

## 博士論文 (要約)

論文題目 マウス乾癬モデルにおける CX3CL1/CX3CR1 の役割

氏名 森村 壮志

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス乾癬モデルにおけるCX3CL1/CX3CR1の役割

氏名 森村 壮志

乾癬はケラチノサイト、樹状細胞、Th1 細胞、Th17 細胞などを介した種々の免疫学的異常を呈する慢性炎症性皮膚疾患である。イミキモドは日光角化症や尖圭コンジローマなどの治療に用いられるが、樹状細胞や単球に存在する Toll 様受容体 7/8 に作用して乾癬様皮膚炎を引き起こすと報告されている。CX3CL1 は唯一の CX3C ケモカインで、内皮細胞、上皮細胞、マクロファージ、血管平滑筋細胞などに発現し、CX3CR1 は T リンパ球、好中球、マクロファージ、NK 細胞、肥満細胞などの様々な細胞に発現している。CX3CL1 と CX3CR1 の役割は、関節リウマチ、血管炎、アトピー性皮膚炎などの多くの炎症性疾患で指摘されている。マクロファージは機能的に M1 と M2 との 2 種類が存在することが知られ、さらに CCR2 と CX3CR1 の発現により 2 つのサブセットに分類される。今まで CX3CL1 欠損マウスまたは CX3CR1 欠損マウス (以降、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスと称す)を用いて様々な疾患の病態が研究されてきた。しかしながら、乾癬の病態について CX3CL1 と CX3CR1 の役割について研究された報告はあまりない。また、マクロファージは乾癬に関与するとの報告はあるが、マクロファージのフェノタイプや分布について詳しく調べた報告は少ない。我々は Toll 様受容体 7/8 のアゴニストであるイミキモドを使用して乾癬様皮膚炎を起こさせる系において、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスを使用して CX3CL1 と CX3CR1 が乾癬の病

態にどのように関わっているか、浸潤しているマクロファージがどのように乾癬の病態に関与するかを調べた。

C57BL/6 マウス (以降、野生型マウスと称す)及び CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスを使用した。背部と右耳に 6 日間連続して 62.5mg/日のイミキモドクリームを外用した。背部の乾癬様皮膚炎を客観的に評価するため Psoriasis Area and Severity Index (PASI)スコアを用いた。紅斑、落屑、皮膚と耳の厚さを測定して皮膚炎の重症度を評価した。マウスの右耳に 62.5mg/日のイミキモドクリームを連日塗布して 24 時間後、48 時間後の右耳を採取して IL-12/IL-23p40、IL-23p19、IL-12p35、IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\gamma$ 、CX3CL1 の mRNA を測定した。また、背部皮膚を採取して免疫組織学的検討を行った。腹腔内マクロファージを採取し、CX3CL1 (0.04、0.4 ng/ml) を添加した後 24 時間培養した。24 時間培養後、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-23 の発現を mRNA レベルと蛋白レベルで調べた。さらに、皮膚と腹腔マクロファージが発現する MCP-1 (M1 マクロファージのマーカー)、MRC-1、Arginase1、Ym1/2 (M2 マクロファージのマーカー)を mRNA レベルで調べた。加えて、皮膚と腹腔マクロファージが発現する CCR2 と CX3CR1 を mRNA レベルと flow cytometry で調べた。

イミキモド連日外用 6 日後の背部の皮膚炎は、肉眼的、組織学的に CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスの方が野生型マウスと比較して紅斑や鱗屑、表皮の厚さなどが減弱し、右耳の厚さも有意に減少していた。真皮に浸潤している CD8 陽性細胞と好中球の数は、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスの方が野生型マウスと比較して有意に減少していた。イミキモド外用で誘発された右耳の皮膚炎部分における

IL-12/IL-23p40、IL-23p19、IL-12p35、IL-17A、IL-17F、IL-22、TNF- $\alpha$ 、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\gamma$ 、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\gamma$ 、CX3CL1 の産生を 24 時間後、48 時間後に mRNA レベルで測定した。結果、IL-17F、IL-22、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\gamma$  の産生は 24 時間後、48 時間後ともに CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較して有意に減少していた。IL-12/IL-23p40、IL-23p19 の産生は 24 時間後のみ有意に減少し、IL-12p35、IL-17A、IL-6 は 48 時間後のみ有意に減少、CX3CL1 はイミキモド刺激前から有意に減少していた。ナীব状態で CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウスの腹腔内マクロファージの数を調べたところ、野生型マウスの方が CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスより約 3 倍多かった。腹腔内マクロファージから産生される IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  は、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスの方が野生型マウスと比較して有意に減少していた。野生型マウスでは CX3CL1 の刺激により IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の産生が抑制されていた。一方、IL-23p19 の産生はどちらのマウスも CX3CL1 の刺激で変化を認めなかった。同様の結果が ELISA における蛋白レベルでも得られた。ナীব状態の耳から採取した組織の MCP-1 の発現は、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比べて有意に減少していた。一方、MRC-1、Arginase 1、Ym1/2 の発現は有意に上昇していた。腹腔液でも同様に MCP-1 の発現は CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは有意に減少し、MRC-1、Arginase 1、Ym1/2 の発現は有意に上昇していた。背部皮膚に浸潤しているマクロファージが発現している MCP-1 と Arginase 1 を病理組織染色で調べた結果、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは、MCP-1 陽性のマクロファージが有意に減少し、一方 Arginase 1 陽性マクロファージが有意に増加していた。すなわち、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは M1 マクロファージが減少し、M2 マクロファージが増加していた。CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは、耳と腹腔のマ

クロファージに CX3CR1 を発現しておらず、CCR2 の発現は野生型マウスと比較して有意に上昇していた。病理免疫染色にて、CX3CR1<sup>-/-</sup>マウスでは CX3CR1 を発現するマクロファージを認めず、一方 CCR2 を発現するマクロファージは野生型マウスと比較して有意に増加していた。加えて、Flow cytometry でも CX3CR1 と CCR2 の発現を調べて同様の結果を得た。

以上より、CX3CR1 の欠損は M2 マクロファージの浸潤を優位にし、イミキモド外用で誘発される皮膚炎を減弱させていることがわかった。また、CX3CR1 が欠損していてもマクロファージの浸潤が完全に抑制されるわけではなく、CCL-CCR2 の経路がマクロファージの浸潤を補っていると考えられた。CX3CL1-CX3CR1 の経路はイミキモド誘発乾癬マウスモデルにおいて M1、M2 マクロファージの分布に重要な役割を果たした。マクロファージのフェノタイプについてまだわからないことが多いが、ある特定のマクロファージ、特に CX3CR1 を発現しているマクロファージを解析することが、乾癬の病態を知る一つの手がかりとして期待される。