

博士論文

IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモト誘発乾癬様皮膚炎

川口 真喜子

目次

1)	要旨.....	5
2)	序文.....	6
3)	方法.....	9
a)	動物	
b)	イミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスの作成	
c)	組織切片と免疫染色	
d)	腹腔マクロファージの採取	
e)	脾臓 bulk 細胞の採取	
f)	腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞のイミキモド刺激	
g)	腹腔マクロファージの interferon (IFN) - α 刺激	
h)	enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による腹腔マクロファージ培養液中の IFN- α の測定	

- i) ELISA 法による腹腔マクロファージ培養液中の nitric oxide (NO) の測定
 - j) interferon regulatory factor (IRF) -2 と IRF-7 の免疫蛍光染色
 - k) ribonucleic acid (RNA) の抽出
 - l) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)
 - m) 統計解析
- 4) 結果.....18
- a) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスにおける背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像
 - b) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床評価
 - c) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織
 - d) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織における浸潤細胞
 - e) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織におけるサイトカイン発現

f) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド

刺激後のサイトカイン発現

g) 野生型マウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激前とイミキモド

刺激 6 時間後の IRF-2 と IRF-7 の局在

h) 野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおける IRF-2 発現

i) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺

激後の培養液中 IFN- α 発現、及び脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現

j) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおける IFN- α 刺激後

の各種サイトカイン発現

k) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド

刺激による nitric oxide (NO) 産生

l) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織にお

ける拡張血管

5) 考察.....44

6) 謝辞.....54

7) 引用文献.....55

1. 要旨

乾癬のメカニズムの全体像は未だ解明されていない。Interferon regulatory factor (IRF) -2 は乾癬の疾患感受性遺伝子の候補の 1 つである(1)。本研究では野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスを用いて各種実験を行い、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における IRF-2 の働きを明らかにすることを目的とした。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎は臨床的にも *in vitro* における皮膚や腹腔マクロファージにおけるサイトカイン発現においても、IRF-2 ヘテロマウスにおいて増悪していることを示唆する結果であった。本研究を通してイミキモド誘発乾癬様皮膚炎における IRF-2 の働きについて考察した。

2. 序文

乾癬は遺伝要因と環境要因の両方が複雑に関与する、T 細胞が主要な役割を果たす皮膚疾患であり(2, 3)、そのメカニズムの全体像は未だ解明されていない。乾癬のメカニズムの解明はその新規治療につながる。

イミキモドとはイミダゾリキン系の合成低分子化合物で、細菌やウイルスの構成成分を認識し免疫を賦活化する Toll-like receptor (TLR) の 1 つである TLR7 に対してアゴニスト活性を示す(4, 5)。現在のところ、イミキモドの作用としては以下の 5 つが推察あるいは確認されている。1 つ目は樹状細胞や単球の TLR7 に作用し、IFN- α や tumor necrosis factor (TNF) - α 、interleukin (IL) -12 の発現増強によるウイルス増殖抑制作用と、細胞性免疫賦活化作用によるウイルス感染細胞傷害作用。2 つ目は、骨髓系樹状細胞と形質細胞様樹状細胞に作用し、TNF 関連アポトーシス誘導リガンドの発現による腫瘍細胞へのアポトーシス誘導作用。3 つ目は death receptor CD95 (Fas) 発現増強による腫瘍細胞へのアポトーシス誘導作用。4 つ目はアデノシン受容体 (A2A) に作用し、サイトカイン発現増強作用。5 つ目は抗血管新生作用による抗腫瘍細胞効果(6)、である。臨床の現場では、イミキモドはイミキモド 5% クリームとして 1997 年にアメリカにてウイルス性の性感染症の 1 つである尖圭コンジローマの治療薬として初めて認可され、2004 年にはアメリカにて表在性の基底細胞癌と前癌病変である日光角

化症に対して保険適応が追加され、2007 年に日本にて尖圭コンジローマの治療薬として 5%イミキモドクリーム (Mochida, Tokyo, Japan) が承認された。2011 年には日本においても日光角化症に対する保険適用が追加となった。イミキモドの薬理作用としては以下のようなものが推察されている。イミキモドは樹状細胞あるいは単球に発現する TLR7 に作用して nuclear factor kappa B (NFκB) を活性化させ、IFN-α、TNF-α、IL-12 などのサイトカインの産生を促進させる。その後、上記のサイトカインによる細胞性免疫の賦活化、IFN-γ 産生を促す。そして IFN-γ により活性化された NK 細胞やキラー T 細胞によってウイルス感染細胞傷害作用を示す。また、イミキモドにより産生が促進される IFN-α の作用がメインとなってウイルスの増殖も抑制する(6)。

IRF は interferon (IFN)-α/βのほか、様々なサイトカインやケモカインの発現を調節する転写因子であり(7)、1988 年に IRF-1 が最初に発見されて以来、哺乳類では現在までに少なくとも IRF-1、2、3、4、5、6、7、8、9 の 9 種類が報告されている(8)。IRF の名称の由来は、IRF-1 がヒト IFN-β 遺伝子のプロモーター部分に存在する制御配列 (IRF binding sequence element : IRF-E) に結合する因子として単離されたことによる(9)。その中の 1 つである IRF-2 は、IRF-1 と同じ調節領域に結合し IRF-1 を競合的に阻害することにより IFN 誘導遺伝子の転写抑制を行っており(10)、C57BL/6 の遺伝的背景を持つ IRF-2 ノックアウトマウスにおいて IFN 誘導遺伝子が発現上昇していると

いう報告(11, 12)がある。IRF-2 ノックアウトマウスがヒトの乾癬に似た炎症性皮膚疾患を自然発症することは、過去の論文で報告されている(11)。また、TLR7 のリガンドであり免疫賦活剤であるイミキモドをマウスに局所的に外用すると、TLR7 を発現している形質細胞様樹状細胞に刺激が加わり、産生された I 型 IFN により、真皮の樹状細胞である TNF- α /induced nitric oxide synthase (iNOS)-producing dendritic cell (TIP-DC) が刺激されることで IL-23/IL-17 軸を介したヒトの乾癬に似た炎症性皮膚疾患を発症することが知られている(13)。このように、IRF-2 ヘテロマウスが乾癬に似た炎症性皮膚疾患を自然発症し、野生型マウスにおけるイミキモド誘発皮膚炎が乾癬に似ているということ、また、ヒトの乾癬における過去の研究の結果から IRF-2 は乾癬の疾患感受性遺伝子の候補の 1 つであるとする報告(1, 14)があることが今回の実験の背景である。

今回我々は IRF-2 ヘテロマウスを用いて、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を評価することで乾癬の病態における IRF-2 の関与を解明することを実験の目的とした。

3. 方法

a) 動物

本研究に必要な C57BL/6 マウス (野生型マウス) は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より購入し、繁殖した。また、IRF-2 ノックアウトマウスは谷口 維紹特任教授 (東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学社会連携研究部門) よりご供与いただいた。IRF-2 ヘテロマウスは前述の IRF-2 ノックアウトマウスと C57BL/6 マウス (野生型マウス) とを交配して作成した。研究に用いたマウスはすべて 8-14 週齢であり、specific pathogen-free (SPF) 条件下、12 時間の明暗サイクル、水と餌を自由に摂取できる環境にて飼育した。全ての実験プロトコールは東京大学の動物実験委員会の承認を受けた。

b) イミキモド誘発乾癬様皮膚炎マウスの作成

イミキモド誘発乾癬様皮膚炎マウスの作成は野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスを用いて過去の報告同様に行った(13)。具体的には 5%イミキモドクリーム (Mochida, Tokyo, Japan) を 62.5mg、つまり有効成分としてイミキモド 3.125mg を剃毛したマウスの背部及び右耳介に連日 5 日間外用した。背部の炎症の程度をスコア化するために Psoriasis Area and Severity Index (PASI) に似た評価方法を用いた。ただし、マウスモデルであるため罹患部位の面積は考慮しなかった。紅斑、鱗屑、浸潤はそれぞれ 0 から

4 までのスコアで評価し、0：なし、1：軽度、2：中等度、3：重度、4：極めて重度、とした。紅斑、鱗屑、浸潤の合計スコアは 0 から 12 までのスコアとなり、炎症の程度を表すと考えられた。また、耳介の厚さはダイヤルシックスゲージ (Adachi, Tokyo, Japan) を用いてイミキモド連日外用 1 日目から 6 日目まで連日測定した。

c) 組織切片と免疫染色

イミキモドを連日 5 日間外用してイミキモド誘発乾癬様皮膚炎を起こした野生型マウスもしくは IRF-2 ヘテロマウスの耳介を 10%ホルマリンで固定してパラフィン包埋した。6 μm 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。また、凍結切片を作成して、VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて免疫組織学的検討を行った。凍結組織から 6 μm の厚さの切片を作り、アセトン固定し、phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 10%正常ウサギ血清と 37°C、10 分間反応させ、非特異的な染色をブロックした。切片は次いでマクロファージ特異的な抗体である抗 F4/80 抗体 (Serotec, Oxford, UK)、抗 CD4 抗体(clone RM4-5; BD Pharmingen, San Diego, CA)、抗 major histocompatibility complex (MHC) - II 抗体(abcam, Cambridge, UK) と 4°Cで一晩、反応させた。非特異的染色のためのコントロールとしてラット免疫 IgG (Sounthern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) を用いた。切片は次いでビオチン化ウサギ抗ラット免疫 IgG 二次抗体と室温で、20 分間反応させ

た後、horseradish peroxidase 標識アビディン-ビオチン複合体と 1 時間反応させた。切片を 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と hydrogen peroxide と反応させることによって発色させた。細胞数および血管数のカウントは光学顕微鏡を用いて行い、400 倍率の視野でランダムに 3 ヶ所カウントし、それらの平均を取った。拡張血管数のカウント方法は、血管の大きさに関わらず、また同一血管であると考えられる位置関係にあるものも 1 つの血管管腔構造を 1 つとカウントし、明らかに拡張していると考えられる血管のみをカウントした。耳介の表皮の厚さはイミキモドを連日 5 日間外用後の 6 日目に採取した耳介のヘマトキシリン・エオジン染色の病理標本を用いて光学顕微鏡のスケールにて測定した。

d) 腹腔マクロファージの採取

野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスそれぞれに対し PBS 5ml を腹腔に注入してマウスの体を揺すり、その後、可能な限り腹腔の PBS を回収して腹腔マクロファージを含む腹腔の細胞を採取した。その腹腔の細胞を含む PBS を 1500rpm、4℃、5 分間の条件で遠心にかけ、血球計算盤 (Burker-Turk) を用いて細胞数を数え、6well プレートに 1well 当たり 1×10^6 個の細胞数となるように分注した。培養液は 10% fetal bovine serum (FBS) と 1% penicillin G & streptomycin を添加した Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) とし、37℃、5% CO₂ の培養器で 2 時間培養した。培養 2 時間後に培

養液を吸引器で吸引破棄し、well の底に付着する細胞を腹腔マクロファージとして実験に使用した。

e) 脾臓 bulk 細胞の採取

野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスそれぞれの脾臓を採取し、PBS 5ml 内においてスライドグラスを用いて粉碎した。その脾臓を粉碎した PBS をメッシュで濾し、PBS を追加して合計 11ml とした。1500rpm、4℃、5 分間の条件で遠心をかけ、上澄みを破棄し、red blood cell lysis buffer (水 500ml に 0.017M Trizma[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 1.029g、0.1M NH₄Cl 2.675g を溶解させたもの) を 4 ml 入れ、赤血球を溶解した。それを再び 1500rpm、4℃、5 分間の条件で遠心をかけ、上澄みを破棄し、PBS 10ml を入れて 1500rpm、4℃、5 分間の条件で遠心をかけ、その後に RPMI 10ml を入れ、腹腔マクロファージと同様に血球計算盤 (Burker-Turk) を用いて細胞数を数え、6well プレートに 1well 当たり 1×10^6 個の細胞数となるように分注した。培養液は腹腔マクロファージと同様に 10% FBS と 1% penicillin G & streptomycin を添加した RPMI とし、37℃、5% CO₂ の培養器で培養した。

f) 腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞のイミキモド刺激

腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞のイミキモド刺激の方法は、イミキモド (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 3mg を 1ml の dimethyl sulfoxide (DMSO) に添加し、

60°C、15 分で加温して 3mg/ml のイミキモド溶解液を作成し、10% FBS 及び 1%

penicillin G & streptomycin 添加 RPMI に添加し、最終的な培養液中のイミキモド濃度がそれぞれ 0 µg/ml、1µg/ml、5µg/ml となるようにすることで行った。これら各濃度のイミキモド添加 RPMI 培養液を用いて野生型マウス及び IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージもしくは脾臓 bulk 細胞を 6 時間または 24 時間培養したものを、それぞれイミキモド刺激 6 時間後、24 時間後とした。

g) 腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞の IFN- α 刺激

腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞の IFN- α 刺激の方法は、IFN- α (R&D systems, Minneapolis, USA) を 10% FBS 及び 1% penicillin G & streptomycin 添加 RPMI に添加し、最終的な培養液中の IFN- α 濃度がそれぞれ 0 U/ml、100U/ml、1000U/ml となるようにすることで行った。これら各濃度の IFN- α 添加 RPMI 培養液を用いて野生型マウス及び IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージもしくは脾臓 bulk 細胞を 24 時間培養したものを、IFN- α 刺激 24 時間後とした。

h) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による腹腔マクロファージ培養液中 IFN- α 蛋白量の測定

前述の方法にて腹腔マクロファージを採取し、10%FBS および 1% penicillin G & streptomycin 添加 RPMI 培養液にてイミキモド濃度がそれぞれ 0 µg/ml、5µg/ml の培養

液を作成し、37°C、5% CO₂ の培養器で培養した。培養開始 6 時間後と 24 時間後に培養液を回収し、Mouse IFN- α ELISA Kit (Quansys Biosciences, West Logan, Utah) を用いて培養液中の IFN- α 蛋白量を測定した。

i) ELISA 法による腹腔マクロファージ培養液中 nitric oxide (NO) 産生量の測定

前述の方法にて腹腔マクロファージを採取し、10%FBS および 1% penicillin G & streptomycin 添加 Minimum Essential Medium (MEM) 培養液にてイミキモド濃度がそれぞれ 0 μ g/ml、5 μ g/m の培養液を作成し、37°C、5% CO₂ の培養器で培養した。培養開始 24 時間後に培養液を回収し、OxiSelect™ *In Vitro* Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Assay Kit (Colorimetric) (CELL BIOLABS, INC. , San Diego, CA) を用いて培養液中の NO 産生量を測定した。

j) IRF-2 と IRF-7 の免疫蛍光染色

前述の方法にて腹腔マクロファージを採取し、10%FBS および 1% penicillin G & streptomycin 添加 RPMI 培養液にてイミキモド濃度がそれぞれ 0 μ g/ml、5 μ g/ml の培養液を作成し、37°C、5% CO₂ の培養器で 6 時間培養した。その後、培養液を取り除き PBS にて洗浄し、ホルムアルデヒドにて固定した。1%FBS 添加 PBS にてブロッキングを行い、抗 IRF-2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 及び抗 IRF-7 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa, CA) を用いてそれぞ

れ一次抗体反応を行い、続いて IRF-2、IRF-7 に対する二次抗体である Anti mouse IgG Rabbit pAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて二次抗体反応を行った。その後、DAPI 含有の Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) を使用して核染色と封入を同時に行い、蛍光顕微鏡 Keyence Biozero (BZ 8000, Keyence, Osaka, Japan) により腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激前後の IRF-2 および IRF-7 の局在を観察した。

k) ribonucleic acid (RNA) の抽出

採取したマウスの背部皮膚からは RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて total RNA を抽出した。また、採取した腹腔マクロファージと脾臓 bulk 細胞からは TRIZOL reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて total RNA を抽出した。

l) quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

抽出した total RNA はその後 Rever Tra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写を行い complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) にした。プライマーは以下の配列のものを Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) にてデザインした。panIFN- α : forward, 5'-ATG GCT AGG CTC TGT GCT TTC CT-3'、reverse, 5'-AGG GCT CTC CAG ACT TCT GCT CTG-3'。TNF- α : forward, 5'-CCA CCA CGC TCT

TCT GTC TCT AC-3'、reverse, 5'-AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT-3'。IL-12/23p40 : forward, 5'-CTC ACA TCT GCT GCT CCA CAA G-3'、reverse, 5'-AAT TTG GTG CTT CAC ACT TCA GG-3'。IL-12p35 : forward, 5'-ACT CTG CGC CAG AAA CCT C-3'、reverse, 5'-CAC CCT GTT GAT GGT CAC GAC-3'。IL-23p19 : forward, 5'-TGT GCC TAG GAG TAG CAG TCC TGA-3'、reverse, 5'-TTG GCG GAT CCT TTG CAA GCA GAA-3'。iNOS : forward, 5'-CGA AAC GCT TCA CTT CCA A-3'、reverse, 5'-TGA GCC TAT ATT GCT GTG GCT-3'。IL-36 : forward, 5'-TCC TGA CTT TGG GGA GGT TTT-3'、reverse, 5'-TCA CGC TGA CTG GGG TTA CT-3'。GAPDH : forward, 5'-CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3'、reverse, 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT-3'。IL-17A、IL-17F、IL-22 のプライマーは Applied Biosystems (Foster City, CA) より購入した。

合成した cDNA に SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を加え、定量 PCR は以下の条件で Step One Plus real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて行った(14)。95°C20 秒間を 1 サイクル、95°C3 秒間の後に 60°C30 秒間というサイクルを 40 サイクル。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて mRNA を標準化した。GAPDH PCR 産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を $\Delta\Delta C_t$ method にて算出した。つまり、fold

induction は $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ と定義され、ここで Ct は threshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。

m) 統計解析

データは平均値 \pm SEM （一部は平均値+SEM）を用いて表した。群間の比較には Wilcoxon の順位和検定を用いた。

4. 結果

まず初めに、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床的比較検討を行った。

a) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスにおける背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの剃毛した背部と右耳介に連日 5 日間イミキモドクリームを外用した。6 日目の背部の臨床像を野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスで比較すると、IRF-2 ヘテロマウスの方が紅斑、鱗屑、浸潤が目立っていた (図 1)。

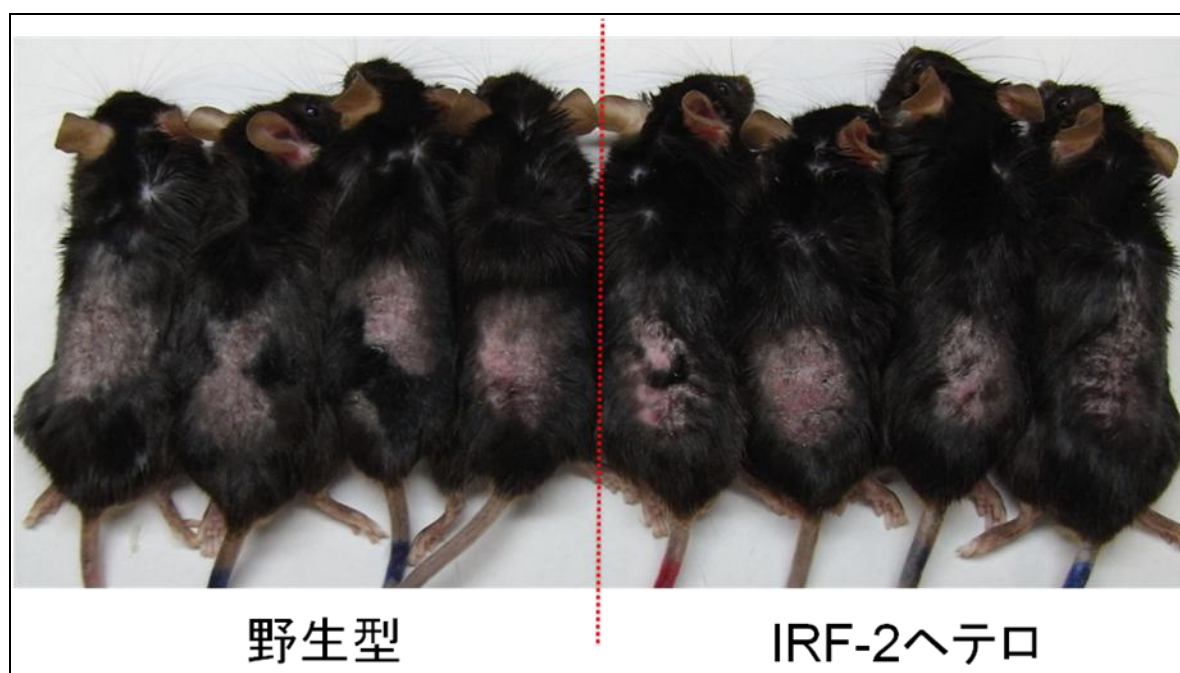


図 1 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスにおける背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの剃毛した背部と右耳介に連日 5 日間イミキモドクリームを外用した 6 日目の背部の臨床像を示す。左の 4 匹が野生型マウスで右 4 匹が IRF-2 ヘテロマウスである。

次に、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおける背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を定量化して評価するために、紅斑、鱗屑、浸潤をスコア化して評価した。

b) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床評価

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの剃毛した背部に連日 5 日間イミキモドクリームを外用した。背部の紅斑、鱗屑、浸潤を 0 から 4 までのスコアにて 1 日目から 6 日目まで毎日スコアリングし、1-6 日目の各の日の紅斑、鱗屑、浸潤の合計スコアを計算した。結果は、紅斑、鱗屑、浸潤はいずれも 2 日目や 3 日目辺りから出現し、常に IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスより高い値であり、必然的に、紅斑、鱗屑、浸潤の合計スコアも 3 日目より IRF-2 ヘテロマウスの方が高い値となった (図 2-A)。

連日 5 日間イミキモドクリームを外用した右耳介の厚さは 2 日目より IRF-2 ヘテロマウスの方が厚みの増加量が多い結果となった (図 2-B)。

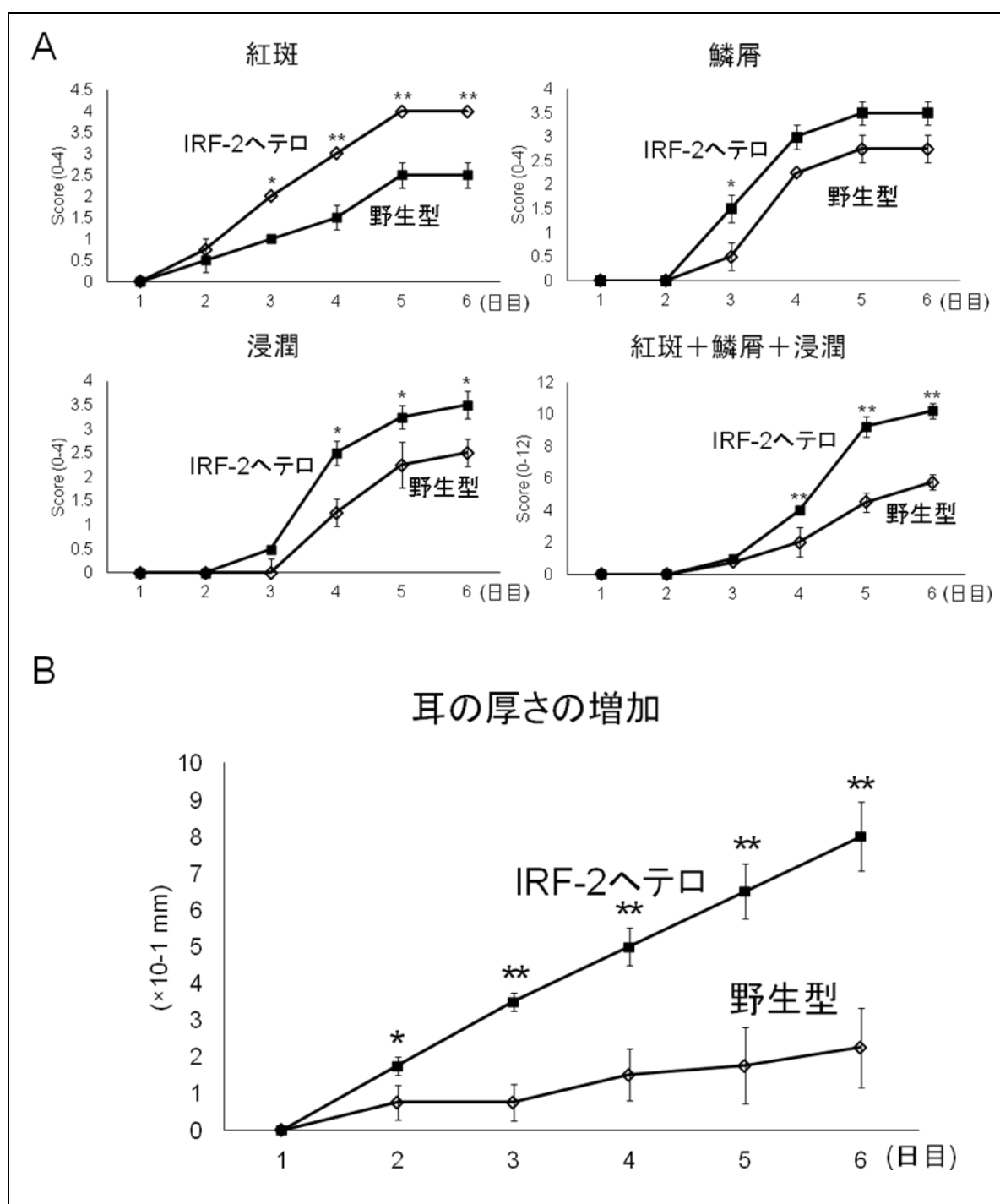


図2 野生型マウス、IRF-2ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床の評価

(A) 野生型マウスとIRF-2ヘテロマウスの剃毛した背部に連日5日間イミキモドクリームを外用した。背部の紅斑、鱗屑、浸潤を0から4までのスコアにて1日目から6日目まで毎日スコアリングした。また、1-6日目の各の日の紅斑、鱗屑、浸潤の合計スコアも示す。(B) 連日5日間イミキモドクリームを外用した右耳介の厚さの増加を示す。耳介の厚さの測定にはダイヤルシクネスゲージを用いた。n = 8。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

以上の実験から **IRF-2** ヘテロマウスにおいてイミキモド誘発乾癬様皮膚炎は臨床的に増強することがわかった。

次に、野生型マウスと **IRF-2** ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎をミクロで評価するために病理組織像の比較検討を行った。

c) 野生型マウス、**IRF-2** ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織

連日5日間イミキモドクリームを外用した耳介のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の組織をヘマトキシリン・エオジン染色標本にて検討した。**IRF-2** ヘテロマウスの方が野生型マウスより表皮が厚く、真皮の浮腫が強く、細胞浸潤が強く、拡張した毛細血管の増数が多く見られた (図 3-A)。また、光学顕微鏡のスケールを用いて表皮の厚さを検討したところ、**IRF-2** ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べ有意に厚いという結果が得られた (図 3-B)。

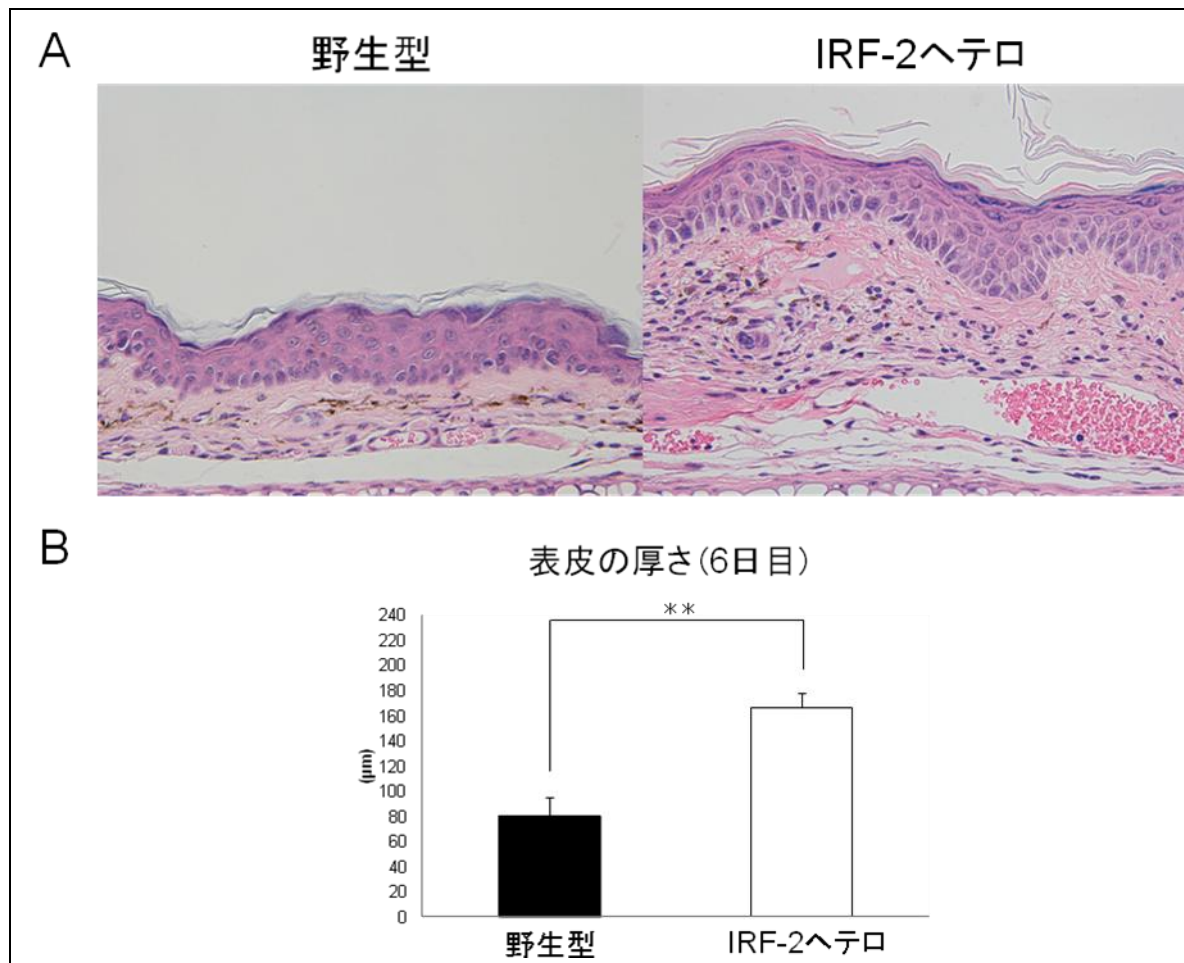


図3 野生型マウス、**IRF-2**ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織
(A) 連日5日間イミキモドクリームを外用した耳介のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎のヘマトキシリン・エオジン染色組織像。倍率は400倍。代表的な組織像を示す。**(B)** 連日5日間イミキモドクリームを外用したイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の耳介組織の表皮の厚さ。ヘマトキシリン・エオジン染色の組織標本の表皮を光学顕微鏡のスケールを用いて測定した。n = 8。** $p < 0.01$ 。

続いて、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎に浸潤している細胞について検討した。

d) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織における浸潤細胞

連日 5 日間イミキモドクリームを外用した耳介のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織に浸潤している好中球、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、MHC-class II 陽性細胞の数は、いずれも IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて有意に多かった (図 4)。

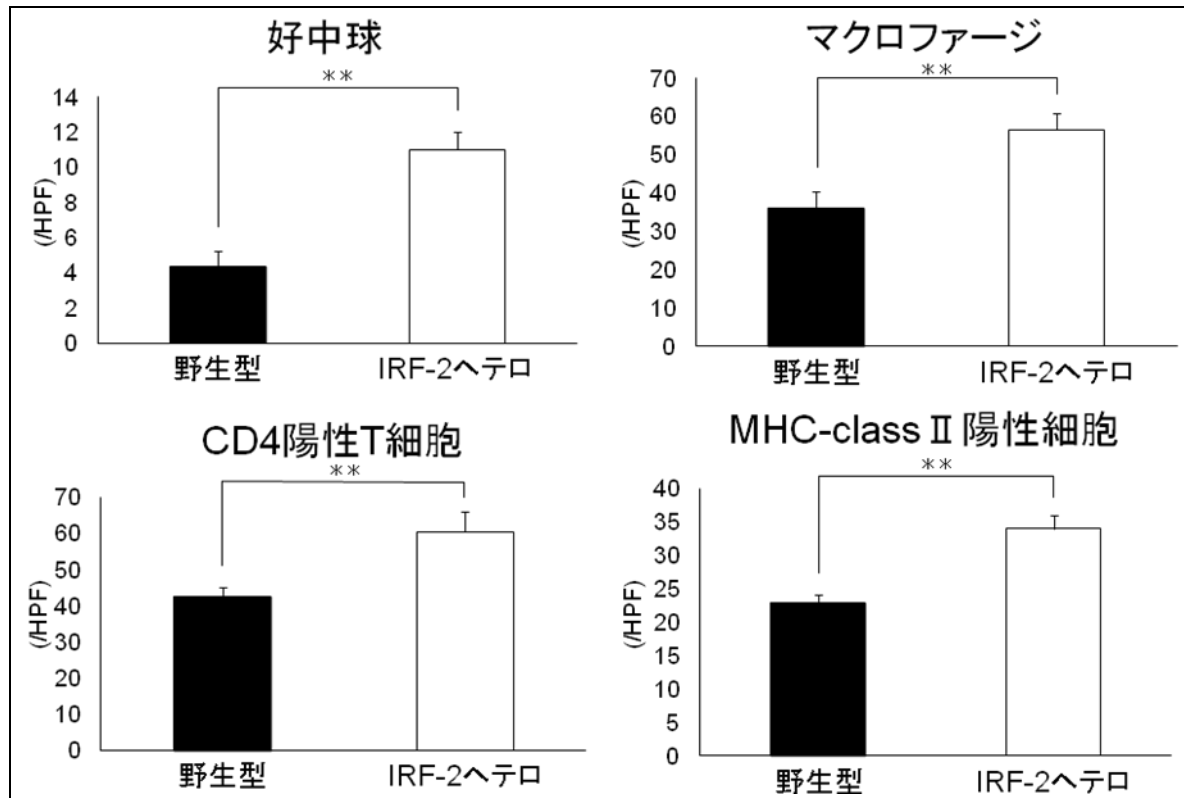


図4 野生型マウス、IRF-2ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織における浸潤細胞

イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を起こした耳介組織に浸潤している好中球、マクロファージ、CD4陽性T細胞、MHC-class II陽性細胞の数。組織を400倍で観察し、一視野あたりの細胞数をカウントした。カウントは一切片あたり3視野ずつ行った。データは平均値+SEMを用いて表した。n=8。** $p < 0.01$ 。

次に、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の皮膚組織での各種サイトカインの mRNA 発現を比較検討した。

e) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織におけるサイトカイン発現

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの剃毛した背部に連日 5 日間イミキモドクリームを外用し、3 日目、6 日目の背部皮膚組織における各種サイトカインの mRNA の発現を qRT-PCR を用いて検討した。3 日目では TNF- α 、IL-12/23p40、IL-12p35、IL-23p19 の発現、つまり主に抗原提示細胞が産生するサイトカインが IRF-2 ヘテロマウスにおいて野生型マウスより有意に増加していた (図 5-A)。また、6 日目では IL-12p35、IL-17A、IL-22、iNOS の発現、つまり T 細胞が産生する細胞が主に IRF-2 ヘテロマウスにおいて野生型マウスより有意に増加していた (図 5-B)。

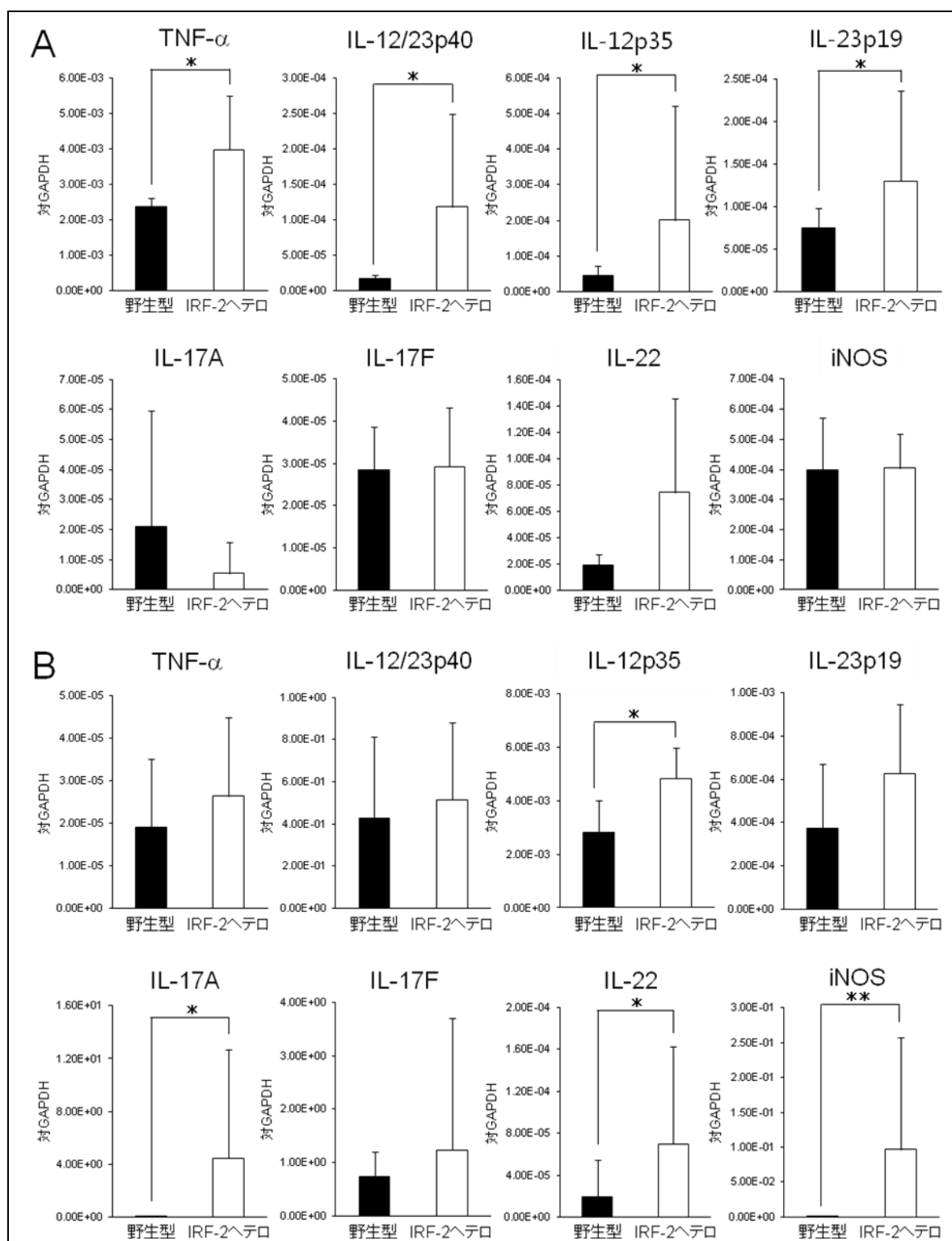


図5 野生型マウス、IRF-2ヘテロマウスの背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織におけるサイトカイン発現

野生型マウスとIRF-2ヘテロマウスの剃毛した背部に連日5日間イミキモドクリームを外用した。イミキモドクリーム外用 (A) 3日目、(B) 6日目の背部組織における各種サイトカインのmRNAの発現。データは平均値+SEMを用いて表した。n=6。* $p < 0.05$ 。
** $p < 0.01$ 。

次に、抗原提示細胞における炎症性サイトカインの産生に IRF-2 がどのように関与しているかを解析するため、*in vitro* の実験として IFN- α の産生をすることが知られている腹腔マクロファージを用いた実験を行った。

まず初めに、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおけるマクロファージのイミキモド刺激に対する各種サイトカインの mRNA 発現を比較検討した。

f) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後のサイトカイン発現

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ 0 μ g/ml、1 μ g/ml、5 μ g/ml の各濃度のイミキモドを加えた 6 時間後、24 時間後の腹腔マクロファージにおける各種サイトカインの mRNA の発現を qRT-PCR を用いて検討した。TNF- α 、IL-12/23p40、IL-36、iNOS の発現は、イミキモド刺激 6 時間後では高濃度のイミキモドで有意に誘導されており、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に有意な差はなかった。イミキモド刺激 24 時間後では高濃度のイミキモドで有意に誘導される傾向はイミキモド刺激 6 時間後と同様であったが、イミキモド刺激 6 時間後と異なり、IRF-2 ヘテロマウスにおいて野生型マウスに比べて、検討したサイトカインの多くが有意差を持って増加していた (図 6-A)。また、IL-12p35、IL-23p19 の発現は、イミキモド刺激 6 時間後では高濃度のイミキモドで有意に誘導されており、野生

型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの中に有意な差はなく、刺激 24 時間後においても高濃度のイミキモドで有意に誘導されていたが、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に差はなかった (図 6-B)。

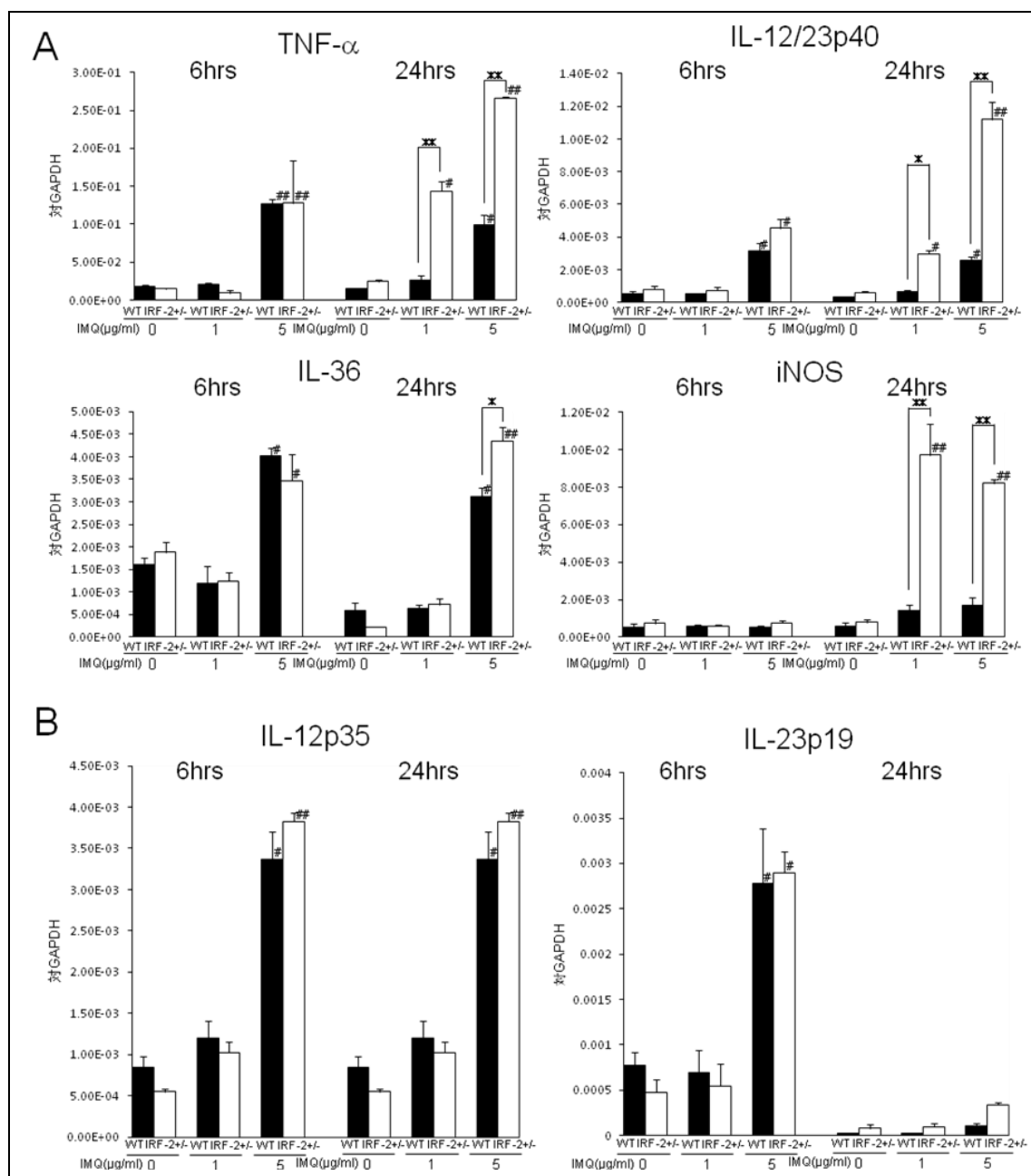


図6 野生型マウス、IRF-2ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後のサイトカイン発現

野生型マウスとIRF-2ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ0 μ g/ml、1 μ g/ml、5 μ g/mlの各濃度のイミキモドを加えた。イミキモド刺激6時間後、24時間後の腹腔マクロファージにおける各種サイトカインのmRNAの発現。データは平均値+SEMを用いて表した。n=6。野生型マウスとIRF-2ヘテロマウスそれぞれにおけるイミキモド0 μ g/mlとイミキモド1 μ g/ml及びイミキモド0 μ g/mlとイミキモド5 μ g/mlでの各種サイトカイン発現の有意差の表記は、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 。同じ条件下における野生型マウスとIRF-2ヘテロマウスの各種サイトカイン発現の有意差の表記は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

次に、腹腔マクロファージにおいてイミキモド刺激が IRF-2 及び IRF-7 を作動させるか否かを知るために、免疫蛍光染色を用いて腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激による IRF-2 及び IRF-7 の局在の変化を検討した。

g) 野生型マウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激による IRF-2 と

IRF-7 の局在の変化

免疫蛍光染色を用いて、野生型マウスにおけるマクロファージのイミキモド刺激による IRF-2 及び IRF-7 それぞれの局在の変化を検討した。具体的には、野生型マウスの腹腔マクロファージを用いて、イミキモド刺激あり(イミキモド濃度 5 μ g/ml) とイミキモド刺激なし (イミキモド濃度 0 μ g/ml) の条件下でそれぞれ 6 時間培養し、免疫染色を行って IRF-2 及び IRF-7 の局在を調べた (図 7)。IRF-7 はイミキモド刺激なしの条件下において、核の染まりとほぼ一致していた。イミキモド刺激ありの条件下においても、IRF-7 はイミキモド刺激なしの条件下とほぼ同じ所見を認めた。一方、IRF-2 はイミキモド刺激なしの条件下において、核の部分が抜けるように染まっており、細胞質に局在していることが示唆された。イミキモド刺激ありの条件下においては、イミキモド刺激なしの条件下では抜けていた核、及び核周囲が染まっていた。この所見から IRF-2 がイミキモド刺激にて細胞質から核内に移行することが示唆された。

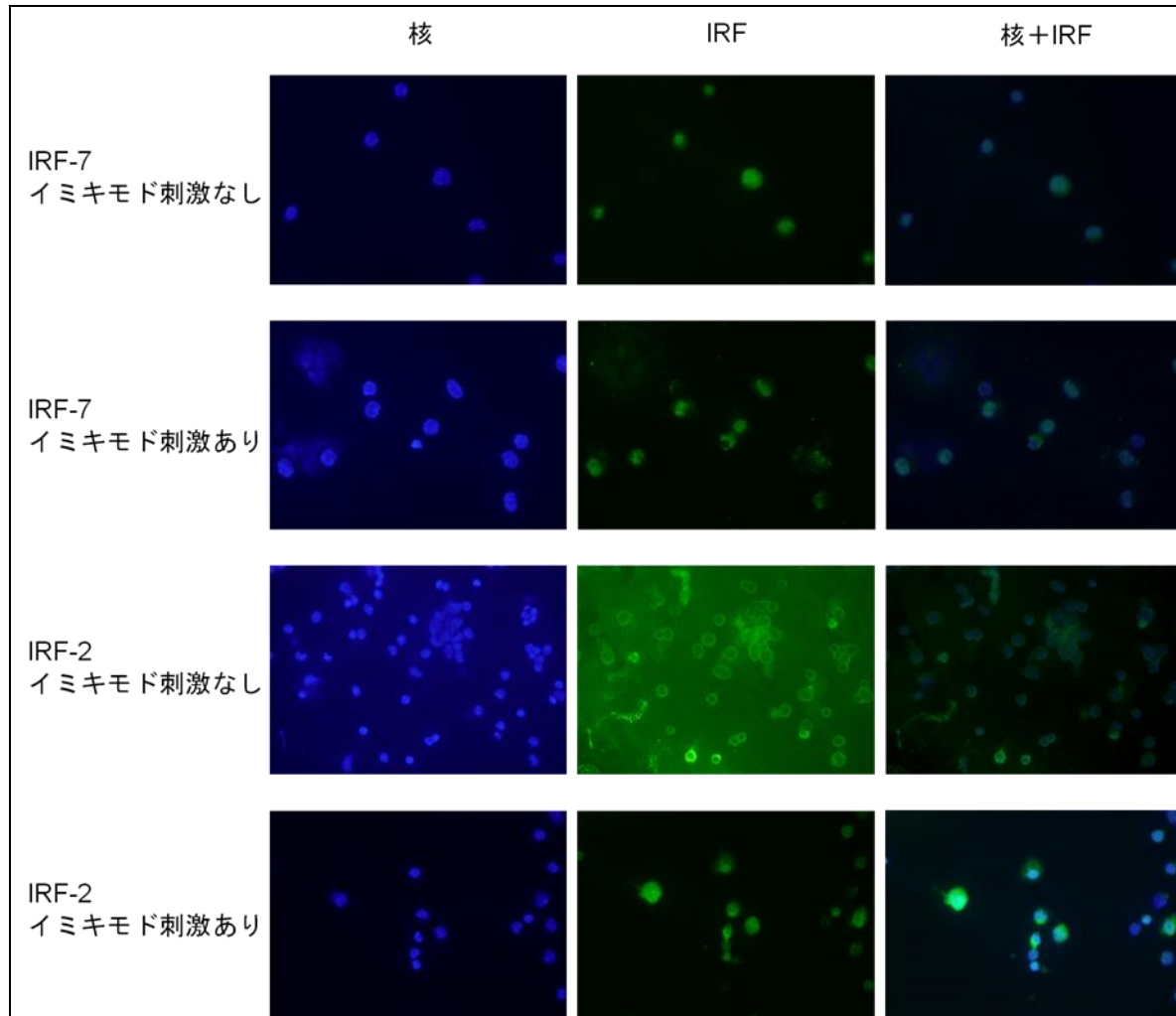


図7 野生型マウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激前とイミキモド刺激 6 時間後の IRF-2 と IRF-7 の局在

免疫蛍光染色の結果を示す。横一列が同じ条件であり、同じ領域の画像である。左一列の青色は細胞の核を示す。中央の一系列の黄緑色は上 2 つが IRF-7、下 2 つが IRF-2 を示す。右の一系列は左の一系列と右の一系列を重ねた画像である。野生型マウスにおける腹腔マクロファージを用いて、イミキモド刺激あり（イミキモド濃度 5 μ g/ml）とイミキモド刺激なし（イミキモド濃度 0 μ g/ml）の条件でそれぞれ 6 時間培養し、免疫蛍光染色を行って IRF-2 及び IRF-7 の局在を調べた。倍率は 400 倍。刺激ありは n = 6。代表的な結果を示す。

続いて、IRF-2 ヘテロマウスにおける IRF-2 の発現量が低下していることを確認するために、免疫蛍光染色を用いて野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの IRF-2 発現を比較検討した。

h) 野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおける IRF-2 発現

免疫蛍光染色を用いて、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおける腹腔マクロファージのイミキモド刺激なしの条件下での IRF-2 発現を検討した。具体的には、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージを用いて、イミキモド刺激なし (イミキモド濃度 0 μ g/ml) の条件下でそれぞれ 6 時間培養し、免疫蛍光染色を行って IRF-2 の発現を調べた (図 8)。IRF-2 の染色は野生型マウスに比べ IRF-2 ヘテロマウスで弱く、IRF-2 ヘテロマウスにおいて IRF-2 の発現量は野生型マウスに比べて低下していることを示唆する所見と考えられた。

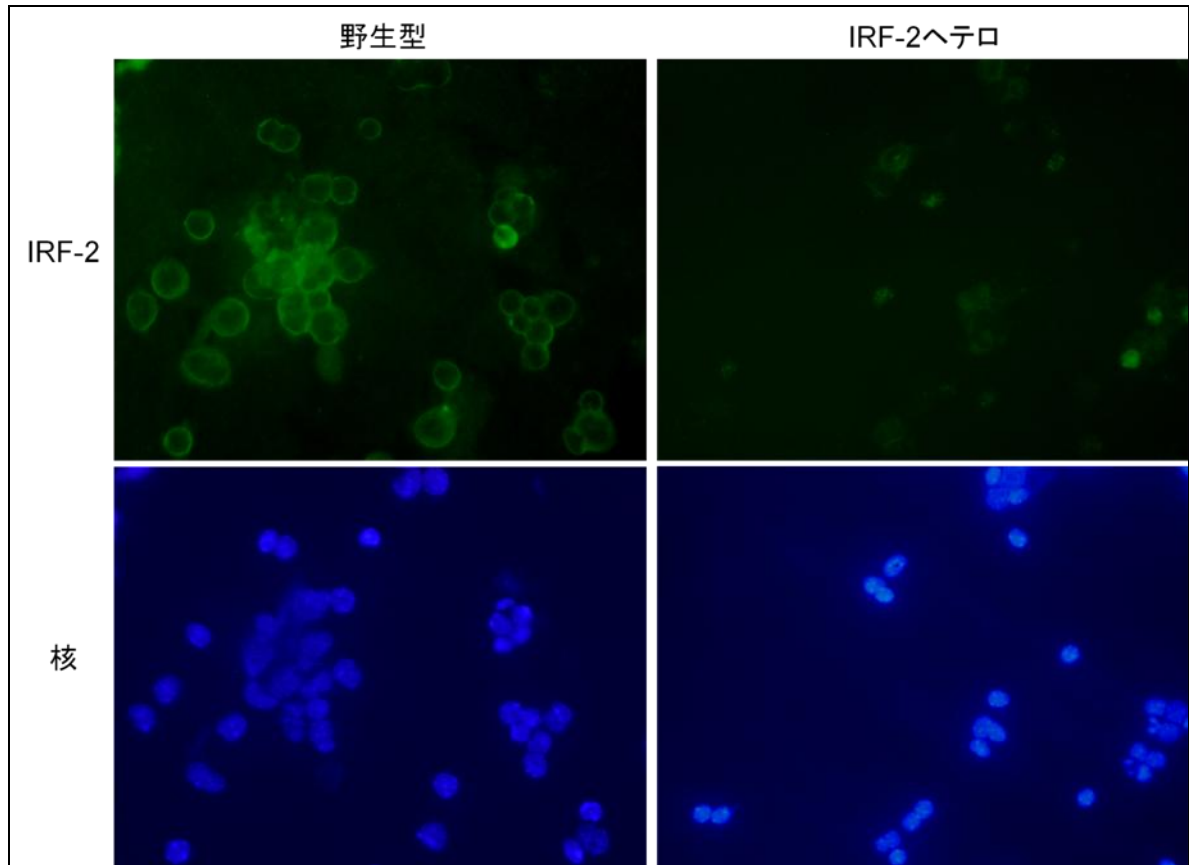


図 8 野生型マウスの腹腔マクロファージにおける **IRF-2** の発現

免疫蛍光染色の結果を示す。左列が野生型マウス、右列が **IRF-2** ヘテロマウスの腹腔マクロファージであり、それぞれ上段と下段は同じ領域の画像である。上段の黄緑色は **IRF-2** を示し、下段の青色は細胞の核を示す。いずれもイミキモド刺激はなく、同じ条件下で撮影した。倍率は 400 倍。n = 6。代表的な結果を示す。

次に、IRF-2 の作用が、イミキモド刺激が TLR7 に入ってから IFN- α が産生されるまでの間か否かを知るために、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージのイミキモド刺激後の培養液中の IFN- α 蛋白量を検討した。また、上記と同様、IRF-2 の作用が、イミキモド刺激が TLR7 に入ってから IFN- α が産生されるまでの間か否かを知るために、IFN- α 産生の主要細胞が形質細胞様樹状細胞であることを考慮し、形質細胞様樹状細胞を含む脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現の検討も行った。

i) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの (A) 腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後の培養液中の IFN- α 蛋白量、及び (B) 脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ 0 μ g/ml、1 μ g/ml、5 μ g/ml の各濃度のイミキモドを加え、6 時間後、24 時間後の培養液中における IFN- α 蛋白量を ELISA にて測定した。結果は、イミキモド刺激 6 時間後も 24 時間後も野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に有意な差はなく、いずれも小さい値であった (図 9-A)。次に、IFN- α 産生の主要細胞である形質細胞様樹状細胞を含む脾臓 bulk 細胞にそれぞれ 0 μ g/ml、1 μ g/ml、5 μ g/ml の各濃度のイミキモドを加え、イミキモド刺激 6 時間後の脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現を qRT-PCR

を用いて測定した。結果は、イミキモド刺激にて脾臓bulk細胞における IFN- α の mRNA 産生は増加したが、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの上に有意な差はなかった (図 9-B)。

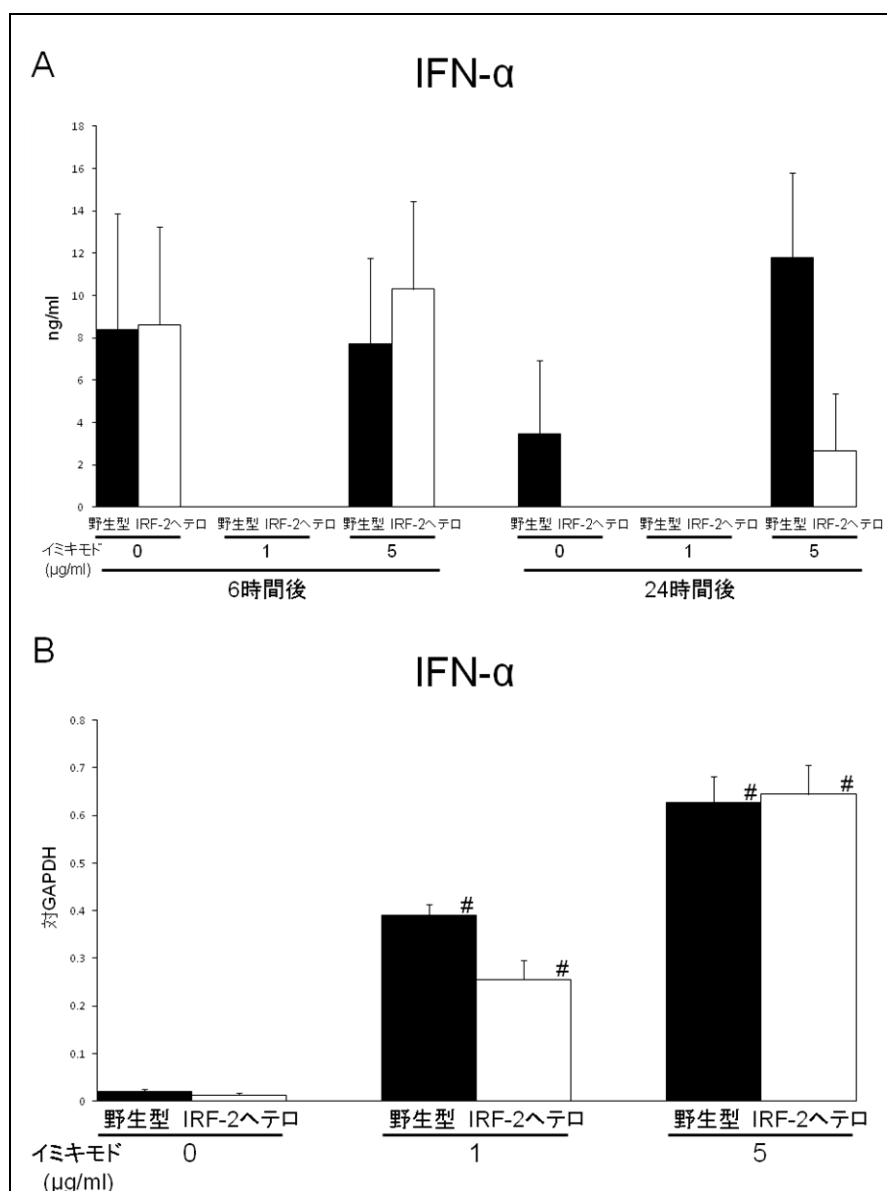


図9 野生型マウス、IRF-2ヘテロマウスの (A) 腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後の培養液中の IFN- α 蛋白量、及び (B) 脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現

(A) 野生型マウスと IRF-2ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ 0 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度のイミキモドを加えた。イミキモド刺激 6 時間後、24 時間後の培養液中における IFN- α 蛋白量を ELISA にて測定。データは平均値+SEM を用いて表した。 $n=2$ 。(B) 野生型マウスと IRF-2ヘテロマウスから採取した脾臓 bulk 細胞にそれぞれ 0 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度のイミキモドを加えた。イミキモド刺激 6 時間後の脾臓 bulk 細胞における IFN- α の mRNA 発現。データは平均値+SEM を用いて表した。 $n=6$ 。野生型マウスと IRF-2ヘテロマウスそれぞれの IFN- α の mRNA 発現量のイミキモド 0 $\mu\text{g/ml}$ とイミキモド 1 $\mu\text{g/ml}$ 、及びイミキモド 0 $\mu\text{g/ml}$ とイミキモド 5 $\mu\text{g/ml}$ での有意差の表記は、# $p < 0.05$ 。

図 9 で示した実験結果は、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージ及び形質細胞様樹状細胞を含む脾臓 bulk 細胞におけるイミキモド刺激後の IFN- α の産生に差がないことを示唆するものであった。この結果より、IRF-2 の作用は、イミキモド刺激が TLR7 に入ってから IFN- α が産生される間ではなく、イミキモド刺激が TLR7 に入ってから IFN- α が産生され、その産生された IFN- α がオートクラインもしくはパラクライン的に作用した後に作用することが予想された。

そこで、次に、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージに外から IFN- α を加えた後の腹腔マクロファージにおける各種サイトカインの mRNA 発現を検討した。

j) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおける IFN- α 刺激後の各種サイトカイン発現

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ 0 U/ml、100 U/ml、1000 U/ml の各濃度の IFN- α を加え、IFN- α 刺激 24 時間後の腹腔マクロファージにおける各種サイトカインの mRNA の発現を qRT-PCR を用いて測定した。結果は、TNF- α 、IL-12p40、IL-36、iNOS は IFN- α の濃度依存性に誘導され、IFN- α の濃度に関わらず IRF-2 ヘテロマウスでの値の方が野生型マウスでの値に比べて増加していた (図 10-A)。一方 IL-12p35、IL-23p19 は、IFN- α によって誘導される傾向はあ

るものの、きれいな濃度依存性は示さなかった (図 10-B)。

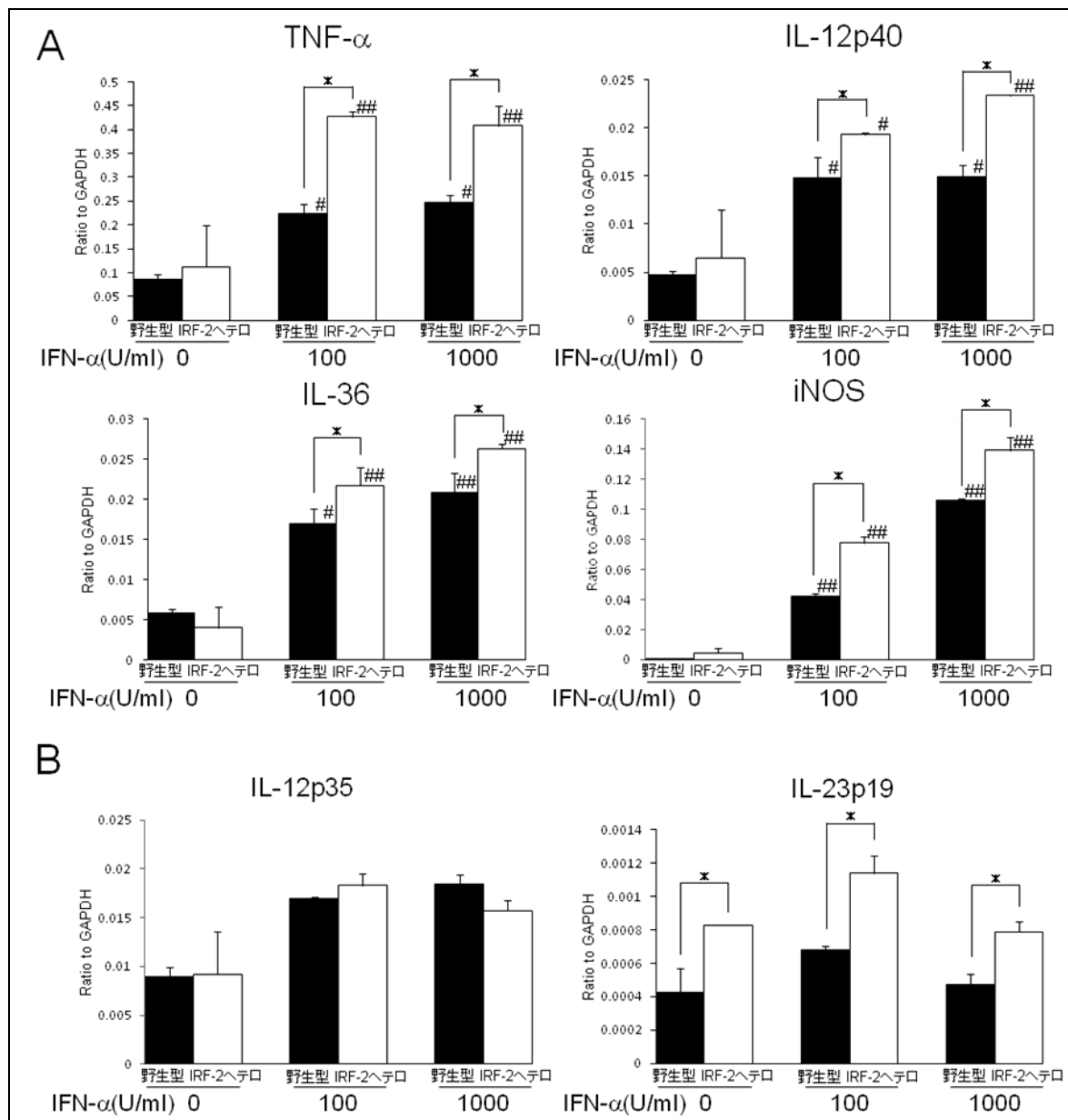


図 10 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおける IFN- α 刺激後の各種サイトカイン発現

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージにそれぞれ 0 U/ml、100 U/ml、1000 U/ml の各濃度の IFN- α を加えた。IFN- α 刺激 24 時間後の腹腔マクロファージにおける各種サイトカインの mRNA の発現。データは平均値+SEM を用いて表した。n = 6。野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスそれぞれにおける IFN- α 0 U/ml と IFN- α 100 U/ml 及び IFN- α 0 U/ml と IFN- α 1000 U/ml での各種サイトカイン発現の有意差の表記は、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ 。同じ IFN- α 濃度条件下における野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの各種サイトカイン発現の有意差の表記は、* $p < 0.05$ 。

ここで iNOS に注目した。その理由は、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎での皮膚での iNOS 発現及び腹腔マクロファージのイミキモド刺激後の iNOS 発現が、皮膚ではイミキモドクリーム外用 6 日目の方で、腹腔マクロファージはイミキモド刺激 24 時間後の方で、それぞれ IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて有意に上昇していたことから、IRF-2 の低下は iNOS の産生に非常に強い影響を与えることが判明した。また、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像においても、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて紅斑が非常に目立っており、iNOS によって生じる、血管拡張作用を持つ NO がイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の紅斑形成に重要と考えられたためである。

そこで、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激を与えた場合と与えない場合での NO 産生量を比較検討した。

k) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激による NO 産生

皮膚での発現および腹腔マクロファージのイミキモド刺激の実験結果から、IRF-2 の低下は iNOS の産生に非常に強い影響を与えることが判明した。実際イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像においても、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて紅斑が非常に目立っていたことから、iNOS によって生じる nitric oxide (NO) が血管

平滑筋を弛緩させることで、紅斑形成に寄与していると考えた。そこで腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後の NO 産生量を比較検討することにした。具体的には、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージをイミキモド濃度 0 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ の各培養液で培養し、24 時間後の培養液中における NO 産生量を ELISA にて測定した。結果は、イミキモド刺激により IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおいて有意に NO 産生量が増加していた (図 10)。

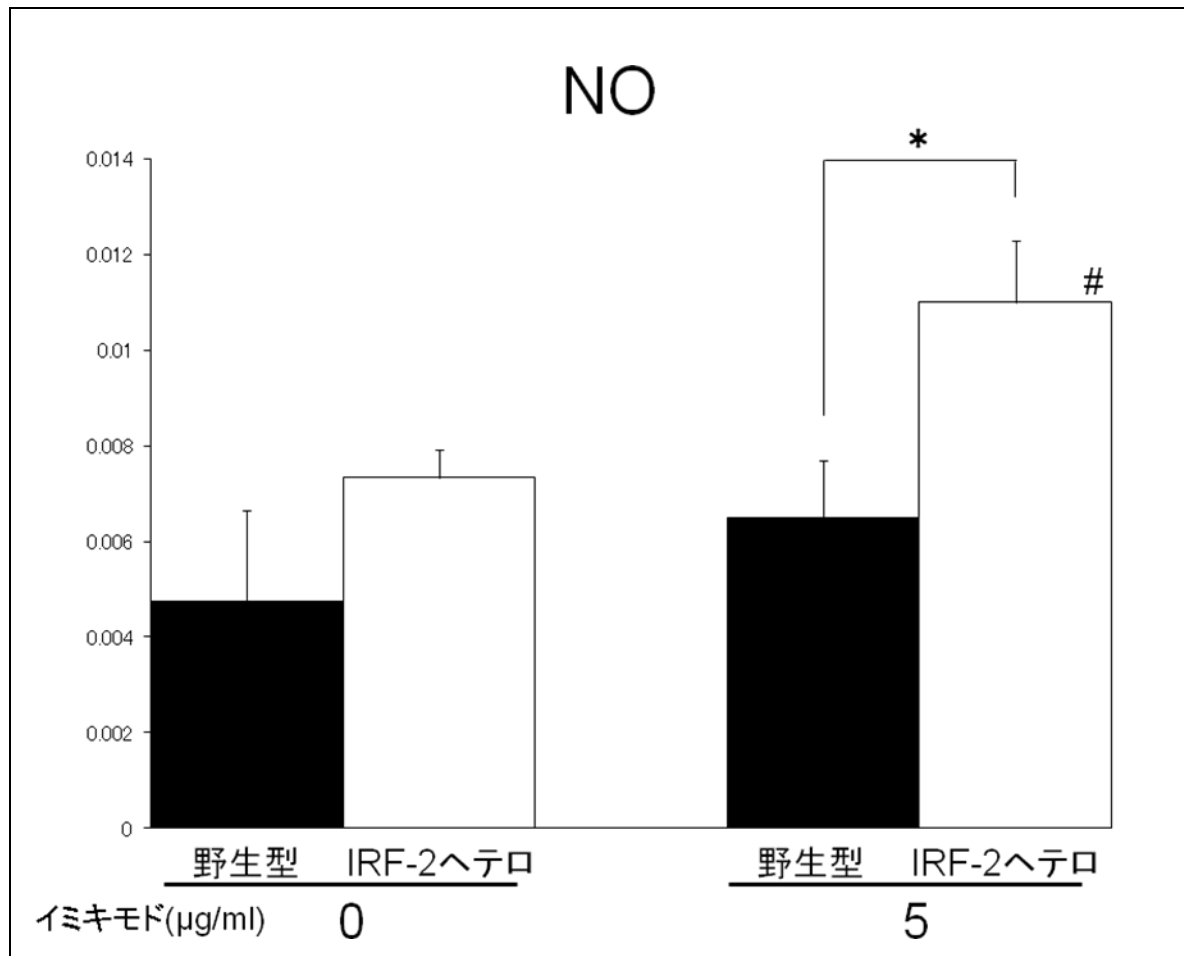


図 11 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激による nitric oxide (NO) 産生

野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスから採取した腹腔マクロファージをイミキモド濃度 0 μg/ml、5 μg/ml の各培養液で培養し、24 時間後の培養液中における NO 産生量を ELISA にて測定。データは平均値+SEM を用いて表した。野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスそれぞれにおけるイミキモド濃度 0 μg/ml と 5 μg/ml での NO 産生量の有意差の表記は、# $p < 0.05$ 。同じイミキモド濃度条件下における野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの各種サイトカイン発現の有意差の表記は、* $p < 0.05$ 。

また、図 11 で認めた、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージにおけるイミキモド刺激後の NO 産生量の差が、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における血管の拡張に差が生じていると考えられたため、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの耳の組織におけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の拡張血管数を比較検討した。

1) 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスの耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織における拡張血管

連日 5 日間イミキモドクリームを外用した耳介組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いて拡張血管数をカウントした (図 12-A)。拡張血管数は、大きさや同一血管であると考えられる位置関係にあるものも、1 つの血管管腔構造を 1 つとカウントし、明らかに拡張していると考えられる血管のみをカウントした。光学顕微鏡を用いて 400 倍率の視野でランダムに 3 ヶ所カウントし、それらの平均を取った。結果は、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて有意に拡張血管数が増加していた (図 12-A) (図 12-B)。

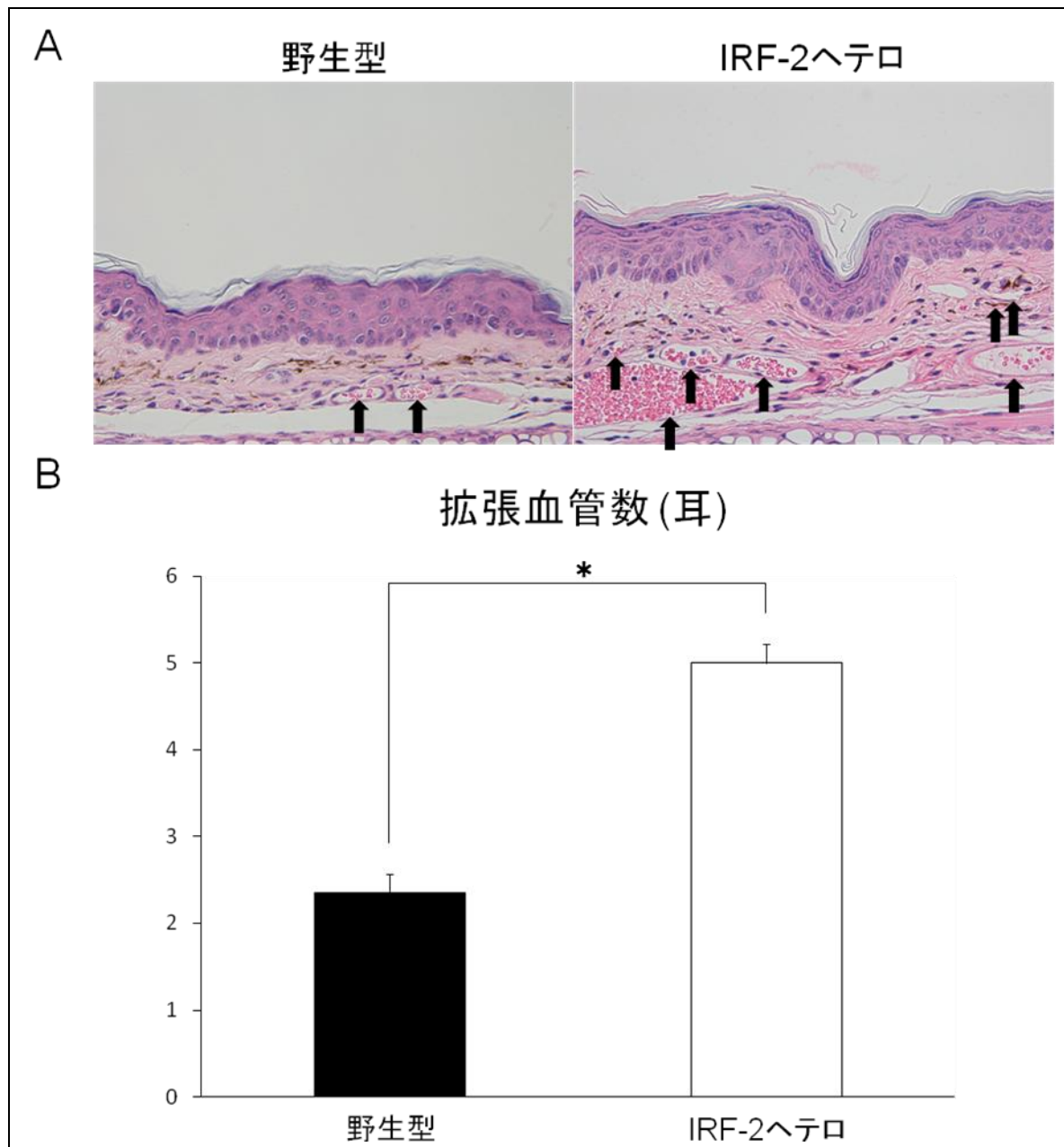


図 12 野生型マウス、IRF-2 ヘテロマウスのイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の耳介組織における拡張血管

(A) 連日 5 日間イミキモドクリームを外用した耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎のヘマトキシリン・エオジン染色組織像。倍率は 400 倍。代表的な組織像を示す。(B) 連日 5 日間イミキモドクリームを外用したイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の耳介組織の拡張血管数。拡張血管数は、大きさや同一血管であると考えられる位置関係にあるものも、1 つの血管管腔構造を 1 つとカウントし、明らかに拡張していると考えられる血管のみカウントした。ヘマトキシリン・エオジン染色の組織標本にて光学顕微鏡を用いて 400 倍率の視野でランダムに 3 ヶ所カウントし、それらの平均を取った。n = 8。

* $p < 0.05$ 。

5. 考察

本研究では、IRF-2 ノックアウトマウスではなく IRF-2 ヘテロマウスを用いた。IRF-2 ノックアウトマウスは生後 8 週齢頃より CD8 陽性 T 細胞の異常活性化による炎症性皮膚病変を発症し(11)、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の評価を正確に行うことができない懸念があったためである。IRF-2 ヘテロマウスでは、生後 48 週齢を越えても炎症性皮膚病変を自然発症しないことを確認した。また、IRF-2 ヘテロマウスにおいて IRF-2 の発現量が野生型マウスに比べて低下していることは免疫蛍光染色にて確認した (図 8)。

今回我々は、IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎が、野生型マウスのイミキモド誘発乾癬様皮膚炎と比較して増悪することを明らかにした。組織学的な検討では肉眼的所見の違いと同様に、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて表皮が厚く (図 3-A, B)、浸潤細胞も多かった (図 3-A、図 4)。これは IRF-2 ノックアウトマウスで自然発症する炎症性皮膚疾患の組織像と酷似していた(12)。

次に、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における各種サイトカインの mRNA 発現を検討したところ、イミキモド連日外用 3 日目では、抗原提示細胞が主として産生するサイトカインの発現が、IRF-2 ヘテロマウスにおいて野生型マウスより有意に増加していた(図 5-A)。イミキモド連日外用 6 日目では、T 細胞が産生するサイトカインが主

に増加していた(図 5-B)。イミキモドは TLR7 を介して抗原提示細胞を活性化し、それらの細胞が T 細胞を活性化して皮膚での炎症が引き起こされると想定されている。従ってこのタイムコースは、従来のイミキモド誘発乾癬様皮膚炎のメカニズムの考え方と合致していた。また、今回 IRF-2 ヘテロマウスで発現が上昇していたサイトカインは、過去の論文(3, 17, 18)にてヒトの乾癬の病態に関与すると報告されているものであり、臨床像に合致していた。IL-12p35 は抗原提示細胞が発現する IL-12 のサブユニットであるが、制御性 T 細胞が発現する IL-35 のサブユニットでもある。皮膚炎が強くなると、同時にそれを抑制する系も活性化されることが考えられ、IRF-2 ヘテロマウスにおいて IL-12p35 の発現が野生型マウスより有意に増加していたのは、IL-35 の上昇による可能性もある。

抗原提示細胞における炎症性サイトカインの産生に IRF-2 がどのように関わっているのか解析するため、*in vitro* の実験として IFN- α を産生することが知られている腹腔マクロファージを用いた。IFN- α 産生の主要な細胞は形質細胞様樹状細胞であるが(19, 20)、単離できる細胞数が非常に限られているため、本研究では安価に回収できる腹腔マクロファージを用いた。腹腔マクロファージにイミキモドを加えた 6 時間後の時点の結果から判断すると、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間には有意な差はなかったことから、IRF2 の低下はイミキモドによるマクロファージからの炎症性サイト

カインの産生に直接的な影響はないと考えられた。一方、イミキモド刺激 24 時間後では高濃度のイミキモドで誘導される傾向は同様であったが、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスと比べて TNF- α 、IL-12/23p40、IL-36、iNOS の発現が有意に高かった。IRF-2 は IRF-1 と拮抗する転写抑制因子であることから、培養中に産生される IFN- α/β がオートクライン的に働き、IRF-2 がないとシグナルが増強することを反映していると思われた。また IL-12p35、IL-23p19 の発現は、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に有意な差はなく、これらのサイトカイン産生に IFN- α/β の影響が少ない可能性が考えられた。

マクロファージにおける TLR7 シグナル伝達経路については現在のところ報告が見当たらないが、形質細胞様樹状細胞における TLR7 シグナル伝達経路 (図 13) についての報告(21)はあり、マクロファージにおける TLR7 シグナル伝達経路も形質細胞様樹状細胞におけるものと同様と想定される。

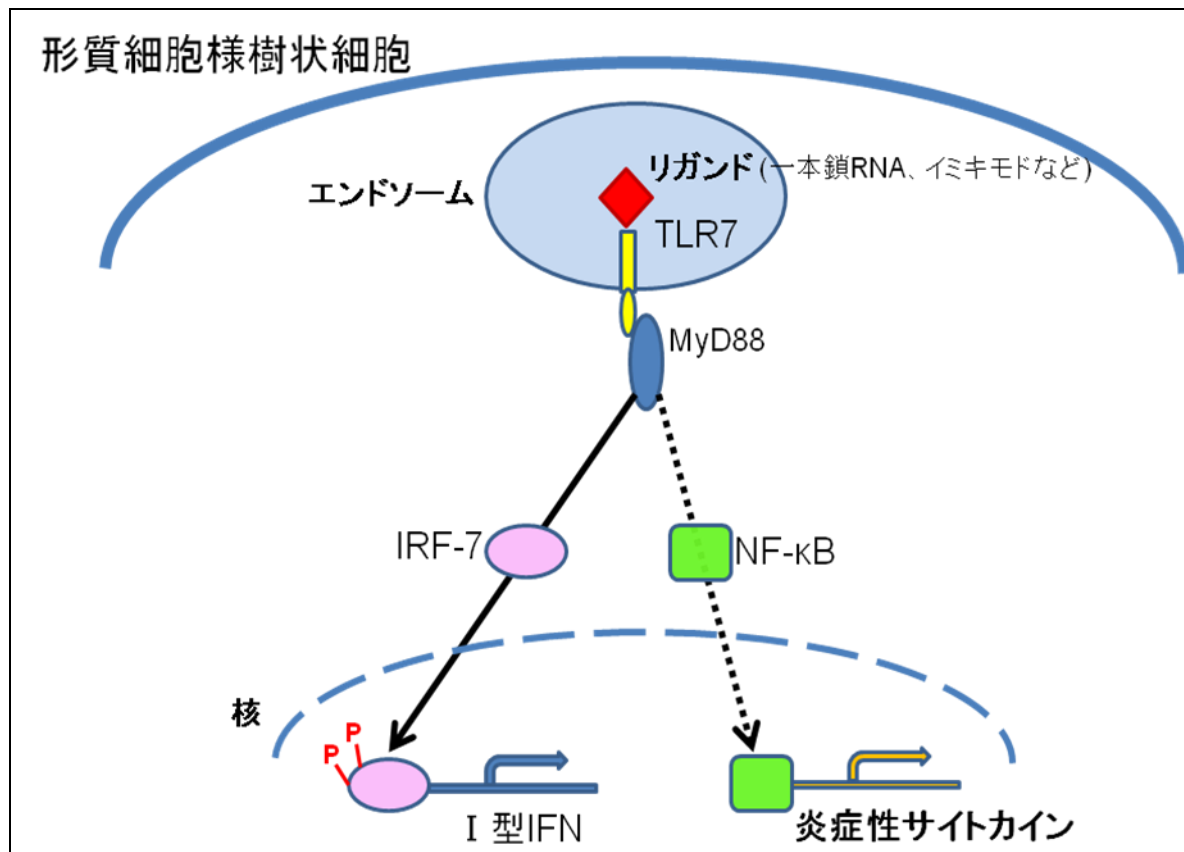


図 13 形質細胞様樹状細胞における TLR7 シグナル伝達経路

形質細胞様樹状細胞における TLR7 シグナル伝達経路。マクロファージでの経路も同様と想定される。

イミキモドはエンドソーム上の TLR7 に作用する。そこから IRF-7 を介する経路で I 型 IFN が産生され、NF- κ B を介する経路で各種炎症性サイトカインが産生されることが知られている(21, 22)。IRF-2 は I 型 IFN の転写に関与しているわけだが、TLR7 刺激による IFN 産生に関与するかは分かっていない。そこで、次に、マクロファージを用いてイミキモド刺激による IRF-2 及び IRF-7 の局在の変化を検討した。IRF-7 はイミキモド刺激のない条件でもほぼ核に一致して存在し、刺激によって局在は変わらなかった。これは腹腔マクロファージの精製及び 6 時間の培養の間に、ある程度の活性化が起き、IRF-7 が核内に移行してしまったと考えられる。イミキモド刺激によって IRF-7 の局在や蛍光強度が変化しないことは、本研究ではマクロファージからの IFN- α 産生をイミキモドが増強していないことに合致していると考ええる。IRF-2 はイミキモド刺激がない場合には細胞質に存在し、刺激があると核内に移行していた(図 7)。

TLR7 を介する刺激が IRF-2 の局在を変化させていることから、イミキモド刺激によって IFN- α/β が産生される過程に IRF-2 が影響を与える可能性が考えられた。しかしこの仮説は、IRF-2 ヘテロマウスの腹腔マクロファージからの IFN- α 産生がイミキモド刺激の有無に関係なく野生型マウスと有意な差はなくいずれも非常に小さい値であったこと (図 9-A)、また、形質細胞様樹状細胞を含む脾臓 bulk 細胞を用いた検討で野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に差がなかったこと(図 9-B)、から否定的で

ある。IRF-2 ヘテロマウスでは、培養中に産生される微量の IFN- α/β がオートクラインあるいはパラクライン的に働き、その際に IRF-2 が少ないことで炎症性サイトカインの産生が増強していると考えられた。イミキモド刺激 6 時間後では野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に差がなく、24 時間後に有意差があることは、この仮説に矛盾しない。また腹腔マクロファージに外から IFN- α を加えた際、イミキモド刺激にて IRF-2 ヘテロマウスで産生が増強していたサイトカインが IFN- α 濃度依存性に誘導されたことも(図 10-A)、この仮説を裏付けると考える。

皮膚での発現 (図 5) および腹腔マクロファージのイミキモド刺激の実験結果 (図 6) から、IRF-2 の低下は iNOS の産生に非常に強い影響を与えることが判明した。iNOS とは NO を合成する NO 合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) の 3 つの亜種のうちの 1 つであり、免疫系、心血管系、肺などに発現しており、炎症性刺激として知られるリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) などにより誘導される。また、病原体に対する生体防御にも関与している。iNOS により合成される NO は血管拡張作用を持つが、本研究における野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスにおけるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の臨床像を比較検討した実験において、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて紅斑が非常に目立ち (図 1、図 2)、また、拡張血管数も IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて有意に増加していた (図 12-A) (図 12-B) ことから、iNOS

によって生じる NO が乾癬の紅斑形成に重要であると考えられた。実際、過去の報告ではヒトの乾癬の病変部で iNOS の発現が増加しており(18)、乾癬患者群の血中 NO 値は健常人に比べて有意に増加している(21)。ただし、NO は生体内において非常に多彩な機能を発揮しており、血管拡張以外にも乾癬の病態に寄与している可能性がある。例えば、NO は活性化酸素種 (reactive oxygen species : ROS) と反応し様々な生理活性を発揮することが分かってきており、生体内の ROS は NO と反応することによって、より反応性の高い活性酸化窒素種 (reactive nitrogen oxide species : RNOS) となり、核酸や蛋白質、脂質といった生体分子を酸化したりニトロ化したりする(25)。このような経路で NO が乾癬の病態形成に関与している可能性も考えられる。

以上、本研究の結果をまとめると、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における IRF-2 の働きは以下のように考えられた (図 14)。

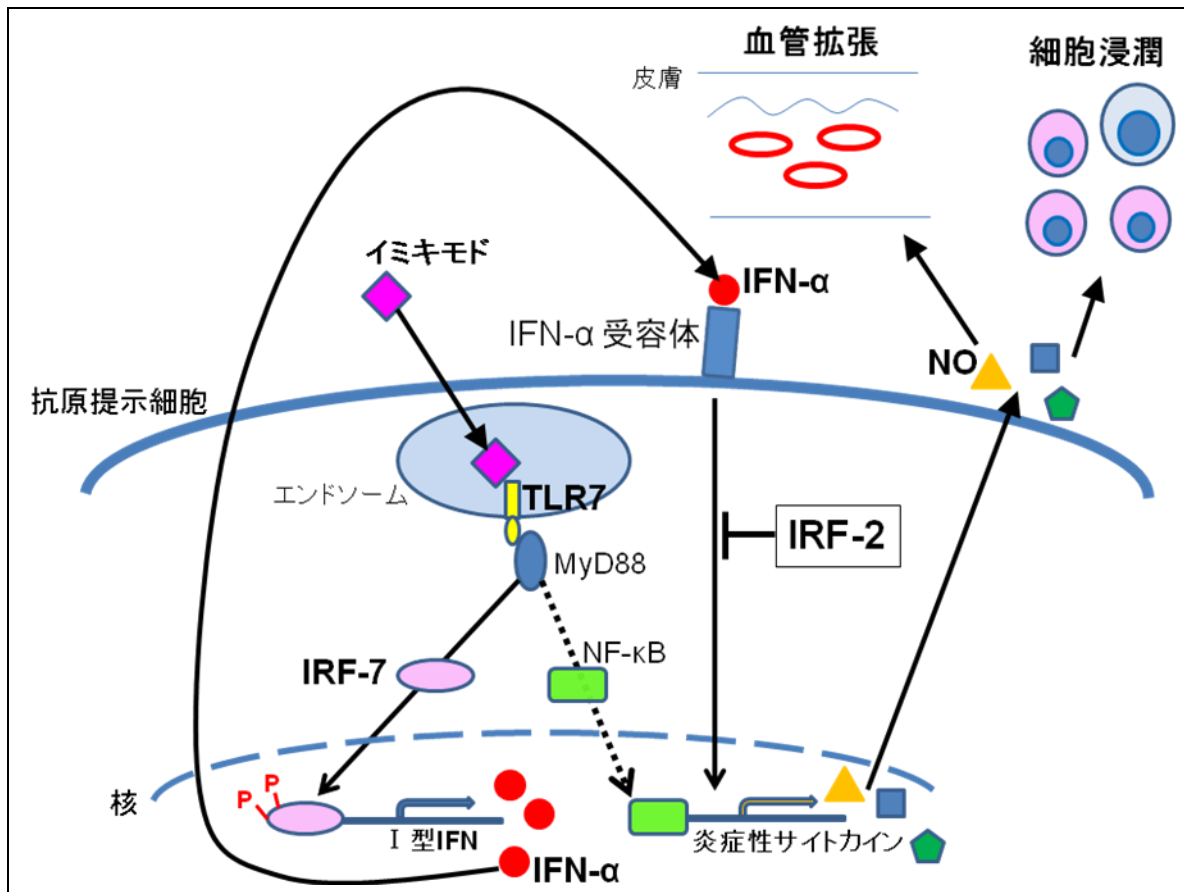


図 14 イミキモド誘発乾癬様皮膚炎における IRF-2 の働き

本研究の結果より予想されるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎における IRF-2 の働きを模式図で示す。

イミキモドはエンドソーム上の TLR7 に作用し、そこから IRF-7 を介する経路で IFN- α を含む I 型 IFN が産生され、NF- κ B を介する経路で炎症性サイトカインが産生される(20, 22)。産生された IFN- α がオートクラインあるいはパラクライン的に IFN- α 受容体を介して炎症性サイトカインをさらに増加させるが、その際に IRF-2 が抑制的に働いていると考えられた。IRF-2 ヘテロマウスにおいては NO や炎症性サイトカインの産生が増加し、血管拡張や細胞浸潤をより引き起こして皮膚炎が増悪すると推察された。

本研究にて我々は、IRF-2 のハプロ不全が TLR7 刺激と協同し、乾癬モデルである Th17 関連皮膚炎を増悪させることを明らかにした。過去の報告では、IRF-2 遺伝子の 921 G/A 対立遺伝子における Single Nucleotide Polymorphism (SNP) により IRF-2 921 G/G、G/A、A/A の遺伝子型が存在し、この SNP がスプライシングに影響を与えられ、さらに 40 歳以下に発症した乾癬患者群において、特に若年発症した乾癬患者で 921 G/G 遺伝子型の割合が多いことから、IRF-2 921 G/G 遺伝子型を持つヒトは IRF-2 の発現もしくは機能障害により I 型 IFN への感受性が高まっているとされる(1)。今回の検討結果はこれに合致すると思われた。

IRF-2 は IRF-1 を競合的に阻害することによって遺伝子の転写を抑制することから、外部から IRF-2 を導入したり、IRF-1 を阻害することが治療に結びつくと考えられた。

また、今回の研究によりイミキモド誘発乾癬様皮膚炎で誘導されるサイトカインの中にも、IFN- α の影響が大きいものとそうでないものがあることが明らかになった。

IFN- α は既に臨床の現場で使用されていることや、今後、乾癬や膠原病などの治療ターゲットになることを考えると、IFN- α の生体への影響を正確に理解しておくことは重要であると考えた。

6. 謝辞

免疫染色を始め、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申し上げます。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申し上げます。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致しております。また、本研究の共同研究者の一人である東京大学医学部皮膚科学教室、菅谷 誠准教授には丁寧に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、心より深謝申し上げます。

7. 引用文献

1. Foerster J, Nolte I, Schweiger S, Ehlert C, Bruinenberg M, Spaar K, et al. Evaluation of the IRF-2 gene as a candidate for PSORS3. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(1): 61-4.
2. Grjibovski AM, Olsen AO, Magnus P, Harris JR. Psoriasis in Norwegian twins: contribution of genetic and environmental effects. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007; 21(10): 1337-43.
3. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007; 445(7130): 866-73.
4. Ito H, Ando T, Ogiso H, Arioka Y, Seishima M. Inhibition of induced nitric oxide synthase enhances the anti-tumor effects on cancer immunotherapy using TLR7 agonist in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2015.
5. Wang C, Zhou Q, Wang X, Wu X, Chen X, Li J, et al. The TLR7 agonist induces tumor regression both by promoting CD4⁺T cells proliferation and by reversing T regulatory cell-mediated suppression via dendritic cells. *Oncotarget.* 2014.
6. 三石 剛. イミキモドの基礎と臨床. ラジオ NIKKEI・medical. 2011.11.24 放送
7. Cuesta N, Salkowski CA, Thomas KE, Vogel SN. Regulation of lipopolysaccharide

sensitivity by IFN regulatory factor-2. *J Immunol.* 2003; 170(11): 5739-47.

8. Zhang XJ, Jiang DS, Li H. Interferon regulatory factors as novel potential targets in the treatment of cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2014.

9. 瀧 伸介. Regulation of the Immune System by IRF Family Transcription Factors. *信州医学雑誌.* 2004; 52(3): 163-170

10. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, et al. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell.* 1989; 58(4): 729-39.

11. Hida S, Ogasawara K, Sato K, Abe M, Takayanagi H, Yokochi T, et al. CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity.* 2000; 13(5): 643-55.

12. Arakura F, Hida S, Ichikawa E, Yajima C, Nakajima S, Saida T, et al. Genetic control directed toward spontaneous IFN-alpha/IFN-beta responses and downstream IFN-gamma expression influences the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disease. *J Immunol.* 2007; 179(5): 3249-57.

13. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17

axis. *J Immunol.* 2009; 182(9): 5836-45.

14. van der Fits L, van der Wel LI, Laman JD, Prens EP, Verschuren MC. Psoriatic lesional skin exhibits an aberrant expression pattern of interferon regulatory factor-2 (IRF-2). *J Pathol.* 2003; 199(1): 107-14.

15. Parkinson J, Charon C, Baker BS, Powles AV, Rogers S, Caird A, et al. Variation at the IRF2 gene and susceptibility to psoriasis in chromosome 4q-linked families. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(3): 640-3.

16. Sugaya M, Kuwano Y, Suga H, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kadono T, et al. Lymphatic dysfunction impairs antigen-specific immunization, but augments tissue swelling following contact with allergens. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(3 Pt 1): 667-76.

17. Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gilliet M, Nestle FO. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol.* 2007; 28(2): 51-7.

18. Li Y, Zhang G, Xiao R, Chen H, Wen H. [Expression of iNOS and HIF-1 α with angiogenesis in affected skin biopsies from patients with psoriasis]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010; 35(9): 952-7.

19. Xia CQ, Peng R, Chernatynskaya AV, Yuan L, Carter C, Valentine J, et al. Increased IFN- α -producing plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in human Th1-mediated type 1

diabetes: pDCs augment Th1 responses through IFN- α production. *J Immunol.* 2014; 193(3): 1024-34.

20. Cao W. Pivotal Functions of Plasmacytoid Dendritic Cells in Systemic Autoimmune Pathogenesis. *J Clin Cell Immunol.* 2014; 5(2): 212.

21. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008; 19(1): 3-19.

22. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol.* 2002; 218(1-2): 74-86.

23. Meki AR, Al-Shobaili H. Serum Vascular Endothelial Growth Factor, Transforming Growth Factor β 1, and Nitric Oxide Levels in Patients With Psoriasis Vulgaris: Their Correlation to Disease Severity. *J Clin Lab Anal.* 2014; 28(6): 496-501.

24. Ueyama A, Yamamoto M, Tsujii K, Furue Y, Imura C, Shichijo M, et al. Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: a role for interferon-alpha in dendritic cell activation by imiquimod. *J Dermatol.* 2014; 41(2): 135-43.

25. Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, Akuta T, Tokutomi Y, Kim-Mitsuyama S, et al. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate.

Nat Chem Biol. 2007; 3(11): 727-35.