

乾癬などの炎症性皮膚疾患モデル動物の
病因・病態に寄与する T 細胞および樹状細胞の解析

2017

上山 あずみ

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。

1. Azumi Ueyama, Kinichi Imura, Erika Kasai-Yamamoto, Nobuyuki Tai, Morio Nagira, Michitaka Shichijo, Kiyoshi Yasui. Kv1.3 blockers ameliorate allergic contact dermatitis by preferentially suppressing effector memory T cells in a rat model. *Clin. Exp. Dermatol.* **2013**, 38, 897-903. [第 1 章]
2. Azumi Ueyama, Mina Yamamoto, Kenichiro Tsujii, Yoko Furue, Chihiro Imura, Michitaka Shichijo, Kiyoshi Yasui. 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, 135-43. [第 2 章]
3. Azumi Ueyama, Chihiro Imura, Yasuyuki Fusamae, Kenichiro Tsujii, Yoko Furue, Miwa Aoki, Minoru Suzuki, Tomohiko Okuda, Itsuki Oshima, Kiyoshi Yasui, Michitaka Shichijo, Mina Yamamoto. Potential role of IL-17-producing CD4/CD8 double negative $\alpha\beta$ T cells in psoriatic skin inflammation in a TPA-induced STAT3C transgenic mouse model. *J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 27-35. [第 3 章]

目次

序論.....	1
第1章 オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析 ...	3
第1節 緒言.....	3
第2節 実験材料および方法	5
1. 実験動物.....	5
2. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルの作製.....	5
3. 化合物投与.....	5
4. 耳介厚の測定.....	5
5. 耳介組織中サイトカイン測定.....	5
6. 耳介組織中の IFN- γ 産生細胞の検出.....	6
7. 耳介細胞の培養.....	6
8. 耳介細胞中の T 細胞ポピュレーション解析	7
9. リンパ節細胞の培養.....	7
10. 統計学的解析.....	7
第3節 実験成績.....	8
1. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルの構築.....	8
2. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける Kv1.3 阻害剤の効果.....	8
3. 炎症皮膚組織中 T _{EM} 細胞の解析	9
4. リンパ節中ナイーブ T/T _{CM} 細胞の解析	11
第4節 考察.....	12
第5節 小括.....	14

第2章 イミキモド誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析.....	15
第1節 緒言.....	15
第2節 実験材料および方法.....	17
1. 実験動物.....	17
2. IMQ 誘発乾癬モデルの作製.....	17
3. 病理組織学的評価.....	17
4. 皮膚組織中サイトカイン測定.....	17
5. 脾臓由来形質細胞様樹状細胞 (pDC) の調製.....	18
6. 骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の誘導.....	18
7. フローサイトメトリー解析.....	19
8. 樹状細胞からのサイトカイン産生測定.....	19
9. 樹状細胞からの一酸化窒素 (NO) 産生測定.....	20
10. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR).....	18
11. 統計学的解析.....	20
第3節 実験成績.....	21
1. IMQ 誘発乾癬モデルにおける IL-23/Th17 経路および TLR7 の関与.....	21
2. pDC に対する IMQ の作用解析.....	23
3. Tip-DC 様 BMDC の誘導.....	24
4. Tip-DC 様 BMDC に対する IMQ および IFN- α の作用解析.....	25
第4節 考察.....	27
第5節 小括.....	30
第3章 K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析 ..	31
第1節 緒言.....	31
第2節 実験材料および方法.....	33
1. 実験動物.....	33
2. IMQ 誘発乾癬モデルの作製.....	33

3. K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルの作製.....	34
4. 抗体投与.....	35
5. スコアリングによる外的所見の重症度評価.....	35
6. 病理組織学的評価.....	35
7. 皮膚組織中サイトカイン測定.....	36
8. 皮膚組織からの単細胞浮遊液の調製.....	36
9. リンパ節からの単細胞浮遊液の調製.....	36
10. フローサイトメトリー解析.....	36
11. 統計学的解析.....	37
第3節 実験成績.....	38
1. IMQ 誘発乾癬モデルにおける IL-17 産生細胞の解析.....	38
2. K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルの構築.....	39
3. K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおける IL-17 産生細胞の解析.....	41
4. IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞の解析.....	43
5. IL-23 に応答する IL-17 産生細胞の解析.....	45
第4節 考察.....	47
第5節 小括.....	50
総括.....	51
謝辞.....	53
引用文献.....	54

略語表

ACD	allergic contact dermatitis
AOO	acetone:olive oil
BMDC	bone marrow-derived DC
CCR	CC chemokine receptor
DC	dendritic cell
DN $\alpha\beta$ T cell	$\alpha\beta$ -TCR ⁺ double negative T cell
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
IFN	interferon
IKCa1	intermediate conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ channel
IL	interleukin
ILC	innate lymphoid cell
IMQ	imiquimod
IOM	Ionomycin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
K5	Keratin 5
K14	Keratin 14
LPS	lipopolysaccharide
MAIT cell	Mucosal associated invariant T cell
MHC	major histocompatibility complex
NK T cell	natural killer T cell
NO	nitric oxide
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBS	phosphate buffered saline
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
QOL	quality of life
ROR γ t	retinoic acid-related orphan receptor gamma t
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ShK	Stichodactyla helianthus K channel toxin

Stat3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
T _{CM} cell	central memory T cell
TCR	T cell receptor
T _{EM} cell	effector memory T cell
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tc17	T cytotoxic 17
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th17	T helper 17
Tip-DC	TNF- α and iNOS-producing DC
iNOS	inducible NO synthetase
pDC	plasmacytoid DC

序論

皮膚は、体の中で最も広い面積をもつ臓器であり、体温調整や水分調整を行うとともに、外部からの様々な刺激から体を保護する重要な役割を担っている。特に、皮膚は体の中でも免疫機能の高い部位であり、皮膚における免疫機能の働きによって、細菌や有害物質などの異物を認識し体内への侵入を防ぐことが可能となっている。皮膚に異常をきたす皮膚疾患は非常に種類が多く、専門医が詳細に分類すると 400 種類にもなると言われている。主な症状には、痛み、痒み、灼熱感などの自覚症状をはじめ、発疹などの皮膚表面の変化のほか、発熱や血液、尿の変化などの全身症状が起こることもある。

皮膚炎 (湿疹) は、多種類ある皮膚疾患のなかでも、皮膚科医にかかるおよそ 3 分の 1 を占めるほどに身近な皮膚疾患である。代表的な皮膚炎としては、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎などがよく知られており、全般的に共通の原因としては、皮膚のバリア機能が外部からの何らかの刺激により破壊され、侵入してきた刺激から身を守るための免疫反応が皮膚内部で活性化され、種々の生理活性物質が放出されて炎症を引き起こされる。なかでもアトピー性皮膚炎は最もよくみられる慢性の炎症性皮膚疾患であり、ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) 調査によれば全世界における小児の推定有病率は 7~8% であり [1]、先進国ではさらに多く、日本でも、厚生労働省の 2014 年患者調査の結果によれば 45.6 万人が罹患している。患者の半数は思春期までに治るが、症状が生涯続く人もおり、症状が悪化すると強い掻痒感により夜も眠れず、生活の質 (QOL; quality of life) の低下や社会生活の障害をきたしている。一般に、アトピー性皮膚炎の治療には、原因除去などの生活改善が重要とされるが、抗炎症作用を目的としたステロイド系抗炎症薬や、痒みを標的とした抗ヒスタミン薬が処方される。しかし、近年では、これらの薬剤に抵抗性を有する難治性のアトピー性皮膚炎患者も急増し、問題となっている。

また、アトピー性皮膚炎と並ぶ二大慢性炎症性皮膚疾患として乾癬がある。特に欧米において発症者が多く、有病率は 2~3% と言われている [2-4]。日本でも、認知度は低いものの、第二次世界大戦以降、生活習慣の変化とともに患者数が増加し続けており、厚生労働省の 2014 年患者調査の結果によれば国内の患者数はおよそ 12.5 万人と推定されている。表皮の細胞増殖亢進と分化不全を特徴とする炎症性皮膚疾患であり、一度発症すると長期にわたって寛解と増悪を繰り返す完治が難しい疾患であるため、日常生活の中で精神的な苦痛や悩みを抱えている患者が多い。

このように、皮膚疾患に苦しむ患者は多く、精神的負担が問題となっている状況であるにも

関わらず、病態の詳細な解析とこれに連動する根治療法の開発は大幅に遅れていた。しかし、近年、アトピー性皮膚炎や乾癬においては、抗サイトカイン抗体などの生物学的製剤の登場によって病態解明が進展し、両疾患ともに T 細胞の機能異常が原因で、アトピー性皮膚炎は 2 型ヘルパー T (Th2; T h l p e r 2) 細胞応答、乾癬は 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞応答の過剰な活性化が病態発症に大きく関与していることが明らかとなり、生物学的製剤の開発とともに高い効果が期待できる治療が可能となってきた。そして現在も、より利便性に優れ、安全かつ強い効果を発揮する新薬の開発に向けた創薬研究が活発に進められている。

創薬研究においては、薬効評価や疾患機序の解明を目的として、適切な疾患モデル動物の開発が不可欠である。現在までに、皮膚疾患の有用な非臨床評価モデル動物として、①ハプテンやアレルゲンなどの外的因子により皮膚炎を誘導するモデル動物 [5,6]、②炎症関連遺伝子トランスジェニック動物 [7,8]、③自然発症モデル動物 [9,10] が存在する。これらには、それぞれに特徴的な表現型、様々な特性や利点、ヒト病態との相違点が存在し、個々の創薬標的に応じて適した疾患モデル動物を選択することで、創薬の成功確率をあげることに繋がると考えられる。しかしながら、皮膚疾患のモデル動物における病因や病態に関して、特に免疫学的観点から詳細に検討された報告は十分ではなく、不明な部分が多い。このことは、皮膚疾患を対象として免疫細胞を標的とした創薬研究を行ううえで、評価のための疾患モデル動物の選択を困難にしている。

そこで、本論文では、3 種類の皮膚疾患モデル動物について、それぞれの病因および病態に関連する免疫学的特性を明らかにする目的で解析した。第 1 章では、オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し、病変部皮膚に浸潤するエフェクターメモリー T (T_{EM} ; effector memory T) 細胞の寄与について解析した。第 2 章では、イミキモド誘発乾癬モデルを構築し、樹状細胞に着目して病態発症メカニズムの解析を行った。第 3 章では、活性化型 Stat3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) を恒常的に表皮に発現させたトランスジェニックマウスを用いて K14.Stat3C マウス TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 誘発乾癬モデルを構築し、病態に寄与する T 細胞ポピュレーションについて解析した。

第1章 オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

第1節 緒言

炎症性皮膚疾患を対象とした治療薬開発において、開発候補品の薬効を評価可能な簡便な疾患モデル動物としてハプテン誘発アレルギー性接触性皮膚炎 (ACD; Allergic Contact Dermatitis) モデル動物が汎用されている。

接触性皮膚炎は、外来性の刺激物質や抗原が皮膚に接触することによって発症する湿疹性の炎症反応であり、大きく刺激性とアレルギー性に分類される。このうち、アレルギー性接触皮膚炎は、ハプテンと呼ばれる分子量 1,000 以下の化学物質が接触アレルゲンとなり、感作相と惹起相を経て、皮膚炎が発症する [11]。感作相においては、ハプテンが皮膚表面から表皮内を通過して蛋白と結合し、皮膚樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) がこれを捕獲して所属リンパ節に遊走し、その物質を特異的に認識する T 細胞を誘導し増殖させる。惹起相においては、感作が成立した個体に再び接触アレルゲンが表皮に侵入すると、ランゲルハンス細胞から抗原特異的 T 細胞に速やかに情報が伝達され、炎症性サイトカイン、ケモカインが放出され、紅斑、細胞浸潤、浮腫などの炎症反応が引き起こされる [11-13]。アレルギー物質が表皮に侵入後 1~3 日に明らかな反応が認められることから、遅延型アレルギー反応ともよばれている。

近年、自己免疫疾患、乾癬や ACD などの炎症性皮膚疾患において、病態に寄与する T 細胞として T_{EM} 細胞が注目されている。活性化されたエフェクター T 細胞は、抗原がいなくなるとその大半がアポトーシスにより死滅するが、一部がメモリー T 細胞として残存し維持される。メモリー T 細胞は、リンパ節へのホーミングに必要なケモカイン受容体 CCR (CC chemokine receptor) 7 の発現によって、CCR7 陽性のセントラルメモリー T (T_{CM} ; central memory T) 細胞と、CCR7 陰性の T_{EM} 細胞に分類される [14,15]。 T_{CM} 細胞は分裂能が高く、二次リンパ組織内で長期免疫記憶を担っているのに対し、 T_{EM} 細胞はサイトカイン産生の即時応答性が高く、末梢組織において即応免疫に重要な役割を果たしている [14,15]。 T_{CM} 細胞と T_{EM} 細胞は、抗原刺激後の活性化状態の維持に働くカリウムチャンネルの種類によってもそれぞれ特徴づけられる。 T 細胞が T 細胞受容体 (TCR; T cell receptor) 刺激を受けると細胞内カルシウム濃度が増加するが、それに伴ってカリウムチャンネルが開閉し、カリウムを細胞外へ流出させることにより膜電位の過分極が引き起こされ、これによって持続的なカルシウム流入が可能となり、 T 細胞の活性化が維持される [16-18]。 ナイーブ T 細胞および T_{CM} 細胞の活性化時には、カルシウム活性化型カリウムチャンネル IKCa1 (intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel) の発現が亢進し機能するのに対し、 T_{EM} 細胞の活性化時には電位依存性カリウムチャンネル Kv1.3 の発現が亢進し

主に機能する [18,19]. すなわち, Kv1.3 は, 通常の T 細胞免疫応答に影響を及ぼすことなく, 炎症に寄与する T 細胞のみを狙った安全性の高い免疫治療薬の創薬標的として期待されている分子である.

本章では, 炎症性皮膚疾患の治療薬として T_{EM} 細胞を標的とした創薬研究を実現するために, ハプテン誘発 ACD モデル動物としてオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し, 本モデル動物の有用性を検証した. ACD においてはインターフェロン (IFN; interferon) - γ を産生する CD8 T 細胞が病態発症に重要であるが [11,20,21], ACD モデルラットにおいて, Kv1.3 を発現する CD8 T 細胞が病変部皮膚に浸潤していること, Kv1.3 阻害剤の投与により病態発症が抑制されることがこれまでに報告されている [22,23]. これらの知見は, ACD モデルラットにおいて Kv1.3 機能をもつ T_{EM} 細胞が病因および病態に寄与していることを示唆している. しかしながら, 炎症組織中に浸潤する T 細胞を詳細に解析し, T_{EM} 細胞の機能的な関与を直接的に示した報告はない. 本研究では, オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおいて病変部皮膚に浸潤する T 細胞を単離して *ex vivo* 解析を実施することにより, Kv1.3 の機能をもつ T_{EM} 細胞の関与についてさらに詳細に調べた.

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

実験には6-9週齢の雌性Lewisラット（日本チャールズリバー、横浜）を使用した。動物は、温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ の環境下で飼育し、固形試料および水道水を自由摂取させ、1週間以上予備飼育した後、実験に使用した。全ての動物実験は塩野義製薬株式会社の「動物実験委員会（IACUC; Institutional Animal Care and Use Committee）による動物実験の適正な実施の為の規定」に準拠して行った。

2. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルの作製

AOO (acetone:olive oil=4:1) に1%の濃度で溶解させたオキサゾロン (Sigma, St. Louis, MO, USA) 溶液を、剃毛したラットの腹部に300 μL 滴下し、感作した。7日後に、60 μL の0.3%オキサゾロン AOO 溶液を両耳に滴下し、オキサゾロン誘発耳介炎症モデルを作製した。

3. 化合物投与

既報の方法 [23] で合成した Kv1.3 阻害剤 PAP-1 を落花生油に溶解させ、オキサゾロン誘発の28, 20 および4時間前に100 mg/kg の用量で経口投与した。対照群には、同じ容量の落花生油を投与した。

4. 耳介厚の測定

オキサゾロン誘発の直前と6および24時間後に、ダイヤルシクネスゲージ (株式会社テックロック、長野、型式 SM-112) を用いて耳介の厚さを測定し、誘発前後の耳介厚の差を耳介腫脹として算出した。

5. 耳介組織中サイトカイン測定

オキサゾロン誘発6あるいは24時間後に、ラットを CO_2 チャンバー内に置き、安楽死させた。耳介組織を採取し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; phosphate buffered saline) 中で破碎後、遠心分離し、得られた上清中の IFN- γ 量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) にて測定した。

6. 耳介組織中の IFN- γ 産生細胞の検出

オキサゾロン誘発 24 時間後に、ラットを CO₂ チャンバー内に置き、安楽死させた。耳介組織を採取し、細かく切り刻んだ後、2.7 mg/mL コラゲナーゼ IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA), 1 mg/mL DNase I (Sigma), 0.25 mg/mL ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む RPMI 培地 (10 mM HEPES 含有, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) に懸濁し、37°C で 1 時間反応させた。100 μ m ストレイナー上でシリンジプランジャーを用いて組織をすりつぶし、通過画分を回収して単細胞浮遊液を得た。細胞培養培地 (1% ウシ胎児血清 (Equitech-Bio Inc., Keeville, TX, USA) およびペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies) を含む RPMI 培地) で洗浄後、 1×10^6 cells/mL の濃度になるように懸濁し、Leukocyte Activation Cocktail (BD Biosciences) を添加して 37°C で 4 時間反応させた。Stain Buffer (BD Biosciences) で洗浄後、蛍光標識抗ラット CD3 抗体 (クローン 1F4, BD Biosciences) で染色し、続いて BD Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) を用いて固定・膜透過処理後、蛍光標識抗ラット IFN- γ 抗体 (クローン DB-1, BD Biosciences) で細胞内染色した。得られた細胞を、FACS Aria (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析した。

7. 耳介細胞の培養

オキサゾロン誘発 24 時間後に耳介を採取し、既報の方法で耳介細胞浮遊液を調製した [24]。すなわち、耳介組織をピンセットを使って内側と表側の二枚のシートに引き裂き、真皮側を 1% トリプシン溶液 (Life Technologies) に浸した。37°C で 40 分反応後、耳介シートを氷上の 80% ウシ胎児血清 (HBSS (Life Technologies) で希釈) 中に置いた 100 μ m ストレイナー上に移して反応を停止させ、シリンジプランジャーを用いて細胞を押し出した。通過画分を回収して遠心し、細胞培養培地に懸濁した。

得られた耳介細胞を、3 μ g/mL の抗ラット CD3 抗体 (クローン G4.18, BD Biosciences) を固相化させた 96 穴平底プレートに 1 穴あたり 1×10^5 細胞となるように播種し、Figure 1-3, 1-4 に示す終濃度の薬物存在下で培養した。PAP-1 はジメチルスルホキシドに溶解させて 10 mM 溶液を調製、Psora-4 (5-(4-phenylbutoxy) psoralen), clotrimazole, Cyclosporin A は Sigma から購入し同様に 10 mM のジメチルスルホキシド溶液を調製、ShK (Stichodactyla helianthus K channel toxin) はペプチド研究所 (大阪) から購入し蒸留水で 10 μ M 水溶液を調製後、細胞培養培地で希釈して添加した。24 時間後の培養上清中の IFN- γ 量を ELISA (BD Biosciences) にて測定した。

8. 耳介細胞中の T 細胞ポピュレーション解析

7の方法で調製した耳介細胞の一部を取り、Stain Buffer で洗浄後、蛍光標識された抗ラット CD3 抗体、CD8a 抗体 (クローン OX-8, BD Biosciences), CD45RC 抗体 (クローン OX-22, BD Biosciences) で染色した。得られた細胞を、FACS Aria (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析した。

9. リンパ節細胞の培養

オキサゾロン誘発 24 時間後にリンパ節を採取し、100 μm ストレイナー上でシリンジプランジャーを用いてすりつぶし、通過画分を回収して細胞培養培地に懸濁した。同ラットの脾臓から同様に単細胞懸濁液を調製し、Pan T Cell MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて T 細胞を除去後、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ マイトマイシン C (ナカライテスク, 京都) 存在下で 37°C で 30 分反応させた。得られたリンパ節細胞とマイトマイシン C 処理脾臓細胞を、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ラット CD3 抗体 (クローン G4.18, BD Biosciences) を固相化させた 96 穴平底プレートに、それぞれ 1 穴あたり 1×10^5 細胞となるように播種し、図に示す終濃度の薬物存在下で培養した。24 時間後の培養上清中の IFN- γ 量を ELISA (BD Biosciences) にて測定した。

10. 統計学的解析

実験成績は、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は Welch's *t*-test を用いて行い、有意水準は 5% とした。

第3節 実験成績

1. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルの構築

Lweis ラットの腹部にオキサゾロンを塗布することにより感作処置を行い，7日後にオキサゾロンを耳介に塗布して炎症を惹起した．その結果，オキサゾロン誘発6および24時間後に，経時的な耳介腫脹が観察され (Figure 1-1A)，これに連動して耳介組織中の IFN- γ の産生増加も確認された (Figure 1-1B)．

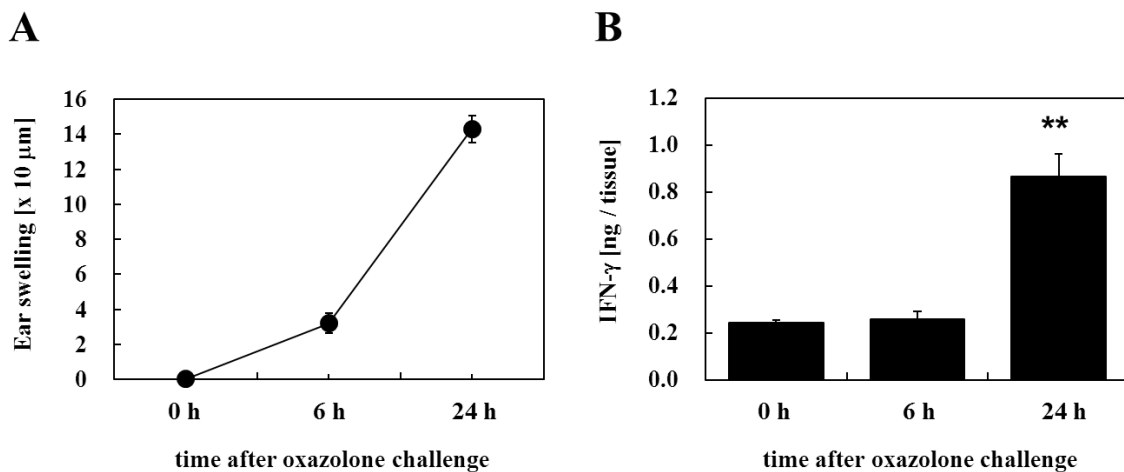


Figure 1-1 Time course of oxazolone-induced ear swelling and IFN- γ production in inflamed lesions. Lewis rats were sensitized with oxazolone on the abdomen 7 days before being challenged on both ears. Ear swelling responses (A) and IFN- γ production in the ear (B) were measured at 0, 6 and 24 hour after challenge. The values represent the mean \pm SEM for 5 rats. **P < 0.01 compared with the 0 hour group.

Ueyama *et al. Clin. Exp. Dermatol.* **2013**, 38, 899.

2. オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける Kv1.3 阻害剤の効果

本モデルにおいて Kv1.3 機能をもつ T_{EM} 細胞の寄与を確認するために，Kv1.3 阻害剤である PAP-1 の効果を評価した．オキサゾロン誘発の前日から PAP-1 を 100 mg/kg の用量で 3 回投与した後，炎症を惹起させたところ，対照群と比較して耳介腫脹の有意な抑制が確認された (Figure 1-2A)．このとき，耳介組織中の IFN- γ 産生も抑制されていた (Figure 1-2B)．さらに，耳介組織中に浸潤する IFN- γ 産生細胞についてフローサイトメトリー解析したところ，炎症惹起により増加した IFN- γ 産生細胞の割合が，PAP-1 投与により有意に抑制されていることも確認した (Figure 1-2C)．

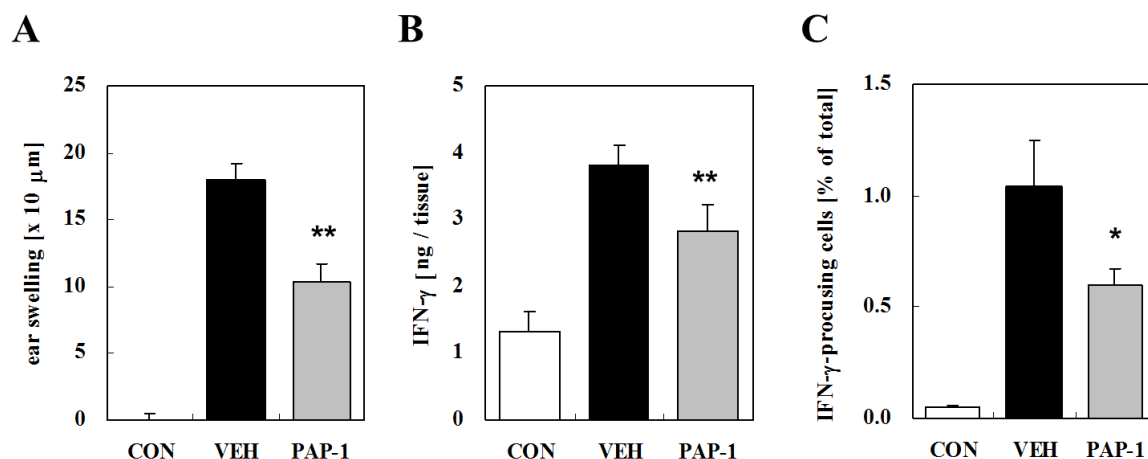


Figure 1-2 PAP-1 suppresses oxazolone-induced ear swelling by reducing IFN- γ production from infiltrating T cells. Lewis rats sensitized with oxazolone were treated with vehicle, peanut oil, or 100 mg/kg PAP-1 by oral gavage three times before challenge. Rats were challenged on both ears with AOO (control) or oxazolone (vehicle, PAP-1). Twenty four hours after challenge, ear swelling (A) and IFN- γ production in ears (B) were measured and the proportion of IFN- γ -producing T cells relative to the total number of cells was analyzed by flow cytometry (C). The values represent the mean \pm SEM for 6 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated controls.

Ueyama *et al. Clin. Exp. Dermatol.* **2013**, 38, 900.

3. 炎症皮膚組織中 T_{EM} 細胞の解析

次に、炎症皮膚組織において Kv1.3 機能をもつ T_{EM} 細胞の関与を直接的に調べるため、炎症惹起後の耳介組織をトリプシン処理することにより浸潤細胞を単離し、*in vitro* 機能解析を実施した。まず、単離した浸潤細胞についてフローサイトメトリー解析したところ、CD3 陽性 T 細胞は約 2.5% 含まれており、そのほぼ全てが CD45RC 陰性のメモリー T 細胞であった (Figure 1-3A)。この耳介細胞を抗 CD3 抗体存在下で一晩刺激培養すると、培養上清中に IFN- γ が速やかに産生された (Figure 1-3B)。このとき、Kv.13 阻害剤を作用させると、評価した 3 種類の薬剤 (PAP-1, Psora-4, ShK) いずれも、濃度依存的に有意な IFN- γ 産生抑制効果を示した。これに対し、IKCa1 阻害剤である Clotrimazole によっては、IFN- γ 産生は抑制されなかった。すなわち、本モデルの皮膚組織においては、Kv1.3 機能をもつ T_{EM} 細胞が、病態発症に重要な IFN- γ 産生に大きく寄与していることが示された。

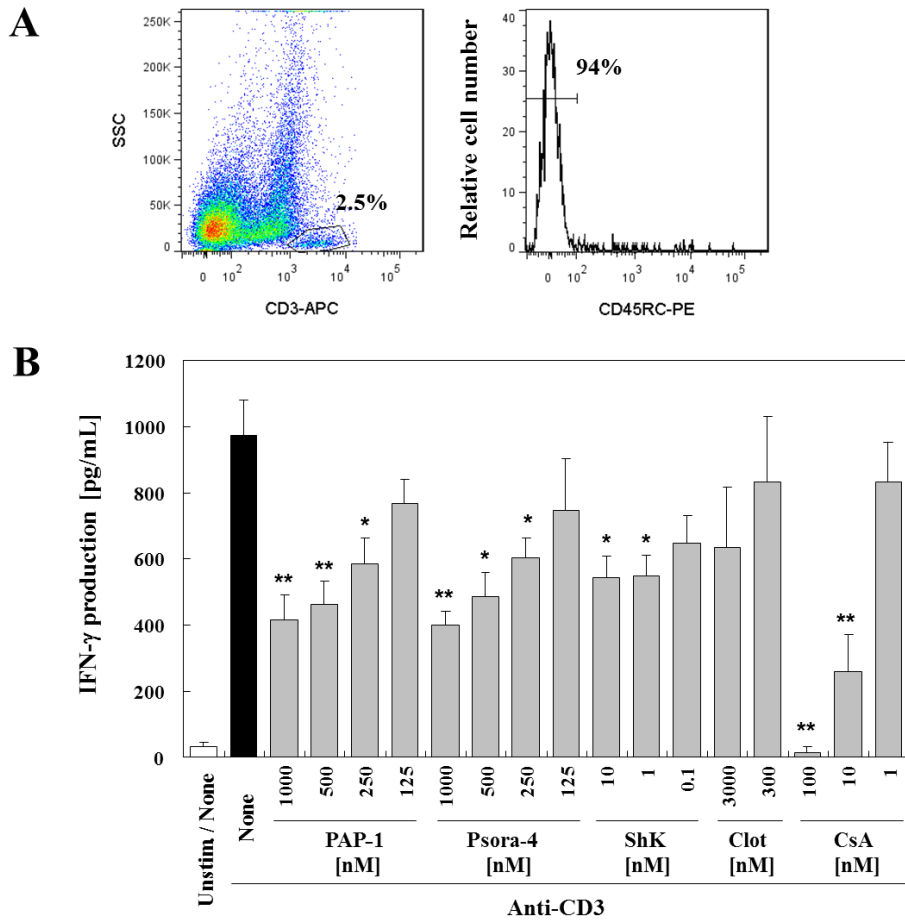


Figure 1-3 Effect of Kv1.3 blockers on IFN- γ production from T_{EM} cells isolated from inflamed ears. (A) T cell populations isolated from ears of a rat model of oxazolone-induced ACD. Rats were sensitized on day 0 and ear-challenged at day 7 with oxazolone. Ears were harvested 24 hour after challenge, pooled by group (n = 5 to 10), and single cell suspensions were prepared. Ear cells were stained with anti-CD3, CD8 and CD45RC antibodies and analyzed by flow cytometry. The results of one experiment are shown, which is representative of three independent experiments. (B) Ear cells prepared from oxazolone-induced ACD rats were stimulated with anti-CD3 with or without the indicated concentration (nM) of PAP-1, Psora-4, ShK, clotrimazole (Clot) or cyclosporin A (CsA). After 24 hours of culture, the levels of IFN- γ in cell supernatants were measured by ELISA. Data represent the mean \pm SEM from four to six experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 compared with the controls.

Ueyama *et al. Clin. Exp. Dermatol.* **2013**, 38, 901.

4. リンパ節中ナイーブ T / T_{CM} 細胞の解析

最後に、Kv1.3 阻害剤の創薬標的としての特性を検証する目的で、リンパ節中に含まれるナイーブ T / T_{CM} 細胞への作用を調べた。ACD ラットの耳介組織、および、所属リンパ節から単細胞浮遊液を調製し、抗 CD3 抗体刺激 IFN- γ 産生への各種薬剤の効果と比較評価した。その結果、Kv1.3 阻害剤である PAP-1、Psora-4 は、リンパ節細胞 (ナイーブ T / T_{CM} 細胞) には影響せず、耳介細胞 (T_{EM} 細胞) からの IFN- γ 産生のみ抑制した (Figure 1-4)。これに対し、IKCa1 阻害剤である Clotrimazole は、耳介細胞 (T_{EM} 細胞) への効果は弱く、リンパ節細胞 (ナイーブ T / T_{CM} 細胞) からの IFN- γ 産生を強く抑制した。一方、免疫抑制剤である Cyclosporin A は、いずれの T 細胞機能も強く抑制した。以上の結果から、Kv1.3 阻害剤は、炎症組織中の T_{EM} 細胞の機能のみを選択的に抑制することが示された。

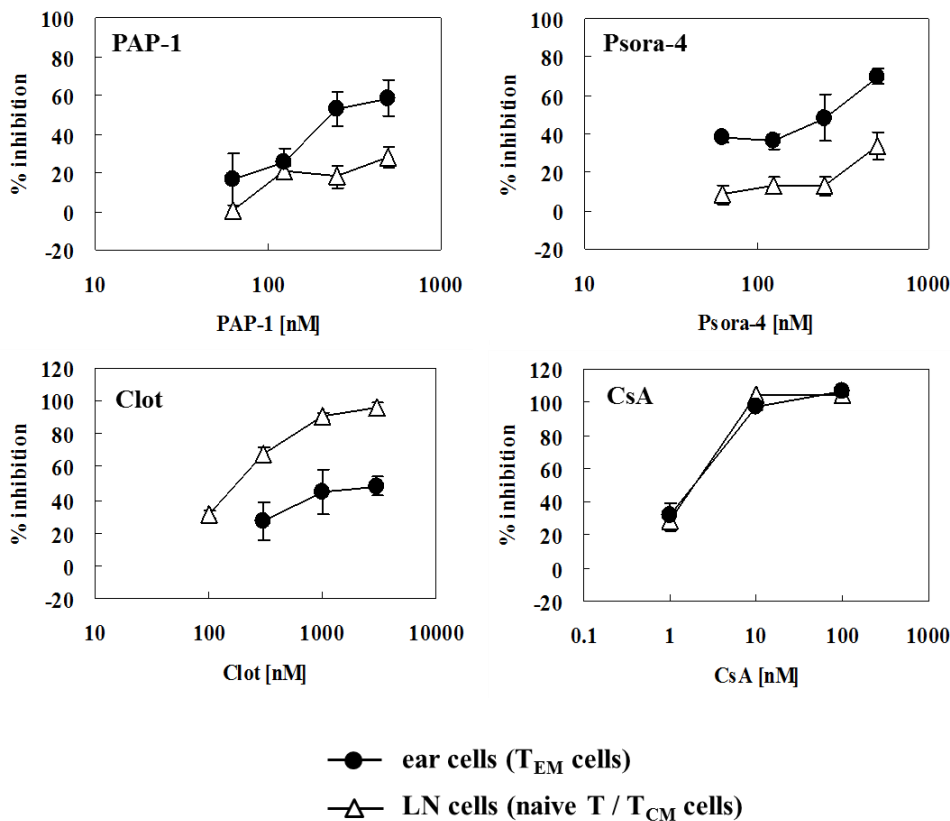


Figure 1-4 Kv1.3 blockers preferentially suppress IFN- γ production from T_{EM} cells in inflamed tissue. Ear cells and LN cells prepared from oxazolone-induced ACD rats were stimulated with anti-CD3 with or without PAP-1, Psora-4, clotrimazole (Clot) or cyclosporin A (CsA). After 24 hours of culture, the levels of IFN- γ in cell supernatants were measured by ELISA. The values represent the mean \pm SEM of triplicate wells.

Ueyama *et al. Clin. Exp. Dermatol.* **2013**, 38, 901.

第4節 考察

本章では、ACDモデル動物としてオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し、本モデルの病態に寄与する細胞として、Kv1.3の機能をもつT_{EM}細胞に着目し解析した。

ACDの病態においてはIFN- γ を産生するCD8 T細胞が重要であること [11,20,21]、ACDモデルラットの病態においてはKv1.3が寄与していること [22,23] が報告されている。まず最初に、オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおいても、これらが再現されているかを検証した。その結果、オキサゾロン誘発による耳介腫脹とともに、耳介組織中にIFN- γ の産生増加と、IFN- γ 産生細胞の浸潤が観察され (Figure 1-1)、また、Kv1.3阻害剤投与による病態発症の抑制も認められた (Figure 1-2A) ことから、既報通りのACDモデル動物が構築できていることが確認された。

次に、本モデル動物におけるKv1.3陽性T_{EM}細胞の関与について、さらに詳細な解析を実施した。まず、Kv1.3阻害剤を投与したラットの病態について詳しく調べたところ、耳介組織中のIFN- γ 産生と、浸潤するIFN- γ 産生細胞の割合が有意に抑制されていた (Figure 1-2B, C)。すなわち、Kv1.3阻害剤による病態抑制効果は、IFN- γ 産生T細胞の抑制によるものであることが示唆された。続いて、本モデルの炎症皮膚組織におけるKv1.3機能亢進T_{EM}細胞の関与を直接的に調べるため、炎症惹起後の耳介組織から浸潤細胞を単離し、*in vitro*機能解析を実施した。その結果、耳介に浸潤するT細胞はほぼ全てCD45RC陰性のメモリーT細胞であり、抗CD3抗体刺激によるIFN- γ 産生は、IKCa1阻害剤によっては抑制されず、Kv1.3阻害剤によって抑制された (Figure 1-3)。ACDの病態においてはIFN- γ がエフェクターサイトカインとして大きく寄与していることが抗IFN- γ 抗体投与やIFN- γ 受容体欠損動物を用いた実験から示されている [25, 26] ことから、以上の実験成績によって、本モデル動物の病態には、Kv1.3機能を持つT_{EM}細胞が重要であることが直接的に示されたものと考えられる。

T_{EM}細胞におけるKv1.3の機能については、ヒト自己免疫疾患患者由来、あるいはラット由来のT細胞を繰り返し抗原刺激して活性化させ、長期培養して得たT_{EM}細胞株でよく研究されている。これらT_{EM}細胞株においては、末梢血や二次リンパ組織由来のナイーブT/T_{CM}細胞に比べてKv1.3の発現や機能が亢進していること、TCR刺激による増殖応答がKv1.3阻害剤により強く抑制されることが報告されている [19,27-29]。また、*in vitro*誘導T細胞株だけでなく、*in vivo*炎症組織由来のプライマリーT細胞に関する知見としては、リウマチ患者の滑液より採取した病変部浸潤T細胞がCCR7陰性のT_{EM}細胞であり、Kv1.3の発現と機能亢進が認められること、Kv1.3阻害剤により増殖およびサイトカイン産生応答が強く抑制されることが示され

ている [30]. しかしながら、疾患モデル動物の炎症組織由来プライマリー T_{EM} 細胞における Kv1.3 の機能を直接的に示したのは本研究が初めてである.

オキサゾロン誘発ラット耳介炎症 ACD モデルにおいて炎症皮膚組織に浸潤している T 細胞は、ヒト自己免疫疾患患者の病変部 T 細胞と同様に、Kv1.3 機能が亢進している T_{EM} 細胞であった. これに対し、本モデルの所属リンパ節中に含まれるナイーブ T / T_{CM} 細胞においては、IKCa1 の機能が優位に働いており、Kv1.3 の寄与が小さいことを示した (Figure 1-4). 一方、免疫抑制剤である Cyclosporin A は、 T_{EM} 細胞に対してもナイーブ T / T_{CM} 細胞に対しても強い機能抑制効果を示した (Figure 1-4). 本研究において Cyclosporin A や IKCa1 阻害剤の *in vivo* 薬効評価は未検討であるが、Cyclosporin A と同様の作用メカニズムを持つ FK506 が OXA 誘発ラット耳介炎症モデルにおいて病態抑制効果を発揮することが報告されており [31], また、IKCa1 阻害剤も、少なくともリンパ節においては T 細胞機能を抑制することから、本モデルにおいて病態抑制効果を発揮する可能性は考えられる. しかしながら、これら薬剤とは異なり、Kv1.3 阻害剤は、炎症組織中の T_{EM} 細胞の機能のみを選択的に抑制することによって、免疫機能全般への影響は少なく、病態抑制効果を発揮し得ることが示された.

本章では、オキサゾロン誘発ラット耳介炎症 ACD モデルは、 T_{EM} 細胞を標的とした創薬研究の簡便な評価モデル動物として適していること、また、Kv1.3 阻害剤は、病態に寄与する T 細胞のみを選択的に抑制する安全性の高い創薬標的になり得ることを明らかにした.

第5節 小括

本章では、アレルギー性接触性皮膚炎モデルとしてオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し、病態に寄与する T 細胞について詳細に解析し、次の知見を得た。

1. 本モデルの病変部皮膚において Kv1.3 機能をもつ T_{EM} 細胞が浸潤し、病態発症に重要な IFN- γ 産生に大きく寄与していることが示された。
2. Kv1.3 阻害剤は、T 細胞機能全般を抑制する免疫抑制剤とは異なり、炎症組織中の病態に寄与する T_{EM} 細胞機能のみを選択的に抑制する安全性の高い治療薬となり得る可能性が示された。

第2章 イミキモド誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

第1節 緒言

特に欧米において発症者が非常に多い皮膚疾患として乾癬がある。表皮の細胞増殖亢進と分化不全を特徴とする慢性の炎症性皮膚疾患であり、典型的な症状として、皮膚表面にわずかに盛上がった境界明瞭な赤い発疹（紅斑）ができ、その表面に乾燥した白銀色の厚い角質が付着し（鱗屑）、ポロポロとはがれ落ちる（落屑）[32]。乾癬の根本的な原因は未だ不明であるが、近年、表皮の角化異常は二次的なもので、T細胞の機能異常、特にTh17経路の過剰な活性化が病態発症に大きく関与していることがわかっていっている[33-36]。Th17細胞は、1型ヘルパーT（Th1）細胞やTh2細胞とは異なるサブセットとして2005年に新たに見出されたCD4陽性のヘルパーT細胞サブセットである[37]。多発性硬化症やリウマチなどの自己免疫疾患への関与[37,38]や、感染防御における重要性[39]が報告されたが、乾癬においても、Th17細胞から産生されるインターロイキン（IL; interleukin）-17やIL-22などのサイトカインが表皮角化細胞に作用して炎症性ケモカインの産生や過増殖を引き起こすこと[40-42]や、乾癬患者の末梢血や病変部皮膚においてTh17細胞が増加しているなどの報告[43,44]が相次ぎ、Th17細胞の関与が注目されるようになった。Th17細胞の分化と増殖維持にはIL-23が重要であるが、IL-23の主な産生源としてTip-DC（TNF- α (tumor necrosis factor α) and iNOS (inducible nitric oxide synthetase) -producing DC）と呼ばれる樹状細胞（DC; dendritic cell）が乾癬患者の病変部皮膚に存在し、Th17経路の活性化に働くことも明らかにされてきた[34,45-47]。そして、近年、サイトカインを標的とした生物学的製剤による乾癬の治療研究が進み、臨床においてIL-12/23p40分子に対する抗体製剤（ウステキヌマブ）や、IL-17あるいはIL-17受容体に対する抗体製剤（イクセキズマブ、セクキヌマブ、プロダルマブなど）が著効を示したことから[36,48-50]、乾癬病態においてIL-23/Th17経路が確かに重要な役割を担っていることが証明された。

乾癬の治療薬開発研究においては、安価で簡便に作製可能なイミキモド誘発乾癬モデルマウスが、疾患モデル動物として汎用されている。イミキモド（IMQ; Imiquimod）は、日光角化症や表在型基底細胞癌の治療薬として臨床で使用されているToll様受容体（TLR; Toll-like receptor）7アゴニストであるが[51,52]、乾癬の既往歴のある患者にIMQを塗布すると乾癬を再発することが知られている[53-56]。マウスにおいてもIMQを塗布すると乾癬様の皮疹を発症することが2009年に報告され[57]、さらに、IL-17やIL-23の欠損マウスを用いた検討から、IMQ塗布により誘導される皮膚炎症はヒト病態と同様にIL-23/Th17経路を介していることが明らかとなり[57-59]、乾癬の疾患モデル動物としての有用性が示された。しかしながら、IMQ

の処置によって、どのようにして Th17 経路の活性化が誘導され病態発症につながるのか、そのメカニズムは未だ不明であった。

本章では、IMQ 誘発乾癬モデルにおいて、IMQ によって Th17 経路の誘導を介した乾癬様病態が惹起されるメカニズムを明らかにする目的で、TLR7 を発現する DC に着目して IMQ の作用を免疫学的に解析した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

実験には 8 週齢，雌性の野生型 C57BL/6 マウス（日本クレア，東京）および TLR7 欠損 C57BL/6 マウス（オリエンタルバイオ，東京）を使用した。動物は，温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ の環境下で飼育し，固形試料および水道水を自由摂取させ，1 週間以上予備飼育した後，実験に使用した。全ての動物実験は塩野義製薬株式会社 医薬研究センターの「動物実験委員会 (IACUC) による動物実験の適正な実施の為の規定」に準拠して行った。

2. IMQ 誘発乾癬モデルの作製

剃毛したマウスの背部皮膚に，市販の IMQ クリーム (5% ベセルナクリーム; 持田製薬，東京) 62.5 mg を，2 日に 1 回，6 日目まで塗布し，IMQ 誘発乾癬モデルを作製した。6 日目の最終誘発 4 時間後に，イソフルラン (エスカイン吸入麻酔液，ファイザー，東京) 麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた後，皮膚サンプルを採取した。対照群には剃毛のみを施したマウスを用いた。

3. 病理組織学的評価

皮膚組織を採取し，10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬，大阪) に浸して固定後，パラフィン包埋した。薄切し，脱パラフィン処理後，ヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色を行った。表皮の厚さを Image-Pro Plus 画像解析ソフト (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) を用いて測定し，測定値は 5 カ所の平均値とした。

4. 皮膚組織中サイトカイン測定

皮膚組織を摘出し，直径 8 mm の皮膚組織 3 つを Protease Inhibitor Cocktail (Life Technologies) を添加した T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Life Technologies) 中で破碎後，遠心分離し，得られた上清中のサイトカインを測定した。IL-17A, IL-22, IL-23 は ELISA キット (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定し，IL-12/23p40, IL-6, IL-1 β , TNF- α は Procarta Immunoassay Kit (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定した。

5. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

RNA を Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出し, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて逆転写の後, SYBER PreMix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を用いてリアルタイム PCR を実施した. PCR サイクルは, 95°C 10 分を 1 サイクルの後, 95°C 5 秒, 60°C 34 秒を 40 サイクル行った. GAPDH 遺伝子をハウスキーピング遺伝子とし, $\Delta\Delta Ct$ 法により各遺伝子の発現を相対定量した.

用いたプライマーセットは以下の通りである.

GAPDH	Forward primer	5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'
	Reverse primer	5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3'
IL-6	Forward primer	5'-CCA CTT CAC AAG TCG GAG GCT TA-3'
	Reverse primer	5'-GCA AGT GCA TCA TCG TTG TTC ATA C-3'
IL-1 β	Forward primer	5'-TCC AGG ATG AGG ACA TGA GCA C-3'
	Reverse primer	5'-GAA CGT CAC ACA CCA GCA GGT TA-3'
IFN- α	Forward primer	5'-GAG GAA ATA CTT CCA CAG GAT CAC TGT-3'
	Reverse primer	5'-GAC AGG GCT CTC CAG ACT TCT GCT CTG-3'
TNF- α	Forward primer	5'-TAT GGC CCA GAC CCT CAC A-3'
	Reverse primer	5'-GGA GTA GAC AAG GTA CAA CCC ATC-3'
iNOS	Forward primer	5'-TAG GCA GAG ATT GGA GGC CTT G-3'
	Reverse primer	5'-GGG TTG TTG CTG AAC TTC CAG TC-3'

6. 脾臓由来形質細胞様樹状細胞 (pDC; plasmacytoid DC) の調製

無処置マウスから脾臓を採取し, 2 mg/mL コラゲナーゼ (和光純薬) と 15 μ g/mL DNase I (Sigma) を含む RPMI 培地 (Life Technologies) (2% ウシ胎児血清 (Equitech-Bio Inc), ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies) 含有) 中で細かく切り刻んだ後, 37°C で 60 分反応させた. 70 μ m のセルストレイナーを通し, 赤血球の除去後, Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いたネガティブセレクションにより pDC を得た. フローサイトメトリー解析により, mPDCA-1 陽性の pDC は約 70% の純度であることを確認した.

7. 骨髄由来樹状細胞 (BMDC; bone marrow-derived DC) の誘導

無処置マウスから大腿骨および脛骨を採取し, 細胞培養 RPMI 培地 (10% ウシ胎児血清, 2.5

mM HEPES (Life Technologies), 5 mM グルタミン (Life Technologies), 55 μ M 2-メルカプトエタノール (Life Technologies), ペニシリン-ストレプトマイシン含有) を入れた注射器で骨髄細胞を押し出し、赤血球の除去後、70 μ m のセルストレイナーを通し、細胞浮遊液を得た。10 ng/mL GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; R&D system) と 1 ng/mL IL-4 (R&D system) を含む細胞培養 RPMI 培地に 2×10^6 cells/mL の濃度で懸濁し、100 mm デッシュに 15 mL ずつ播種して 37°C 10% CO₂ 下で培養した。培養開始 3, 6, 9 日目に、ピペッティングにより非接着細胞を回収し、遠心後、GM-CSF と IL-4 を含む新たな細胞培養 RPMI 培地に懸濁して再播種した。10 日目に非接着細胞を回収し、CD11c MACS ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いたポジティブセレクションにより BMDC を得た。CD11c 陽性の樹状細胞は 95% の純度であった。

8. フローサイトメトリー解析

脾臓由来 pDC と BMDC を Stain Buffer (BD Biosciences) に懸濁し、抗マウス CD16/32 抗体 (mouse BD Fc Block, クローン 2.4G2, BD Biosciences) を添加して 4°C で 5 分反応後、蛍光標識された以下の抗体を種々の組み合わせで添加し、さらに 4°C で 30 分反応させた。用いた蛍光標識抗体は以下の通りである。

以下の抗体は eBiosciences (San Diego, CA, USA) より購入した。

抗マウス PDCA-1 抗体 (クローン eBio927)

以下の抗体は BD Biosciences より購入した。

抗マウス CD11c 抗体 (クローン HL3)

抗マウス CD11b 抗体 (クローン M1/70)

抗マウス B220 抗体 (クローン RA3-6B2)

抗マウス Mac-3 抗体 (クローン M3/84)

抗マウス I-A/I-E 抗体 (クローン 2G9)

抗マウス CD86 抗体 (クローン GL1)

抗マウス CD40 抗体 (クローン 3/23)

Stain Buffer で洗浄後、FACS Aria (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析した。

9. 樹状細胞からのサイトカイン産生測定

脾臓由来 pDC と BMDC を細胞培養 RPMI 培地にて 3×10^5 cells/mL の濃度でプレートに播種し、1 μ g/mL のリポ多糖 (LPS; lipopolysaccharide, Sigma), 3 μ M の CpG (Invivogen, San Diego, CA, USA), 1 μ M あるいは 10 μ M の IMQ (Sequoia Research Products, Pangbourne, UK), 10 ng/mL の

IFN- α A (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA) 存在下あるいは非存在下で培養した。24 時間培養後, 培養上清中の IFN- α を ELISA キット (Life Technologies) を用いて測定し, IL-12/23p40, IL-23p19, IL-6, IL-1 β , TNF- α を Procarta Immunoassay Kit (Affimetrix) を用いて測定した。

10. 樹状細胞からの一酸化窒素 (NO; nitric oxide) 産生測定

BMDC を 10% ウシ胎児血清およびペニシリン-ストレプトマイシン含有 DMEM 培地 (Sigma) にて同様に LPS, IMQ, IFN- α A 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養した。NO 産生量として培養上清中の亜硝酸塩の濃度を Nitrate/Nitrite Colormetric Assay Kit (Cayman, Ann Arbor, MI, usA) を用いて測定し, 細胞ライセート中の iNOS 量を PathScan Total iNOS Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) を用いて測定した。

11. 統計学的解析

実験成績は, 平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は Welch's *t*-test を用いて行い, 有意水準は 5% とした。

第3節 実験成績

1. IMQ誘発乾癬モデルにおけるIL-23/Th17経路およびTLR7の関与

マウスの背部皮膚にIMQクリームを繰り返し塗布したところ、既報の通り [57]、皮膚の肥厚、紅斑、鱗屑を特徴とする乾癬様の症状が観察され、病理組織像からは表皮の肥厚と炎症性細胞浸潤も確認された (Figure 2-1A, B). 病変部の皮内サイトカインを測定した結果、Th17関連サイトカインIL-17、IL-22、IL-23の増加も確認された (Figure 2-1C). TLR7欠損マウスにおいては、これらの皮膚症状、組織学的変化、皮内Th17関連サイトカイン産生の全てが抑制されていた (Figure 2-1A-C).

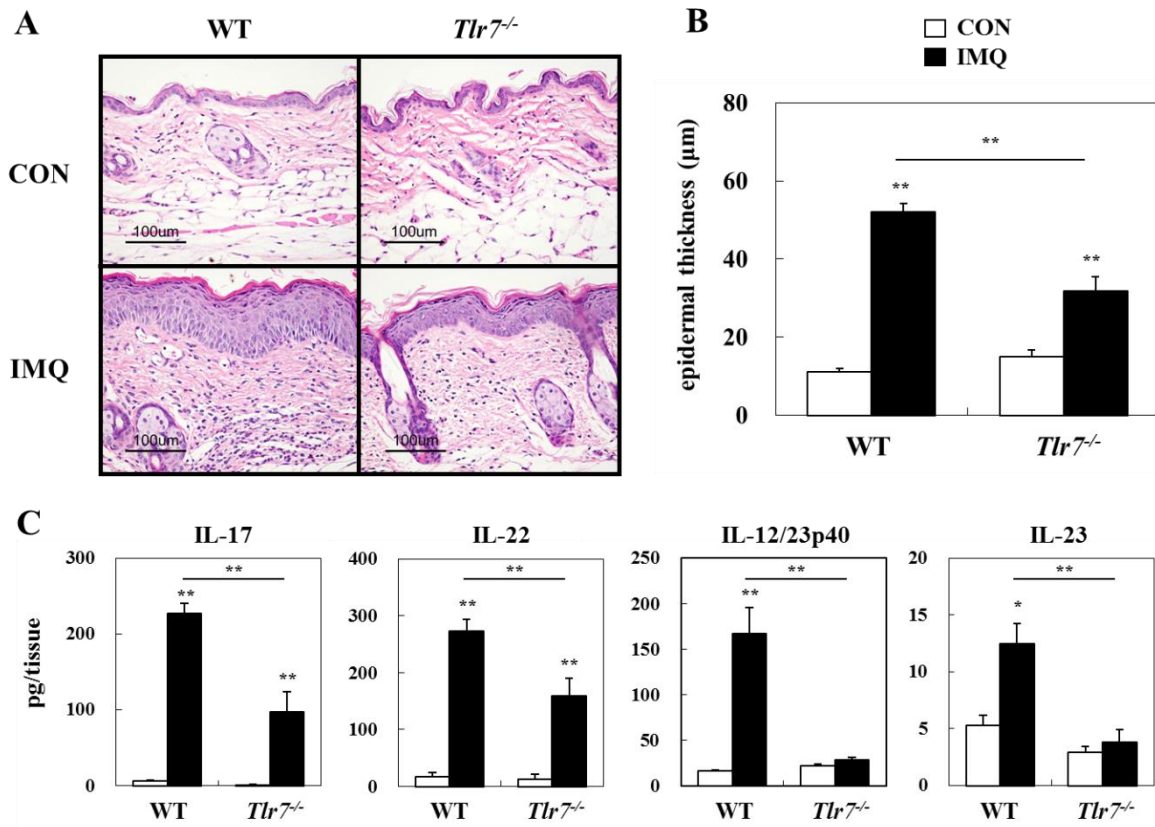


Figure 2-1 IMQ-induced skin inflammation and activation of IL-23/Th17 pathways are mediated via TLR7. Wild-type (WT) or *Tlr7*^{-/-} C57BL/6 mice were treated every second day with IMQ cream on the shaved back skin. On day 6, samples from the back skin were collected. (A) Skin sections were stained with H&E. (B) The epidermal thickness was measured. (C) Levels of IL-17A, IL-22, IL12/23p40 and IL-23 in homogenized skin tissue were measured using ELISA or a Procarta Immunoassay Kit. Values are shown as the mean \pm SEM for groups of four to five animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol.* **2014**, 41, 137.

続いて, DC が産生する他の炎症性メディエーターの発現について解析した結果を Figure 2-2 に示す. 形質細胞様樹状細胞 (pDC; plasmacytoid DC) からよく産生される IFN- α , Tip-DC 由来の炎症性メディエーターである TNF- α と iNOS, そして IL-23 とともに Th17 経路の誘導に関わるサイトカイン IL-6 と IL-1 β が, 本モデルの病変部皮膚において増加していることが確認された. また, これらの応答は全て, TLR7 欠損マウスでは認められなかった.

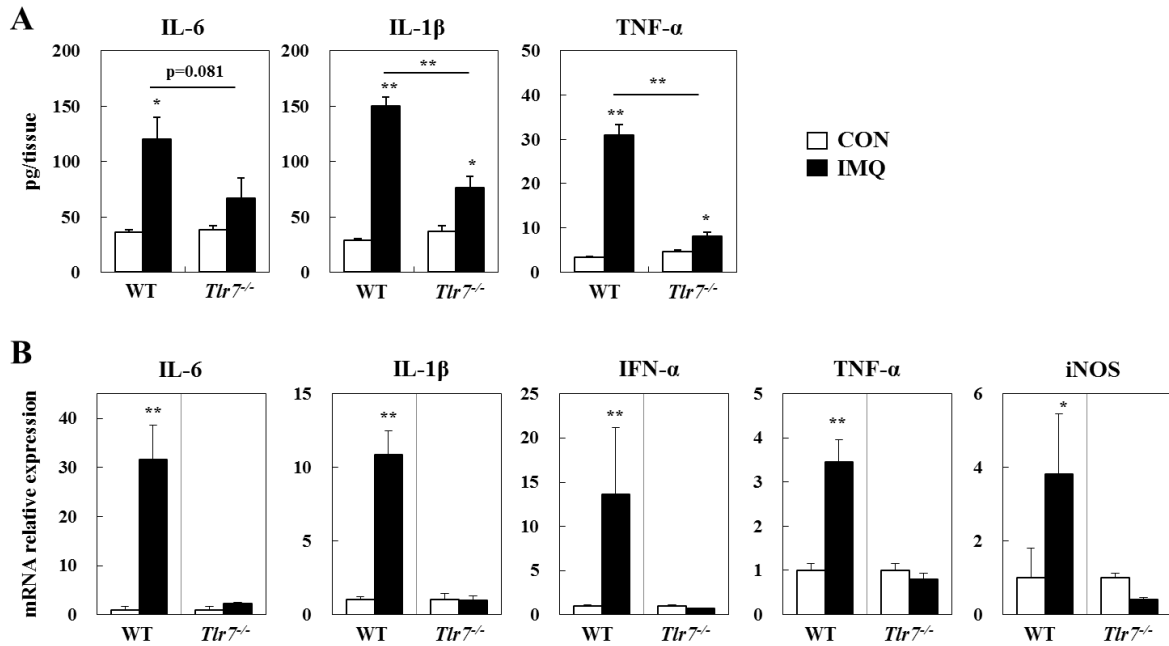


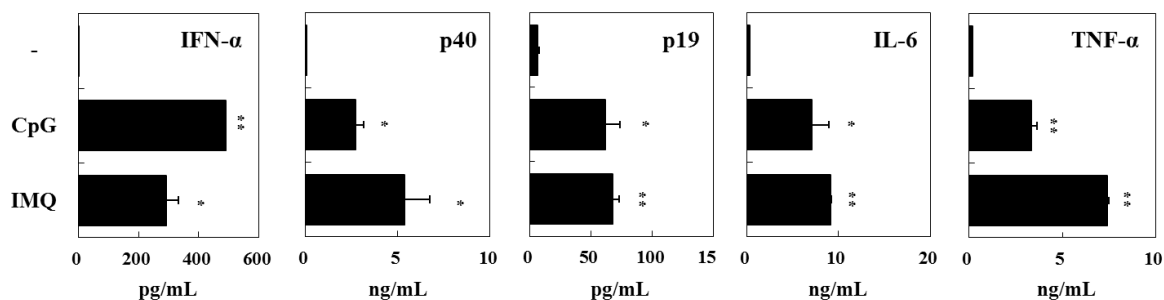
Figure 2-2 Expression of pDC- or Tip-DC-related inflammatory mediators and Th17-inducing cytokines in IMQ-treated skin of wild-type or Tlr7^{-/-} mice. IMQ was applied every second day to wild-type or Tlr7^{-/-} mice. After 6 days, (A) protein levels and (B) mRNA levels of IL-6 and IL-1 β (Th17-inducing cytokines), IFN- α (pDC-related cytokine), TNF- α and iNOS (Tip-DC-related inflammatory mediators) in the skin homogenates were measured. Values represent the mean \pm SEM for groups of four to five animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol.* **2014**, 41, 138.

2. pDC に対する IMQ の作用解析

マウスの脾臓から pDC を調製し、pDC に対する IMQ の作用を *in vitro* にて解析した結果を Figure 2-3 に示す。IMQ 刺激によって pDC から IFN- α の産生誘導が確認された。さらに、IL-23, IL-6, TNF- α 産生も誘導された。一方、TLR7 欠損マウス由来 pDC においては、TLR9 アゴニストである CpG の応答性は野生型と同等であったのに対し、IMQ 刺激によるこれらサイトカインの産生誘導は認められなかった。

A Wild-type



B *Tlr7*^{-/-}

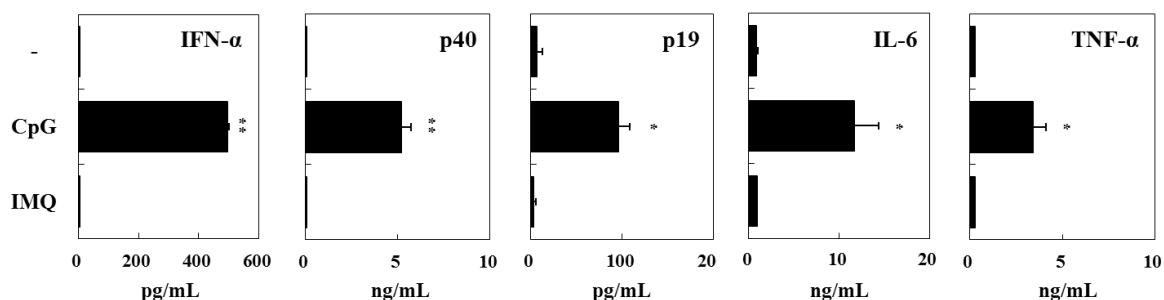


Figure 2-3 Effect of IMQ on cytokine production in splenic pDCs from wild-type and *Tlr7*^{-/-} mice. Splenic pDCs were prepared from wild-type (A) or *Tlr7*^{-/-} (B) mice and stimulated with CpG (3 μ M) or IMQ (1 μ M) for 24 hours. Supernatants were analyzed for the indicated cytokines using an ELISA or a Procarta Immunoassay Kit. Values represent the mean \pm SEM of duplicate wells. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol.* **2014**, 41, 139.

3. Tip-DC 様 BMDC の誘導

次に、Tip-DC に対する IMQ と IFN- α の作用を調べるために、マウスの骨髄から Tip-DC 様の細胞誘導を試みた。Xu らの報告によると、マウス骨髄細胞を *in vitro* にて GM-CSF と IL-4 存在下で培養すると、Tip-DC に類似した特徴をもつ細胞を誘導可能であることが示されている [60]。同様の手法で骨髄細胞を培養後、CD11c 陽性の BMDC を精製した。そのフェノタイプを解析した結果を Figure 2-4 に示す。細胞表面マーカーの発現は MHC (major histocompatibility complex) II^{high}, CD11b^{high}, B220⁻, CD86^{high}, MAC-3⁺であった。また、高い TNF- α および NO / iNOS 産生能も有していた。すなわち、既報の通り、Tip-DC に類似した特徴をもつ BMDC を誘導できたことが確認された。

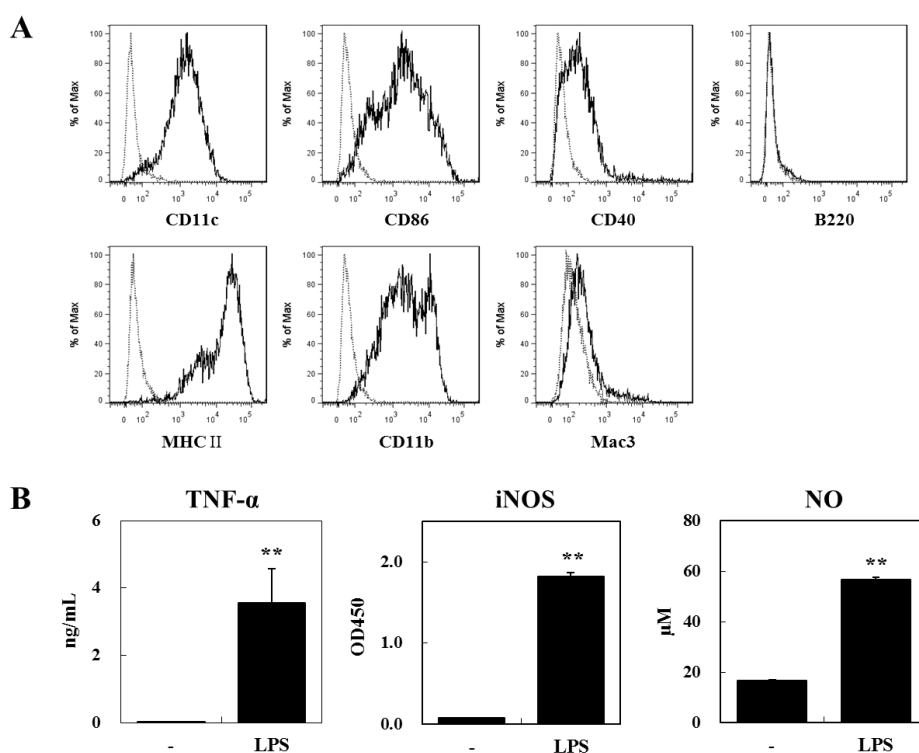
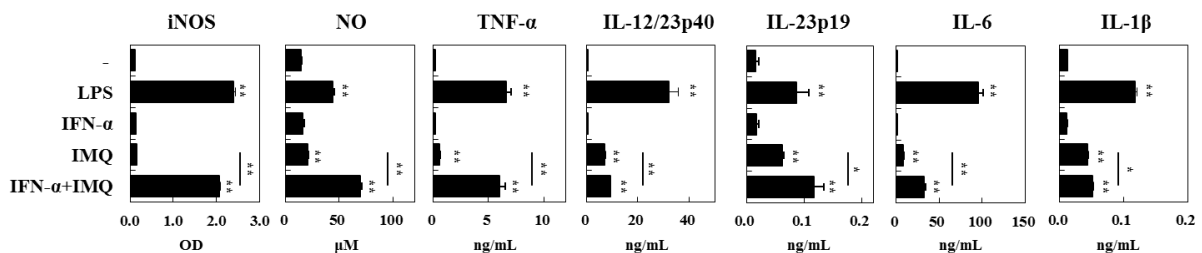


Figure 2-4 Tip-like DC features on GM-CSF/IL-4 cultured BMDCs. (A) BM-derived DCs cultured in the presence of GM-CSF/IL-4, as described in the Methods, were harvested and stained with monoclonal antibodies. Cells were gated on the CD11c⁺ population and expression of the indicated cell surface markers was determined using flow cytometry. The dotted line represents the background staining using an isotype control antibody. (B) Highly purified CD11c⁺ DCs were incubated with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 hours, and TNF- α and NO production in supernatants, and iNOS production in cell lysates, were measured. Values represent the mean \pm SEM of duplicate wells. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

4. Tip-DC 様 BMDC に対する IMQ および IFN- α の作用解析

誘導した Tip-DC 様 BMDC を用いて、IMQ および IFN- α の作用を解析した結果を Figure 2-5 に示す。IMQ を作用させると、弱いながらも NO/iNOS, TNF- α , IL-23, IL-6, IL-1 β の産生が誘導された。IFN- α は、単独で作用させてもいずれのサイトカイン産生も誘導しなかったが、IMQ と共刺激させると劇的な相乗作用がもたらされ、NO/iNOS, TNF- α , IL-23, IL-6, IL-1 β はいずれも、IMQ 単独に比べて強い産生亢進が認められた。これらの応答は全て TLR7 欠損 BMDC ではほとんど認められなかった。

A Wild-type



B *Tlr7*^{-/-}

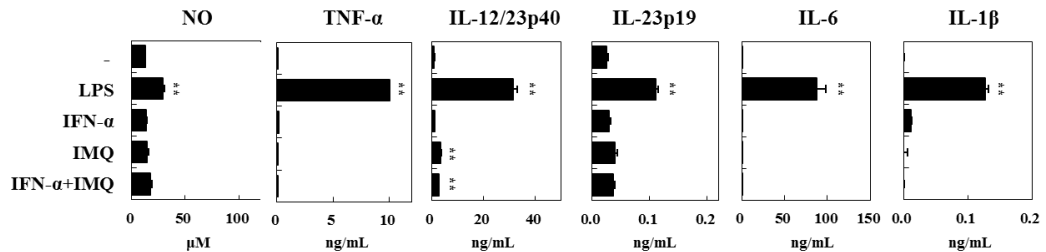


Figure 2-5 Synergistic effect of IMQ and IFN- α on production of TNF- α , iNOS and Th17-inducing cytokines from BMDCs. Purified BMDCs derived from wild-type (A) or *Tlr7*^{-/-} (B) mice were stimulated with LPS (1 μ g/mL), IFN- α (10 ng/mL) and IMQ (10 μ M). After 24 hours, iNOS production in cell lysates, and production of NO and the indicated cytokines in supernatants, were measured. Values represent mean \pm SEM of duplicate or triplicate wells. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol.* **2014**, 41, 141.

次に, Tip-DC様BMDCをIFN- α 単独で処理した後のTLR7発現を解析した結果をFigure 2-6Aに示す。IFN- α 刺激3時間後にはTLR7発現が上昇し, 24時間後にはさらに約7倍まで発現上昇した。すなわち, IMQとIFN- α の相乗効果は, IFN- α によってTLR7発現が誘導されたためと考えられた。さらに, IMQ誘発乾癬モデルマウスにおけるTLR7発現も調べた結果, Figure 2-6Bに示すように, IMQ処置によって病変部皮膚におけるTLR7発現の上昇が認められた。

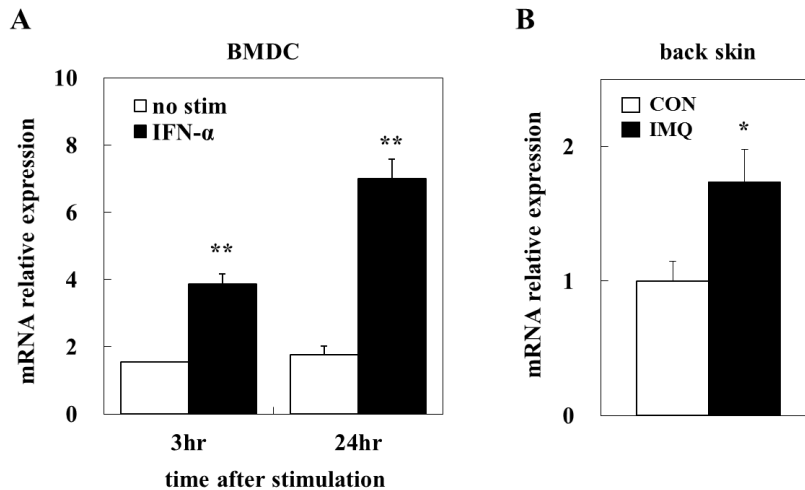


Figure 2-6 Upregulation of TLR7 expression *in vitro* and *in vivo*. (A) IFN- α -induced TLR7 expression in BMDCs. Purified BMDCs derived from wild-type mice were incubated with or without IFN- α (10 ng/mL). After 3 or 24 hours, total RNA was extracted and Tlr7 gene expression was analyzed by RT-PCR. Data represent mean \pm SEM of triplicate wells. ** $p < 0.01$. (B) TLR7 upregulation in the IMQ-treated mouse skin. IMQ was applied every second day to wild-type mice. After 6 days, mRNA levels of TLR7 in the skin homogenates were measured. Values represent the mean \pm SEM for groups of four to five animals. * $p < 0.05$.

Ueyama *et al. J. Dermatol.* **2014**, 41, 141.

第4節 考察

IMQ による乾癬様病態の発症には IL-23/Th17 経路が重要であることが報告されている [57-59]. 本章で構築した IMQ 誘発乾癬モデルマウスにおいても, Th17 関連サイトカインの発現上昇が認められた (Figure 2-1). さらに, TLR7 欠損マウスにおいてはこれら Th17 関連サイトカインの発現上昇も皮膚症状も減弱していた (Figure 2-1) ことから, 本モデルにおいては, TLR7 活性化による IL-23/Th17 経路の活性化が乾癬様病態の発症をもたらしていることが示唆された.

これまでの研究報告から, ヒトの皮膚において TLR7 を発現する pDC が存在し, IMQ は最初にこの pDC に作用して I 型インターフェロンの産生を誘導することが示唆されている [53]. しかし, 乾癬における I 型インターフェロンの役割は不明であり, IL-23/Th17 経路を誘導するメカニズムは明らかとなっていない. 一方で, 近年, IL-23/Th17 経路の誘導において鍵となる細胞として, Tip-DC が IL-23 の主な産生源となり乾癬病態に深く関与していることが知られてきている [34,45-47]. IMQ 誘発乾癬モデルマウスにおいても, 病変部皮膚に pDC と IL-23 を産生する CD11c 陽性細胞が浸潤していることが報告されている [58,61,62]. 本研究において構築した IMQ 誘発乾癬モデルマウスにおいて, これら DC の存在を直接的には確認していないが, pDC から産生される IFN- α の発現上昇, および, Tip-DC 由来の炎症性メディエーターである TNF- α および iNOS の発現上昇が観察された (Figure 2-2) ことから, pDC と Tip-DC が病態に関与している可能性が示唆された. そこで, IMQ 塗布によって IL-23/Th17 経路が活性化され乾癬様病態が誘導されるメカニズムを解明するため, *in vitro* にて pDC と Tip-DC に対する IMQ の作用を解析した.

まず, 脾臓から pDC を調製し, IMQ の作用を解析した (Figure 2-3). その結果, IFN- α の産生が誘導され, また, TNF- α の明らかな産生も確認された. TNF- α は, 表皮角化細胞や種々の炎症性細胞に作用して様々な炎症反応を引き起こすが, Tip-DC の活性化と維持にも働く重要なサイトカインである. さらに興味深いことに, IMQ の作用によって pDC から, IL-6 とともに, IL-12/23p40 と IL-23p19 の産生誘導も認められた. IL-23 は Tip-DC から主に産生されることが知られていたが, 乾癬の病態が形成される初期の段階においては, pDC が最初に IL-23 を産生し, IL-6 とともに Th17 経路の誘導に働いている可能性が示唆された. さらに, IMQ 刺激によるこれら全ての応答は, TLR7 欠損マウス由来 pDC では消失していたことから, IMQ は TLR7 を介して pDC を活性化させ, IFN- α , IL-23, IL-6, TNF- α の産生を誘導することが示された.

pDC から産生される IFN- α が乾癬の病態発症に関与していることは報告されているが [63],

前述したように、その発症メカニズム、すなわち IL-23/Th17 経路を誘導するメカニズムについては、明らかとなっていない。そこで、次に、Tip-DC 様の特徴をもつ BMDC を誘導し (Figure 2-4), IMQ と IFN- α の作用を解析した (Figure 2-5)。その結果、IMQ 単独あるいは IFN- α 単独の作用によっては、サイトカイン産生応答は弱い、あるいは全く認められなかったが、IMQ と IFN- α を共刺激させると、TNF- α と iNOS、そして IL-23 を含む Th17 分化誘導サイトカインが強く産生された。すなわち、IMQ と IFN- α が相乗的に働いて Tip-DC を活性化させ、Th17 分化に働くサイトカインの産生を誘導する可能性が示された。そのメカニズムとして、IFN- α が Tip-DC 様 BMDC における TLR7 発現を誘導することを示し (Figure 2-6)、これにより IMQ の効果が増強されたと考えられた。

以上のように、本研究から得られた知見をもとに考えられる、IMQ による IL-23/Th17 経路の活性化メカニズムを Figure 2-7 に示した。

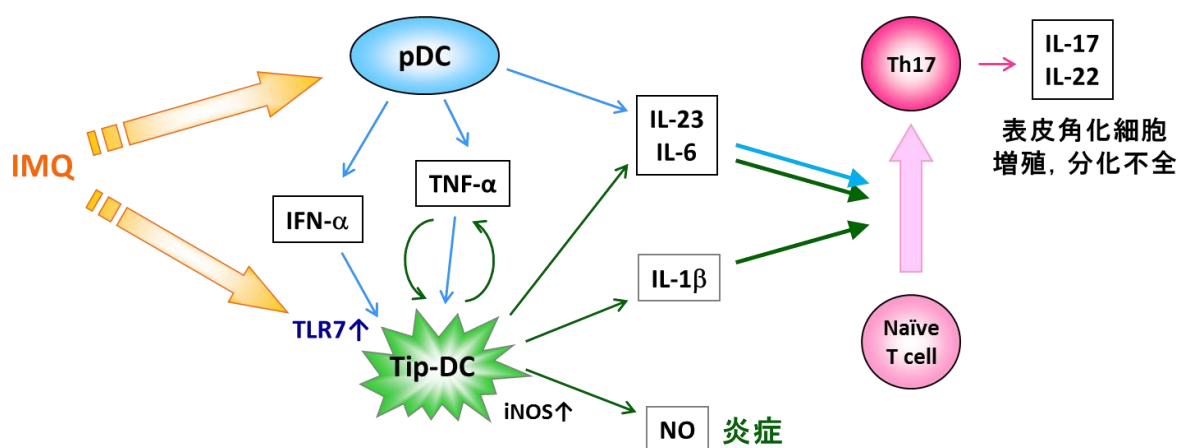


Figure 2-7 Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation

ところで、本研究で構築した IMQ 誘発乾癬モデルは、TLR7 欠損による完全な病態抑制は示さなかった。これは、IMQ 誘発に用いたベセルナクリームに含まれる基剤成分が影響し、TLR7 非依存的な応答を惹起したためと考えられる。ベセルナクリームと同じ組成を有する Aldara を用いて IMQ 誘発乾癬モデルについて検討した最近の論文報告において、基剤クリームのみ処置で Aldara 処置と同等の皮膚炎症が惹起されることが示されている [64]。この報告においては、Aldara により誘発される病態は TLR7 にも I 型インターフェロンにも依存しないことが示されている。しかしながら、IMQ クリーム塗布によって TLR7 を介して pDC / IFN- α 経路が誘導されることを示す論文もいくつか報告されている [59,65]。おそらく、マウス系統や IMQ クリームの塗布量、誘発タイミング等の実験条件の違いによって、IMQ によって誘導され

る TLR7 を介した pDC / IFN- α 経路の寄与度が異なるのではないかと考えられる。本研究で構築した IMQ 誘発乾癬モデルにおいては、TLR7 欠損によって完全ではないが明らかな病態抑制が認められたことから、少なくとも部分的には、TLR7 を介した pDC / IFN- α 誘導に始まる IL-23/Th17 経路の活性化メカニズム (Figure 2-7) が働いている可能性があると考えられる。

ヒト乾癬患者の病変部皮膚においては、LL37 と呼ばれる陽イオン性の抗菌ペプチドが多量に存在していることが知られている [66]。LL37 は障害を受けた細胞から放出される自己 RNA と結合し、pDC 上の TLR7 を活性化して IFN- α の産生を誘導することが報告されている [66]。すなわち、自然発症するヒト乾癬病態においても、IMQ による TLR7 を介した pDC の活性化から引き起こされる IL-23/Th17 経路の誘導と同様のメカニズムが、LL37-自己 RNA 複合体がトリガーとなって働き、発症原因となっている可能性が考えられる。

本研究の成果から、未だ解明されていない部分の多い乾癬病態の研究において発症メカニズム解明につながるひとつの重要な知見を得ることができた。また、IMQ 誘発乾癬モデルマウスは、ヒト乾癬病態と同じ発症メカニズムを模倣している可能性が示され、新規創薬研究における評価モデル動物としての有用性を示すことができた。

第5節 小括

本章では、IMQ 誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズム解明を目的とし、本モデルの病態解析、ならびに、樹状細胞を用いた *in vitro* 解析を実施し、以下の知見を得た。

1. 本モデルにおいては、TLR7 活性化による IL-23/Th17 経路の活性化が乾癬様病態の発症をもたらしている可能性が示された。
2. 乾癬病態形成の初期段階においては、IMQ によって TLR7 を発現する pDC が活性化され、IFN- α と TNF- α が産生されるとともに、IL-23 や IL-6 も産生され、最初の Th17 経路の誘導に働いている可能性が示された。
3. pDC から産生される IFN- α は IMQ と相乗的に働いて Tip-DC を活性化し、IL-23 を含む Th17 分化誘導サイトカインや種々の炎症性サイトカインの産生をさらに誘導する可能性が示された。この相乗効果は、IFN- α が Tip-DC 上の TLR7 発現を誘導するためと考えられた。

第3章 K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

第1節 緒言

乾癬は、近年特に患者数の増加が著しい皮膚疾患のひとつである。患者の QOL を著しく低下させる疾患であり、根治が難しく、アンメット・メディカルニーズが高い。利便性が高く、安全かつ強い効果を発揮する新薬の開発が望まれており、新規治療薬の開発研究が活発に進められている。

乾癬の非臨床評価モデルとしては、ヒト乾癬病態に類似した特徴をもつモデル動物が数多く報告されているが、なかでも、安価で簡便に作製可能な IMQ 誘発乾癬モデルマウスが最もよく汎用されている。IMQ 誘発乾癬モデルマウスの病態には、ヒト乾癬患者と同様に IL-23/Th17 経路が重要であり [57-59]、第2章で示したようにその発症メカニズムもヒトと同じである可能性が示唆された。しかし、本モデルでは、IL-17 を産生する細胞として $\gamma\delta$ T 細胞の寄与が非常に大きいことが知られており [58,59]、この点がヒト乾癬病態と異なっている可能性がある。

IL-17 を産生する細胞として最初に同定されたのは CD4 陽性の Th17 細胞であり [37]、乾癬患者の末梢血や病変部皮膚において Th17 細胞の増加が報告されている [43,44]。しかし、その後の研究から、IL-17 を産生するのは CD4 陽性 Th17 細胞のみではなく、CD8 陽性の 17 型細胞障害性 T (Tc17; T cytotoxic 17) 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、3 型自然リンパ球 (ILC3; innate lymphoid cell 3) など、種々の細胞サブセットが IL-17 を産生し得ることが明らかとなり、これら全てが乾癬病態に関与していることが報告されている [67-71]。これらの知見から考えると、 $\gamma\delta$ T 細胞のみが IL-17 を産生し病態に大きく寄与している IMQ 誘発乾癬モデルは、IL-17 産生細胞を標的とした創薬研究には適していない可能性が考えられた。

そこで、よりヒト乾癬病態を模倣した疾患モデル動物を得るために、活性化型 Stat3 を恒常的に表皮に発現させたトランスジェニックマウスに着目した。乾癬は、表皮角化細胞の増殖抗進による著明な表皮の肥厚と炎症細胞の浸潤を特徴とし、表皮細胞と免疫細胞間のサイトカインネットワークの異常が病因のひとつとして指摘されている。表皮角化細胞における Stat3 の活性化はヒト乾癬患者病変部皮膚でも観察されており、ケラチン 5 (K5) プロモーター下で活性化型 Stat3 を表皮に発現させたトランスジェニックマウス (K5.Stat3C-Tg マウス) が創傷刺激や TPA 刺激によって乾癬様の皮疹を発症することが 2005 年に報告された [72]。本モデルマウスは、乾癬様の外的所見と病理学的所見を示すとともに、免疫学的観点においても、活性化 T 細胞の関与と IL-23/Th17 経路の重要性が示されており [72-75]、ヒト乾癬患者と類似した病態を有し

ていることが期待された。

そこで本章では、ケラチン 14 (K14) プロモーター下で活性型 Stat3 を発現させた K14.Stat3C-Tg マウスを作製して TPA 誘発乾癬モデルを構築し、どのような IL-17 産生細胞ポピュレーションが病態に寄与しているのかを詳細に解析した。

第2節 実験材料および方法

1. 実験動物

IMQ 誘発乾癬モデルの実験には、8 週齢、雌性の野生型 C57BL/6 マウス（日本チャールズリバー）を使用した。

K14.Stat3C トランスジェニック FVB/N マウスは塩野義製薬株式会社で作製した。導入遺伝子は、Figure. 3-1 に示すように、ヒト K14 プロモーター、ニワトリ β -アクチンのイントロン、恒常的に活性化される変異型の STAT3C、Flag タグ、および、ウサギ β -グロビンのポリ A シグナル配列を連結することにより構築した。K14 プロモーターは pG3Z-K14 ベクター (ATCC, Manassas, VA, USA) 由来のものを使用した。Stat3C は、Stat3 cDNA の Open Reading Frame 断片に、部位特異的変異導入 PCR により A661C と N663C の変異を導入して作製した。トランスジェニックマウスは、構築した DNA 断片を FVB/N マウス受精卵前核にマイクロインジェクションすることにより作出した。作出した動物は油日事業所で自家繁殖し、実験には、8-12 週齢、雌性のヘテロ K14.Stat3C トランスジェニックマウスを使用した。

動物は、温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ の SPF 環境下で飼育し、固形試料および水道水を自由摂取させ、医薬研究センターに輸送して 1 週間以上予備飼育した後、実験に使用した。全ての動物実験は塩野義製薬株式会社 医薬研究センターの「動物実験委員会 (IACUC) による動物実験の適正な実施の為の規定」に準拠して行った。



Figure 3-1 Generation of K14.Stat3C transgenic mice. Schematic diagram of the transgenic construct used to generate K14.Stat3C mice. Stat3C, a constitutively active form of Stat3 containing A661C and N663C mutations. AI, Chicken β -actin intron. pA, polyadenylation signal.

Ueyama *et al.* *J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 28.

2. IMQ 誘発乾癬モデルの作製

剃毛したマウスの背部皮膚に、市販の IMQ クリーム (5%ベセルナクリーム; 持田製薬) 62.5 mg を、2 日に 1 回、6 日目まで塗布し、IMQ 誘発乾癬モデルを作製した。6 日目の最終誘発 4 時間後に、イソフルラン (エスカイン吸入麻酔液, ファイザー) 麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた後、皮膚サンプルを採取した。対照群には剃毛のみを施したマウスを用いた。

3. ウェスタンブロット解析

無処置マウスの背部皮膚から表皮を採取し、Total Protein Extraction Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) と Tissue Lyser (Qiagen) を用いてタンパク成分を抽出した。タンパク量を揃えて、4～12%勾配の Bis-Tris ゲル (Thermo Scientific) を用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、ポリビニリデンジフルオライド膜に転写した。Blocking One (ナカライテスク) にて 1 時間、室温で反応することでブロッキングを行った後、Cell Signaling Technology (東京) より購入した以下の抗体を用いて 4°C、一晩にて一次抗体反応を行った。

ウサギ抗 DYKDDDDK Tag 抗体	1000 倍希釈
ウサギ抗 Stat3 抗体	2000 倍希釈
ウサギ抗 Phospho-Stat3 (Tyr705) 抗体	1000 倍希釈

TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20) で洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を 6000 倍希釈にて室温、1 時間にて二次抗体反応を行った。内部標準タンパク質 GAPDH の検出には、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology) を 40000 倍希釈にて 4°C、一晩にて抗体反応を行った。TBS-T で洗浄後、Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) を用いて発色させ、ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare) を用いて検出した。

4. 免疫組織染色

無処置マウスの足底から皮膚組織を採取し、マイルドホルム (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) で 4°C、一晩、浸漬固定した。エタノールによる脱水後、パラフィン包埋を行い、5 μm 厚の切片を作製した。脱パラフィン処理し、下記の通り抗体に応じた抗原賦活化処理の後、3% 過酸化水素水にて内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害し、Avidin/Biotin kit (Vector Laboratories, California, USA) を用いて内在性のビオチンを阻害した。5%あるいは 1.5%のヤギ血清にて室温、30 分のブロッキング処理後、室温、1 時間にて一次抗体反応を行った。用いた一次抗体と、対応する抗原賦活化処理およびブロッキング処理条件は、以下の通りである。

ウサギ抗 DYKDDDDK Tag 抗体 (Cell Signaling Technology)

抗原賦活化処理；	クエン酸緩衝液にてマイクロウェーブ処理, 5 分
ブロッキング処理；	1.5%ヤギ血清にて室温, 30 分
抗体希釈倍率；	1000 倍希釈

ウサギ抗 Phospho-Stat3 (Tyr705) 抗体 (Cell Signaling Technology)

抗原賦活化処理；	1 mM EDTA 溶液にて 90°C, 20 分
----------	---------------------------

ブロッキング処理； 1.5%ヤギ血清にて室温，30分

抗体希釈倍率； 400倍希釈

ウサギ抗 Phospho-Stat3 (Ser727) 抗体 (Cell Signaling Technology)

抗原賦活化処理； クエン酸緩衝液にて90℃，20分

ブロッキング処理； 5%ヤギ血清にて室温，30分

抗体希釈倍率； 50倍希釈

PBS で洗浄し，Vectastain Rabbit IgG Elite ABC HRP Kit (Vector Laboratories).を用いてビオチン標識抗ウサギ抗体 (GE Healthcare) を室温，1時間にて二次抗体反応を行った後，ABC reagent を室温，30分反応させた．洗浄後，DAB 基質 (Roche, Dubai, UAE) を用いて発色させた．対比染色にはメチルグリーンを用い，Entellan new (Merck, Darmstadt, Germany) にて封入後，透過顕微鏡にて撮像した．

5. K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルの作製

剃毛した K14.Stat3C マウスの臀部皮膚に，2 nmol TPA (Sigma) アセトン溶液 100 μ L を2日1回，12～14日目まで塗布し，K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルを作製した．最終誘発3時間後あるいは24時間後に，イソフルラン麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させた後，皮膚およびリンパ節を採取した．対照群には剃毛のみを施した K14.Stat3C マウスを用いた．

6. 抗体投与

TPA 誘発開始0, 4, 8, 12日目の K14.Stat3C マウスに，20 μ g の抗マウス IL-12/23p40 抗体 (クローン C17.8; BioLegend, San Diego, CA, USA) あるいはアイソタイプコントロール抗体 (ラット IgG2a κ ; BioLegend) を皮下投与した．

7. スコアリングによる外的所見の重症度評価

誘導された皮膚症状の重症度を判定するために，臨床試験で標準的な指標として使用されている PASI (Psoriasis Area and Severity Index) を考慮したスコアリングシステムを構築した．紅斑，鱗屑，皮膚の硬さの3項目についてスコア0-4に分類し (0; 所見なし，1; 軽度，3; 中等度，4; 重度)，合計を全体臨床スコアとして算出した．

8. 病理組織学的評価

最終誘発3時間後に皮膚組織を採取し，10%中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬) に浸して固定後，パラフィン包埋した．薄切し，脱パラフィン処理後，ヘマトキシリン-エオジン (H&E)

染色を行った。

9. 皮膚組織中サイトカイン測定

最終誘発 3 時間後に皮膚組織を摘出し、直径 8 mm の皮膚組織 3 つを採取し、Protease Inhibitor Cocktail (Life Technologies) を添加した T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Life Technologies) 中で破碎後、遠心分離した。得られた上清中の IL-17A, IL-22, IL-23 を ELISA キット (R&D systems) を用いて測定した。

10. 皮膚組織からの単細胞浮遊液の調製

最終誘発 24 時間後に皮膚組織を採取し、細かく切り刻んだ後、2.7 mg/mL コラゲナーゼ IV (Worthington Biochemical), 1 mg/mL DNase I (Sigma), 0.25 mg/mL ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む無血清 RPMI 培地 (10 mM HEPES およびペニシリン-ストレプトマイシン含有, 全て Life Technologies) に懸濁し、37°C で 1 時間反応させた。100 μ m ストレイナー上でシリンジプランジャーを用いてすりつぶし、通過画分を回収して細胞培養 RPMI 培地 (10% ウシ胎児血清 (Equitech-Bio Inc), 55 μ M 2-メルカプトエタノール (Life Technologies), ペニシリン-ストレプトマイシン含有) で洗浄し、単細胞浮遊液を得た。

11. リンパ節からの単細胞浮遊液の調製

最終誘発 24 時間後に鼠蹊リンパ節を採取し、100 μ m ストレイナー上でシリンジプランジャーを用いてすりつぶし、通過画分を回収して細胞培養 RPMI 培地に懸濁し、単細胞浮遊液を得た。

12. フローサイトメトリー解析

皮膚細胞あるいはリンパ節細胞を、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) + IOM (Ionomycin) 刺激の場合は Leukocyte Activation Cocktail (BD Biosciences) 存在下で 37°C で 4-6 時間、IL-23 刺激の場合は 100 ng/mL マウス IL-23 (R&D Systems) および BD GolgiPlug (BD Biosciences) 存在下で 37°C で 6 時間反応させた。PBS で洗浄後、Fixable Viability Dye (eBioscience) を添加して 4°C で 30 分反応させた。続いて、Stain Buffer (BD Biosciences) で洗浄し、抗マウス CD16/32 抗体 (mouse BD Fc Block, クローン 2.4G2, BD Biosciences) を添加して 4°C で 5 分反応後、細胞表面分子 CD45, TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD8, NK1.1, CCR6 に対する抗体を種々の組み合わせで添加し、さらに 4°C で 30 分反応させた。Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences) を用いて固定・

膜透過処理後，細胞内あるいは核内の CD4, IL-17, IFN- γ , ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor gamma t) を染色した．用いた蛍光標識抗体は以下の通りである．

以下の抗体は BD Biosciences より購入した．

- 抗マウス CD45 抗体 (クローン 30-F11)
- 抗マウス TCR $\gamma\delta$ 抗体 (クローン GL3)
- 抗マウス CD4 抗体 (クローン RM4-5)
- 抗マウス CD8 抗体 (クローン 53-6.7)
- 抗マウス NK1.1 抗体 (クローン PK136)
- 抗マウス CCR6 抗体 (クローン 140706)
- 抗マウス ROR γ t 抗体 (クローン Q31-378)

以下の抗体は BioLegend より購入した．

- 抗マウス TCR β 抗体 (クローン H57-597)
- 抗マウス IL-17 抗体 (クローン TC11-18H10)
- 抗マウス IFN- γ 抗体 (クローン XMG1.2)

得られた細胞を FACS Aria (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー解析した．

13. 統計学的解析

実験成績は，平均値 \pm 標準誤差で示した．有意差検定は Student's t-test を用いて行い，有意水準は 5%とした．

第3節 実験成績

1. IMQ 誘発乾癬モデルにおける IL-17 産生細胞の解析

IMQ 誘発乾癬モデルマウスを作製後、皮膚組織から単細胞浮遊液を調製し、PMA+IOM 刺激後、細胞内 IL-17 を染色してフローサイトメトリー解析した結果を Figure 3-2 に示す。CD45 陽性の生細胞に解析ゲートを設定し、IL-17 産生細胞の割合を算出したところ、IMQ 誘発による IL-17 産生細胞の増加が確認できた。IL-17 産生細胞サブセットを同定するために、種々の細胞表面マーカーと多重染色して解析した結果、IMQ 誘発によって増加した IL-17 産生細胞のほとんどが真皮 $\gamma\delta$ T 細胞 (中程度の TCR $\gamma\delta$ 発現細胞; TCR $\gamma\delta$ + mid) であった。

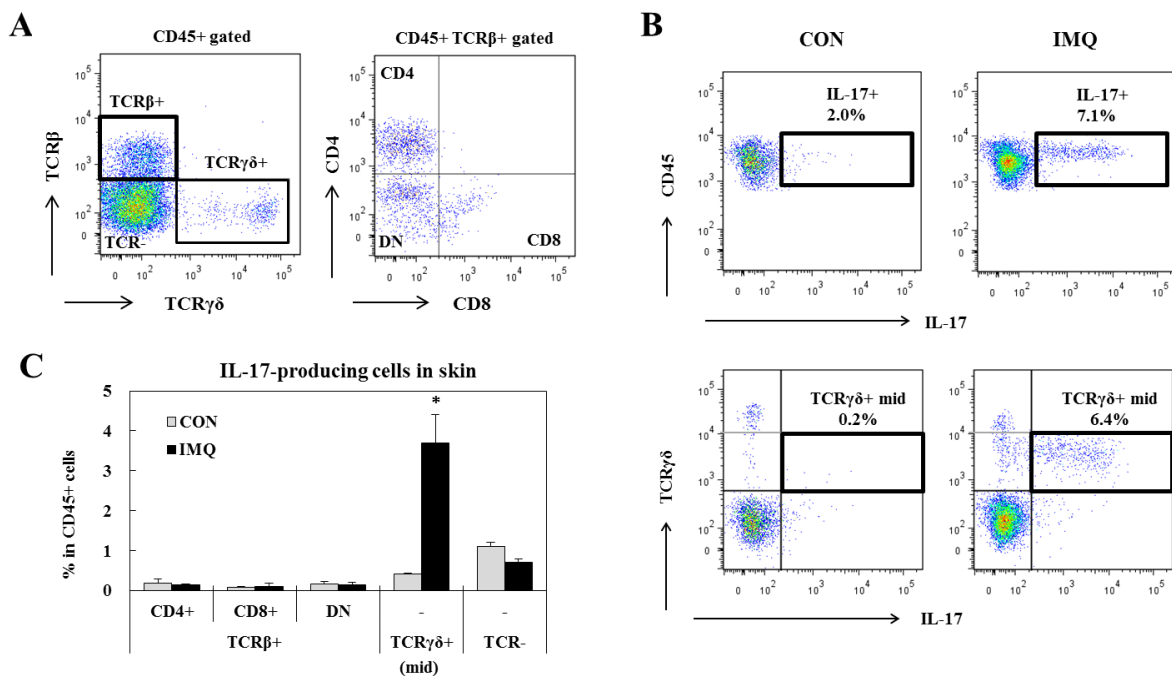


Figure 3-2 Dermal $\gamma\delta$ T cells are the predominant IL-17-producers in IMQ-induced skin inflammation. (A) Skin cell suspensions of non-treated C57BL/6 mice were prepared and stained by CD45, TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD4 and CD8. (B-C) Skin cell suspensions from IMQ-treated C57BL/6 mice were stimulated with PMA+Ionomycin and analyzed for intracellular IL-17 expression by flow cytometry. Cells were gated on live CD45+ leukocytes and percentages of each IL-17⁺ cells were determined. (B) Representative flow cytometric data of skin cells are shown. (C) Percentages of each IL-17⁺ cells in the lesional skin were analyzed from groups of four animals. Values represent the mean \pm SEM. * p < 0.05.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 34.

Supplementary data; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.10.007>

2. K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルの構築

次に、K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルの構築を試みた。まず、K14 プロモーター下で表皮角化細胞特異的に恒常的活性化型 Stat3 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。ウエスタンブロット解析および免疫組織染色により、作製した K14.Stat3C-Tg マウスの表皮基底膜層において Stat3 およびリン酸化 Stat3 の発現が亢進していることを確認した (Figure 3-3).

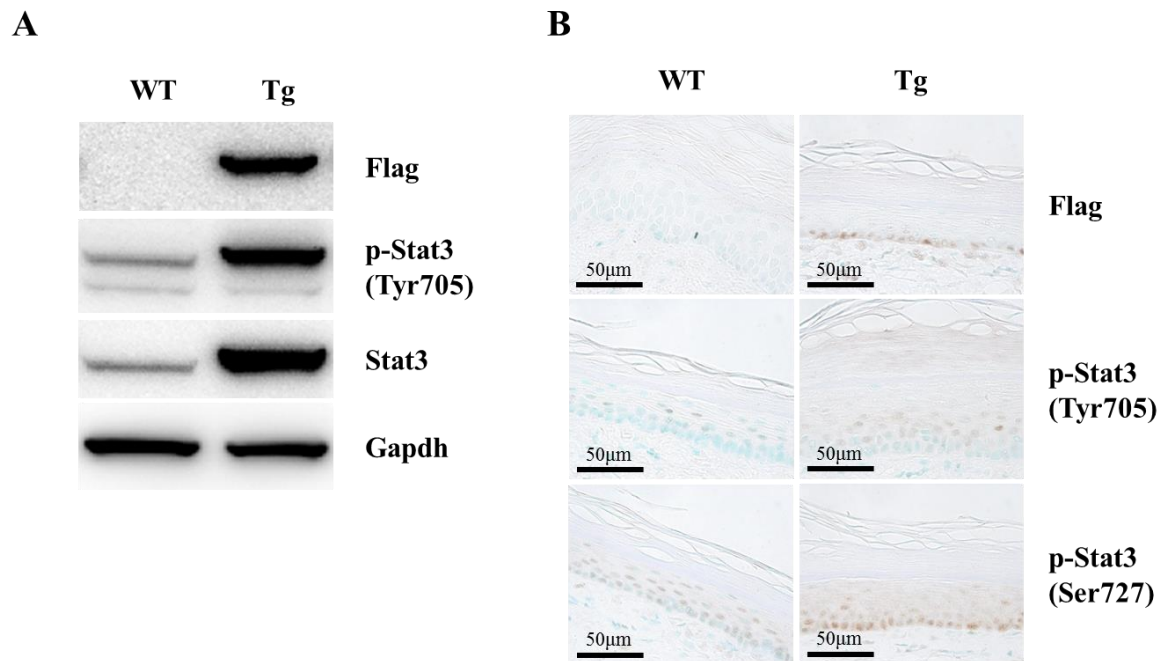


Figure 3-3 (A) Westernblot analysis of transgene expression in the epidermis from back skin of K14.Stat3C mice. (B) Immunohistochemical staining of transgene expression in foot pad skin from K14.Stat3C mice.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 28.

作製した K14.Stat3C-Tg マウスの剃毛した臀部皮膚に TPA を繰り返し塗布すると、皮膚の肥厚、紅斑、鱗屑を特徴とする乾癬様の症状が惹起された。その外的所見と病理組織像を Figure 3-4A,B に示す。病理組織像からは、表皮の肥厚、T 細胞や好中球などの炎症性細胞浸潤が観察された。さらに、病変部皮膚において、Th17 関連サイトカインの産生増加も確認された (Figure 3-4C)。病態における IL-23/Th17 経路の寄与を確認する目的で、抗 IL-12/23p40 抗体の評価を実施した結果を Figure 3-4D,E に示す。抗 IL-12/23p40 抗体の投与により、皮内 IL-17 産生抑制とともに、乾癬様皮膚症状の完全な抑制が確認された。

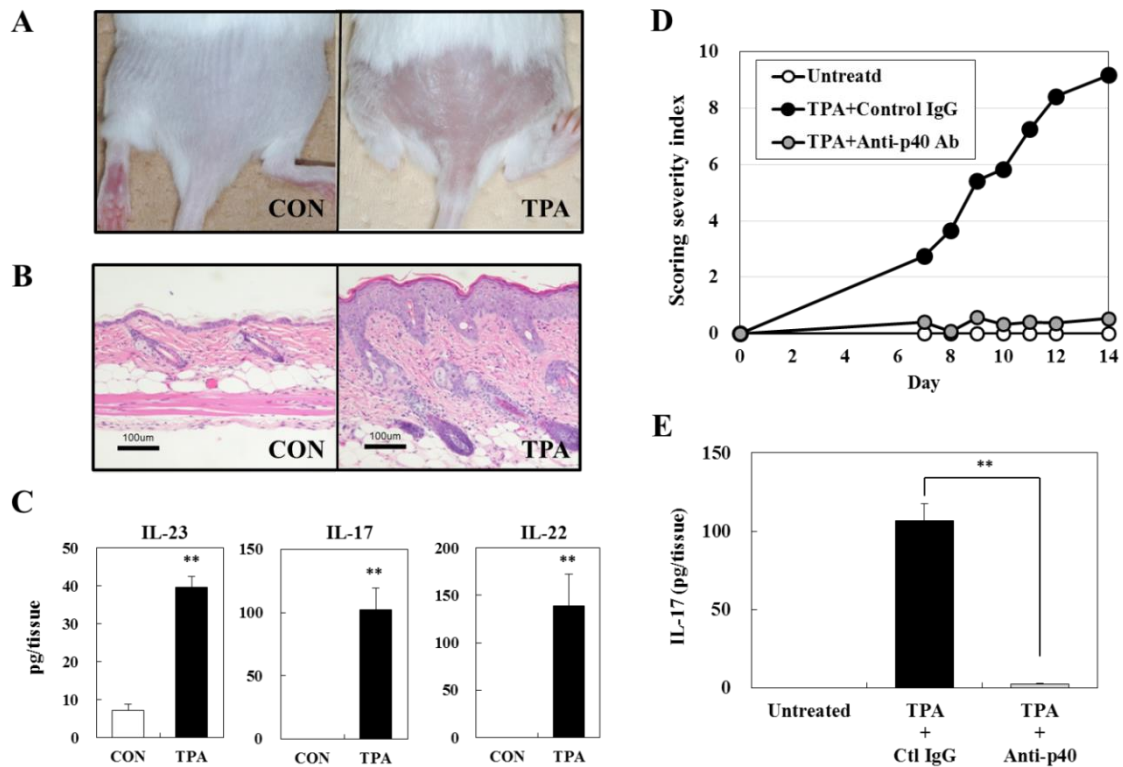


Figure 3-4 Psoriasis-like skin inflammation is induced in TPA-treated skin of K14.Stat3C mice via the IL-23/Th17 axis. The shaved back skin of K14.Stat3C mice was treated with TPA every second day over 12-14 consecutive days. (A) Representative macroscopic view. (B) Skin sections were stained with hematoxylin and eosin. (C) Levels of IL-23, IL-17A and IL-22 in homogenized skin tissues were measured by ELISA. (D-E) mAb against mouse IL-12/23p40 or isotype control IgG were administered. Scoring severity index (D) and levels of IL-17A in homogenized skin tissue measured by ELISA (E). Values are shown as the mean \pm SEM for groups of four to six animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 30.

3. K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおける IL-17 産生細胞の解析

K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおいて、病態に寄与する IL-17 産生細胞サブセットを同定するために、炎症皮膚組織から単細胞浮遊液を調製し、PMA+IOM 刺激による IL-17 産生細胞をフローサイトメトリー解析した結果を Figure 3-5 に示す。CD45 陽性の生細胞に解析ゲートを設定し、IL-17 産生細胞の割合を算出したところ、TPA 処置していない K14.Stat3C-Tg マウスと比較して、TPA 処置したマウス皮膚において、IL-17 産生細胞の有意な増加が確認できた。リンパ節においても、同様に IL-17 産生細胞の有意な増加が確認された。

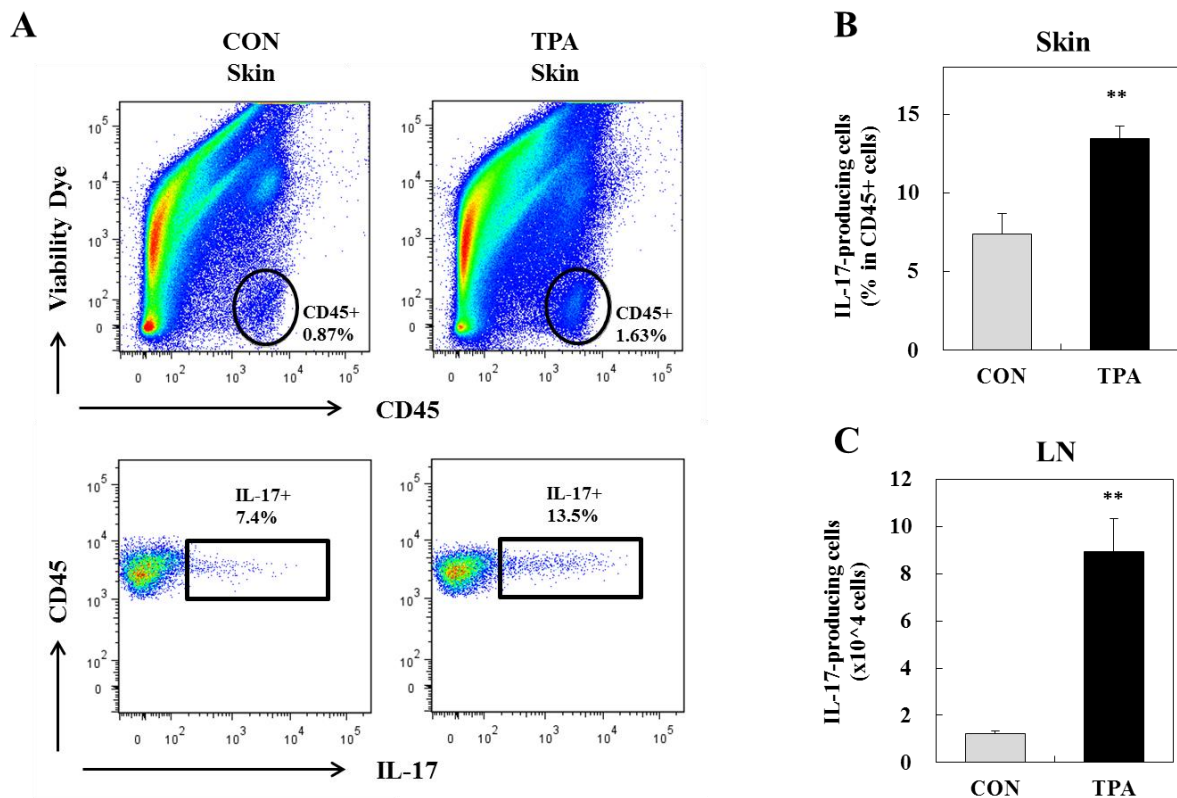


Figure 3-5 IL-17-producing cells are significantly increased in lesional skin and draining lymph nodes of TPA-treated mice. Cell suspensions prepared from the skin and the draining LNs of TPA-treated K14.Stat3C mice were stimulated with PMA+IOM and analyzed for intracellular IL-17 expression by flow cytometry. (A) Cells were gated on live CD45⁺ leukocytes and the percentage of whole IL-17⁺ cells was determined. Representative flow cytometric data of skin cells are shown. (B, C) Percentages or numbers of total IL-17⁺ cells in the skin and the draining LNs from groups of four animals were analyzed.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, *85*, 31.

続いて、IL-17 産生細胞サブセットを同定するために、種々の細胞表面マーカーと多重染色して解析した結果を Figure 3-6 に示す。TPA 誘発皮膚組織において、CD4 陽性 Th17 細胞、CD8 陽性 Tc17 細胞の増加が確認された。また、真皮に常在する $\gamma\delta$ T 細胞 (中程度の TCR $\gamma\delta$ 発現細胞; TCR $\gamma\delta$ + mid) も、TPA 処置による増加は認められないが、定常状態から PMA+IOM 刺激による IL-17 産生能を有していた。さらに、ILC を含むと考えられる TCR 陰性細胞からの IL-17 産生も観察された。さらに、TPA 誘発により病変部皮膚において増加するもうひとつの IL-17 産生細胞サブセットとして、CD4 陰性 CD8 陰性の DN $\alpha\beta$ T ($\alpha\beta$ -TCR⁺ double negative T) 細胞の存在が確認された。

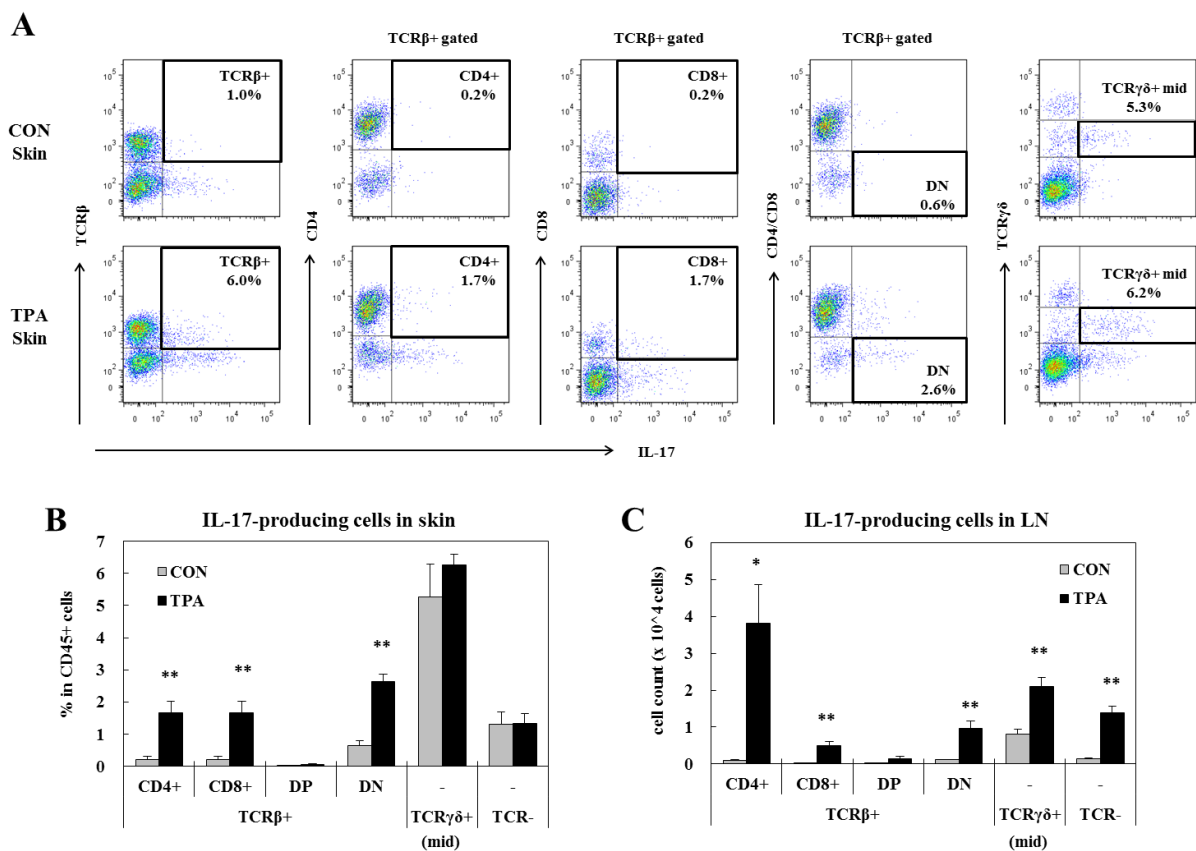


Figure 3-6 IL-17-producing T cell subsets involved in TPA-induced skin inflammation in K14.STAT3C mice are heterogeneous and DN $\alpha\beta$ T cells are also responsible for IL-17 production. To determine the source of IL-17 production, multi-color analysis in combination with antibodies for various T cell surface markers was performed. (A) Representative flow cytometric data of skin cells are shown. Percentages or numbers of each IL-17⁺ cell subset in the lesional skin (B) and the draining LNs (C) were analyzed from groups of four animals. Values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

4. IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞の解析

K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおいて同定された IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞について、詳細な解析を実施した結果を Figure 3-7 に示す。まず、DN $\alpha\beta$ T 細胞は無処置マウスの皮膚においても存在が確認され、その割合自体は、TPA 誘発による乾癬様病態の発症に伴って増加しなかった (Figure 3-7A)。病変部皮膚においては、DN $\alpha\beta$ T 細胞の約 30% が PMA+IOM 刺激により IL-17 を産生したが、IFN- γ を産生する細胞はほとんど検出されなかった (Figure 3-7B)。

CD4 陰性 CD8 陰性の T 細胞として、NK T 細胞 (natural killer T cell) や MAIT 細胞 (Mucosal associated invariant T cell) も IL-17 産生能をもつことが知られている。そこで、FVB/N 系統マウスにおいてこれらの細胞にみられる NK 細胞系マーカー NK1.1 の発現を調べた。その結果、IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞において NK1.1 陽性細胞はほとんど検出されなかった (Figure 3-7C)。すなわち、この IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞は NK T 細胞でも MAIT 細胞でもないことが示された。

続いて、ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor gamma t) と CCR6 の発現を調べた。TPA 誘発した病変部皮膚において、IL-17 産生細胞のほぼ全てが ROR γ t 陽性 (Figure 3-7D) および CCR6 陽性 (Figure 3-7E) であり、DN $\alpha\beta$ T 細胞ポピュレーション中にもこれら分子の陽性細胞が確認されたことから、IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞も ROR γ t と CCR6 を発現していることが示唆された。

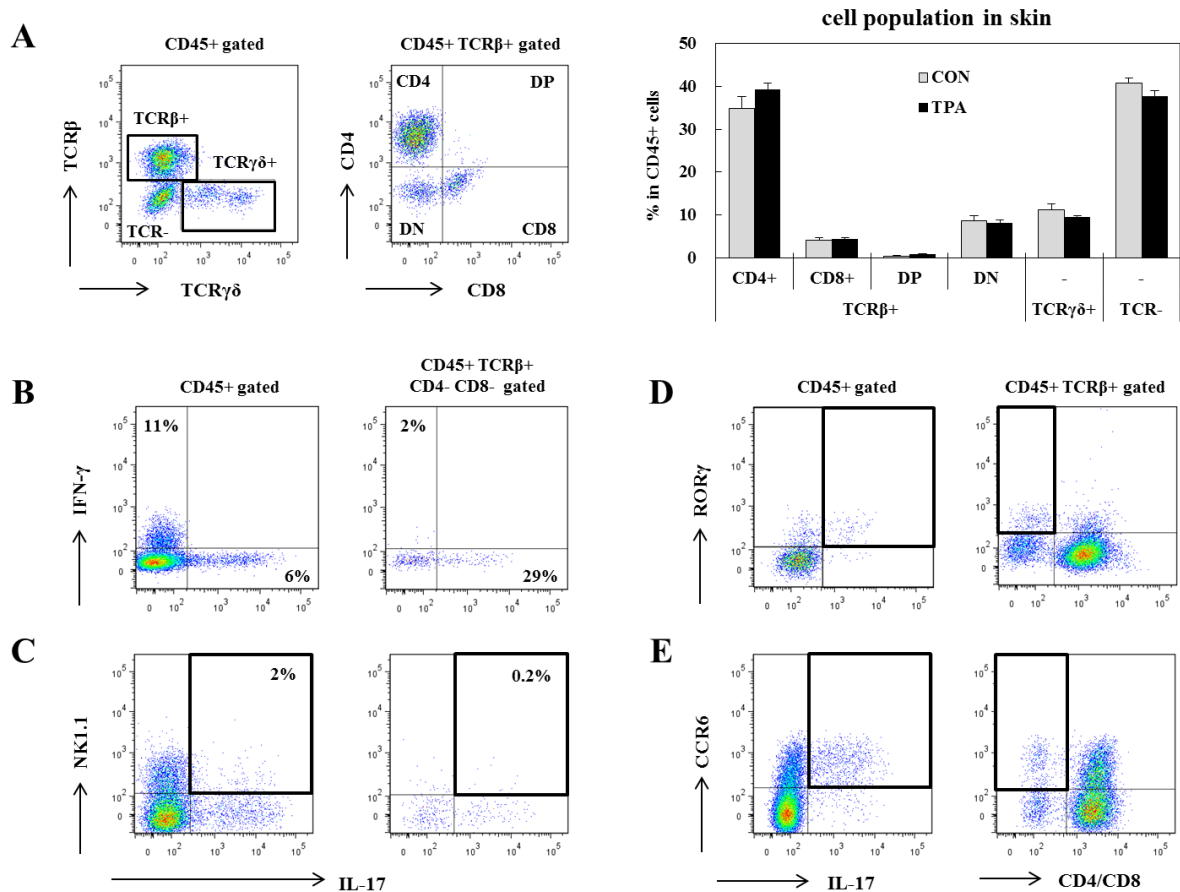


Figure 3-7 Characterization of IL-17-producing DN $\alpha\beta$ T cells in lesional skin. (A) Skin cell suspension of non-treated or TPA-treated K14.Stat3C mice were prepared for surface staining of CD45, TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD4 and CD8, and percentages of each cell population were analyzed. (B-E) Cell suspensions from TPA-induced skin lesions were stimulated with PMA+Ionomycin, and the expression of intracellular IFN- γ (B), cell surface NK1.1 (C), intranuclear ROR γ t (D) and cell surface CCR6 (E) were examined. Representative flow cytometric data are shown and the bars represent the mean \pm SEM for groups of four animals.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 32.

5. IL-23 に応答する IL-17 産生細胞の解析

最後に, 病変部皮膚に浸潤する IL-17 産生細胞の IL-23 応答性について調べた. K14.Stat3C-Tg マウスの皮膚および所属リンパ節から単離した細胞を IL-23 存在下で 6 時間刺激培養し, 同様にフローサイトメトリー解析した結果を Figure 3-6 に示す. TPA 処置したマウスの皮膚のみで, IL-23 に応答して IL-17 を産生する細胞が観察された (Figure 3-8A,B). 細胞サブセットを詳細に解析すると, PMA+IOM 刺激により IL-17 を産生した細胞サブセットの全てが, IL-23 にも応答して IL-17 を産生していた (Figure 3-8C). 真皮 $\gamma\delta$ T 細胞は, 無処置マウスにおいても PMA+IOM 刺激による IL-17 産生能を示したが, IL-23 に応答するのは病態発症したマウスにおいてのみであった. そして, IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞も, 他の IL-17 産生細胞と同様に IL-23 応答能をもつことが確認され, しかもその割合は Th17 細胞や Tc17 細胞よりも多かった.

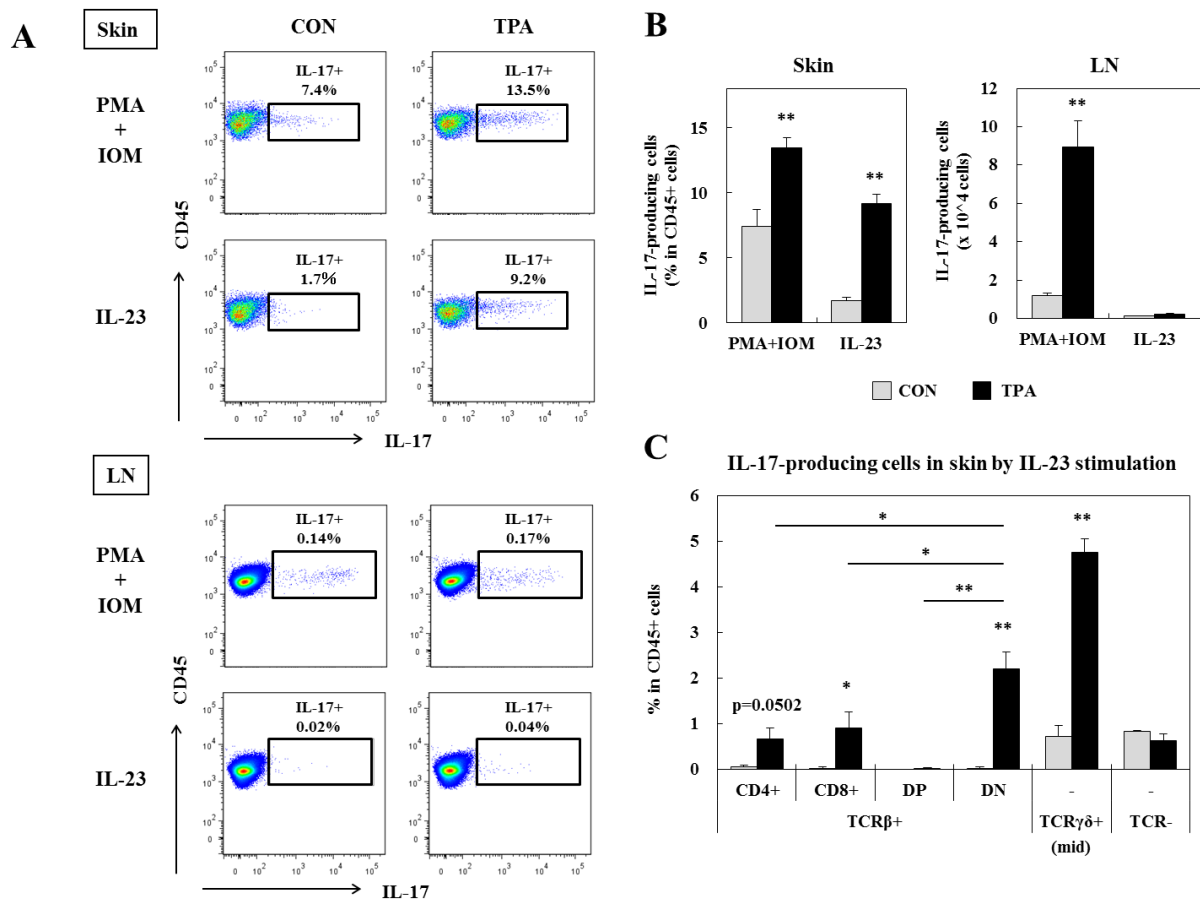


Figure 3-8 All IL-17 producers including DN $\alpha\beta$ T cells in TPA-induced skin lesions of K14.STAT3C mice respond to IL-23 stimulation. Cell suspensions prepared from the skin and the draining LNs of TPA-treated K14.Stat3C mice were stimulated with PMA+IOM or IL-23, and analyzed for intracellular IL-17 expression by flow cytometry. (A) Percentages of whole IL-17⁺ cells were determined. Representative flow cytometric data of skin cells are shown. (B) Percentages or numbers of total IL-17⁺ cells in the skin and the draining LNs from groups of four animals were analyzed. (C) Percentages of each IL-17⁺ cell subset following IL-23 stimulation were analyzed from groups of four animals. Values represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ueyama *et al. J. Dermatol. Sci.* **2016**, 85, 33.

第4節 考察

乾癬においては、Th17細胞、Tc17細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ILC3などの種々の細胞サブセットがIL-17を産生し、病態形成に関与していることが示唆されている [67-71]。しかし、乾癬の非臨床動物モデルとして汎用されているIMQ誘発乾癬モデルにおいては、主に真皮 $\gamma\delta$ T細胞のみがIL-17を産生しており、他の細胞サブセットの寄与が少ないことが知られている [49,50]。我々が構築したIMQ誘発乾癬モデルにおいても同様の現象が確認された (Figure 3-2)。すなわち、IMQ誘発乾癬モデルは、病態形成に関与する細胞サブセットがヒト乾癬病態とは異なっており、IL-17産生細胞を標的とした創薬研究には適していない可能性が考えられた。そこで本章では、よりヒト乾癬病態に類似した疾患モデル動物を得るために、活性型Stat3を恒常的に表皮に発現させたK14.Stat3C-Tgマウスを作製してTPA誘発乾癬モデルを構築し、病態に寄与するIL-17産生細胞ポピュレーションを詳細に解析した。

まず、既報のK5.Stat3C-Tgマウスと同様に [72-75]、作製したK14.Stat3C-Tgマウスの臀部皮膚にTPAを繰り返し塗布すると、皮膚の肥厚、紅斑、鱗屑を特徴とする乾癬様の症状が惹起された (Figure 3-4)。データは示していないが、WTマウスにTPAを処置した場合も皮膚炎症の惹起は認められたが、その程度は弱く、K14.Stat3C-Tgマウスにおいてよりヒト乾癬患者と類似した外的所見および病理組織像が観察された。表皮角化細胞におけるStat3の活性化はヒト乾癬患者病変部皮膚でも観察されている [72] ことから、K14.Stat3C-Tgマウスで惹起された病態はメカニズム的にもヒト乾癬病態に類似していると言える。また、臨床において抗IL-12/23p40抗体であるウステキヌマブが著効を示す [36] が、本モデルにおいても抗IL-12/23p40抗体の投与によって病態発症が完全に抑制されたことから、ヒト乾癬病態と同様にIL-23/Th17経路を介していることが確認できた。

次に、病態に寄与するIL-17産生細胞ポピュレーションを調べるために、構築したK14.Stat3C-TgマウスTPA誘発乾癬モデルの病変部皮膚から単細胞浮遊液を調製し、フローサイトメトリー解析を実施した。まずは、IL-17産生能を持つ細胞を検出するために、一般的な手法であるPMA+IOM刺激を行い、解析した。その結果、IMQ誘発乾癬モデルとは異なり、本モデルにおいてIL-17産生能を有する細胞サブセットは単一ではなく、Th17細胞、Tc17細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ILC3全てがIL-17を産生し得ることが示された (Figure 3-6)。さらに、病変部皮膚においてこれら全ての細胞サブセットは、IL-23で刺激した際にもIL-17を産生した (Figure 3-8)。IL-23はTh17経路の活性化に働くサイトカインで、ヒト乾癬病態においても本モデル病態においてもその重要性が示されている。すなわち、IL-23応答性を示したIL-17産生サブセットであるTh17細胞、Tc17細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ILC3全てが本モデルの病態形成に寄与している可能性が

示された。

IMQ 誘発乾癬モデルにおいて、なぜ真皮 $\gamma\delta$ T 細胞のみが IL-17 産生に大きく寄与するのかは明らかとなっていないが、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞は、IMQ の受容体である TLR7 を発現しており、TLR7 リガンド刺激により活性化され炎症性サイトカインを産生することが知られている [76-78]。さらに、TLR7 リガンドと IL-23 の共刺激により IL-17 産生が相乗的に誘導されることも報告されている [58]。一方で、第 2 章で示したように、IMQ は pDC と Tip-DC に作用して IL-23 をはじめとして Th17 経路の誘導に働く炎症性メディエーターの産生を誘導する。すなわち、IMQ は、DC 活性化による IL-23/Th17 経路の誘導に加えて、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞への直接的な活性化作用によって、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞のみが強く応答する病態を形成するのではないかと考えられる。これに対して、K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおいては、表皮角化細胞における Stat3 の活性化によって乾癬関連の炎症性サイトカインやケモカインが産生され [75]、これが炎症性 DC の皮膚への遊走と活性化を促し、IL-23/Th17 経路の誘導をもたらすと考えられる。この表皮角化細胞の活性化、DC 活性化、IL-23/Th17 経路誘導の増幅機構は、ヒト乾癬病態においても働いていると考えられ、このような機構が働いた場合には、ヒトにおいてもマウスにおいても、種々の細胞サブセットが IL-23 に応答して IL-17 を産生する能力を獲得し、乾癬病態の誘導に働くものと推察される。

本研究では、さらに、TPA 誘発により病変部皮膚において増加するもうひとつの IL-17 産生細胞サブセットとして、CD4 陰性 CD8 陰性の DN $\alpha\beta$ T 細胞の存在を発見した (Figure 3-6)。CD4 陰性 CD8 陰性の T 細胞としては、NK T 細胞や MAIT 細胞も IL-17 産生能をもつことが知られているが、NK 細胞系マーカーNK1.1 の発現は陰性であった (Figure 3-7C) ことから、これらとは異なる細胞である。IL-17 を産生する DN $\alpha\beta$ T 細胞については、ヒトおよびマウスモデルにおいて、細菌感染や全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患への関与が報告されているが [79-83]、乾癬への関与を示した知見は本研究が初めてである。Figure 3-2 に示すように、DN $\alpha\beta$ T 細胞は野生型 C57BL/6 マウスの皮膚にも存在していたが、C57BL/6 マウスを用いた IMQ 誘発乾癬モデルにおいては IL-17 を産生しなかった。これに対し、K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルにおいては、皮膚に存在する DN $\alpha\beta$ T 細胞の約 30%が IL-17 産生能を有していた (Figure 3-7B)。他の IL-17 産生細胞と同様に、Th17 細胞の分化と機能を制御するマスター転写因子 ROR γ t と、乾癬病態において炎症皮膚組織への遊走に働くケモカイン受容体 CCR6 の発現も確認された (Figure 3-7D, E)。そして、IL-23 応答能も確認された (Figure 3-8C)。

DN $\alpha\beta$ T 細胞は、健常人および健常マウスの末梢リンパ組織において 1%程度存在していることが知られている [84, 85] が、その機能や特徴についてはあまり詳細な解析はされていない。

その起源としては、CD4 陽性の前駆細胞由来 (MHC class II 拘束性) と CD8 陽性の前駆細胞由来 (MHC class I 拘束性) のいずれも存在し、繰り返し活性化刺激を受けることによって CD4 あるいは CD8 分子の発現が低下し最終分化した T 細胞サブセットであることを示唆する知見も報告されている [86-94]. 機能的には、炎症誘発性と制御性の 2 種類のサブセットの存在が示されている [79-84,95,96]. 本研究で見出された IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞については、病態惹起の過程で、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞から分化誘導されたのか、皮膚に常在していた DN $\alpha\beta$ T 細胞が活性化されたのかは不明であるが、IL-23 に応答して IL-17 を産生したことから、CD4 や CD8 に補助された TCR 刺激は介さずにエフェクター機能を発揮し得る炎症誘発性の細胞サブセットであると考えられる. K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルの病変部皮膚において、IL-23 に応答する IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞の割合は Th17 細胞や Tc17 細胞よりも多かった (Figure 3-8C) ことから、本モデルにおいて DN $\alpha\beta$ T 細胞の病態への寄与は高い可能性が示された.

以上より、新たに構築した K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルは、ヒト乾癬患者と同様に IL-23/Th17 経路に強く依存しており、さらに、病態に寄与する IL-17 産生ポピュレーションも類似していたことから、よりヒト乾癬病態を反映した有用なモデルであることが示された. そして、乾癬病態に寄与する IL-17 産生サブセットとして、新たに DN $\alpha\beta$ T 細胞の存在も見出した. IL-17 産生 DN $\alpha\beta$ T 細胞は、ヒトにおいても、細菌感染や全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患への関与が示されており [79-83], 末梢血や炎症組織における存在が確認されている [82] ことから、ヒト乾癬病態においても関与している可能性が十分に考えられる. 本研究で構築した乾癬モデルと、新たに見出された知見から、今後の創薬研究や新たな乾癬病態メカニズム解明につながることを期待される.

第5節 小括

本章では, K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルを構築し, 病態に寄与する IL-17 産生細胞ポピュレーションを詳細に解析し, 以下の知見を得た.

1. 本モデルは, ヒト乾癬患者と類似した外的所見および病理組織像を示し, IL-23/Th17 経路がその病態発症に重要であることが示された.
2. 本モデルにおいて病態に寄与する IL-17 産生細胞サブセットは単一ではなく, ヒト乾癬病態と同様に, Th17 細胞, Tc17 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞, ILC3 全てが IL-17 産生し病態形成に関与している可能性が示され, よりヒト病態を反映した有用なモデルであることが示された.
3. 病変部皮膚において IL-17 産生する新たなサブセットとして, DN $\alpha\beta$ T 細胞の存在も見出した. ROR γ t と CCR6 を発現し, 高い IL-23 応答性が確認され, 乾癬病態への寄与度が高い可能性が示された.

総括

多くの疾患、特に慢性疾患は、1つの遺伝子や蛋白質の異常のみで病態を形成するのではなく、様々な原因が複雑に絡み合い、生体恒常性の調節不全が基となって発症する。また、同一疾患であっても、多様な表現型を含むため、病態や治療を一括りにすることは難しい。疾患モデル動物は、このように複雑多岐にわたる慢性疾患の発症原因や分子メカニズム解明の糸口となり、さらには、予防や治療法の開発に重要な役割を担っている。一方で、全てにおいてヒトの病態を正確に反映した疾患モデル動物を実現することは困難であるため、様々な疾患モデル動物の特性や利点、ヒト病態との相違などを理解し、研究目的や個々の創薬標的に応じて適した評価モデルを選択することが重要である。本論文では、アトピー性皮膚炎や乾癬をはじめとする慢性の炎症性皮膚疾患を対象とした創薬研究に汎用される皮膚疾患モデル動物において、それぞれのモデルの病態発症メカニズムを免疫学的に解析した。

第1章 オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

アレルギー性接触性皮膚炎モデルとしてオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し、病変部に浸潤するT細胞について詳細に解析した。

その結果、Kv1.3機能をもつT_{EM}細胞が病態形成に寄与していることを示した。ハプテン誘発皮膚炎モデルは、炎症性皮膚疾患を対象とした創薬研究において簡便に作製可能なモデルとして汎用されているが、急性モデルであることから慢性皮膚疾患とは表現型が異なり、特にIFN- γ が関与するTh1型病態である点が、Th2型であるアトピー性皮膚炎病態やTh17型である乾癬病態とは大きく異なる。しかし、T_{EM}細胞は、疾患によらず炎症組織中において強く機能するT細胞であることから、本モデル動物は、Kv1.3をはじめとしてT_{EM}細胞を標的とした創薬研究においては、治療薬のコンセプト検証や、候補化合物の簡便な評価モデルとして適していると考えられた。

第2章 イミキモド誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

乾癬モデルとして汎用されているIMQ誘発乾癬モデルの病態発症メカニズム解明を目的として、本モデルの病態解析、ならびに、樹状細胞を用いた*in vitro*解析を実施した。

その結果、IMQによってTh17経路が誘導され乾癬様病態が惹起され得るメカニズムのひとつを明らかとした。すなわち、IMQによってTLR7を介して最初にpDCが活性化されてIFN- α の産生とTh17誘導サイトカインが産生され、続いてIFN- α とIMQがTip-DCに相乗的に働き、

TLR7 を介してさらに強く Th17 誘導サイトカインが産生され、これにより Th17 経路の活性化と病態発症につながる可能性が示唆された。ヒト乾癬患者においても、TLR7 アゴニストとして働く LL37-自己 RNA 複合体がトリガーとなって、同様のメカニズムで病態が引き起こされている可能性が考えられ、特に DC を標的とした乾癬の治療薬開発研究において、本モデル動物は有用であると考えられた。

第 3 章 K14.Stat3C マウス TPA 誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルを構築し、病変部皮膚に浸潤する IL-17 産生細胞ポピュレーションを詳細に解析した。

その結果、本モデル動物の病態に寄与する IL-17 産生細胞サブセットは単一ではなく、ヒト乾癬病態と同様に、Th17 細胞、Tc17 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、ILC3 全てが IL-17 を産生し、病態形成に関与していることを明らかにした。さらに、乾癬病態に寄与する IL-17 産生サブセットとして、新たに DN $\alpha\beta$ T 細胞の存在を見出した。乾癬モデルとして広く活用されている IMQ 誘発乾癬モデルは、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞のみが IL-17 を産生しており、他の細胞サブセットの寄与が少ない点がヒト乾癬病態と異なっている懸念がある。これに対し、K14.Stat3C-Tg マウス TPA 誘発乾癬モデルは、病態に寄与する IL-17 産生ポピュレーションがヒトと類似しており、T 細胞を標的とした乾癬の治療薬開発研究への有用性が示された。

以上より、本研究では 3 種類の皮膚疾患モデル動物における病態発症メカニズムについて検討し、免疫学的特性を明らかにするとともに、ヒト病態との類似点を明確に示した。また、それぞれのモデル動物の病態解析を通して、Kv1.3 阻害剤の創薬標的としてのコンセプトの実証、未だ不明な部分の多い乾癬の病態発症メカニズムの解明につながる知見、乾癬病態に寄与する新たな IL-17 産生細胞サブセットの同定など、新たな研究成果も得ることができた。これらの知見は、研究の目的や個々の創薬標的に応じて最適なモデルを選択するうえで有用であり、また、皮膚疾患の病態解明や新薬開発の一助となり、今後の創薬研究にとって有用な情報になり得ると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 西口工司教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり御指導と御討論を頂きました塩野義製薬株式会社 安井潔博士、山本美奈博士、七條通孝博士に心より感謝いたします。併せて、実験に際し多大な御協力と御助言を頂きました塩野義製薬株式会社 研究所諸氏に深謝いたします。

引用文献

1. Javier Mallol, Julian Crane, Erika von Mutius, Joseph A. Odhiambo, Ulrich Keil, Alistair Stewart, ISAAC Phase Three Study Group. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergol. Immunopatho. (Madr)* **2013**, 41, 73-85.
2. Robert S. Stern, Tamar Nijsten, Steven R. Feldman, David J. Margolis, Tara Rolstad. Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2004**, 9, 136-139.
3. Joel M. Gelfand, Rachel Weinstein, Steven B. Porter, Andrea L. Neimann, Jesse A. Berlin, David J. Margolis. Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom: a population-based study. *Arch. Dermatol.* **2005**, 141, 1537-1541.
4. Shanu Kohli Kurd, Joel M. Gelfand. The prevalence of previously diagnosed and undiagnosed psoriasis in US adults: results from NHANES 2003-2004. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2009**, 60, 218-224.
5. Hideki Kitagaki, Shigeki Fujisawa, Kozo Watanabe, Kazuhito Hayakawa, Tetsuo Shiohara. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, 105, 749-755.
6. Mina Yamamoto, Takayo Haruna, Kiyoshi Yasui, Hisashi Takahashi, Miho Iduhara, Shigeki Takaki, Masashi Deguchi, Akinori Arimura. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. *Allergol. Int.* **2007**, 56, 139-148.
7. Lawrence S. Chan, Neha Robinson, Luting Xu. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, 117, 977-983.
8. Hiroshi Konishi, Hiroko Tsutsui, Takaaki Murakami, Shizue Yumikura-Futatsugi, Kei-ichi Yamanaka, Minoru Tanaka, Yohichiro Iwakura, Noboru Suzuki, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Kenji Nakanishi, Hitoshi Mizutani. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 11340-11345.
9. Hiroshi Matsuda, Naohiro Watanabe, Gregory P. Geba, Johann Sperl, Masaoki Tsudzuki, Jun Hiroi, Masahiro Matsumoto, Hiroko Ushio, Saburo Saito, Philip W. Askenase, Ra Chisei. Development of

- atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* **1997**, 9, 461-466.
10. Ichiro Hikita, Takeshi Yoshioka, Tsuyoshi Mizoguchi, Kiyoshi Tsukahara, Kenta Tsuru, Hiroshi Nagai, Tsutomu Hirasawa, Yuji Tsuruta, Ryuji Suzuki, Masamitsu Ichihashi, Tatsuya Horikawa. Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **2002**, 30, 142-153.
 11. Stephan Grabbe, Thomas Schwarz. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today.* **1998**, 19, 37-44.
 12. Daniel H. Kaplan, Botond Z. Igyártó, Anthony A. Gaspari. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, 12, 114-124.
 13. Marc Vocanson, Anca Hennino, Aurore Rozieres, Gaelle Poyet, Jean-François Nicolas. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy.* **2009**, 64, 1699-1714.
 14. Federica Sallusto, Danielle Lenig, Reinhold Förster, Martin Lipp, Antonio Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* **1999**, 401, 708-712.
 15. Federica Sallusto, Anja Langenkamp, Jens Geginat, Antonio Lanzavecchia. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2000**, 251, 167-171.
 16. Michael D. Cahalan, K. George Chandy. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 749-756.
 17. Michael D. Cahalan, Heike Wulff, K. George Chandy. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* **2001**, 21, 235-252.
 18. Heike Wulff, Christine Beeton, K. George Chandy. Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2003**, 6, 640-647.
 19. Heike Wulff, Peter A. Calabresi, Rameeza Allie, Sung Yun, Michael Pennington, Christine Beeton, and K. George Chandy. The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* **2003**, 111, 1703-1713.
 20. Marc Vocanson, Anca Hennino, Magalie Cluzel-Tailhardat, Pierre Saint-Mezard, Josette Benetiere, Cyril Chavagnac, Frederic Berard, Dominique Kaiserlian, Jean-François Nicolas. CD8⁺ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, 126, 815-820.

21. Hitoshi Akiba, Jeanne Kehren, Marie-Thérèse Ducluzeau, Maya Krasteva, Françoise Horand, Dominique Kaiserlian, Fumio Kaneko, Jean-François Nicolas. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J. Immunol.* **2002**, 168, 3079-3087.
22. Philippe Azam, Ananthakrishnan Sankaranarayanan, Daniel Homerick, Stephen Griffey, Heike Wulff. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, 127, 1419-1429.
23. Alexander Schmitz, Ananthakrishnan Sankaranarayanan, Philippe Azam, Kristina Schmidt-Lassen, Daniel Homerick, Wolfram Hänsel, Heike Wulff. Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 1254-1270.
24. Thomas Plitz, Pierre Saint-Mézard, Masataka Satho, Susanne Herren, Caroline Waltzinger, Marcelo de Carvalho Bittencourt, Marie H. Kosco-Vilbois, Yolande Chvatchko. IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. *J. Immunol.* **2003**, 171, 1164-1171
25. Jennifer A. Thomson, Anthony B. Troutt, Anne Kelso. Contact sensitization to oxazolone: involvement of both interferon-gamma and interleukin-4 in oxazolone-specific Ig and T-cell responses. *Immunology.* **1993**, 78, 185-192.
26. Muriel Saulnier, Sui Huang, Michel Aguet, Bernhard Ryffel. Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Toxicology.* **1995**, 102, 301-312.
27. Christine Beeton, Heike Wulff, Jocelyne Barbaria, Olivier Clot-Faybesse, Michael Pennington, Dominique Bernard, Michael D. Cahalan, K. George Chandy, Evelyne Béraud. Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 13942-13947.
28. Christine Beeton, Heike Wulff, Satendra Singh, Steve Botsko, George Crossley, George A. Gutman, Michael D. Cahalan, Michael Pennington, K. George Chandy. A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 9928-9937.
29. Christine Beeton, Michael W. Pennington, Heike Wulff, Satendra Singh, Daniel Nugent, George Crossley, Ilya Khaytin, Peter A. Calabresi, Chao-Yin Chen, George A. Gutman, K. George Chandy. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy

- of autoimmune disease. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 1369-1381.
30. Christine Beeton, Heike Wulff, Nathan E. Standifer, Philippe Azam, Katherine M. Mullen, Michael W. Pennington, Aaron Kolski-Andreaco, Eric Wei, Alexandra Grino, Debra R. Counts, Ping H. Wang, Christine J. LeeHealey, Brian S. Andrews, Ananthakrishnan Sankaranarayanan, Daniel Homerick, Werner W. Roeck, Jamshid Tehranzadeh, Kimber L. Stanhope, Pavel Zimin, Peter J. Havel, Stephen Griffey, Hans-Guenther Knaus, Gerald T. Nepom, George A. Gutman, Peter A. Calabresi, K. George Chandy. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 17414-17419.
 31. Yasutomo Fujii, Hiroko Takeuchi, Keiko Tanaka, Shozo Sakuma, Yoshitaka Ohkubo, Seitaro Mutoh. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, 456, 115-21.
 32. Michael P. Schön, W.-Henning Boehncke. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 1899-1912.
 33. Antonella Di Cesare, Paola Di Meglio, Frank O. Nestle. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **2009**, 129, 1339-1350.
 34. Lisa C. Zaba, Irma Cardinale, Patricia Gilleaudeau, Mary Sullivan-Whalen, Mayte Suárez-Fariñas, Judilyn Fuentes-Duculan, Inna Novitskaya, Artemis Khatcherian, Mark J. Bluth, Michelle A. Lowes, James G. Krueger. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J. Exp. Med.* **2007**, 204, 3183-3194.
 35. Gerald G. Krueger, Richard G. Langley, Craig Leonardi, Newman Yeilding, Cynthia Guzzo, Yuhua Wang, Lisa T. Dooley, Mark Lebwohl, for the CNTO 1275 Psoriasis Study Group. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 580-592.
 36. Craig L. Leonardi, Alexa B. Kimball, Kim A. Papp, Newman Yeilding, Cynthia Guzzo, Yuhua Wang, Shu Li, Lisa T. Dooley, Kenneth B. Gordon, for the PHOENIX 1 study investigators. 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.* **2008**, 371, 1665-1674.
 37. Claire L. Langrish, Yi Chen, Wendy M. Blumenschein, Jeanine Mattson, Beth Basham, Jonathan D. Sedgwick, Terrill McClanahan, Robert A. Kastelein, Daniel J. Cua. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **2005**, 201, 233-240.
 38. Laura A. Tesmer, Steven K. Lundy, Sujata Sarkar, David A. Fox. Th17 cells in human disease.

- Immunol. Rev.* **2008**, 223, 87-113.
39. Shean J. Aujla, Patricia J. Dubin, Jay K. Kolls. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin. Immunol.* **2007**, 6, 377-382.
 40. Katia Boniface, François-Xavier Bernard, Martine Garcia, Austin L. Gurney, Jean-Claude Lecron, Franck Morel. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.* **2005**, 174, 3695-3702.
 41. Susan M. Sa, Patricia A. Valdez, Jianfeng Wu, Kenneth Jung, Fiona Zhong, Linda Hall, Ian Kasman, Jane Winer, Zora Modrusan, Dimitry M. Danilenko and Wenjun Ouyang. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol.* **2007**, 178, 2229-2240.
 42. Kristine E. Nograles, Lisa C. Zaba, Emma Guttman-Yassky, Judilyn Fuentes-Duculan, Mayte Suárez-Fariñas, Irma Cardinale, Artemis Khatcherian, Juana Gonzalez, Katherine C. Pierson, Traci R. White, Cara A. Pensabene, Israel Coats, Inna Novitskaya, Michelle A. Lowes, James G. Krueger. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.* **2008**, 159, 1092-1102.
 43. Michelle A. Lowes, Toyoko Kikuchi, Judilyn Fuentes-Duculan, Irma Cardinale, Lisa C. Zaba, Asifa S. Haider, Edward P. Bowman, James G. Krueger. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, 128, 1207-1211.
 44. Helen Benham, Paul Norris, Jane Goodall, Mihir D. Wechalekar, Oliver FitzGerald, Agnes Szentpetery, Malcolm Smith, Ranjeny Thomas, Hill Gaston. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis. Res. Ther.* **2013**, 15, R136.
 45. Michelle A. Lowes, Francesca Chamian, Maria Veronica Abello, Judilyn Fuentes-Duculan, Shao-Lee Lin, Rachel Nussbaum, Inna Novitskaya, Henrietta Carbonaro, Irma Cardinale, Toyoko Kikuchi, Patricia Gilleaudeau, Mary Sullivan-Whalen, Knut M. Wittkowski, Kim Papp, Marvin Garovoy, Wolfgang Dummer, Ralph M. Steinman, James 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.* **2005**, 102, 19057-19062.
 46. Lisa C. Zaba, Judilyn Fuentes-Duculan, Narat John Eungdamrong, Maria Veronica Abello, Inna Novitskaya, Katherine C. Pierson, Juana Gonzalez, James G. Krueger, Michelle A. Lowes. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, 129, 79-88.

47. Anja Hänsel, Claudia Günther, Jens Ingwersen, Josephine Starke, Marc Schmitz, Michael Bachmann, Michael Meurer, Ernst Peter Rieber, Knut Schäkel. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **2011**, 127, 787-794.
48. Craig Leonardi, Robert Matheson, Claus Zachariae, Gregory Cameron, Linda Li, Emily Edson-Heredia, Daniel Braun, Subhashis Banerjee,. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, 366, 1190-1199.
49. K.A. Papp, R.G. Langley, B. Sigurgeirsson, M. Abe, D.R. Baker, P. Konno, S. Haemmerle, H.J. Thurston, C. Papavassilis, H.B. Richards. Efficacy and safety of secukinumab in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II dose-ranging study. *Br. J. Dermatol.* **2013**, 168, 412-421.
50. Kim A. Papp, Craig Leonardi, Alan Menter, Jean-Paul Ortonne, James G. Krueger, Gregory Kricorian, Girish Aras, Juan Li, Chris B. Russell, Elizabeth H.Z. Thompson, Scott Baumgartner. Brodalumab, an anti-interleukin- 17-receptor antibody for psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, 366, 1181-1189.
51. John K. Geisse, Phoebe Rich, Amit Pandya, Kenneth Gross, Kara Andres, Angie Ginkel, Mary Owens. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2002**, 47, 390-398.
52. Rolf-Markus Szeimies, Marie-Jeanne P. Gerritsen, Girish Gupta, Jean Paul Ortonne, Stefano Serresi, Jens Bichel, James H. Lee, Terry L. Fox, Agustín Alomar. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratosis: results from a phase III, randomized, double-blind, vehicle-controlled, clinical trial with histology. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2004**, 51, 547-555.
53. Michel Gilliet, Curdin Conrad, Michael Geiges, Antonio Cozzio, Wolfgang Thürlimann, Günter Burg, Frank O. Nestle, Reinhard Dummer. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch. Dermatol.* **2004**, 140, 1490-1495.
54. Neil Rajan, James A.A. Langtry. Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clin. Exp. Dermatol.* **2006**, 31, 140-141.
55. P. A. Fanti, E. Dika, S. Vaccari, C. Miscial, C. Varotti. Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. *Int. J. Dermatol.* **2006**, 45, 1464-1465.
56. U. Patel, N.M. Mark, B.C. Machler, V.J. Levine. Imiquimod 5% cream induced psoriasis: a case

- report, summary of the literature and mechanism. *Br. J. Dermatol.* **2011**, 164, 670-672.
57. Leslie van der Fits, Sabine Mourits, Jane S. A. Voerman, Marius Kant, Louis Boon, Jon D. Laman, Ferry Cornelissen, Anne-Marie Mus, Edwin Florencia, Errol P. Prens, Erik Lubberts. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* **2009**, 182, 5836-5845.
 58. Yihua Cai, Xiaoyan Shen, Chuanlin Ding, Chunjian Qi, Kejia Li, Xia Li, Venkatakrishna R. Jala, Huang-ge Zhang, Tian Wang, Jie Zheng, Jun Yan. Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation, *Immunity.* **2011**, 35, 596-610.
 59. Stanislav Pantelyushin, Stefan Haak, Barbara Ingold, Paulina Kulig, Frank L. Heppner, Alexander A. Navarini, Burkhard Becher. Ror γ t innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, 122, 2252-2256.
 60. Yuekang Xu, Yifan Zhan, Andrew M. Lew, Shalin H. Naik, Michael H. Kershaw. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J. Immunol.* **2007**, 179, 7577-7584.
 61. Francesca Palamara, Simone Meindl, Martin Holcman, Petra Lühns, Georg Stingl, Maria Sibilica. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol.* **2004**, 173, 3051-3061.
 62. Barbara Drobits, Martin Holcman, Nicole Amberg, Melissa Swiecki, Roland Grundtner, Martina Hammer, Marco Colonna, Maria Sibilica. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest.* **2012**, 122, 575-585.
 63. Frank O. Nestle, Curdin Conrad, Adrian Tun-Kyi, Bernhard Homey, Michael Gombert, Onur Boyman, Günter Burg, Yong-Jun Liu, Michel Gilliet. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med.* **2005**, 202, 135-143.
 64. Anne Walter, Matthias Schäfer, Virginia Cecconi, Claudia Matter, Mirjana Urosevic-Maiwald, Benedetta Belloni, Nicola Schönewolf, Reinhard Dummer, Wilhelm Bloch, Sabine Werner, Hans-Dietmar Beer, Alexander Knuth, Maries van den Broek. Aldara activates TLR7-independent immune defence. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1560.
 65. Barbara Drobits, Martin Holcman, Nicole Amberg, Melissa Swiecki, Roland Grundtner, Martina Hammer, Marco Colonna, Maria Sibilica. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J. Clin. Invest.* **2012**, 122, 575-585.
 66. Dipyaman Ganguly, Georgios Chamilos, Roberto Lande, Josh Gregorio, Stephan Meller, Valeria

- Facchinetti, Bernhard Homey, Franck J. Barrat, Tomasz Zal, Michel Gilliet. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* **2009**, 206, 1983-1994.
67. Pieter C. M. Res, Gamze Piskin, Onno J. de Boer, Chris M. van der Loos, Peter Teeling, Jan D. Bos, Marcel B. M. Teunissen. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One.* **2010**, 5, e14108.
68. DirkJan Hijnen, Edward F. Knol, Yoony Y. Gent, Barbara Giovannone, Scott Beijm, Thomas S. Kupper, Carla A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, Rachael A. Clark. CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, 133, 973-979.
69. Stanley Cheuk, Maria Wikén, Lennart Blomqvist, Susanne Nylén, Toomas Talme, Mona Ståhle, Liv Eidsmo. Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *J. Immunol.* **2014**, 192, 3111-3120.
70. Yihua Cai, Chris Fleming, Jun Yan. Dermal $\gamma\delta$ T cells--a new player in the pathogenesis of psoriasis. *Int. Immunopharmacol.* **2013**, 16, 388-391.
71. Federica Villanova, Barry Flutter, Isabella Tosi, Katarzyna Gryś, Hemawtee Sreeneebus, Gayathri K Perera, Anna Chapman, Catherine H Smith, Paola Di Meglio, Frank O Nestle. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, 134, 984-991.
72. Shigetoshi Sano, Keith Syson Chan, Steve Carbajal, John Clifford, Mary Peavey, Kaoru Kiguchi, Satoshi Itami, Brian J Nickoloff, John DiGiovanni. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.* **2005**, 11, 43-49.
73. Shigetoshi Sano, Keith Syson Chan, John DiGiovanni. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J. Dermatol. Sci.* **2008**, 50, 1-14.
74. Ken Miyoshi, Mikiro Takaishi, Kimiko Nakajima, Mitsunori Ikeda, Takashi Kanda, Masahito Tarutani, Tatsuo Iiyama, Naoki Asao, John DiGiovanni, Shigetoshi Sano. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, 131, 108-117.
75. Kimiko Nakajima, Takashi Kanda, Mikiro Takaishi, Takeo Shiga, Ken Miyoshi, Hideki Nakajima, Reiko Kamijima, Masahito Tarutani, Jacqueline M. Benson, M. Merle Elloso, Lester L. Gutshall,

- Michael F. Naso, Yoichiro Iwakura, John DiGiovanni, Shigetoshi Sano. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J. Immunol.* **2011**, 186, 4481-4489.
76. Hao Fang, Thomas Welte, Xin Zheng, Gwong-Jen J. Chang, Michael R. Holbrook, Lynn Soong, Tian Wang. $\gamma\delta$ T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, 59, 71-80.
77. Hideki Shimura, Ayano Nitahara, Akiko Ito, Katsuhiko Tomiyama, Masaaki Ito, Kazuhiro Kawai. Up-regulation of cell surface Toll-like receptor 4-MD2 expression on dendritic epidermal T cells after the emigration from epidermis during cutaneous inflammation. *J. Dermatol. Sci.* **2005**, 37, 101-110.
78. Jinping Zhang, Jia Wang, Lan Pang, Guorui Xie, Thomas Welte, Vandana Saxena, Jason Wicker, Brian Mann, Lynn Soong, Alan Barrett, Willi Born, Rebecca O'Brien, Tian Wang. The co-stimulatory effects of MyD88-dependent Toll-like receptor signaling on activation of murine $\gamma\delta$ T cells. *PLoS One.* **2014**, 9, e108156.
79. Fernanda Nobre Amaral Villani, Manoel Otávio da Costa Rocha, Maria do Carmo Pereira Nunes, Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Luisa Mourão Dias Magalhães, Janete Soares Coelho dos Santos, Kenneth J. Gollob, Walderez O. Dutra. Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct alphabeta and gammadelta CD4⁻ CD8⁻ T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect. Immun.* **2010**, 78, 4421-4430.
80. Lis R. V. Antonelli, Walderez O. Dutra, Ricardo R. Oliveira, Karen C. L. Torres, Luiz H. Guimarães, Olivia Bacellar, Kenneth J. Gollob. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4⁻ CD8⁻) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **2006**, 74, 6317–6323.
81. Steven C Derrick, Teresa H Evering, Vasan K Sambandamurthy, Kripa V Jalapathy, Tsungda Hsu, Bing Chen, Mei Chen, Robert G Russell, Ana Paula Junqueira-Kipnis, Ian M Orme, Steven A Porcelli, William R Jacobs, Sheldon L Morris. Characterization of the protective T-cell response generated in CD4-deficient mice by a live attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine. *Immunology.* **2007**, 120, 192–206.
82. José C. Crispín, Mohammed Oukka, George Bayliss, Robert A. Cohen, Christine A. Van Beek, Isaac E. Stillman, Vasileios C. Kyttaris, Yuang-Taung Juang, George C. Tsokos. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the

- kidneys. *J. Immunol.* **2008**, 181, 8761-8766.
83. Jack J.H. Bleesing, Margaret R. Brown, Janet K. Dale, Stephen E. Straus, Michael J. Lenardo, Jennifer M. Puck, T.Prescott Atkinson, Thomas A. Fleisher. TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin. Immunol.* **2001**, 100, 314-324.
 84. Zhu-Xu Zhang, Liming Yang, Kevin J. Young, Barb DuTemple, Li Zhang. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* **2000**, 6, 782-789.
 85. Zhu-Xu Zhang, Young K, Li Zhang. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J. Mol. Med. (Berl)*. **2000**, 79, 419-427.
 86. Dong Zhang, Wei Yang, Nicolas Degauque, Yan Tian, Allison Mikita, and Xin Xiao Zheng. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood*. **2007**, 109, 4071-4079.
 87. Inna V. Grishkan, Achilles Ntranos, Peter A. Calabresi, Anne R. Gocke. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell. Immunol.* **2013**, 284, 68-74.
 88. L Hang, A N Theofilopoulos, R S Balderas, S J Francis, F J Dixon. The effect of thymectomy on lupus-prone mice. *J. Immunol.* **1984**, 132, 1809-1813.
 89. Wajahat Z. Mehal, I. Nicholas Crispe. TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells in vivo. *J. Immunol.* **1998**, 4, 1686-1693.
 90. José C. Crispín and George C. Tsokos. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* **2009**, 183, 4675-4681.
 91. Zhirong Mou, Dong Liu, Ifeoma Okwor, Ping Jia, Kanami Orihara, Jude Ezeh Uzonna. MHC class II restricted innate-like double negative T cells contribute to optimal primary and secondary immunity to *Leishmania major*. *PLoS. Pathog.* **2014**, 10, e1004396.
 92. Thomas Giese, Wendy F. Davidson. In CD8+ T cell-deficient *lpr/lpr* mice, CD4+B220+ and CD4+B220- T cells replace B220+ double-negative T cells as the predominant populations in enlarged lymph nodes. *J. Immunol.* **1995**, 154, 4986-4995.
 93. Christian M. Hedrich, José C. Crispín, Thomas Rauen, Christina Ioannidis, Tomohiro Koga, Noe

- Rodríguez Rodríguez,‡ Sokratis A. Apostolidis, Vasileios C. Kyttaris, George C. Tsokos. cAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 2361-2370.
94. Noé Rodríguez-Rodríguez, Sokratis A. Apostolidis, Pablo Penaloza-MacMaster, José Manuel Martín Villa, Dan H. Barouch, George C. Tsokos, José C. Crispín. Programmed cell death 1 and Helios distinguish TCR- $\alpha\beta$ ⁺ double-negative (CD4-CD8-) T cells that derive from self-reactive CD8 T cells. *J. Immunol.* **2015**, 194, 4207-4214.
95. Kevin J. Young, Liming Yang, M. James Phillips, Li Zhang. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood.* **2002**, 100, 3408-3414.
96. Boris P.-L. Lee, Elaine Mansfield, Szu-Chuan Hsieh, Tina Hernandez-Boussard, Wenhao Chen, Christopher W. Thomson, Megan S. Ford, Steven E. Bosinger, Sandy Der, Zhu-xu Zhang, Meixia Zhang, David J. Kelvin, Minnie M. Sarwal, Li Zhang. Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival. *J. Immunol.* **2005**, 174, 4535-44.