

論文の内容の要旨

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

氏名 岡 知徳

乾癬は表皮角化細胞の異常な増殖、血管増殖、表皮と真皮における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比較的頻度の高い慢性炎症性皮膚疾患である。乾癬には尋常性乾癬、関節症性乾癬、乾癬性紅皮症、膿疱性乾癬など複数の病型があり、症状や必要とする治療の強度は様々である。根治的治療がなく、一生にわたって症状が続くため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- α 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、大きな治療成果をあげている。一方で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。近年の研究で、乾癬の病態形成、維持において Th17 細胞、樹状細胞が重要と考えられている。皮膚の樹状細胞からの TNF- α や IL-23 の産生亢進により、樹状細胞自身の活性化、また Th17 細胞の分化を誘導され、IL-17 は TNF- α や IL-22 とともに表皮角化細胞に作用して分化異常を誘導し、表皮肥厚を起こすとともに、IL-36 や血管内皮細胞増殖因子などのサイトカインやケモカイン、抗菌ペプチドの分泌を亢進させる。病態の中心をなす TNF/IL-23/IL-17 経路はこれらの経路を阻害する生物学的製剤の治療により乾癬が著効することからも立証されている。

今回我々が研究した CXCL17 は新しく発見された CXC ケモカインファミリーの一つで、気管、胃、大腸などの粘膜組織、樹状細胞や血管内皮細胞に強く発現する一方で、肝細胞癌や乳癌、肺癌、大腸癌などの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、腫瘍自体でも産生され、独立した予後不良因子となる。CXCL17 の受容体は GPR35/CXCR8 と同定され、消化管や肺を含む粘膜組織に発現し、マクロファージや樹状細胞、顆粒球に発現する。CXCL17 は単球、マクロファージ、樹状細胞に対する細胞走化因子として作用するが、同時に腫瘍増殖を促進することが報告されている。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。一方で CXCL17 はマウス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、間質性肺炎の粘膜において抗菌活性を持つケモカインとして報告されている。

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、CD25 を発現し、転写因子 Foxp3 がマスター制御因子となり、Treg の増殖、機能に関わる。IL-10 も Foxp3 とともに Treg の活性化マーカーとして知られる。乾癬においては末梢血中の Treg 数に変化はないが、機能異常が報告されている。MDSC は腫瘍の微小環境において免疫抑制に関与する未分化な前駆骨髄細胞からなる細胞で、T 細胞の増殖とサイトカイン産生を強力に抑制する。マウスにおいては CD11b、Gr-1 を表面マーカーとして発現し、Arginase 1 は MDSC の活性化マーカーとして知られる。

イミキモドは Toll-like receptor 7 と 8 のリガンドであり、局所外用によりヒトの乾癬の皮疹によく似た皮膚炎を起こすことができ、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎として乾癬の病態解明に用いられている。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。本研究で我々は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 の役割を解明することを目的とした。最初に皮膚疾患における CXCL17 の関与を調べるため、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、正常皮膚における CXCL17 の mRNA の発現量を測定したところ、乾癬において有意な上昇を認めた。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。乾癬の病変部皮膚の免疫染色でも表皮角化細胞の CXCL17 の発現が増強していた。次に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- α 、IFN- γ で 24 時間刺激して CXCL17 の発現を調べた。HaCaT 細胞、ヒト正常表皮角化細胞ともに IFN- γ 刺激で CXCL17 の発現が上昇し、IL-4、TNF- α で CXCL17 の発現に変化はなかった。ヒト正常表皮角化細胞では IFN- γ の濃度依存的に CXCL17 の発現が上昇し、培養上清中の CXCL17 の蛋白量も濃度依存的に増加した。

乾癬の病態における CXCL17 の関与を調べるため乾癬の動物モデルであるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を用いた。イミキモド外用 2 日後のマウス皮膚において CXCL17 の発現が上昇しており、ヒト乾癬病変部皮膚における CXCL17 の発現上昇と一致する結果であった。野生型マウスの耳に CXCL17 を投与するのみでは臨床的、組織学的変化が起きなかったため、イミキモド外用前、外用中に CXCL17 を投与したところ、耳の厚さの変化が CXCL17 を注射した群で有意に低下した。組織学的検討でも CXCL17 を投与した群では PBS を投与した群に比べて、イミキモドによる耳の肥厚が抑制され、浸潤する炎症細胞数も有意に低下し、皮膚の RT-PCR でも IL-17A、IL-22、TNF- α 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19 といった乾癬の病態に関わる炎症性サイトカイン

ンの発現が低下していた。CXCL17 投与で炎症が抑制されると同時に、Treg の活性化マーカーである Foxp3、IL-10、MDSC の活性化マーカーである Arginase 1 の発現が亢進しており、Treg、MDSC の関与が考えられたため、蛍光免疫染色とフローサイトメトリーで評価した。蛍光免疫染色では CXCL17 を投与した群で CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞、Foxp3 陽性細胞がそれぞれ増加していた。フローサイトメトリーでも CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞、CD4 陽性 CD25 陽性細胞がそれぞれ増加していた。このように CXCL17 の投与は皮膚に浸潤する Treg と MDSC の細胞数を上昇させた。マウスの脾臓より採取した MDSC、Treg を用いて *in vitro* で CXCL17 に対する遊走能を評価したところ、MDSC は CXCL17 に濃度依存的に遊走したが、Treg は遊走しなかった。また MDSC は CXCL17 の受容体である Gpr35 の mRNA を発現したが、Treg や CD4 陽性 CD25 陰性細胞はどちらも Gpr35 を発現しなかった。

MDSC が CCR5 依存的に Treg を誘導するため、CCR5 の ligand である CCL5 に注目した。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎に CXCL17 を投与すると同時に抗 CCL5 抗体を投与したところ、CXCL17 とコントロール IgG を打った群では PBS とコントロール IgG を打った群より耳の厚さが減弱したが、CXCL17 と抗 CCL5 抗体を打った群では PBS とコントロール IgG を打った群と耳の厚さが同程度となった。また抗 CCL5 抗体を投与することで IL-17A、IL-22、TNF- α 、IL-12p35、IL-12/23p40、IL-23p19 の mRNA 発現量も増加した。抗 CCL5 抗体を投与することで CXCL17 の抗炎症作用が抑制されたと考えられた。同様の効果は CCR5 の別の ligand である CCL4 の中和抗体でも得られた。一方で同じく CCR5 の ligand である CCL3 の中和抗体は CXCL17 の抗炎症作用に変化を起こさなかった。抗 CCL5 抗体または抗 CCL4 抗体を CXCL17 と同時に投与することで CXCL17 とコントロール IgG を投与した群と比べて IL-10、Foxp3 の mRNA 発現量が低下し、PBS とコントロール IgG を投与した群と同程度となった。

以上の結果をまとめると、CXCL17 は乾癬病変部皮膚において発現が亢進しており、*in vitro* では表皮角化細胞を IFN- γ 刺激することで CXCL17 の発現が増加した。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎に CXCL17 を投与することで皮膚炎が減弱し、炎症性サイトカインの発現が抑制される一方で MDSC マーカーと Treg マーカーは発現が亢進した。CXCL17 を投与した群で皮膚に浸潤する MDSC、Treg の細胞数は上昇していた。*In vitro* で MDSC は CXCL17 に走化性を示し、CXCL17 の受容体である Gpr35 を発現していたが、Treg は CXCL17 に遊走せず、Gpr35 も発現していなかった。CXCL17 と同時に抗 CCL5 抗体、抗 CCL4 抗体を投与することで CXCL17 の抗炎症作用が抑制された。以上より CXCL17 は直接的に MDSC を誘導し、MDSC が CCL5 や CCL4 を介して Treg

の遊走を起こし、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を抑制したと考えた。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。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。