

博士論文

論文題目 乾癬の病態における ICAM-1, L-selectin の役割
の検討

氏名 三井 彩

目次

I. 要旨

II. 序文

III. 方法

IV. 結果

V. 考察

VI. 謝辞

VII. 参考文献

VIII. 図表

I. 要旨

乾癬とは表皮細胞の過形成、分化異常と多数の白血球の浸潤を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。今回白血球浸潤に重要な接着分子である ICAM-1 と L セレクチンの乾癬の病態における役割を検討するため、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスに、トール様受容体 7/8 のアゴニストであるイミキモドを外用し乾癬様皮疹を惹起させた。ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウスでは野生型と比較し皮疹は軽度であったが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは予想に反して増悪した。L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは病変部皮膚における乾癬の病態で重要なサイトカインであるところの IL-17A, IL-23, TNF α の発現増強がみられ、さらに抗 TNF α 抗体による皮疹改善効果が乏しかった。L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスの病変部皮膚では、E セレクチンおよび E-selectin ligand-1(ESL-1)の発現が増強していた。本実験の結果から、ICAM-1 と L セレクチンが同時に消失した状態でイミキモド外用により乾癬様皮疹を惹起すると、他の細胞接着分子の発現が代償的に増加し、むしろ皮膚の炎症が強く惹起されることが示された。

II. 序文

乾癬とは鱗屑を付着した表皮細胞の過形成、分化異常と多数の白血球の浸潤を特徴とする慢性炎症性皮膚疾患である。乾癬の病態は近年徐々に明らかになってきており、病態形成に関わるサイトカインを抑制する生物学的製剤など、新たな治療法も確立されてきているが、現在のところ完治は困難であり、病態についても完全には明らかになっていない。今回の実験では、乾癬の病態における細胞接着分子の役割について検討を行った。

皮膚の炎症局所への白血球が浸潤する過程は、一連の細胞接着分子の発現によって制御されている。白血球は血管外へ漏出する時に、皮膚の血管内皮細胞によって捕獲(capture)され、血管に沿って転がり(rolling)、固着する(firm adhesion)。その後、血管内皮細胞を通り抜け(transmigration)、血管孔へと遊出し(diapedesis)、皮膚へと浸潤する。セレクトリンファミリーと呼ばれる L セレクトリン(CD62L)、E セレクトリン(CD62E)、P セレクトリン(CD62P)は、初めの内皮細胞での capture と rolling に関与し(1)、inter-cellular adhesion molecule(ICAM)-1 などの免疫グロブリンスーパーファミリーと、そのリガンドであるインテグリンは、その後の強固な接着に関し重要な役割を果たしている。E セレクトリン、P セレクトリン、ICAM-1 は主に血管内皮細胞に発現しており、L

セレクトリンはほぼ全ての白血球に発現している(2)。セレクトリンのリガンドとしては、P-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)は、3種類の全てのセレクトリンに認識され(3)、E-selectin ligand-1(ESL-1)はEセレクトリンと結合する。Lセレクトリンのリガンドは血管内皮細胞に発現し、CD34, GlyCAM-1, podocalyxinなどが報告されている。ICAM-1は、leukocyte function-associated antigen-1(LFA-1)や、リンパ球の $\beta 2$ インテグリンと結合する。ICAM-1とLFA-1の相互作用は、主に炎症局所での白血球の接着と移動の調節に参与している。主な細胞接着分子とそのリガンドを図1に示す。

細胞接着分子の *in vivo* での免疫学的役割については、各細胞接着因子のノックアウトマウスを用いて研究されている。Lセレクトリン欠損マウスでは、皮膚での遅発性過敏反応における炎症部位への遊走白血球数の減少、遅発性過敏反応の低下、同種皮膚移植の拒絶反応の低下、LPS誘発性敗血症性ショックの軽減が生じることが報告されている(4-9)。ICAM-1ノックアウトマウスでは、腹腔炎における浸潤好中球数の大幅な減少、LPS誘発性の敗血症性ショックの軽減、創傷治癒の遅延、遅発性過敏反応の低下がみられるが、同種皮膚移植に対する拒絶反応は正常である(5,10-12)。Lセレクトリン/ICAM-1ノックアウトマウスでは、どちらか一方が欠如したマウスと比べ、炎症部位への白血球の遊走が低下することが報告されている(12,13)。Eセレクトリン欠損マウスでは、白血球の

rolling や炎症の程度に明らかな低下はみられないが、同時に P セレクチンを欠損させると、炎症が減弱することがわかっている(14-17)。つまり L セレクチン、E セレクチン、P セレクチン、ICAM-1 はそれぞれの発現レベルによって調節されながら、炎症局所における白血球の遊走に関して協調的に作用している。さらに、これら細胞接着分子を欠損させたマウスではその多くで炎症反応は減弱しており、in vivo での炎症惹起における接着分子の役割の重要性が示されている。

乾癬とは、表皮細胞の過形成、分化異常と白血球の多数の浸潤によって特徴づけられる、慢性の炎症性の皮膚疾患である(18)。図 2 に示すように、乾癬では樹状細胞、T 細胞などの炎症細胞浸潤がみられる。樹状細胞を含む抗原提示細胞から産生される IL-23 は Th17 細胞を活性化し、Th17 細胞より分泌された IL-17、IL-22 が表皮細胞の増殖や炎症を誘導し、乾癬の病態が形成される。IL-17 は、Th17 細胞の他、 $\gamma \delta$ T 細胞、肥満細胞、好中球より産生され、TNF α は樹状細胞、表皮細胞、T 細胞、肥満細胞などから産生される。

細胞接着分子は、乾癬の病態形成においても重要な役割を果たしている。例えば、ICAM-1 は、乾癬患者の病変部皮膚および非病変部皮膚において発現が増強している(19)。また、ICAM-1 のリガンド LFA-1 に対するモノクローナル抗体である Efalizumab は、乾癬に効果を示すことがわかっている。加えて、重

症の乾癬患者の血清 L セレクチン濃度は、健常人と比べて優位に高いことが報告されている(20)。しかし、乾癬における L セレクチンと ICAM-1 の役割や、炎症における協調的作用については解明されていない。

最近、トール様受容体(TLR)7/8 のリガンドであるイミキモドをマウスに外用することで、表皮肥厚、錯角化、様々な炎症細胞浸潤が生じ、乾癬様の皮疹が誘発されることから、イミキモド外用マウスが乾癬モデルマウスとして使用できることが報告された(21)。イミキモドは、尖圭コンジローマの治療などに対し臨床で使用されている薬剤である。単球や樹状細胞に発現する TLR7 に作用し、主にインターフェロン α の産生促進を介したウイルス増殖の抑制および細胞性免疫応答の賦活化によるウイルス感染細胞の障害により効果を発揮する。乾癬モデルマウスには、例えば他に IL-23 を局所注射する方法などがある。IL-23 局所注射による乾癬モデルマウスは、乾癬と同様に Th17 系の免疫反応がみられるが、紅斑や鱗屑などの臨床症状はみられない。それに対し、イミキモド外用による乾癬モデルマウスは、紅斑、鱗屑、浸潤などの臨床症状がみられ、かつ Th17 系の炎症が皮膚に生じるという点で、実際の乾癬に近いモデルである。しかし、イミキモド外用マウスは、臨床症状が約 7 日間で消失することや、外用を行った部位にのみ症状が出現する点が、実際の乾癬とは異なる。

今回、乾癬の病態における ICAM-1 と L セレクチンの役割を検討するため、

ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスを用いて、イミキモドを外用することで乾癬様皮疹を誘発させ、乾癬様の皮膚の炎症の重症度を臨床的、組織的に検討した。また、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは予想に反し、むしろ強い乾癬様皮疹が誘発されたため、その機序についても検討を加えた。

Ⅲ. 方法

[1] マウス

ICAM-1 欠損マウス(10)、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウス(13)は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)より購入し、C57BL/6 系に 10 回戻し交配を行って作成した。C57BL/6 マウス(以下野生型)は、日本 SLC(Tokyo, Japan)より購入した。研究に用いたマウスは 8-12 週齢であり、specific pathogen-free(SPF)環境、12 時間の明暗サイクル、水と餌を自由に摂取できる状態で飼育された。

[2] イミキモドによる乾癬様皮疹の誘発と抗体の投与

マウスの背部を剃毛し、5%イミキモドクリーム(ベセルナクリーム;持田製薬, Tokyo, Japan)を 62.5mg、あるいはコントロールとしてワセリンを、背部皮膚および右耳に 6 日間連日外用した。いくつかの実験では、200 μ g あるいは 400 μ g の monoclonal anti-mouse TNF- α 抗体(Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO)、200 μ g の抗マウス E セレクチン抗体、(Abcam, Cambridge, UK)、

コントロール IgG 抗体(Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO)を、イミキモド外用の 1 日前および 3 日目に、腹腔内投与した。

[3] 皮疹の重症度の評価

乾癬患者に対し臨床で使用されている Psoriasis Area and Severity Index(PASI)スコアに基づいて、皮疹の重症度を評価した(21)。紅斑、鱗屑、表皮肥厚の程度を、0; なし、1; 軽度、2; 中等度、3; 高度、4; とても高度、の 5 段階でそれぞれ点数化した。合計点を、炎症の重症度とした(0-12 点)。右耳の厚さは、マイクロメーターを用いて、2 度ずつ測定を行った。

[4] 組織学的検討

マウスの背部皮膚組織は、Tissue-Tek OCT compound(Sakura Finetech, Torrance, CA)に包埋し、液体窒素で凍結し、-80 度で保存した。その後クリオスタットを用いて 6 μ m の厚さに薄切し、染色に用いた。抗マウス CD3 抗体および抗マウス MHC class II 抗体は、Abcam 社(Cambridge, UK)より購入した。薄切した皮膚組織は、5 分間アセトンにて固定をし、ヘマトキシリン-エオジン

(HE)染色を行った。また、抗マウス CD3 抗体、抗 MHC-class II 抗体およびアイソタイプのコントロール抗体を用いて 4°C で一晩保存した後、PBS で洗浄し、ビオチン結合抗ラット IgG 抗体、ABC staining kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて室温で 2 時間置いた。その後 Vectastain ABC -AP 試薬を用い、Mayer hematoxylin で対比染色を行った。

[5] Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis

マウスの背部皮膚を採取し、RNeasy fibrous Tissue Mini kits (Qiagen, Germantown, MD) を用いて RNA を抽出した。RNA は Superscript III First strand synthesis kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて逆転写し、cDNA を作成した。Taqman probe とプライマーは、Applied biosystems (Warrington, UK) より購入した。RNA 量の評価には、 $\Delta\Delta CT$ technique を採用した。GAPDH の RNA 量との比較をグラフに示した。

[6] 統計学的解析

得られたデータは平均±SE で示した。解析には Dunnet's multiple comparison test による One-way ANOVA および Unpaired t test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

IV. 結果

[1] ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおけるイミキモド誘発性乾癬様皮疹の臨床所見および組織所見

乾癬の病態における ICAM-1 および L セレクチンの作用を検討するため、野生型マウス、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスそれぞれに対し、剃毛した背部皮膚および右耳に、6 日間連続してイミキモドを外用した(図 3)。野生型マウスと比較し、ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは、イミキモド 6 日間外用後の皮疹は軽度であった。それに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは、野生型と比較して皮疹の悪化がみられ、表皮肥厚や鱗屑の程度もより重度であった。

これらのマウスの臨床所見の差異を定量的に評価するため、イミキモド外用後の皮疹の重症度、耳の厚さ、表皮肥厚の程度について比較した。まずイミキモド外用後の背部皮膚の紅斑、鱗屑、表皮肥厚を、それぞれ 0 から 4 点までで点数化した。そしてこれらの点数を累計し、疾患の重症度スコアとして評価した。肉眼的な臨床所見と一致して、L セレクチンおよび ICAM-1 の単独欠損マウスでは野生型と比べ有意に重症度スコアが低下していたが、L セレクチン

ICAM-1 欠損マウスでは、イミキモド外用後 5 日目と 6 日目において、野生型と比べスコアの増悪がみられた(図 4A)。6 日目での耳の厚さと、表皮肥厚の程度の比較においても同様の結果であった(図 4B, C)。皮膚に浸潤する細胞の数は、野生型と比較し ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは有意に減少していたのに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは増加していた(図 4D)。以上のことから ICAM-1 あるいは L セレクチンの単独の欠損ではイミキモド誘発性乾癬様皮疹は野生型と比較して軽症となるが、両方欠損したマウスではむしろ増悪することがわかった。

[2] イミキモド外用後の皮膚に浸潤する MHC-class II 陽性抗原提示細胞と CD3 陽性 T 細胞の数

イミキモド外用後のマウスに浸潤する細胞の検討のため、イミキモド外用 3 日目のマウスの背部より皮膚を採取し、MHC-class II 陽性抗原提示細胞および CD3 陽性 T 細胞の数を比較した。イミキモド外用後の MHC-class II 陽性抗原提示細胞は、野生型と比較し、ICAM-1 欠損マウスでは減少しており、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは増加していた(図 5A,B)。L セレクチン欠損マウスと野生型では有意な差がみられなかった。CD3 陽性 T 細胞数は、ICAM-1 欠損マ

ウスと L セレクチン欠損マウスでは、野生型と比較し有意に減少していたが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは野生型と比較して有意な差はみられなかった(図 5A,B)。以上より、T 細胞の浸潤は ICAM-1 欠損マウスと L セレクチン欠損マウスで野生型と比べて減少しており、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは T 細胞数の増加はないものの抗原提示細胞数の増加がみられた。

[4] L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは IL-17A, IL-23, TNF α の mRNA 発現が増加している

次に、乾癬の悪化に関与するサイトカインである IL-17A, IL-23, TNF α について、皮膚での発現の程度を比較検討した。イミキモド外用 2 日目および 4 日目のマウス背部の皮膚を用いて、リアルタイム PCR 法にて各サイトカインの mRNA の発現を評価した。イミキモド外用 2 日目において、IL-17A の発現が、ICAM-1 欠損マウスと L セレクチン欠損マウスでは野生型と比較し有意に低下していた(図 6A)。L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスと野生型の間には有意差はなかった。しかし、イミキモド外用 4 日目では、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでの IL-17A の発現は、野生型と比較し増加していた。IL-23, TNF α の発

現については、イミキモド外用 2 日目では有意差がみられなかったものの、イミキモド外用 4 日目で L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは野生型と比較し増加がみられた。TGF- β 、IL-10 についてはイミキモド外用 2 日目、4 日目ともにいずれのマウスにおいても有意差がみられなかった。乾癬患者の皮膚における IL-23 と TNF α の主な産生細胞は抗原提示細胞であることがわかっており

(22)、このリアルタイム PCR の結果は、イミキモド外用 3 日後の L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおける MHC-class II 陽性細胞の浸潤が野生型と比べて増加していたことと合致する。この実験結果からは、IL-23 および TNF α の発現増加に加え、IL-17A の発現増加が、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおける乾癬様皮疹の悪化に関与しているものと考えられた。皮膚での炎症抑制に関与する制御性 T 細胞由来のサイトカインである IL-10, TGF β についてもイミキモド外用 2 日後および 4 日後に測定したが、いずれも野生型と比較して有意な差はみられなかった。

[5] L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは、E セレクチンおよび ESL-1 の発現が増加している

L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおいて、総浸潤細胞数、抗原提示細胞数の

増加がみられたことから、他の細胞接着分子の代償的な発現増強が生じている可能性について調べた。剃毛したマウスの背部にイミキモドまたはワセリンを外用し、4日目の皮膚においてEセレクトリン、ESL-1、Pセレクトリン、PSGL-1のmRNA発現について、リアルタイムPCR法にて測定した。ワセリンを外用したマウスでは、野生型と比較し、ESL-1、Pセレクトリン、PSGL-1のmRNA発現の増加はみられなかった。しかし、イミキモド外用群においては、Eセレクトリン、ESL-1の発現増加がみられた(図6B)。PセレクトリンおよびPSGL-1については、野生型と比較し有意差はみられなかった。以上より、ICAM-1およびLセレクトリンが同時に欠損すると、EセレクトリンおよびESL-1の代償的な発現増加がみられることがわかった。

そこで、イミキモド外用2日後の皮膚でのEセレクトリン陽性細胞数の測定を行った。図7に示すように、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスにおいてEセレクトリン陽性の血管内皮細胞数が野生型やICAM-1欠損マウス、Lセレクトリン欠損マウスと比較し有意に増加しており、リアルタイムPCRにてEセレクトリンの発現が増加していた結果と合致していた。

[6] Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスに抗Eセレクトリン抗体を投与することにより、イミキモド誘発性乾癬様皮疹の改善がみられる

Eセレクトチンおよび ESL-1 の発現増加により Lセレクトチン/ICAM-1 欠損マウスでのイミキモド誘発性乾癬様皮疹が悪化していることを示すため、 $200\mu\text{g}$ の抗 Eセレクトチン抗体あるいはコントロール IgG 抗体を、イミキモド外用 1 日前および 3 日目にそれぞれ腹腔内投与し、イミキモドを 6 日間連日外用した。図 8 に示すように、コントロール IgG 抗体を投与したマウスと比較し、抗 Eセレクトチン抗体を投与したマウスで臨床所見の改善がみられた。この結果から、イミキモド誘発性乾癬様皮疹の悪化に Eセレクトチンの発現亢進が関与していることが示された。

[7] Lセレクトチン/ICAM-1 欠損マウスでは、抗 TNF α 抗体による治療に抵抗性である

重症の乾癬に対し、抗 TNF α 抗体加療が奏効することが知られている(23, 24)。ICAM-1 欠損マウス、Lセレクトチン欠損マウス、Lセレクトチン/ICAM-1 欠損マウスそれぞれでのイミキモド誘発性乾癬様皮疹に対する抗 TNF α 抗体の効果をみるため、 $200\mu\text{g}$ あるいは $400\mu\text{g}$ の抗 TNF α 抗体あるいはコントロール IgG 抗体を、イミキモド外用 1 日前および 3 日後に、腹腔内投与した。抗 TNF α 抗

体を $200\ \mu\text{g}$ 投与した野生型マウス、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウスでは、ほぼ皮疹が消失したが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは治療抵抗性であった(図 9)。一方、抗 TNF α 抗体を $400\ \mu\text{g}$ に増量したところ、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでも皮疹が改善した。以上のことから、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは野生型と比較し倍量の抗 TNF α 抗体が皮疹の改善に必要であることがわかった。

V. 考察

本研究では、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおいて、イミキモドを外用し乾癬様皮疹を惹起させる方法で、乾癬の病態における ICAM-1、L セレクチンの役割について検討した。臨床所見および組織所見の解析では、イミキモドで誘発される乾癬様皮疹は、ICAM-1 欠損マウスと L セレクチン欠損マウスでは野生型と比較し軽症となるのに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは逆に増悪がみられた。この結果と合致するように、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは野生型と比較し、乾癬の悪化に関わる IL-17A, TNF α 、IL-23 の皮膚での発現増加がみられており、それには MHC-class II 陽性抗原提示細胞の浸潤が多くみられたことが関連すると考えられた。また、抗 TNF α 抗体にてイミキモド誘発性乾癬様皮疹を治療した際、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスのみ炎症を抑えるのに倍量必要としたことは、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスではより治療抵抗性の炎症が生じていることを示すものと考えた。

ヒト化抗 CD11a モノクローナル抗体である Efalizumab は、LFA-1 の α 鎖サブユニットをターゲットとし、ICAM-1 との相互作用を阻害する薬剤であるが、これは中等度から重症の乾癬患者の治療に効果を示した(26)。しかし、進行性多

単性白質脳症の副作用が生じたことから(27)、市場から姿を消した。本実験において、ICAM-1 欠損マウスではイミキモド誘発性乾癬様皮疹が野生型と比較し有意に軽快したことは、LFA-1 と ICAM-1 の相互作用が乾癬の病態形成に重要であることがわかる結果であり、Efalizumab の乾癬への有効性と合致する所見であった。

T 細胞と樹状細胞の両方に発現している LFA-1 は、血管内皮細胞と樹状細胞に発現している ICAM-1 と結合することで、LFA-1 陽性細胞を組織内に移行させ、また ICAM-1 陽性樹状細胞に作用することで T 細胞を活性化させる(28-31)。実際、Efalizumab による乾癬の治療では、HLA-DR 陽性樹状細胞、CD11c 陽性樹状細胞および CD3 陽性 T 細胞の、病変部皮膚への浸潤が強く抑制される(32)。本実験においても、ICAM-1 欠損マウスにおけるイミキモド誘発性乾癬様皮疹の病変部皮膚への、MHC-class II 陽性抗原提示細胞と CD3 陽性 T 細胞の浸潤が抑制されていた。イミキモド誘発性乾癬様皮疹への CD3 陽性 T 細胞の浸潤は、L セレクチン欠損マウスにおいても減少していたが、MHC-class II 陽性抗原提示細胞の数は L セレクチン欠損マウス野生型との間に有意差がみられなかったことを考えると、乾癬の病変部皮膚への抗原提示細胞の浸潤には、L セレクチンの関与は ICAM-1 に比べると少ないものと考えられた。

ICAM-1 欠損マウスと L セレクチン欠損マウスではイミキモド誘発性乾癬様

皮疹の炎症が減弱したのに対し、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスは野生型と比較し、皮疹の炎症の増強がみられた。炎症部位への白血球遊走に関わる細胞接着分子の役割は複雑で、機能的に重複していることが示唆されているため(1)、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスにおいて他の細胞接着分子の代償的な発現増加が生じていないか検討を行った。リアルタイムPCRの結果、Eセレクトリンの発現が、ICAM-1欠損マウスとLセレクトリン欠損マウスではイミキモド外用後の皮膚で野生型と比較し減少していたのに対し、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスでは野生型と同レベルであった。また、ESL-1の発現は、野生型と比べLセレクトリン/ICAM-1欠損マウスで増強していた。興味深いことに、Pendlらは、炎症を生じている皮膚に未熟な樹状細胞が浸潤するためには、EセレクトリンとPセレクトリンが必要であると報告している(33)。彼らは、マウスの未熟な樹状細胞がEセレクトリンとPセレクトリンのリガンドを発現していることを示した。彼らはまた、抗PSGL-1抗体ではなく、抗Eセレクトリンと抗Pセレクトリン抗体の投与において、*in vivo*で炎症皮膚への未熟な樹状細胞の侵入を阻害したことを示した。そこで、本実験でもLセレクトリン/ICAM-1欠損マウスに抗Eセレクトリン抗体を投与し、イミキモド誘発性乾癬様皮疹が改善されることを示した。この結果からLセレクトリン/ICAM-1欠損マウスの血管内皮細胞でのEセレクトリンの代償性の発現増加により、ESLを発現する抗原提示細胞の浸潤が促進され

(33,34)、その抗原提示細胞から産生される $\text{TNF}\alpha$ と IL-23 が増加することで、イミキモド誘発性乾癬様皮疹が悪化したと考えられた。

E セレクチンは、乾癬患者の病変皮膚にて実際に発現が増加している(35)。それに加え、本実験の結果から、乾癬の病態において E セレクチンおよび ESL の発現の重要性も示唆された。しかし、抗 E セレクチン抗体単独では乾癬治療に効果は不十分である(36)。これは抗 E セレクチン抗体治療によって、P セレクチンなど他の細胞接着因子が代償性に増加した可能性が考えられる。例えば、慢性接触性皮膚炎において、E セレクチン欠損マウスでは P セレクチンの代償的増加が生じており、抗 P セレクチン抗体投与により反応が抑制されたことが報告されている(37)。実際、汎セレクチン抗体である bimosiamose は、E セレクチンと P セレクチンの両者を阻害するが、乾癬患者の PASI スコアを著明に改善させた(38)。乾癬の皮膚の炎症に対する細胞接着因子の機能的な役割は、他の細胞接着因子の発現により変化すると考えられる(39,40)。そのため、乾癬に対する特定の細胞接着因子をターゲットにした治療の効果は、臨床試験や乾癬モデルマウスを用いた実験を行ってみないとわからず、事前に予測することは困難であると考えられる。

なぜ L セレクチンあるいは ICAM-1 の単独欠損では代償が働かず、同時に欠損した場合に他の細胞接着分子の代償的発現増加が生じるかについては不明であ

る。今回の結果から、細胞接着分子はお互いに補填しあう作用があると推測され、複数の接着分子を同時に欠損させることで初めて他の細胞接着分子の代償性の発現増加が生じるという可能性が示唆された。

乾癬の病態における炎症性サイトカインとヘルパーT(Th)17細胞の中心的な役割は、TNF α 、IL-23、IL-17をターゲットとした治療薬が効果を示すことから解明されている(24,25,41,42)。活性化したT細胞と樹状細胞から分泌されるTNF α は、局所のT細胞の分化と乾癬の病態形成に重要な役割を果たしている(43)。IL-17とIL-22は、表皮の過形成を引き起こすことで乾癬の病態形成に関与しているが(23)、TNF α を阻害することにより、乾癬の病変部皮膚においてTh17細胞から産生されるIL-17とIL-22は減少する(42)ことから、TNF α を産生する樹状細胞から分泌されるIL-23が、Th17細胞への分化を促進すると考えられている。本実験において、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスで、3日目でMHC-class II抗原陽性細胞が増加し、続いて4日目でIL-23、TNF α 、IL-17のmRNAの発現が増加したことは、これと合致する。これらのIL-23やIL-17のサイトカイン発現は、ICAM-1欠損マウスとLセレクトリン欠損マウスでは野生型と比較し減少していた。

制御性T細胞は、乾癬の炎症を減少させるが、ICAM-1とLセレクトリンが制御性T細胞の恒常性や機能に関与しているという報告も散見される(44-48)。本実

験では、制御性 T 細胞が産生する IL-10 と TGF β の発現は、野生型と ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスのいずれにおいても有意差を認めなかった。そのため、少なくとも、ICAM-1 と L セレクチンは、イミキモドに誘発される乾癬様皮疹では制御性 T 細胞に関与していないと考えられた。

最後に、抗 TNF α 抗体投与にて治療を行った際、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは、乾癬様の皮疹を消失させるのに、他のマウスと比べ倍量を要した。これは、E セレクチンや ESL-1 のような他の細胞接着因子の発現が増加したことにより、病変部皮膚で TNF α を産生する抗原提示細胞が増加したことによると考えられる。

乾癬の治療において、複数のサイトカインを阻害するとより効果的であるという報告もあるが、細胞接着分子に関しては、同時に複数の因子を阻害してしまうと、他の細胞接着因子の代償的增加を生じ、むしろ皮疹の悪化を惹起させる可能性のあることが、本実験から示された。一方、抗 L セレクチン抗体が乾癬の治療に有効である可能性が示唆された。

V. 謝辞

本研究を行うに当たり、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の佐藤伸一教授に深謝いたします。また、本研究の共同研究者の一人である東京大学皮膚科学教室、多田弥生先生には丁寧に御指導御協力頂き、心より深謝いたします。また、免疫染色をはじめ、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いたします。

VII. 参考文献

- [1] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat Rev Immunol*, 7 (2007) 678-689.
- [2] M.L. Dustin, R. Rothlein, A.K. Bhan, C.A. Dinarello, T.A. Springer, Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1), *J Immunol*, 137 (1986) 245-254.
- [3] R.P. McEver, R.D. Cummings, Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment, *J Clin Invest*, 100 (1997) S97-103.
- [4] M.L. Arbones, D.C. Ord, K. Ley, H. Ratech, C. Maynard-Curry, G. Otten, D.J. Capon, T.F. Tedder, Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice, *Immunity*, 1 (1994) 247-260.
- [5] M.L. Tang, L.P. Hale, D.A. Steeber, T.F. Tedder, L-selectin is involved in lymphocyte migration to sites of inflammation in the skin: delayed rejection of allografts in L-selectin-deficient mice, *J Immunol*, 158 (1997) 5191-5199.
- [6] T.F. Tedder, D.A. Steeber, A. Chen, P. Engel, The selectins: vascular adhesion molecules, *FASEB J*, 9 (1995) 866-873.
- [7] J. Xu, I.S. Grewal, G.P. Geba, R.A. Flavell, Impaired primary T cell responses in L-selectin-deficient mice, *J Exp Med*, 183 (1996) 589-598.
- [8] M.D. Catalina, M.C. Carroll, H. Arizpe, A. Takashima, P. Estess, M.H. Siegelman, The route of antigen entry determines the requirement for L-selectin during immune responses, *J Exp Med*, 184 (1996) 2341-2351.
- [9] E.J. Kunkel, K. Ley, Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice.

E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo, *Circulation research*, 79 (1996) 1196-1204.

[10] J.E. Sligh, Jr., C.M. Ballantyne, S.S. Rich, H.K. Hawkins, C.W. Smith, A. Bradley, A.L. Beaudet, Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 8529-8533.

[11] H. Xu, J.A. Gonzalo, Y. St Pierre, I.R. Williams, T.S. Kupper, R.S. Cotran, T.A. Springer, J.C. Gutierrez-Ramos, Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice, *J Exp Med*, 180 (1994) 95-109.

[12] T. Nagaoka, Y. Kaburagi, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara, D.A. Steeber, T.F. Tedder, S. Sato, Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression, *The American journal of pathology*, 157 (2000) 237-247.

[13] D.A. Steeber, M.A. Campbell, A. Basit, K. Ley, T.F. Tedder, Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 7562-7567.

[14] M.A. Labow, C.R. Norton, J.M. Rumberger, K.M. Lombard-Gillooly, D.J. Shuster, J. Hubbard, R. Bertko, P.A. Knaack, R.W. Terry, M.L. Harbison, et al., Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins, *Immunity*, 1 (1994) 709-720.

[15] D.C. Bullard, E.J. Kunkel, H. Kubo, M.J. Hicks, I. Lorenzo, N.A. Doyle, C.M. Doerschuk, K. Ley, A.L. Beaudet, Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice, *J Exp Med*, 183 (1996) 2329-2336.

[16] P.S. Frenette, T.N. Mayadas, H. Rayburn, R.O. Hynes, D.D. Wagner, Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both

P- and E-selectins, *Cell*, 84 (1996) 563-574.

[17] S. Kanwar, D.C. Bullard, M.J. Hickey, C.W. Smith, A.L. Beaudet, B.A. Wolitzky, P. Kubes, The association between alpha4-integrin, P-selectin, and E-selectin in an allergic model of inflammation, *J Exp Med*, 185 (1997) 1077-1087.

[18] M.P. Schon, W.H. Boehncke, Psoriasis, *N Engl J Med*, 352 (2005) 1899-1912.

[19] P.K. Das, O.J. de Boer, A. Visser, C.E. Verhagen, J.D. Bos, S.T. Pals, Differential expression of ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 by endothelial cells in psoriasis and contact dermatitis, *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 186 (1994) 21-22.

[20] M. Inaoki, S. Sato, Y. Shimada, S. Kawara, D.A. Steeber, T.F. Tedder, K. Takehara, Decreased expression levels of L-selectin on subsets of leucocytes and increased serum L-selectin in severe psoriasis, *Clin Exp Immunol*, 122 (2000) 484-492.

[21] L. van der Fits, S. Mourits, J.S. Voerman, M. Kant, L. Boon, J.D. Laman, F. Cornelissen, A.M. Mus, E. Florencia, E.P. Prens, E. Lubberts, Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis, *J Immunol*, 182 (2009) 5836-5845.

[22] Y. Asano, L. Stawski, F. Hant, K. Highland, R. Silver, G. Szalai, D.K. Watson, M. Trojanowska, Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy, *The American journal of pathology*, 176 (2010) 1983-1998.

[23] L.C. Zaba, I. Cardinale, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, M. Suarez-Farinas, J. Fuentes-Duculan, I. Novitskaya, A. Khatcherian, M.J. Bluth, M.A. Lowes, J.G. Krueger, Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses, *J Exp Med*, 204 (2007) 3183-3194.

- [24] U. Chaudhari, P. Romano, L.D. Mulcahy, L.T. Dooley, D.G. Baker, A.B. Gottlieb, Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial, *Lancet*, 357 (2001) 1842-1847.
- [25] C.L. Leonardi, J.L. Powers, R.T. Matheson, B.S. Goffe, R. Zitnik, A. Wang, A.B. Gottlieb, Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis, *N Engl J Med*, 349 (2003) 2014-2022.
- [26] A. Gottlieb, J.G. Krueger, R. Bright, M. Ling, M. Lebwohl, S. Kang, S. Feldman, M. Spellman, K. Wittkowski, H.D. Ochs, P. Jardieu, R. Bauer, M. White, R. Dedrick, M. Garovoy, Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis, *J Am Acad Dermatol*, 42 (2000) 428-435.
- [27] N. Kothary, I.L. Diak, A. Brinker, S. Bezabeh, M. Avigan, G. Dal Pan, Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients, *J Am Acad Dermatol*, 65 (2011) 546-551.
- [28] R. Rothlein, M.L. Dustin, S.D. Marlin, T.A. Springer, A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1, *J Immunol*, 137 (1986) 1270-1274.
- [29] L. Yang, R.M. Froio, T.E. Sciuto, A.M. Dvorak, R. Alon, F.W. Luscinskas, ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow, *Blood*, 106 (2005) 584-592.
- [30] M. Marski, S. Kandula, J.R. Turner, C. Abraham, CD18 is required for optimal development and function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, *J Immunol*, 175 (2005) 7889-7897.
- [31] A. Scholer, S. Hugues, A. Boissonnas, L. Fetler, S. Amigorena, Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8⁺ T cell memory, *Immunity*, 28 (2008) 258-270.

[32] M.A. Lowes, F. Chamian, M.V. Abello, J. Fuentes-Duculan, S.L. Lin, R. Nussbaum, I. Novitskaya, H. Carbonaro, I. Cardinale, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, K.M. Wittkowski, K. Papp, M. Garovoy, W. Dummer, R.M. Steinman, J.G. Krueger, Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 19057-19062.

[33] G.G. Pendl, C. Robert, M. Steinert, R. Thanos, R. Eytner, E. Borges, M.K. Wild, J.B. Lowe, R.C. Fuhlbrigge, T.S. Kupper, D. Vestweber, S. Grabbe, Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1, *Blood*, 99 (2002) 946-956.

[34] J.C. Dudda, J.C. Simon, S. Martin, Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets, *J Immunol*, 172 (2004) 857-863.

[35] R.W. Groves, M.H. Allen, J.N. Barker, D.O. Haskard, D.M. MacDonald, Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation, *Br J Dermatol*, 124 (1991) 117-123.

[36] M. Bhushan, T.O. Bleiker, A.E. Ballsdon, M.H. Allen, M. Sopwith, M.K. Robinson, C. Clarke, R.P. Weller, R.A. Graham-Brown, M. Keefe, J.N. Barker, C.E. Griffiths, Anti-E-selectin is ineffective in the treatment of psoriasis: a randomized trial, *Br J Dermatol*, 146 (2002) 824-831.

[37] T. Fujita, M. Fujimoto, T. Matsushita, Y. Shimada, M. Hasegawa, Y. Kuwano, F. Ogawa, K. Takehara, S. Sato, Phase-dependent roles of E-selectin during chronic contact hypersensitivity responses, *The American journal of pathology*, 170 (2007) 1649-1658.

[38] M. Friedrich, D. Bock, S. Philipp, N. Ludwig, R. Sabat, K. Wolk, S. Schroeter-Maas, E. Aydt, S. Kang, T.N. Dam, R. Zahlten, W. Sterry, G. Wolff, Pan-selectin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man, *Arch Dermatol Res*, 297 (2006) 345-351.

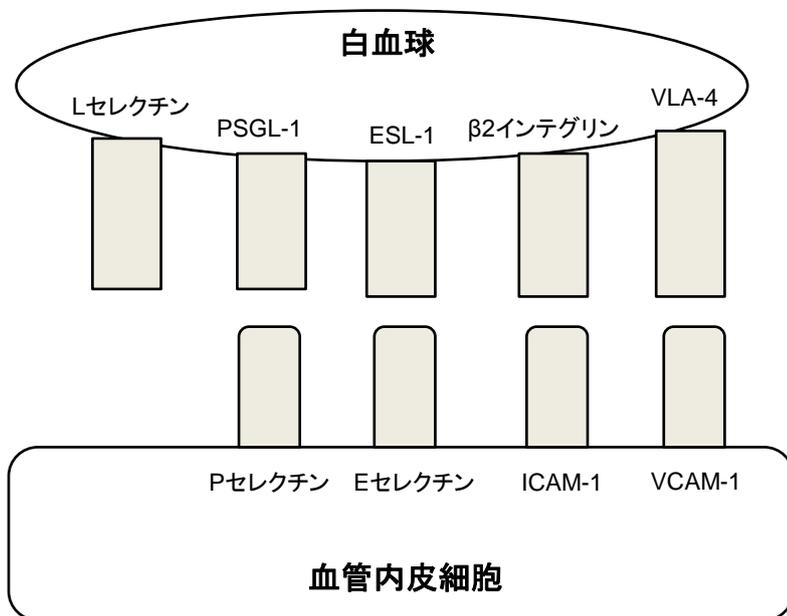
- [39] U. Jung, K.E. Norman, K. Scharffetter-Kochanek, A.L. Beaudet, K. Ley, Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo, *J Clin Invest*, 102 (1998) 1526-1533.
- [40] J.L. Dunne, C.M. Ballantyne, A.L. Beaudet, K. Ley, Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1, *Blood*, 99 (2002) 336-341.
- [41] C.L. Leonardi, A.B. Kimball, K.A. Papp, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, S. Li, L.T. Dooley, K.B. Gordon, Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1), *Lancet*, 371 (2008) 1665-1674.
- [42] K.A. Papp, C. Leonardi, A. Menter, J.P. Ortonne, J.G. Krueger, G. Kricorian, G. Aras, J. Li, C.B. Russell, E.H. Thompson, S. Baumgartner, Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis, *N Engl J Med*, 366 (2012) 1181-1189.
- [43] O. Boyman, H.P. Hefti, C. Conrad, B.J. Nickoloff, M. Suter, F.O. Nestle, Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor- α , *J Exp Med*, 199 (2004) 731-736.
- [44] M. Kamata, Y. Tada, A. Mitsui, S. Shibata, T. Miyagaki, Y. Asano, M. Sugaya, T. Kadono, S. Sato, ICAM-1 deficiency exacerbates sarcoid-like granulomatosis induced by *Propionibacterium acnes* through impaired IL-10 production by regulatory T cells, *The American journal of pathology*, 183 (2013) 1731-1739.
- [45] D. Nummer, E. Suri-Payer, H. Schmitz-Winnenthal, A. Bonertz, L. Galindo, D. Antolovich, M. Koch, M. Buchler, J. Weitz, V. Schirmacher, P. Beckhove, Role of tumor endothelium in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma, *Journal of the National Cancer Institute*, 99 (2007) 1188-1199.

[46] J. Wohler, D. Bullard, T. Schoeb, S. Barnum, LFA-1 is critical for regulatory T cell homeostasis and function, *Molecular immunology*, 46 (2009) 2424-2428.

[47] J.H. Ruth, M.A. Amin, J.M. Woods, X. He, S. Samuel, N. Yi, C.S. Haas, A.E. Koch, D.C. Bullard, Accelerated development of arthritis in mice lacking endothelial selectins, *Arthritis research & therapy*, 7 (2005) R959-970.

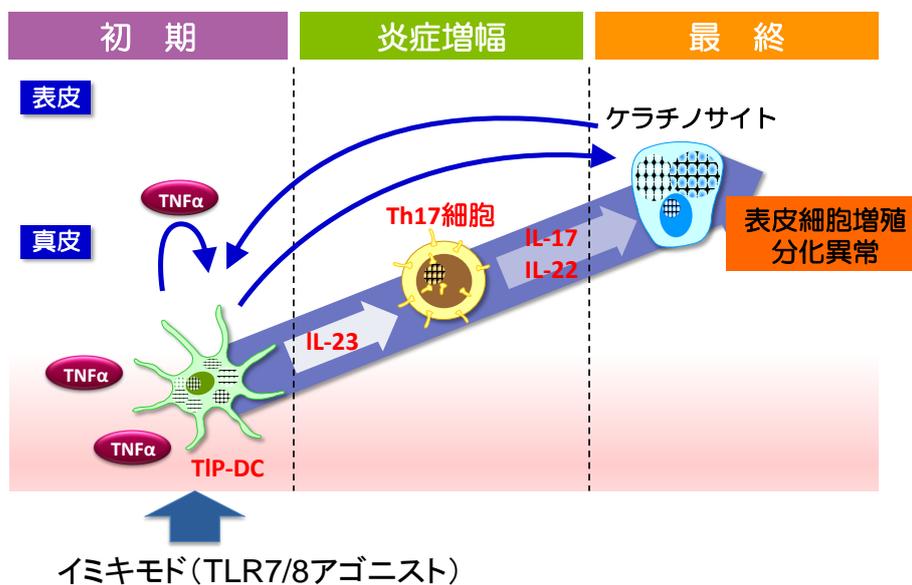
[48] D.C. Bullard, Adhesion molecules in inflammatory diseases: insights from knockout mice, *Immunologic research*, 26 (2002) 27-33.

図 1. 細胞接着分子とそのリガンド



主な細胞接着分子とそのリガンドを示す。

図 2. 乾癬の免疫学的病態



乾癬では樹状細胞、T細胞などの炎症細胞浸潤がみられる。樹状細胞を含む抗原提示細胞から産生されるIL-23はTh17細胞を活性化し、Th17細胞より分泌されたIL-17、IL-22が表皮細胞の増殖、分化異常や炎症を誘導し、乾癬の病態が形成される。

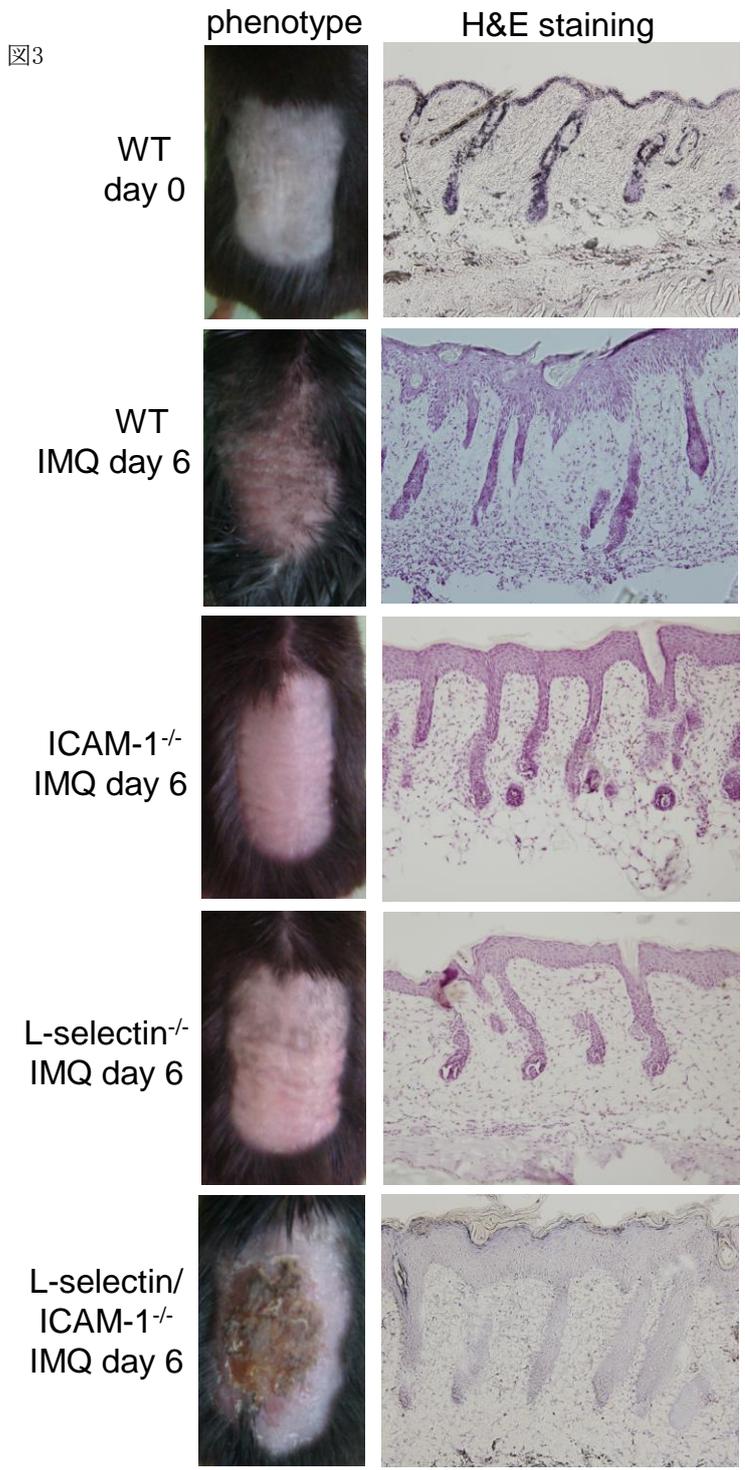


図 3. 野生型、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスに対し、イミキモド外用により乾癬様皮疹を誘発させた。左に臨床所見、右に背部皮膚の組織所見を示す。最上段はイミキモドを外用していない野生型マウスであり、その他は、イミキモドを 6 日間連日外用した後のものである。

野生型マウスと比較し、ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは、イミキモド 6 日間外用後の皮疹は軽度であった。それに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは、野生型と比較して皮疹の悪化がみられ、表皮肥厚や隣屑の程度もより重度であった。

4

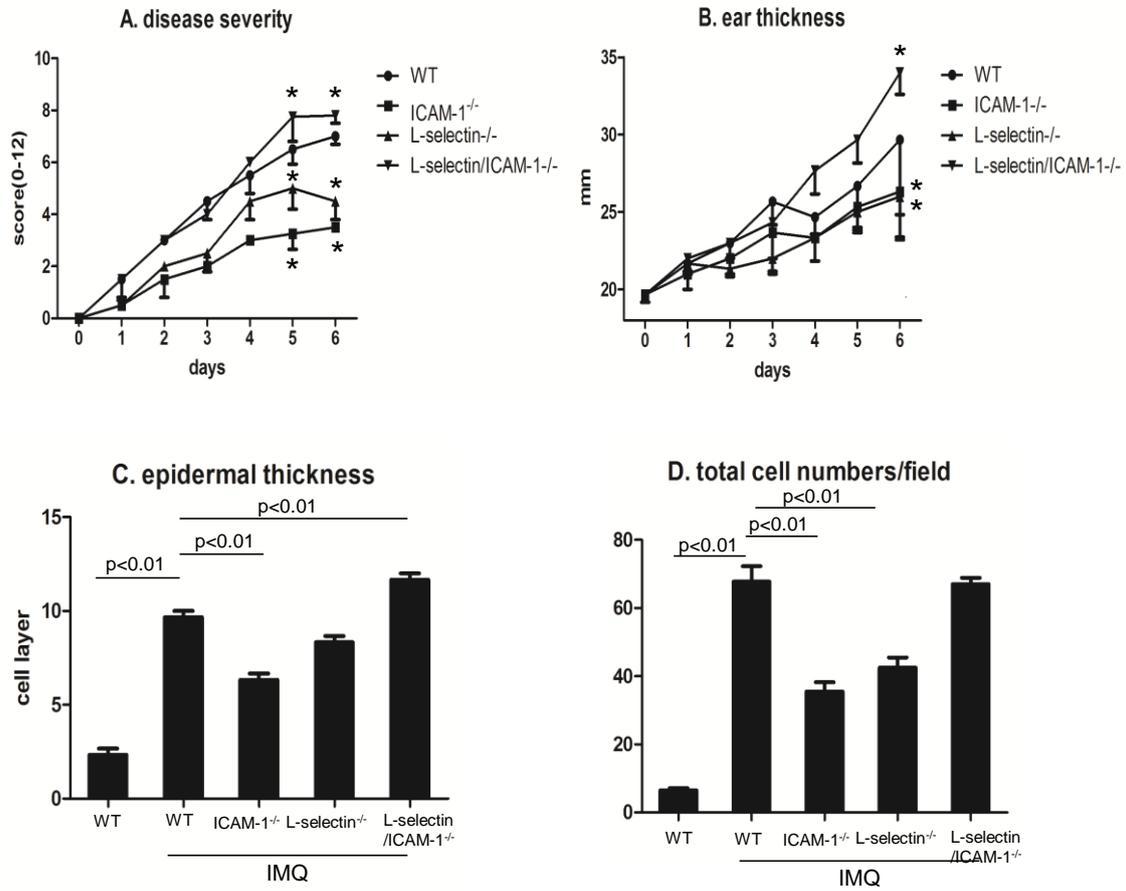


図 4. 野生型と比較した ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスのイミキモド誘発性乾癬様皮疹の重症度

- A. イミキモド外用後の疾患重症度スコアを示す。紅斑、鱗屑、表皮肥厚の程度を 0 から 4 まで点数化し、合計した。それぞれのマウスにつき、3 から 5 匹で評価した。5、6 日目において ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは野生型と比べ有意に重症度スコアが低下していたが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは、スコアの増悪がみられた。
- B. イミキモドを外用した右耳の厚さを測定した。6 日目において、野生型と比較し ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは有意に減少していたのに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは増加していた。
- C. イミキモドまたはワセリンを外用し 6 日後の表皮肥厚について検討した。強拡大にて表皮細胞の層の数を測定した。表皮の厚さは、野生型と比較し ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは有意に減少していたのに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは肥厚していた。
- D. イミキモドまたはワセリンを外用し 6 日後の浸潤細胞数について検討した。強拡大にて浸潤細胞数を測定した。皮膚に浸潤する細胞の数は、野生型と比較し ICAM-1 欠損マウスおよび L セレクチン欠損マウスでは有意に減少していたのに対し、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは増加していた。

5

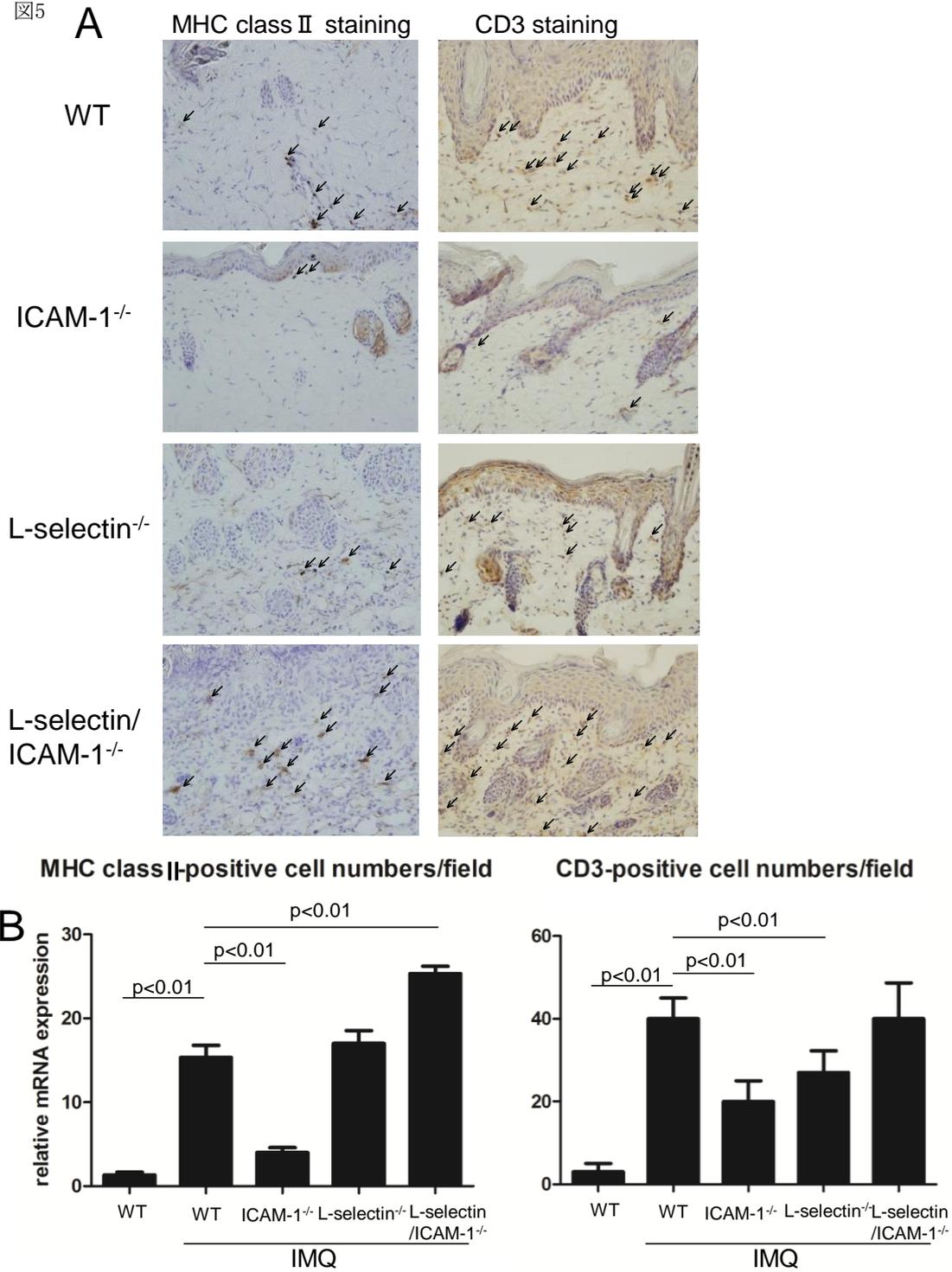


図 5. イミキモド外用後の野生型、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおける MHC-class II 陽性細胞および CD3 陽性細胞の数についての検討

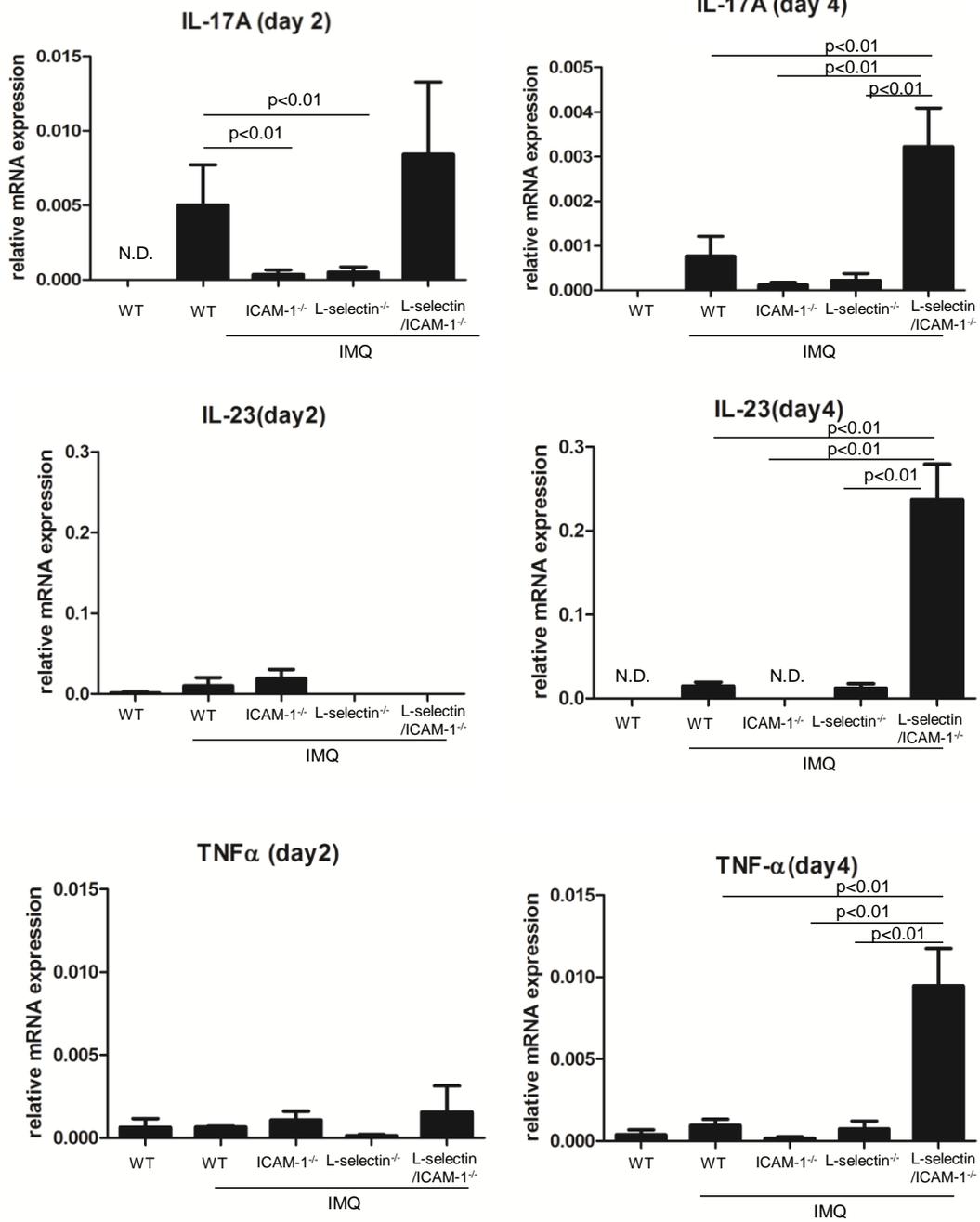
A. イミキモド外用 6 日目の MHC-class II 陽性細胞および CD3 陽性細胞を組織学的に検討した。

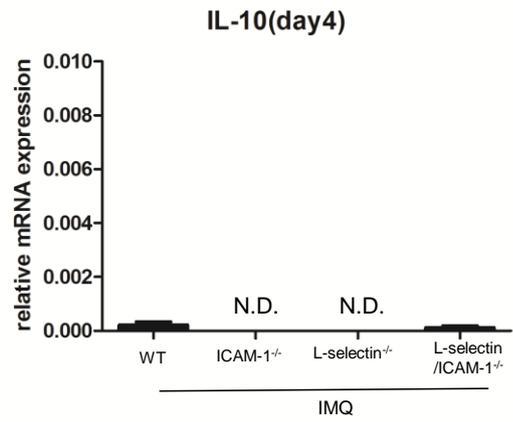
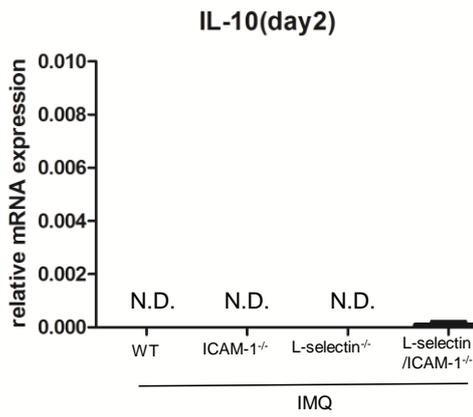
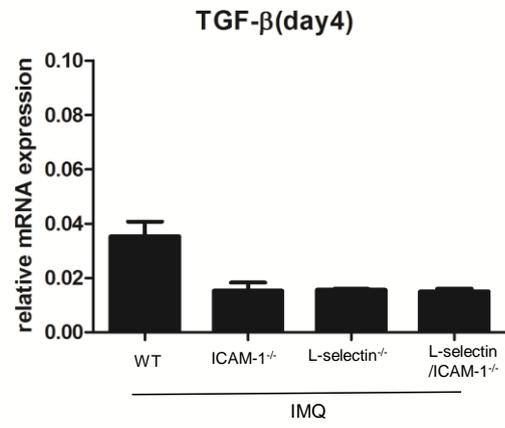
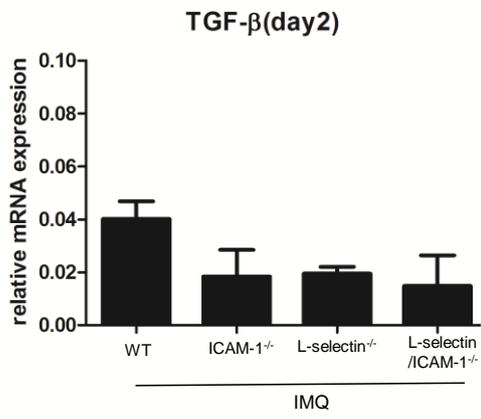
B. イミキモドあるいはワセリンを外用し 6 日目の MHC-class II 陽性細胞および CD3 陽性細胞の数を示した。細胞数は 400 倍の視野あたりの数を測定した。

イミキモド外用後の MHC-class II 陽性抗原提示細胞は、野生型と比較し、ICAM-1 欠損マウスでは減少しており、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは増加していた。L セレクチン欠損マウスと野生型では有意な差がみられなかった。CD3 陽性 T 細胞数は、ICAM-1 欠損マウスと L セレクチン欠損マウスでは、野生型と比較し有意に減少していたが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは野生型と比較して有意な差はみられなかった。

Figure 6

A





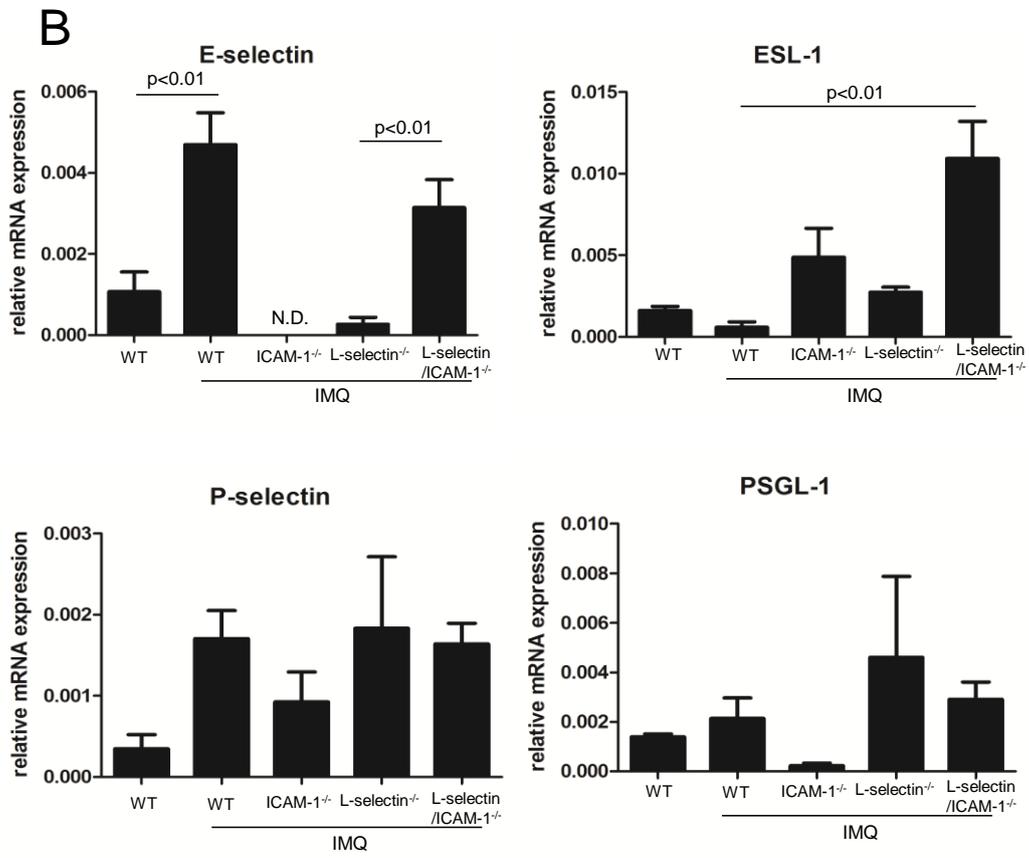


図 6. 乾癬様皮疹部でのサイトカインと細胞接着分子の発現

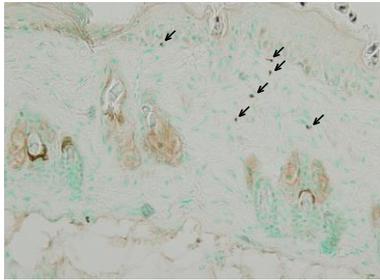
マウス背部皮膚にイミキモドまたはワセリンを外用し、2日目と4日目の皮膚より mRNA を抽出し、IL-17A, IL-23, TNF α について quantitative real-time PCR にて測定した。また4日目の皮膚より Pセレクトリン、Eセレクトリン、PSGL-1、ESL-1 について測定した。それぞれ5匹から8匹のマウスを用いて、2回ずつ実験を行った。N.D.は not detected を表す。

- A. イミキモド外用2日目において、IL-17Aの発現が、ICAM-1欠損マウスとLセレクトリン欠損マウスでは野生型と比較し有意に低下していた。Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスと野生型の間には有意差はなかった。イミキモド外用4日目では、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスでのIL-17Aの発現は、野生型と比較し増加していた。IL-23, TNF α の発現は、イミキモド外用2日目では有意差がみられなかったものの、イミキモド外用4日目でLセレクトリン/ICAM-1欠損マウスでは野生型と比較し増加がみられた。
- B. イミキモド外用群において、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスは、いずれか単独の欠損マウスと比較してEセレクトリンの発現増加を認めた。また、Lセレクトリン/ICAM-1欠損マウスは野生型と比べESL-1の発現増加がみられた。PセレクトリンおよびPSGL-1については、野生型と比較し有意差はみられなかった。

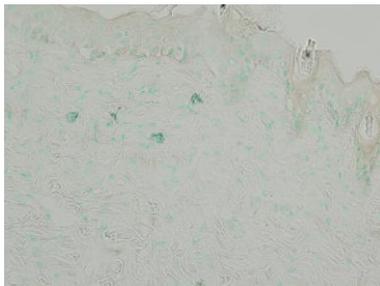
E-selectin staining

7

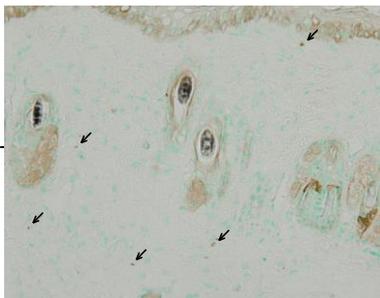
WT



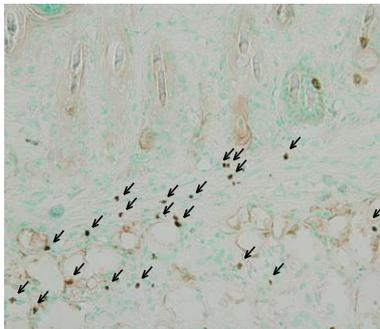
ICAM-1^{-/-}



L-selectin^{-/-}



L-selectin/
ICAM-1^{-/-}



E-selectin positive cell numbers/field

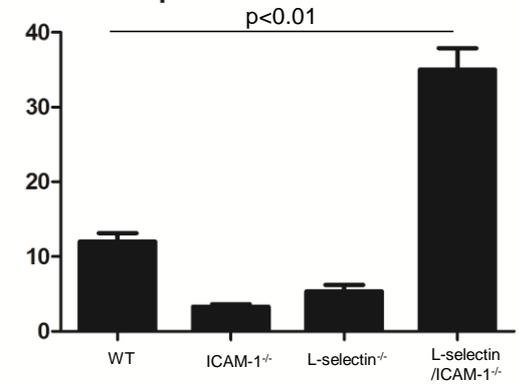


図 7. E セレクチン陽性細胞数の検討

イミキモド 2 日間外用後の野生型、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスの E セレクチン陽性細胞の数について検討した。細胞数は 400 倍の視野あたりの数を測定した。L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおいて E セレクチン陽性細胞数が野生型や ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウスと比較し有意に増加していた。

☒8

control IgG

anti E-selectin

L-selectin/
ICAM-1^{-/-}
IMQ day6



図 8. L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおける抗 E セレクチン抗体投与後のイミキモド誘発性乾癬様皮疹の程度について検討した。抗 E セレクチン抗体あるいはコントロール IgG 抗体を、イミキモド外用 1 日前および 3 日目に腹腔内投与した。それぞれ 3 匹のマウスを用いて実験を行った。イミキモド外用 6 日目の臨床所見を示す。

コントロール IgG 抗体を投与したマウスと比較し、抗 E セレクチン抗体を投与したマウスで臨床所見の改善がみられた。

図9

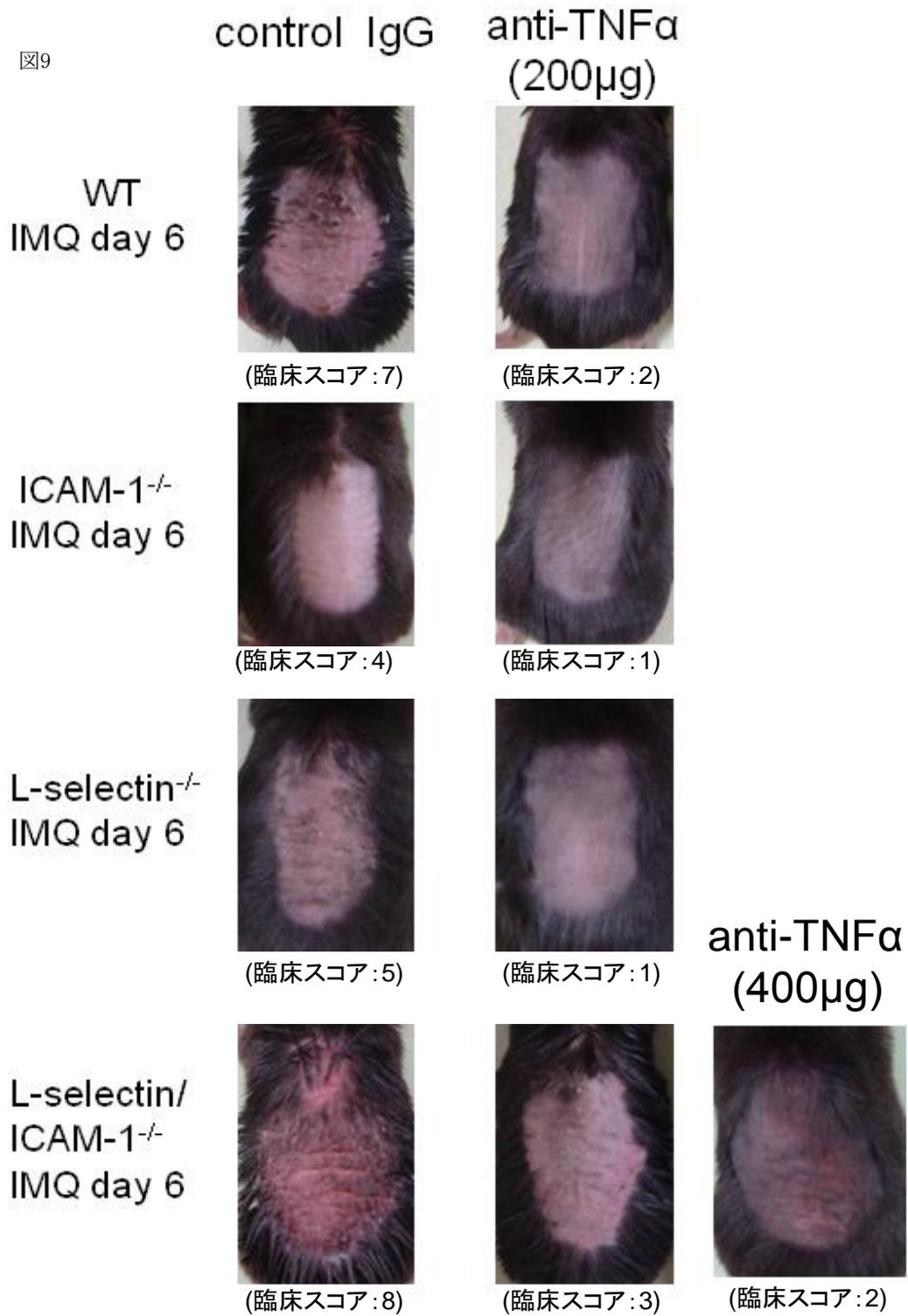


図 9. 野生型、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウス、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスにおける抗 TNF α 抗体投与の効果を評価した。イミキモド外用 1 日前および 3 日後に、抗 TNF α 抗体あるいはコントロール IgG 抗体を腹腔内投与し、イミキモドを外用した。6 日後の臨床所見を示す。

抗 TNF α 抗体を 200 μ g 投与した野生型マウス、ICAM-1 欠損マウス、L セレクチン欠損マウスでは、ほぼ皮疹が消失したが、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでは治療抵抗性であった。一方、抗 TNF α 抗体を 400 μ g に増量したところ、L セレクチン/ICAM-1 欠損マウスでも皮疹が改善した。