしてもイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させる CXCL17 の効果に変化はなかった (図 9-C)。さらに抗 CCL3 抗体は IL-10、Foxp3 の発現を低下させなかった。CCL5 と CCL4 がイミキモド誘発マウス乾癬モデルにおける免疫反応を抑制するだけでなく、Treg の誘導に関わる重要なケモカインであると考えた。

本研究で抗 Gr-1 抗体または抗 CD25 抗体を腹腔内投与することで MDSC または Treg を除去して CXCL17 の抗炎症効果に影響が出るかを検討した。抗 Gr-

1 抗体の腹腔内投与は CXCL17 投与の有無に関わらず耳の厚さを減弱させた (図 11-A) が、これは抗 Gr-1 抗体が、乾癬、イミキモド皮膚炎の病態において重要な好中球も除去するためと考えられる。抗 Gr-1 抗体投与下で CXCL17 の有無は皮膚炎に変化をもたらさなかったため、CXCL17 は MDSC を介して抗炎症作用を発揮していることが示唆されたが、抗 Gr-1 抗体投与のみで皮膚炎が減弱したため、抗 Gr-1 抗体投与の影響が CXCL17 の作用をマスクした可能性も否定できず、CXCL17 の効果は評価困難であった。抗 CD25 抗体の腹腔内投与で Treg を除去すると、CXCL17 投与の有無に関わらず皮膚炎は増悪した (図 11-B)。抗 CD25 抗体投与により Treg も除去することで皮膚炎が増悪したと考えられるが、抗 CD25 抗体投与下で CXCL17 の抗炎症効果ははっきりとは現れなかった。CXCL17 が Treg を介して抗炎症作用を発揮していることが示唆されたが、抗 CD25 抗体投与のみで皮膚炎を増悪させる効果が強く、CXCL17 の作用がマスクされた可能性もあるため、CXCL17 の効果は評価困難であった。このように MDSC または Treg の除去は CXCL17 の効果を目立たなくさせたが、CXCL17 の抗炎症効果に対する MDSC または Treg の影響を、MDSC または Treg の depletion を用いて正確に評価することは困難であった。

本研究は CXCL17、MDSC、Treg の炎症性皮膚疾患における免疫抑制的役割を示すものであった。これらの役割は腫瘍においては複数報告されている(1, 7,



10, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48)。一方で円形脱毛症や関節炎など炎症性疾患における MDSC の抑制的な機能について述べている過去の研究は限られている(49, 50, 51)。MDSC は乾癬において病変部皮膚に存在することが報告されており、MDSC に誘導された免疫抑制が乾癬の病変部皮膚における過剰に活性化した T 細胞を抑制することに寄与していると結論しており(23)、この考えは本研究の結果とよく一致する。

乾癬は当初 Th1 細胞が病態の中心と考えられていたが、Th17 細胞の発見以後 Th1 細胞は乾癬においてあまり重要とは考えられていない(52)。しかし、IFN- $\gamma$  は TNF- $\alpha$  とシナジー効果により表皮角化細胞から IL-6、IL-8、IL-1 などの様々な炎症性サイトカインやケモカインを誘導する(53, 54, 55)。これらのサイトカインはさらに T 細胞、マクロファージ、好中球を活性化させ、乾癬の病態に関わる(56, 57, 58)。本研究では、IFN- $\gamma$  刺激がヒト角化細胞の CXCL17 の発現を上昇させた(図 2-A、図 2-B、図 2-C、図 2-D)。これは IFN- $\gamma$  が乾癬皮膚において過剰な免疫を制御している可能性を示している。しかし recombinant IFN- $\gamma$  を用いた古い臨床治験では乾癬の皮膚病変を治療する効果は得られなかった(59)。これは IFN- $\gamma$  の炎症を惹起する効果が免疫抑制作用を上回っている可能性を示唆する。CXCL17 注射は乾癬患者の過剰な炎症を抑制し、重症な皮膚病変を治療する有望な戦略となる可能性もある。ヒトの乾癬患者において臨

床応用も検討されるが、CXCL17により誘導される MDSC、Treg は悪性腫瘍においては腫瘍免疫を抑制することにより悪性腫瘍に有利な環境を作る可能性が考えられ、その点に注意する必要がある。本研究により得られた結果より考えられる CXCL17 のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎における役割を図 12 に示した。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎において Th1 細胞から産生される IFN- $\gamma$  により CXCL17 が表皮角化細胞から産生され、MDSC、Treg を誘導し、Th17 細胞が抑制されて、乾癬様皮膚炎が抑制されると考えられる。

乾癬において MDSC を誘導してネガティブフィードバックにより過剰な免疫を抑制する以外に、CXCL17 はほかの役割を果たしている可能性もある。CXCL17 は強力な抗菌活性を持つとする報告もある(3)。抗菌活性はペプチドによる細菌壁の破壊する作用による。CXCL17 は感染に対して最初の防御機構である粘膜組織に強く発現する(1, 3)。本研究では乾癬の表皮で CXCL17 が強く発現していた。乾癬の皮膚病変では  $\beta$ -defensin、cathelicidin、psoriasin など様々な抗菌ペプチドを発現することがよく知られている(60, 61)。乾癬患者では皮膚感染症に抵抗性を持つことが臨床的に知られている。

## 6. 結論

本研究をまとめると、CXCL17はIFN- $\gamma$ により誘導され、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させる。MDSCはGpr35のmRNAを発現し、in vitroでCXCL17に走化性を示す。TregはCCL5とCCL4により誘導され、MDSCとあわせて過剰な免疫反応を抑制するネガティブフィードバックとして作用している。将来的にはCXCL17を投与することによって、乾癬を含めた炎症性皮膚疾患を治療するという戦略が考えられた。

## 7. 謝辞

組織の切り出し、ヘマトキシリン・エオジン染色を始め、技術的にサポートして下さった実験助手の加賀玉美さんに深謝致します。また、大学院で学ぶ機会を与えて下さり、終始懇切な御指導御鞭撻を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。佐藤先生の教室で大学院生活を送ることができた幸運に感謝しております。本研究の共同研究者の一人である国際医療福祉大学皮膚科学教室、菅谷 誠教授には丁寧な御指導御協力頂きました。菅谷先生には免疫学の基礎から実験の仕方まで細部にわたり御指導頂き、心より深謝致します。臨床検体、臨床データの回収や実験手技を教えていただいた東京大学医学部皮膚科学教室、宮垣朝光先生、高橋菜穂美先生、高橋岳浩先生、柴田彩先生、浅野善英先生に心より感謝いたします。

## 8. 文献

1. Weinstein EJ, Head R, Griggs DW, Sun D, Evans RJ, Swearingen ML, Westlin MM, Mazarella R VCC-1, a novel chemokine, promotes tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 74-81 2006.
2. Pisabarro M, Leung B, Kwong M, Corpuz R, Frantz G, Chiang N, Vandlen R, Diehl L, Skelton N, Kim H, Eaton D, Schmidt K Cutting edge: Novel human dendritic cell- and monocyte-attracting chemokine-like protein identified by fold recognition methods. *J Immunol* 176: 2069-73 2006.
3. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuniga J, Selman M, Ouellette AJ, Zlotnik A CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. *J Immunol* 188: 6399-406 2012.
4. Li L, Yan J, Xu J, Liu C, Zhen Z, Chen H, Ji Y, Wu Z, Hu J, Zheng L, Lau WY CXCL17 expression predicts poor prognosis and correlates with adverse immune infiltration in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 9: e110064 2014.
5. Maravillas-Montero JL, Burkhardt AM, Hevezi PA, Carnevale CD, Smit MJ, Zlotnik A Cutting edge: GPR35/CXCR8 is the receptor of the mucosal chemokine CXCL17. *J Immunol* 194: 29-33 2015.
6. Mu X, Chen Y, Wang S, Huang X, Pan H, Li M Overexpression of VCC-1 gene in human hepatocellular carcinoma cells promotes cell proliferation and invasion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41: 631-7 2009.
7. Matsui A, Yokoo H, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Chun NAL, Kadouchi I, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Semba K, Kobayashi E, Takahashi M, Murakami T CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b+Gr1highF4/80- cells and promotes tumor progression. *PLoS One* 7: e44080 2012.
8. Ohlsson L, Hammarstrom M, Lindmark G, Hammarstrom S, Sitohy B Ectopic expression of the chemokine CXCL17 in colon cancer cells. *Br J Cancer* 114: 697-703 2016.

9. Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterol* 140: 310-21 2011.
10. Lee W, Wang C, Lin T, Hsiao C, Luo C CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E32-40 2013.
11. Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, Kurd SK, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Strom BL The risk of mortality in patients with psoriasis - results from a population-based study. *Arch Dermatol* 143: 1493-9 2007.
12. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-87 2008.
13. Read S, Malmstrom V, Powrie F Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295-302 2000.
14. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61 2003.
15. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212: 28-50 2006.
16. Buckner JH Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10: 849-59 2010.
17. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD Dysfunctional blood and target tissue CD4(+)CD25(high) regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174: 164-73 2005.
18. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J Immunother* 24: 431-46 2001.

19. Serafini P, Borrello I, Bronte V Myeloid suppressor cells in cancer: Recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16: 53-65 2006.
20. Gabrilovich DI, Nagaraj S Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-74 2009.
21. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo N, Zanovello P Identification of a CD11b(+)/gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96: 3838-46 2000.
22. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, Blosser RL, Tam AJ, Bruno T, Zhang H, Pardoll D, Kim Y STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 123: 1580-9 2013.
23. Cao LY, Chung JS, Teshima T, Feigenbaum L, Cruz PD,Jr, Jacobe HT, Chong BF, Ariizumi K Myeloid-derived suppressor cells in psoriasis are an expanded population exhibiting diverse T-cell-suppressor mechanisms. *J Invest Dermatol* 136: 1801-10 2016.
24. Edwards L, Ferenczy A, Eron L, Baker D, Owens M, Fox T, Hougham A, Schmitt K, HPV Study Grp Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. *Arch Dermatol* 134: 25-30 1998.
25. van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus A, Floencia E, Prens EP, Lubberts E Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182: 5836-45 2009.
26. Ueyama A, Yamamoto M, Tsujii K, Furue Y, Imura C, Shichijo M, Yasui K Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: A role for interferon-alpha in dendritic cell activation by imiquimod. *J Dermatol* 41: 135-43 2014.
27. Nadeem A, Al-Harbi NO, Al-Harbi MM, El-Sherbeeney AM, Ahmad SF, Siddiqui N, Ansari MA, Zoheir KM, Attia SM, Al-Hosaini KA, Al-Sharary SD Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation is suppressed by BET bromodomain inhibitor in mice through RORC/IL-17A pathway modulation. *Pharmacol Res* 99: 248-57 2015.

28. Alam MS, Gaida MM, Ogawa Y, Kolios AGA, Lasitschka F, Ashwell JD Counter-regulation of T cell effector function by differentially activated p38. *J Exp Med* 211: 1257-70 2014.
29. Dilek N, Poirier N, Usal C, Martinet B, Blancho G, Vanhove B Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol* 188: 4209-16 2012.
30. Austin L, Ozawa M, Kikuchi T, Walters I, Krueger J The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: A type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 113: 752-9 1999.
31. Szegedi A, Aleksza M, Gonda A, Irinyi B, Sipka S, Hunyadi J, Antal-Szalmas P Elevated rate of Thelper1 (T(H)1) lymphocytes and serum IFN-gamma levels in psoriatic patients. *Immunol Lett* 86: 277-80 2003.
32. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 2005: 273-9 2005.
33. Bos J, Wierenga E, Smitt J, Vanderheijden F, Kapsenberg M Immune dysregulation in atopic eczema. *Arch Dermatol* 128: 1509-12 1992.
34. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19: 359-61 1998.
35. Plaut M Antigen-specific lymphokine secretory patterns in atopic disease. *J Immunol* 144: 4497-500 1990.
36. Vowels B, Cassin M, Vonderheid E, Rook A Aberrant cytokine production by sézary-syndrome patients - cytokine secretion pattern resembles murine Th2-cells. *J Invest Dermatol* 99: 90-4 1992.



37. Vowels B, Lessin S, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe J, Rook A Th2 cytokine messenger-RNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 103: 669-73 1994.
38. Wierenga E, Snoek M, Degroot C, Chrietien I, Bos J, Jansen H, Kapsenberg M Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ lymphocytes-T in atopic patients. *J Immunol* 144: 4651-6 1990.
39. Ostrand-Rosenberg S Myeloid-derived suppressor cells: More mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1593-600 2010.
40. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179: 977-83 2007.
41. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* 189: 5602-11 2012.
42. Kuznetsov S, Gabrilovich D Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55: 237-45 2006.
43. Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo M Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 102: 2138-45 2003.
44. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182: 4499-506 2009.
45. Youn J, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181: 5791-802 2008.
46. Liyanage U, Moore T, Joo H, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin J, Strasberg S, Eberlein T, Goedegebuure P, Linehan D Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756-61 2002.

47. Sato E, Olson S, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth A, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y, Ohtani H, Old L, Odunsi K Intraepithelial CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8(+)/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18538-43 2005.
48. Wolf A, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9: 606-12 2003.
49. Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zoeller M The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *J Immunol* 179: 5071-81 2007.
50. Singh V, Mueller U, Freyschmidt-Paul P, Zoeller M Delayed type hypersensitivity-induced myeloid-derived suppressor cells regulate autoreactive T cells. *Eur J Immunol* 41: 2871-82 2011.
51. Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N, Fujioka K, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Ishino H, Kohno M, Maekawa T, Kawahito Y Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J Immunol* 191: 1073-81 2013.
52. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445: 866-73 2007.
53. Barker J, Sarma V, Mitra R, Dixit V, Nickoloff B Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest* 85: 605-8 1990.
54. Fujisawa H, Wang B, Sauder D, Kondo S Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes. *J Interferon Cytokine Res* 17: 347-53 1997.
55. Grone A Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 1-12 2002.
56. Bonifati C, Ameglio F Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 38: 241-51 1999.

57. Guenther LC, Ortonne J Pathophysiology of psoriasis: Science behind therapy. *J Cutan Med Surg* 6: 2-7 2002.
58. Prinz JC The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17: 257-70 2003.
59. Rassner G, Fierlbeck G Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with interferon gamma. *J Invest Dermatol* 93: 570-1 1989.
60. Peric M, Koglin S, Kim S, Morizane S, Besch R, Prinz JC, Ruzicka T, Gallo RL, Schaubert J IL-17A enhances vitamin D(3)-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J Immunol* 181: 8504-12 2008.
61. Liang SC, Tan X, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271-9 2006.

## 9. 図表

	-	+	++
normal	10	0	0
AD	6	4	0
CTCL	6	3	1
psoriasis	0	3	7

表 1. CXCL17 の免疫染色

n = 10 ずつ染色性を-: 陰性; +: 弱陽性; ++: 強陽性と評価した。

AD: アトピー性皮膚炎; CTCL: 皮膚 T 細胞リンパ腫

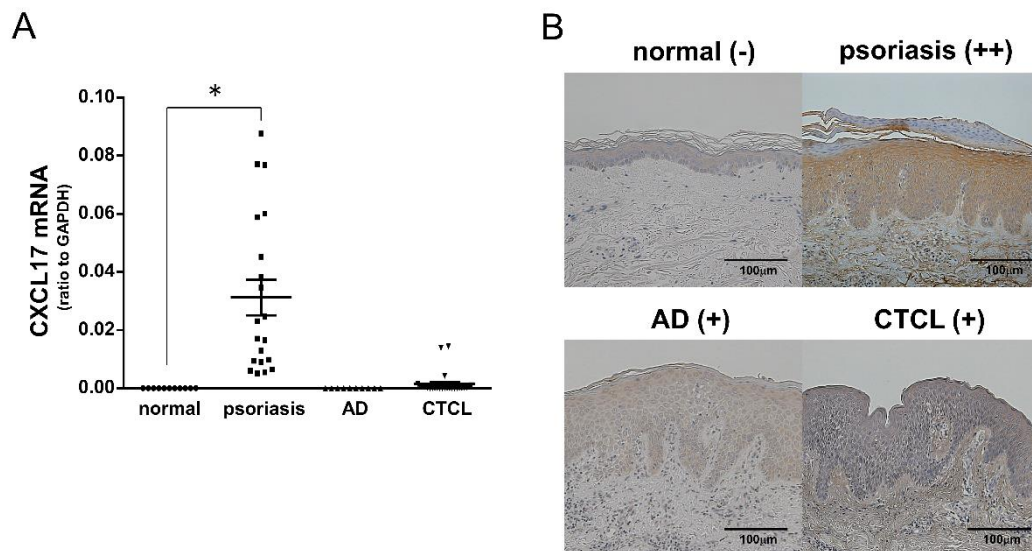


図 1 乾癬病変部皮膚における CXCL17 の発現

- (A) 乾癬 (n = 20)、アトピー性皮膚炎 (n = 10)、皮膚 T 細胞リンパ腫 (n = 28) の病変部皮膚と健常皮膚 (n = 11) における CXCL17 の real-time RT-PCR で測定した mRNA の発現量。個々の患者データは点としてプロットした。\* $p < 0.05$ 。
- (B) 健常皮膚と乾癬、アトピー性皮膚炎、皮膚 T 細胞リンパ腫の病変部皮膚の CXCL17 の免疫染色。

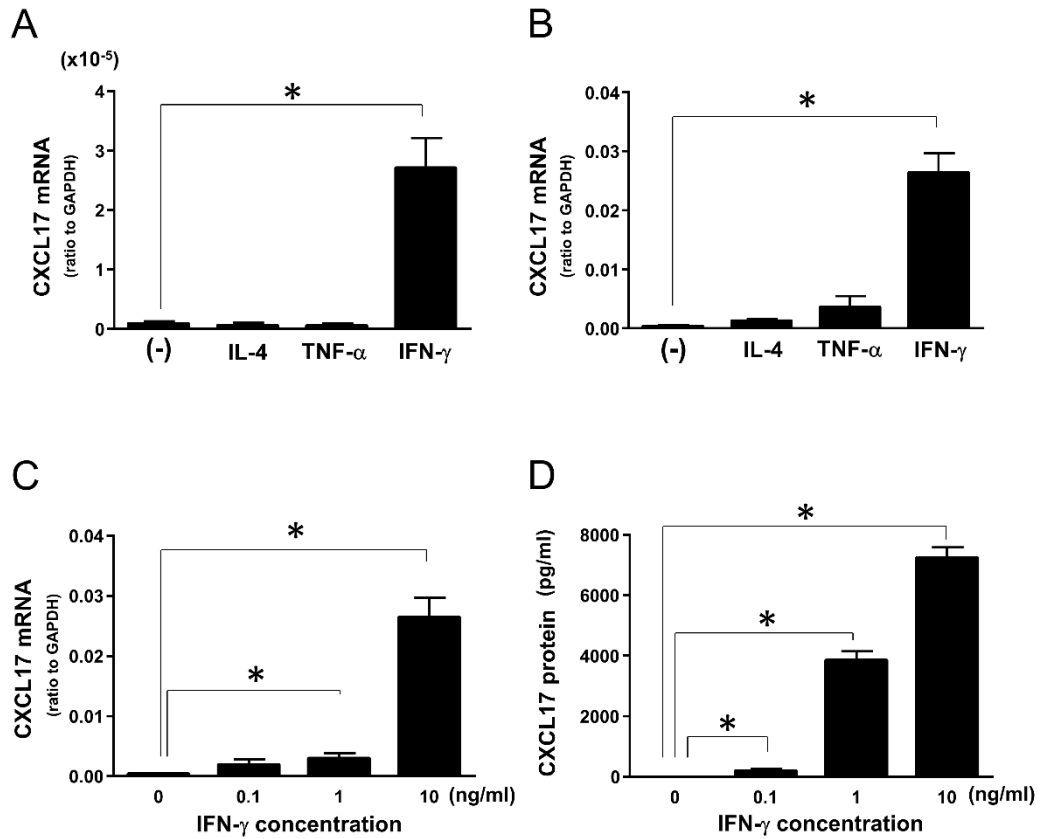
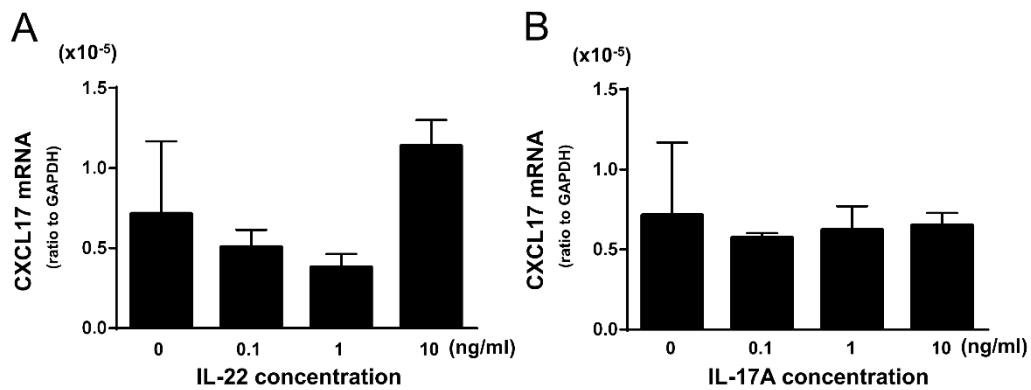


図2 サイトカイン刺激後の角化細胞における CXCL17 の発現の解析

- (A) IL-4 (10 ng/ml)、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)、IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) または培養液のみで 24 時間培養した HaCaT 細胞における CXCL17 の mRNA の発現量。
- (B) IL-4 (10 ng/ml)、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)、IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) または培養液のみで 24 時間培養したヒト正常表皮角化細胞における CXCL17 の mRNA の発現量。
- (C) IFN- $\gamma$  (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) または培養液のみで 24 時間培養したヒト正常表皮角化細胞における CXCL17 の mRNA の発現。
- (D) IFN- $\gamma$  (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) または培養液のみで 24 時間培養したヒト正常表皮角化細胞の培養上清における CXCL17 のタンパクの発現量。
- n = 6。データは mean + SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。すべての実験は 3 回やり、同様の結果を得て代表的な結果を表示している。



**図 3 IL-22, IL-17A 刺激後の HaCaT 細胞の CXCL17 発現の解析**

(A) recombinant human IL-22 で 0.1, 1, 10 ng/ml の濃度、または培養液のみで 24 時間培養した HaCaT 細胞における CXCL17 の mRNA の発現量。

(B) recombinant human IL-17A で 0.1, 1, 10 ng/ml の濃度、または培養液のみで 24 時間培養した HaCaT 細胞における CXCL17 の mRNA の発現量。

n = 6。データは mean + SEM で表記している。すべての実験は 2 回やり、同様の結果を得て代表的な結果を表示している。

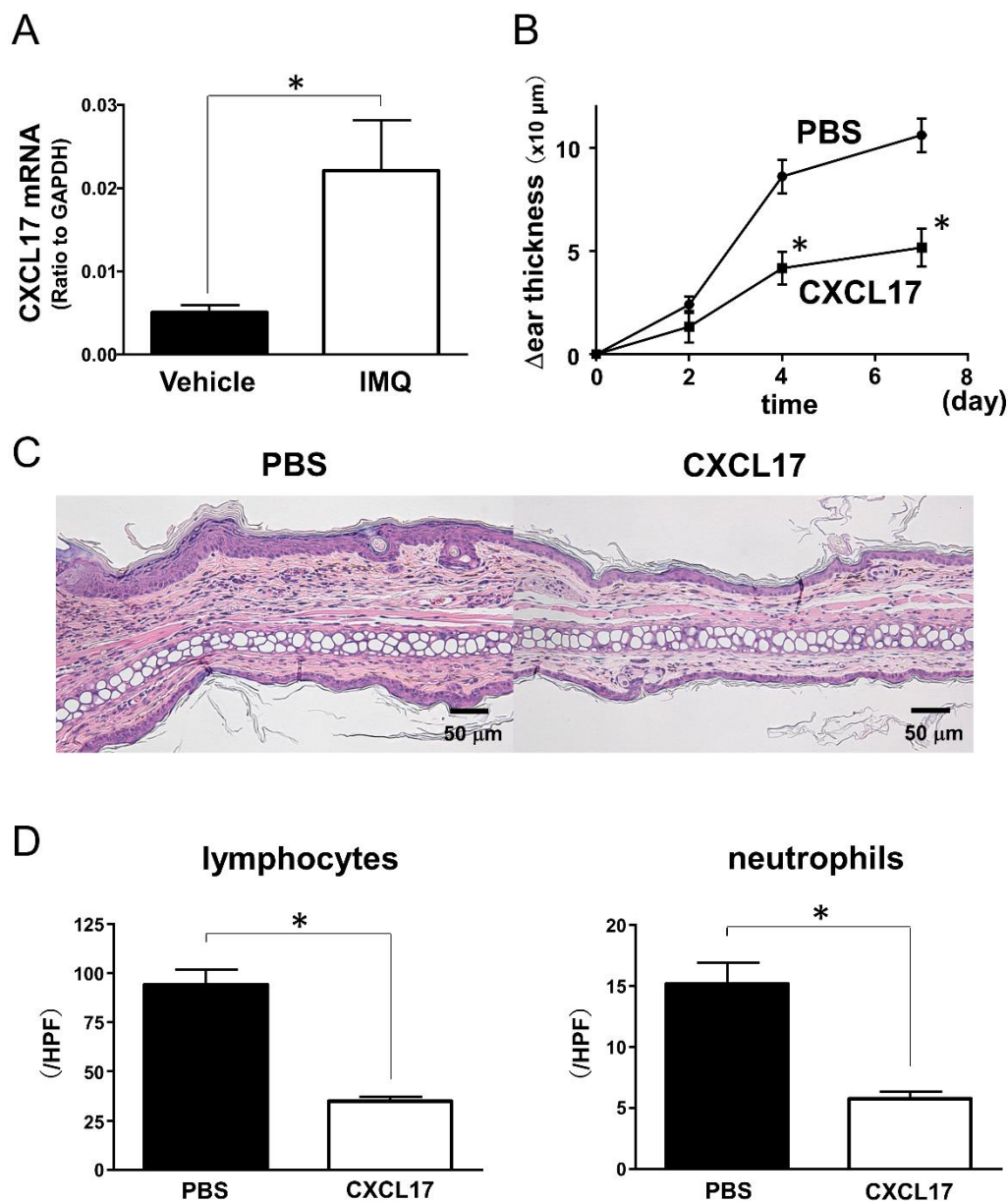


図4 イミキモド誘発乾癬様皮膚炎へのCXCL17の影響の解析

(A)イミキモドまたは基剤外用開始2日後のマウスの耳におけるCXCL17のmRNAの発現量。

(B) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始7日後までの耳の厚さの変化。recombinant CXCL17はイミキモド外用開始前、開始2日後、4日後に投与した。データはmean ± SEM で表記している。

(C) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始7日後の耳



のヘマトキシリン・エオジン染色。

(D) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳の組織に浸潤するリンパ球と好中球数。組織を 400 倍で観察し、浸潤する細胞数は 1 視野あたりでカウントした。データは mean+SEM で表記している。

\* $p < 0.05$ 。すべての実験は 6 匹のマウスを用いて 3 回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。

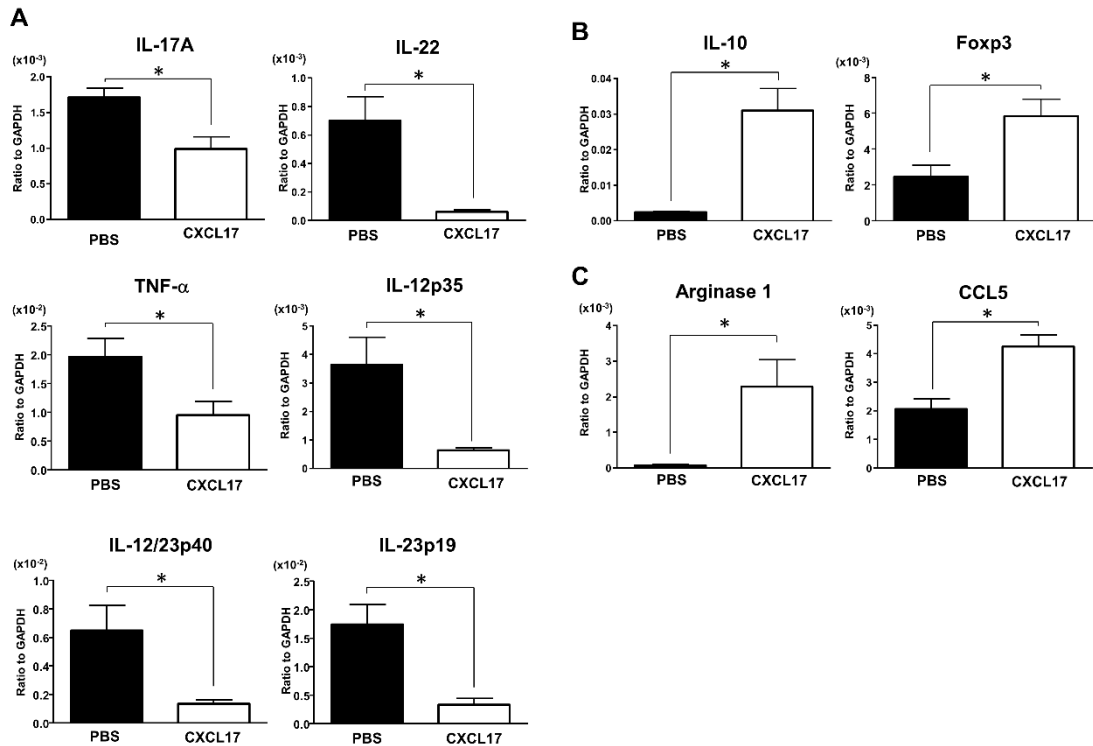


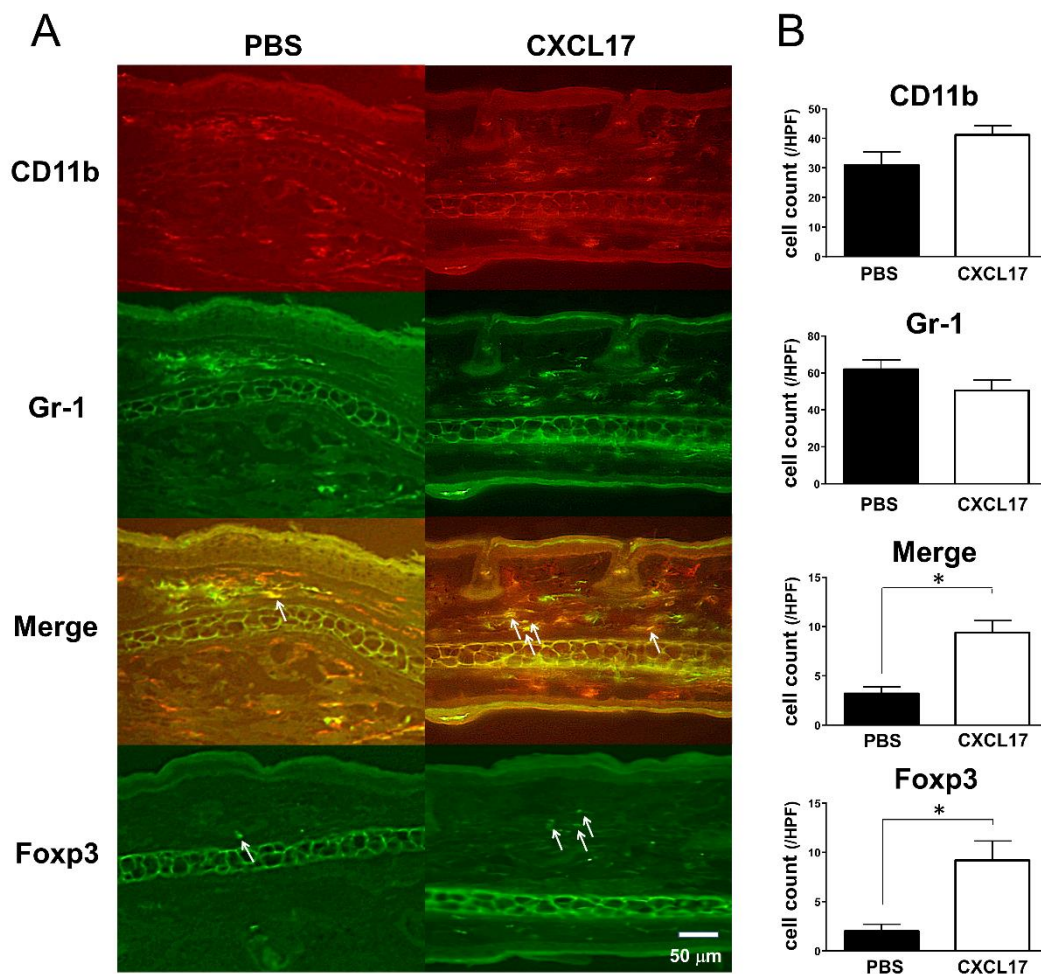
図5 イミキモド誘発乾癬様皮膚炎に CXCL17 投与したときの炎症性サイトカインと Treg、MDSC マーカーの発現の解析

(A) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳における、IL-17A、IL-22、TNF- $\alpha$ 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19 などの乾癬に関連する炎症性サイトカインの mRNA の発現量。

(B) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳における、IL-10 と Foxp3 の mRNA の発現量

(C) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳における Arginase 1、CCL5 の mRNA の発現量。

データは mean + SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。すべての実験は 6 匹のマウスを用いて 3 回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。



**図 6 CXCL17 投与の MDSC、Treg への影響の蛍光免疫染色による解析**  
 (A) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳における CD11b 陽性細胞、Gr-1 陽性細胞、Merge (CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞)、Foxp3 陽性細胞の蛍光免疫染色。白矢印で陽性細胞を明示している。  
 (B) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳における CD11b 陽性細胞、Gr-1 陽性細胞、Merge (CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞)、Foxp3 陽性細胞の浸潤する細胞数。400 倍の視野で細胞数を計測した。データは mean + SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。  
 すべての実験は 6 匹のマウスを用いて 3 回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。

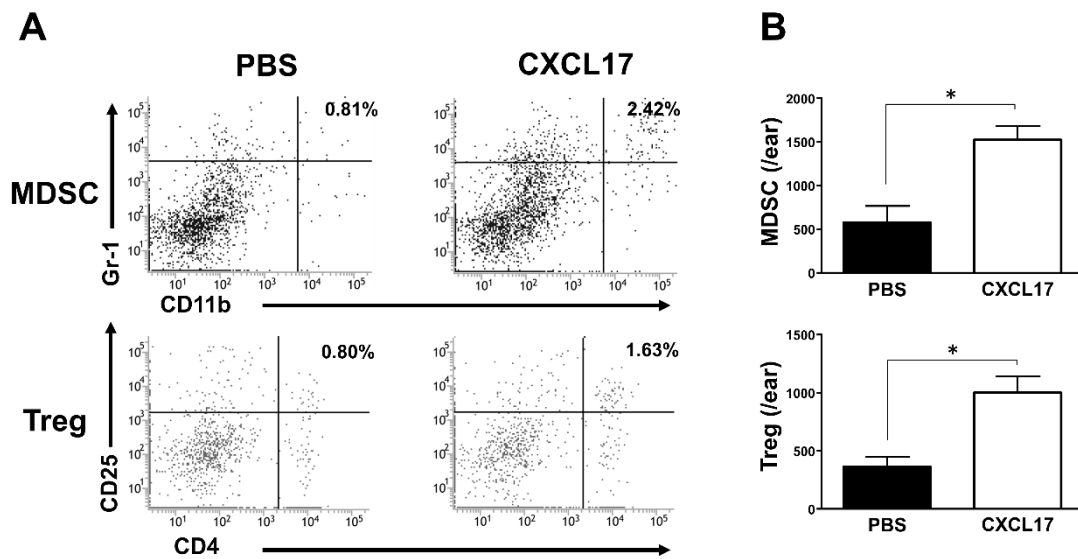
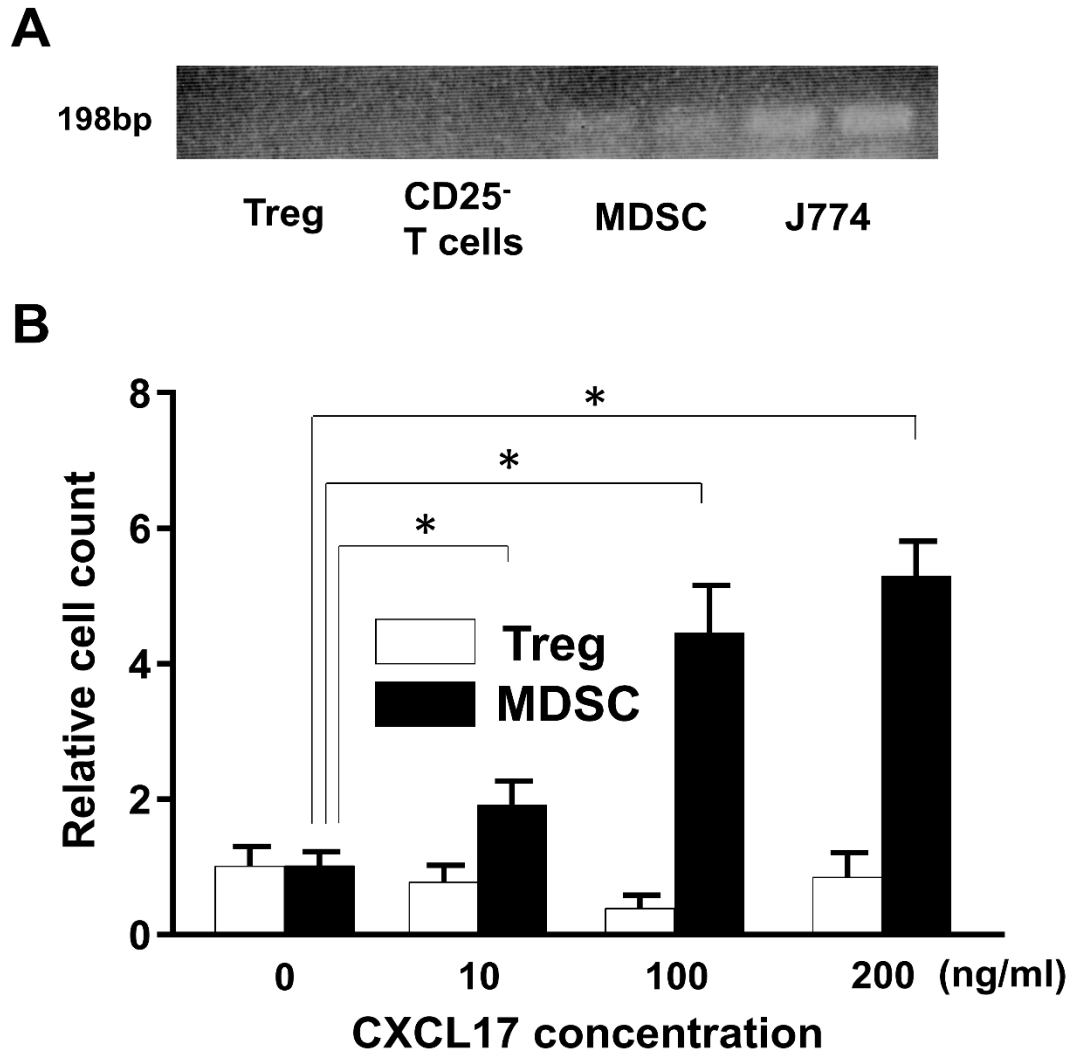


図7 CXCL17投与のMDSC、Tregへの影響のフローサイトメトリーによる解析

(A) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始7日後の耳における浸潤する細胞のフローサイトメトリー解析。耳に浸潤する生細胞の中で CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞 (MDSC) と CD4 陽性 CD25 陽性細胞 (Treg) の割合をそれぞれ表示している。

(B) recombinant CXCL17 または PBS を注射してイミキモド外用開始7日後の耳における浸潤する細胞の中で MDSC (CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞) と Treg (CD4 陽性 CD25 陽性細胞) の割合。データは mean + SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。

すべての実験は6匹のマウスを用いて3回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。



**図 8 MDSC と Treg の Gpr35 の mRNA の発現と CXCL17 への走化性の解析**  
 (A) Treg、CD25 陰性 T 細胞、MDSC、J774 それぞれの細胞から抽出した cDNA をもとに Gpr35 のプライマーを用いて増幅した PCR 産物を電気泳動したアガロースゲル。  
 (B) CXCL17 (10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml) または培養液のみに遊走した Treg と MDSC の細胞数。遊走した細胞数は 200 倍の視野で 25 か所カウントし、培養液のみに遊走した細胞数を 1 として相対的な細胞数を表示している。n = 8。データは mean + SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。  
 すべての実験は 2 回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。

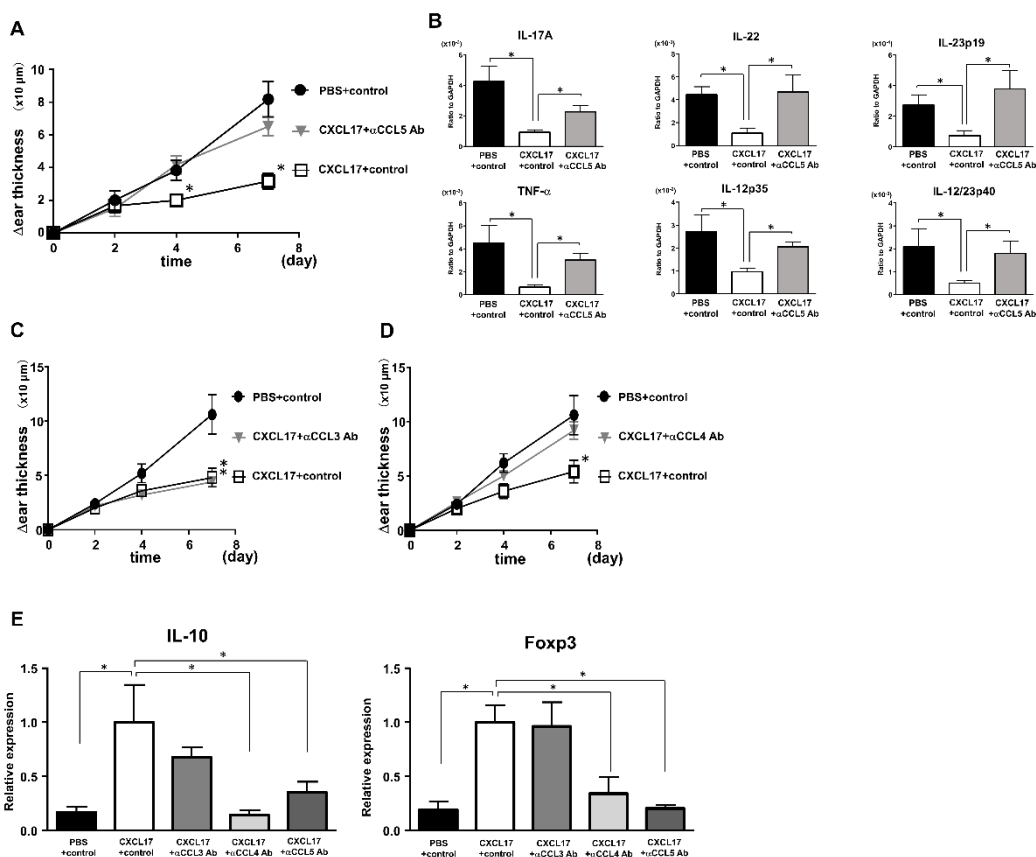


図9 CXCL17の抗炎症効果に対する抗CCL5抗体と抗CCL4抗体投与の影響の解析

(A) recombinant CXCL17 と抗 CCL5 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG を注射してイミキモド外用開始 7 日後までの耳の厚さの変化。recombinant CXCL17 と抗 CCL5 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG はイミキモド外用開始直前、開始 2 日後、4 日後に皮下注射した。データは mean±SEM で表記している。PBS とコントロール IgG を投与した群と比べて \* $p < 0.05$  で有意差があるものを表示している。

(B) recombinant CXCL17 と抗 CCL5 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG を注射してイミキモド外用開始 7 日後の炎症性サイトカインの mRNA の発現量。データは mean+SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。

(C) recombinant CXCL17 と抗 CCL3 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG を注射してイミキモド外用開始 7 日後までの耳の厚さの変化。recombinant CXCL17 と抗 CCL3 抗体、recombinant

CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG はイミキモド外用開始前、開始 2 日後、4 日後に皮下注射した。データは mean ± SEM で表記している。PBS とコントロール IgG を投与した群と比べて  $*p < 0.05$  で有意差があるものを表示している。

(D) recombinant CXCL17 と抗 CCL4 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG を注射してイミキモド外用開始 7 日後までの耳の厚さの変化。recombinant CXCL17 と抗 CCL4 抗体、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、または PBS とコントロール IgG はイミキモド外用開始前、開始 2 日後、4 日後に皮下注射した。データは mean ± SE で表記している。PBS とコントロール IgG を投与した群と比べて  $*p < 0.05$  で有意差があるものを表示している。

(E) PBS とコントロール IgG、recombinant CXCL17 とコントロール IgG、recombinant CXCL17 と抗 CCL3 抗体、recombinant CXCL17 と抗 CCL4 抗体、recombinant CXCL17 と抗 CCL5 抗体を注射してイミキモド外用開始 7 日後の耳の IL-10 と Foxp3 の mRNA の発現量。recombinant CXCL17 とコントロール IgG を投与した群の平均を 1 として相対的発現量を表示している。データは mean + SEM で表記している。  $*p < 0.05$ 。

すべての実験は 6 匹のマウスを用いて 2 回ずつ施行し、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。

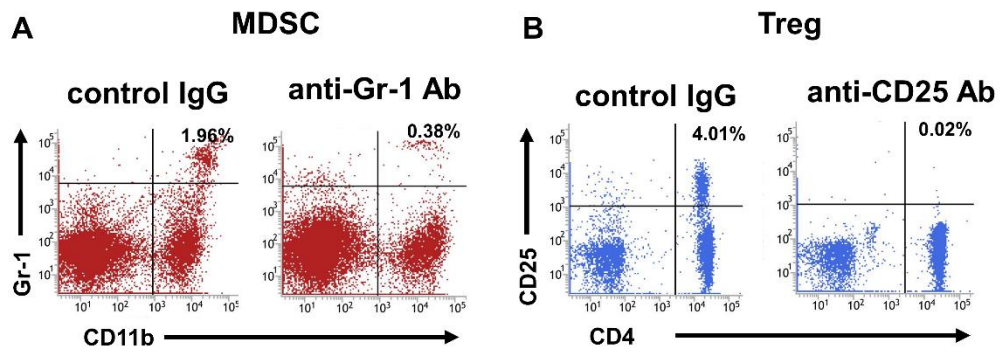


図 10 抗 Gr-1 抗体または抗 CD25 抗体投与による血液中の MDSC、Treg の depletion の確認

- (A) 腹腔内に抗 Gr-1 抗体またはコントロール IgG を投与 1 日後の血液のフローサイトメトリー解析。CD3 陰性 CD19 陰性細胞の中の CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞(MDSC)の割合をそれぞれ表示している。
- (B) 腹腔内に抗 CD25 抗体またはコントロール IgG を投与 1 日後の血液のフローサイトメトリー解析。CD3 陽性リンパ球の中の CD4 陽性 CD25 陽性細胞(Treg)の割合をそれぞれ表示している。



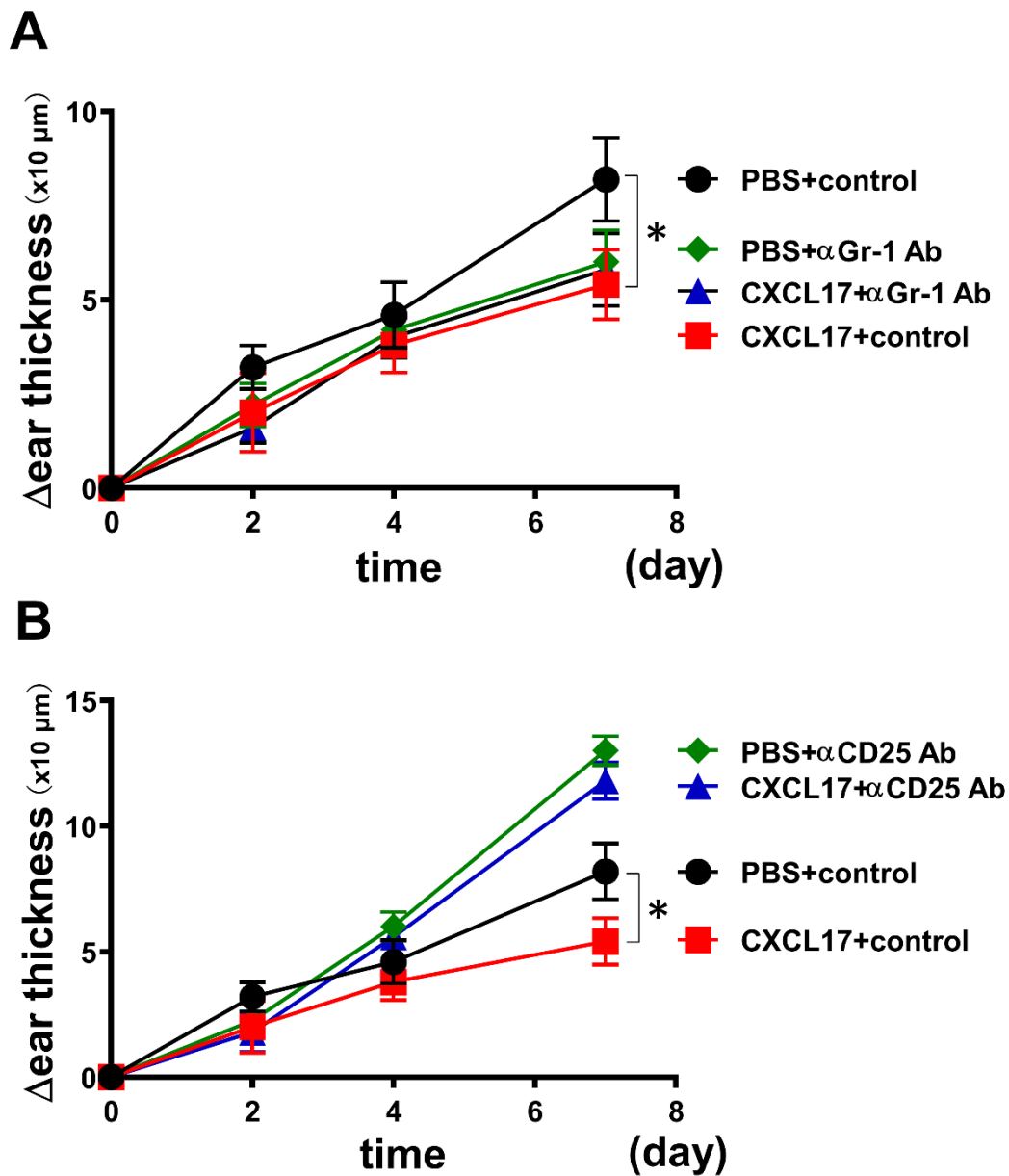


図 11 CXCL17 の抗炎症効果に対する抗 Gr-1 抗体、抗 CD25 抗体投与の影響の解析

(A)PBS とコントロール IgG、PBS と抗 Gr-1 抗体、CXCL17 とコントロール IgG、または CXCL17 と抗 Gr-1 抗体を投与してイミキモド外用開始 7 日後までの耳の厚さの変化。PBS または CXCL17、コントロール IgG または抗 Gr-1 抗体はイミキモド外用開始直前、開始 2 日後、4 日後に皮下注射した。データは mean±SEM で表記している。\* $p < 0.05$ 。Day7 において PBS とコントロール IgG

群と比較して、CXCL17 とコントロール IgG 群は有意に耳の厚さの変化が減弱していた。

(B) PBS とコントロール IgG、PBS と抗 CD25 抗体、CXCL17 とコントロール IgG、または CXCL17 と抗 CD25 抗体を投与してイミキモド外用開始 7 日後までの耳の厚さの変化。PBS または CXCL17、コントロール IgG または抗 CD25 抗体はイミキモド外用開始直前、開始 2 日後、4 日後に皮下注射した。データは  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  で表記している。\* $p < 0.05$ 。

すべての実験は 6 匹のマウスを用いて 2 回ずつ行い、同様の結果を得て、代表的な結果を表示している。

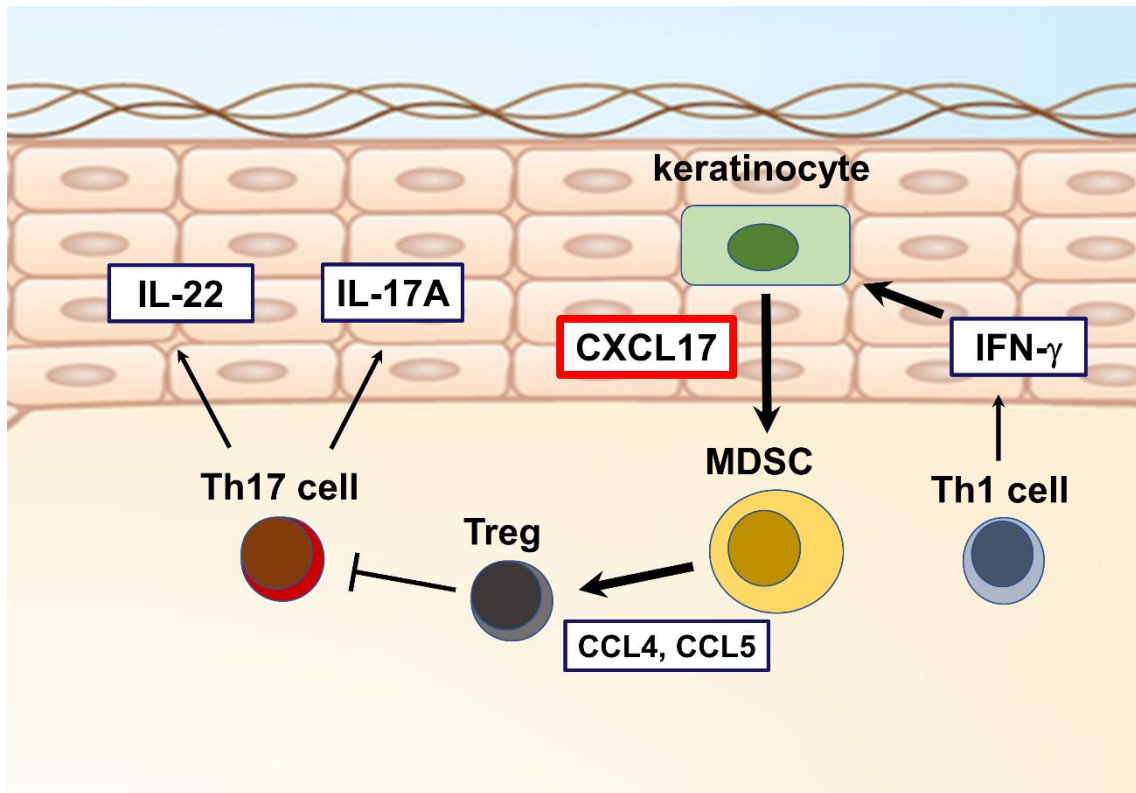


図 12 イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における CXCL17 の作用

乾癬において活性化している Th1 細胞に主に産生される IFN- $\gamma$  刺激によりケラチノサイトから産生された CXCL17 は MDSC を誘導し、MDSC が CCL4 や CCL5 を介して Treg を誘導し、乾癬の病態において重要な役割を果たす Th17 細胞に対して抑制的に作用することで、IL-17A や IL-22 など乾癬の病態に関わる炎症性サイトカインの発現を低下させ、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を減弱させる。本研究で検討したものを図中で太い矢印で示している。