

## 論文の内容の要旨

論文題目 **CXCR3**ノックアウトマウスにおける接触皮膚炎反応

氏名 管 析

接触皮膚炎反応は、外来性の刺激物質や化学抗原が皮膚に接触することによって発症する湿疹性の炎症反応であり、化粧品、金属、植物など様々な物質が接触皮膚炎を起こすことが知られている。その発生のメカニズムの全体像はいまだ不明であるが、多種の免疫担当細胞が末梢組織である皮膚とリンパ節の間で行き来し、シグナルを伝達することで成立すると考えられている。接触皮膚炎を起こす化学抗原の一つが **dinitrofluorobenzene (DNFB)** であり、**T helper (Th)1** 細胞の活性化に関与することで **Th1** 系の接触皮膚炎を起こすことが報告されている。一方、**fluorescein isothiocyanate (FITC)** を用いた接触皮膚炎は、**Th2** が優位な免疫応答であることが報告されている。接触皮膚炎はマウスで容易に再現できる実験系であり、各免疫担当細胞の機能を解析する上で頻用されている。

今回実験に用いたマウスは **CXCR3** ノックアウトマウスであるが、**CXCR3** とは **CXCL9**、**CXCL10**、**CXCL11** の受容体であり主に **Th1** 細胞に発現しているケモカイン受容体である。**CXCR3** は **Th1** 細胞を炎症の場に引き寄せる際に重要であると言われており、**CXCR3** とそのリガンドである **CXCL9-11** が自己免疫疾患および心移植、腎移植後の拒絶反応に関与しているとの報告がある。その一方で脳脊髄炎モデルや自己免疫性肝炎モデルにおいては、**CXCR3** ノックアウトマウスにおいて病勢が悪化していたとの報告がある。これらの報告をまとめて考えると、マウスの疾患モデルによって **CXCR3** の働きは異なるものと考えられる。今回我々は **CXCR3** ノックアウトマウスを用いて **DNFB** による **Th1** 型の接触皮膚炎、**FITC** による **Th2** 型の接触皮膚炎を引き起こ

し、接触皮膚炎における CXCR3 の役割を解明することを実験の目的とした。

最初に、DNFB または FITC による接触皮膚炎における耳介の腫れを計測した。野生型マウスでは耳介腫脹は DNFB 刺激後 36 時間の時点でピークに達し、その後徐々に腫れが引いていったのに対し、CXCR3 ノックアウトマウスでは刺激後 36 時間でピークに達した後も腫れが遷延していた。DNFB 刺激後 72-168 時間の時点で CXCR3 ノックアウトマウスの耳介は野生型マウスと比較して有意に腫脹していた。一方、FITC による接触皮膚炎では、野生型マウスと CXCR3 ノックアウトマウスの間で有意な差はなかった。耳介を組織学的に検討したところ、DNFB 刺激後 24 時間の時点では野生型と CXCR3 ノックアウトマウスにおいて耳介の腫れ、炎症細胞浸潤の程度などの組織学的な差は見られなかったが、DNFB 惹起後 120 時間の時点では野生型マウスの耳の腫れは軽快し、炎症細胞浸潤もわずかであるのに対し、CXCR3 ノックアウトマウスでは耳の腫れが残り、炎症細胞浸潤も多く見られた。耳組織に浸潤している好酸球、肥満細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、マクロファージの数をカウントしたところ、惹起前、惹起 24 時間後では野生型マウスと CXCR3 ノックアウトマウスにおいて同程度であるが、惹起 120 時間後では CXCR3 ノックアウトマウスにおいて野生型と比較して多くの細胞が浸潤していた。一方、FITC による接触皮膚炎ではいずれの時点においても両マウスにおける耳介の腫れ、炎症細胞浸潤の点で有意な差は見られなかった。

次に DNFB もしくは FITC による惹起前、惹起後 24 時間、72 時間、120 時間の時点での耳組織を回収し、各種サイトカイン発現を検討した。惹起後 24 時間における IFN- $\gamma$ 、CXCL9、CXCL10 の発現は、野生型マウス、CXCR3 ノックアウトマウスいずれも惹起前と比べて著明に増加していたが、両者間で差はなかった。72 時間、120 時間の時点でこれらの Th1 型のサイトカインは、CXCR3 ノックアウトマウスにおいて野生型マウスよりも有意に発現が高かった。一方、TGF- $\beta$  の発現は CXCR3 ノックアウトマウスにおいて惹起後 24 時間および

72 時間の時点で野生型よりも低かった。同様に IL-10 の発現も CXCR3 ノックアウトマウスにおいて惹起後 72 時間の時点で野生型よりも低かった。さらに、CXCR3 ノックアウトマウスでは惹起後 24 時間と 72 時間の時点で regulatory T 細胞(Treg)の特異的なマーカーである forkhead box P3 (Foxp3)の発現が野生型よりも低かった。Treg は TGF- $\beta$  や IL-10 などの免疫抑制に関わるサイトカインを産生することでエフェクター細胞の増加およびその働きを抑えていることが報告されており、CXCR3 ノックアウトマウスにおける TGF- $\beta$  や IL-10 の発現低下が、Treg の浸潤が少ないためであることを示唆していた。FITC による接触皮膚炎ではこれらのサイトカインは両マウスにおいて差がなく、耳の腫れの経時的変化と矛盾しない結果だった。

皮膚に浸潤している Treg の数を調べるために、DNFB 惹起後 72 時間、120 時間の耳組織を用いて Foxp3 染色を行った。72 時間の時点における野生型マウスの耳組織での Foxp3 陽性細胞数は  $20.9 \pm 5.9$  (平均  $\pm$  標準誤差) 個/視野 (400 倍)、CXCR3 ノックアウトマウスでは  $8.9 \pm 2.8$  個/視野であり、CXCR3 ノックアウトマウスで有意に少ないという結果だった。120 時間の時点での Foxp3 陽性細胞数は両者の間において差はなかった。さらに Foxp3 と CXCR3 を二重染色したところ、惹起後 72 時間の耳組織における CXCR3 陰性 Foxp3 陽性 Treg は野生型、CXCR3 ノックアウトマウスそれぞれにおいてほぼ同数であった。これらの結果から、CXCR3 ノックアウトマウスの皮膚に浸潤している Treg の数が野生型よりも少ないのは CXCR3 陽性 Treg が欠損していることに起因すると考えられた。

さらに我々は *in vitro* と *in vivo* の両方において CXCR3 陽性 Treg と CXCR3 陰性 Treg の機能解析を行った。皮膚を用いた定量 PCR と同様に Th1 系のサイトカイン、TGF- $\beta$ 、IL-10 などの mRNA 発現を測定したところ、CXCR3 陽性 Treg では陰性 Treg と比べて、IFN- $\gamma$  や CXCR3 といった Th1 系のサイトカインおよび抑制系のサイトカインである TGF- $\beta$  や IL-10 の発現が高かった。*In vivo* における実験では、DNFB 感作した CXCR3 ノッ

クアウトマウスに CXCR3 陽性 Treg を尾静注により移入し、24 時間後に耳を DNFB で惹起したところ、耳の腫れの遷延は正常化した。一方、CXCR3 陰性 Treg を尾静注した CXCR3 ノックアウトマウスでは、耳の腫れの遷延が引き続き見られた。

要約すると、Th1 型の接触皮膚炎において DNFB による惹起後、CXCR3 ノックアウトマウスにおける耳介の腫脹は野生型マウスと比較して遷延しており、Th1 系のサイトカイン発現の上昇および TGF- $\beta$  と IL-10 の発現低下を伴っていた。一方、Th2 型の接触皮膚炎においては FITC による惹起後、CXCR3 ノックアウトマウスと野生型マウスの間で耳介の腫脹に有意な差は見られなかった。Th1 型の接触皮膚炎において、反応を起こした耳介に浸潤している Treg の数は CXCR3 ノックアウトマウスにおいて野生型と比べ減少しており、CXCR3 が Treg を炎症の場に引き寄せる際に重要であることを示唆していた。CXCR3 陽性 Treg に着目したところ、CXCR3 陽性 Treg が CXCR3 陰性 Treg よりも TGF- $\beta$  や IL-10、IFN- $\gamma$  などを高いレベルで発現していた。さらに、CXCR3 ノックアウトマウスに CXCR3 陽性 Treg を移入することで耳介の腫脹の遷延は正常化した。以上のことから、Th1 型の接触皮膚炎を抑える際に CXCR3 陽性 Treg が重要な役割を果たしていることが示された。