

## 論文の内容の要旨

論文題目            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

川口 真喜子

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、そ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一つであるとの報告がある。IRF は interferon (IFN)- $\alpha/\beta$  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る。IRF は哺乳類では全部で 9 種類報告されているが、その中の一つである 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って遺伝子の転写抑制を行っている。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、また、Toll-like receptor (TLR) 7 のリガンドであるイミキモドをマウスに局所的に外用すると 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おり、これらが本研究の背景である。今回我々は野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスを用いて、イミキモド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。

まず初めにイミキモド皮膚炎の臨床的な比較検討を行った。背部皮膚のイミキモド皮膚炎では紅斑、鱗屑、浸潤のいずれも IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスより症状が強いという結果であり、その中でも特に紅斑が IRF-2 ヘテロマウスでより強く現れていた。組織学的な比較検討も行ったが、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、細胞浸潤が強かった。定量的に解析すると、表皮の厚さおよび真皮に浸潤する好中球、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、major histocompatibility complex (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統計学的に有意に高値を示した。

次に背部皮膚イミキモド皮膚炎でのサイトカイン発現について比較検討を行った。イミキモド連日外用 3 日目では、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ 、interleukin (IL) -12/23p40、IL-12p35、IL-23p19 といった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。イミキモド連日外用 6 日目では、IL-17A、IL-22 などの T 細胞が産生するサイトカインの他、induced nitric oxide synthase (iNOS) や IL-12p35 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。

抗原提示細胞における炎症性サイトカインの産生増強のメカニズムを解析するため、腹腔マクロファージを *in vitro* で培養し、0  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度のイミキモドを加えた。6 時間後、24 時間後のマクロファージにおける各種サイトカインの mRNA の発現を検討したところ、イミキモド刺激 6 時間後の時点では、TNF- $\alpha$ 、IL -12/23p40、IL-12p35、IL-23p19、IL-36 の発現は、高濃度のイミキモドで強く誘導されており、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間には有意な差はなかった。従って IRF2 の低下は、イミキモドによる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 ヘテロマウスのほうが野生型マウスと比べて TNF- $\alpha$ 、IL-12/23p40、IL-36 の発現が有意に高かった。これは培養中に産生される IFN- $\alpha/\beta$  がオートクラインとして働き、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- $\alpha/\beta$  の影響が少ない可能性が考えられた。

過去の報告によると、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- $\alpha/\beta$  が産生され、nuclear factor kappa B (NF- $\kappa\text{B}$ ) を介する経路で各種炎症性サイトカインが産生される。マウス腹腔マクロファージをイミキモドで刺激し、IRF-7 と IRF-2 の局在について免疫蛍光染色を用いて検討した。IRF-7 はイミキモド刺激前からほぼ核に一致して存在し、刺激後も局在は変わらなかった。IRF-2 はイミキモド刺激前には細胞質に存在し、刺激後に核に移行していた。従って IRF-2 は、イミキモド刺激によって IFN- $\alpha/\beta$  が産生される過程に影響を与える可能性が考えられた。しかし、

腹腔マクロファージをイミキモドで刺激後の培養液中の IFN- $\alpha$  蛋白量を ELISA にて測定したところ、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、いずれも非常に小さい値であった。さらに、IFN- $\alpha$  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  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度のイミキモドを加え、6 時間後の IFN- $\alpha$  の mRNA 発現を測定したところ、イミキモド刺激によって脾臓 bulk 細胞における IFN- $\alpha$  産生は増加したが、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。この結果より、TLR7 刺激から IFN- $\alpha$  産生までの間に IRF-2 が関与している可能性は低く、培養中に産生される IFN- $\alpha/\beta$  がオートクラインとして働くときに、IRF-2 がいないことでシグナルが増強していると考えられた。実際に腹腔マクロファージに外から IFN- $\alpha$  (0 U/ml、100 U/ml、1000 U/ml) を加えると、刺激 24 時間後において TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、IL-36、iNOS の発現が濃度依存性に誘導され、なおかつ IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスより多く産生していた。一方 IL-12p35、IL-23p19 は、IFN- $\alpha$  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。この結果は、マクロファージのイミキモド刺激 24 時間後のサイトカイン発現の結果に矛盾しなかった。

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、紅斑を生じていると考えた。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。腹腔マクロファージをイミキモド濃度 0  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  で培養し、24 時間後の培養液中における NO 産生量を ELISA にて測定したところ、イミキモド刺激によって IRF-2 ヘテロマウスのほうが有意に NO 産生量が増加した。また耳の組織で拡張血管数の評価をしたところ、IRF-2 ヘテロマウスの方が野生型マウスに比べて有意に拡張血管数が増加していた。

以上、本研究の結果をまとめると、イミキモド皮膚炎における IRF-2 の働きは以下のように予想さ

れた。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- $\alpha$  を含む I 型 IFN が産生され、NF- $\kappa$ B を介する経路で炎症性サイトカインが産生される。産生された IFN- $\alpha$  がオートクライン的に IFN- $\alpha$  受容体を介して作用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。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。また今回の研究で、イミキモド皮膚炎で誘導されるサイトカインの中にも、IFN- $\alpha$  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- $\alpha$  はすで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- $\alpha$  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。