

審査の結果の要旨

氏名 川口 真喜子

本研究は、未だそのメカニズムの全体像が解明されていない乾癬の疾患感受性遺伝子の候補の1つである **interferon regulatory factor (IRF) -2** の働きを推察するものである。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ており、以下の結果を得ている。

1. 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イミキモド誘発乾癬様皮膚炎を検討したところ、野生型マウスに比べて **IRF-2** ヘテロマウスの方が紅斑、鱗屑、浸潤のスコアがいずれも高値であった。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の耳介の厚さは **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。

2. 耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎の組織を検討したところ、**IRF-2** ヘテロマウスの方が野生型マウスより表皮が厚く、真皮の浮腫が強く、拡張した毛細血管も多く見られた。真皮の浸潤細胞を検討したところ、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有意に多かった。

3. 背部イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織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、3日目では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。また、6日目では **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。

4. 腹腔マクロファージをイミキモドで刺激し、**TNF- α** 、**IL-12/23p40**、**IL-36**、**iNOS**、**IL-12p35**、**IL-23p19** の mRNA の発現を検討したところ、これらのサイトカインは野生型マウスと **IRF-2** ヘテロマウスにおいて高濃度のイミキモドにより有意に誘導されたことから、これらのサイトカイン産生に **TLR7** シグナルが関与することが示唆された。また、**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が、イミキモド刺激24時間後では **IRF-2** ヘテロマウスにおいて野生型マウスに比べて有意差を持って増加していた。このように時間差があって影響することから、**IRF-2** の発現低下はイミキモドによる **TNF- α** 、**IL-12/23p40**、**IL-36**、**iNOS** の発現に間接的に影響することが示唆された。また、**IL-12p35**、**IL-23p19** の発現は、イミキモド刺激6時間後及び24時間後において、共に野生型マウスと **IRF-2** ヘテロマウスの間に差はなかった。これは、**IRF-2** の発現低下が **IL-12p35**、**IL-23p19** の発現にあまり影響しないことを示唆していると考えた。

5. 免疫蛍光染色を用いて、腹腔マクロファージのイミキモド刺激による **IRF-2** 及び **IRF-7** の細胞内局在の変化を検討した。**IRF-7** はイミキモド刺激の有無で局在の差は認められなかったが、**IRF-2** は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された。ま

た、IRF-2 の染色は野生型マウスに比べて IRF-2 ヘテロマウスで弱く、IRF-2 のハプロ不全によって IRF-2 の発現量が減弱することが分かった。

6. 腹腔マクロファージにイミキモド刺激を与え、培養液中の IFN- α 蛋白量を ELISA にて測定したところ、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。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細胞における IFN- α の mRNA 発現を検討したところ、イミキモド刺激によって IFN- α の mRNA 産生は増加したが、野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に有意な差はなかった。この結果は IRF-2 が TLR7 を介した IFN- α 産生に関与しないことを示唆するものと考えた。

7. 腹腔マクロファージに IFN- α 刺激を与え、腹腔マクロファージにおける各種サイトカインの mRNA の発現を検討したところ、イミキモド刺激にて IRF-2 ヘテロマウスにて産生が増強していた TNF- α 、IL-12p40、IL-36、iNOS は IFN- α の濃度依存性に誘導され、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。一方イミキモド刺激にて野生型マウスと IRF-2 ヘテロマウスの間に差がなかった 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。この結果は、IFN- α が腹腔マクロファージに作用する際に、IRF-2 の低下が TNF- α 、IL-12p40、IL-36、iNOS の発現に影響し、IL-12p35、IL-23p19 発現には影響しないことを示唆するものと考えた。

8. 腹腔マクロファージにイミキモド刺激を与えた後の iNOS によって生じる nitric oxide (NO) 産生量を ELISA にて測定したところ、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。NO は血管拡張を誘導することから、耳介イミキモド誘発乾癬様皮膚炎組織の拡張血管数をカウントしたところ、拡張血管数は IRF-2 ヘテロマウスにおいて野生型マウスに比べて有意に増加していた。

本研究にて私は、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必要がある。本研究では、乾癬治療および IFN- α の臨床利用において重要な知見が得られており、学位の授与に値するものと考えられる。