

## 論文の内容の要旨

論文題目 表皮角化細胞における CTACK/CCL27 の産生機序に関する検討

指導教員 佐藤伸一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

唐川 大

背景：表皮角化細胞は単なる物理的なバリアではなく、外界からの刺激および自己を構成する細胞からの作用に反応して皮膚における免疫反応の場を形成すると同時にサイトカイン産生により樹状細胞を教育し免疫応答を特定の方向へシフトさせるというように、受動的かつ能動的に皮膚および全身の免疫反応に関与している。最外層に存在するという構造上、皮膚科領域における外用療法をはじめ光線療法などの局所療法の主要なターゲットのひとつとなっている。ケモカインは免疫・炎症反応の場において産生され、炎症細胞の遊走や活性化をはじめとした細胞間相互作用を担う一群のタンパクである。Cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) /CCL27 は、表皮角化細胞に特異的に発現するケモカインで、炎症性皮膚疾患において優位を占める CLA 陽性 T 細胞の皮膚

への浸潤を惹起する作用を持ち、皮膚の炎症形成に不可欠な役割を果たしている。CTACKは尋常性乾癬、アトピー性皮膚炎をはじめとする種々の炎症性皮膚疾患に関与が報告されている。その産生は tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ により、nuclear factor (NF)  $\kappa$ B を介したシグナル伝達系により誘導される。

表皮角化細胞からの炎症にかかわるタンパク産生について検討することは、皮膚の炎症の理解や、皮膚疾患の治療において不可欠である。また、CTACKは皮膚の炎症に必須のケモカインであり、その発現は表皮角化細胞に特異的であることから、皮膚の炎症を特徴付けるものであると考えられる。その産生制御のメカニズムを検討することによりコントロールが可能となれば皮膚特異的に炎症を制御できる可能性がある。

CTACKの産生制御については、TNF $\alpha$ によりその発現が誘導されることはすでに報告されているが、炎症皮膚にはTNF $\alpha$ 以外にも多数のサイトカインや細胞成長因子が存在し、それらの作用も受けているはずであり、その詳細は不明である。その産生にかかわる細胞内シグナルについても、NF $\kappa$ Bを介しているとの報告があるが、それに対して複雑な制御機構が働いていることが予想され、その詳細な検討を行うことで、CTACKの調節にかかわる因子の特定や制御につながる事が期待できる。

本研究では、皮膚特異的な炎症形成に関与していると考えられるCTACKを題材

とした。CTACK の発現が表皮角化細胞特異的であること、表皮角化細胞が表皮の大部分を構成する細胞で単独あるいは表皮角化細胞同士の作用により炎症に関与していると考えられること、CTACK 産生の制御機構について詳細な検討を加えるためには単純化された系での検討が必要であることから、ヒト表皮角化細胞の培養系を用い、主に TNF $\alpha$  と IFN $\gamma$  の相互作用について検討を行った。

方法：本研究では、ヒト正常表皮角化細胞（NHK）および表皮角化細胞 cell line である HaCaT 細胞の in vitro 培養系を用いた。

第一に TNF $\alpha$  および IFN $\gamma$  刺激に対する CTACK 産生の変化につき ELISA 法およびリアルタイム RT-PCR 法にてタンパクレベル、mRNA レベルでの評価を行った。

第二に TNF $\alpha$  および IFN $\gamma$  刺激に対する CTACK 産生について、NF $\kappa$ B および MAP キナーゼの関与を阻害剤を用いて検討した。NF $\kappa$ B の活性化へのこれらのサイトカインの影響について、NF $\kappa$ B 結合配列を持つルシフェラーゼベクターを使用したルシフェラーゼアッセイにて検討した。

第三に TNF $\alpha$  および IFN $\gamma$  による CTACK 産生制御機構における JAK-STAT 系の関与について、STAT1・3 のリン酸化を認識する抗体をもちいたウェスタンブロット法、ドミナントネガティブおよびワイルドタイプの STAT1・3、SOCS1・3 のワイルドタイプを有するアデノウィルスベクター、JAK の化学的阻害剤、既知

の STAT1・3 結合配列を持つルシフェラーゼベクターを使用したルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。

第四に CTACK 産生制御における表皮角化細胞の分化の影響について細胞密度およびカルシウム濃度を調節することにより分化を誘導し、検討した。表皮角化細胞の分化度についてはトランスグルタミナーゼ 1 およびケラチン 1 の mRNA 量を指標にリアルタイム PCR 法で評価した。

最後に TNF $\alpha$ および IFN $\gamma$ による CTACK 産生制御機構における EGF 受容体の関与につき阻害剤を用いて検討し、IFN $\gamma$ 刺激による EGF 受容体リガンドの産生について ELISA 法を用いて調べた。

結果：表皮角化細胞における CTACK 産生は TNF $\alpha$ により誘導、IFN $\gamma$ によりその誘導が抑制された。TNF $\alpha$ による CTACK 産生誘導は、NF $\kappa$ B あるいは p38MAPキナーゼの阻害剤により抑制され、一方 IFN $\gamma$ による CTACK 産生誘導抑制は ERK の阻害により解除された。IFN $\gamma$ は TNF $\alpha$ による NF $\kappa$ B 活性化を抑制しなかった。IFN $\gamma$ により STAT1・3 の活性の上昇とリン酸化が見られた。ドミナントネガティブ STAT1 の導入により IFN $\gamma$ による TNF $\alpha$ 誘導 CTACK 産生の抑制が部分的に解除され、ワイルドタイプ STAT3 を導入することで TNF $\alpha$ による CTACK 産生誘導が低下したが、SOCS1・3 DNA の導入は IFN $\gamma$ による CTACK 産生抑制に影響を与えなかった。IFN $\gamma$ による CTACK 誘導抑制は JAK の阻害により部分的に解除

された。

高細胞密度、高カルシウムイオン濃度の条件において角化細胞の分化のマーカ一の誘導が見られたが、それに伴い、 $\text{IFN}\gamma$ による CTACK 誘導抑制が解除された。 $\text{IFN}\gamma$ による CTACK 誘導抑制は EGF 受容体の阻害により解除された。 $\text{IFN}\gamma$ により EGF 受容体リガンドである  $\text{TGF}\alpha$ および amphiregulin の産生誘導が表皮角化細胞においても認められた。

考案：  $\text{IFN}\gamma$ は  $\text{TNF}\alpha$ により誘導される表皮角化細胞からの CTACK 産生を抑制した。 $\text{TNF}\alpha$ の作用が同様に炎症を誘導する  $\text{IFN}\gamma$ によって抑制される事実については、われわれの調べた限りにおいて Th1 細胞の血管内皮細胞への接着が  $\text{TNF}\alpha$ により誘導され  $\text{IFN}\gamma$ によって抑制されることが報告されているのみで、表皮角化細胞において、あるいはケモカイン産生において過去に同様の報告は見られず、新しい知見と考えられた。 $\text{TNF}\alpha$ は既報告と同様に  $\text{NF}\kappa\text{B}$ 、p38MAP キナーゼを介して CTACK の産生を誘導した。しかし、 $\text{IFN}\gamma$ による CTACK 産生抑制については、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 、p38MAP キナーゼのいずれもあきらかな寄与は見られず、ERK の関与が強く示唆された。 $\text{IFN}\gamma$ は  $\text{TNF}\alpha$  による  $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性化を直接抑制もしていなかった。

STAT1 は  $\text{TNF}\alpha$ による CTACK 産生誘導の  $\text{IFN}\gamma$ による抑制に若干ではあるが関与していることがわかった。一方、 $\text{IFN}\gamma$ は STAT1 の他、細胞種によっては STAT3

をリン酸化、活性化することが報告されているが、本研究により、表皮角化細胞において  $\text{IFN}\gamma$  は  $\text{STAT3}$  の活性化を誘導し、 $\text{TNF}\alpha$  による  $\text{CTACK}$  産生誘導に対し  $\text{STAT3}$  が抑制的に作用することが新たに判明した。一方、 $\text{JAK}$  の広汎阻害、 $\text{JAK3}$  阻害により、 $\text{TNF}\alpha$  による  $\text{CTACK}$  産生誘導の  $\text{IFN}\gamma$  による抑制の強い解除が見られた。 $\text{JAK}$  のシグナル伝達は  $\text{STAT}$  を主とするが、近年他のシグナル伝達系への cross talk が存在することが明らかとなっており、 $\text{STAT1}$  の阻害による解除が部分的である一方  $\text{JAK}$  阻害によっては強い解除が見られたことから、これらの系の関与については今後の検討が必要であると考えられた。

$\text{IFN}\gamma$  による  $\text{CTACK}$  産生抑制は表皮角化細胞の分化に伴い働かなくなるとの結果が得られ、 $\text{IFN}\gamma$  による  $\text{CTACK}$  産生抑制に関与する系は表皮角化細胞の分化に伴い、その作用を減ずるものであると考えた。

表皮角化細胞において  $\text{IFN}\gamma$  による  $\text{EGF}$  受容体リガンド産生に対する作用についてはこれまでわかっていなかったが、正常ヒト表皮角化細胞を用いたわれわれの実験系において、 $\text{IFN}\gamma$  によって  $\text{EGF}$  受容体のリガンドである  $\text{TGF}\alpha$  や  $\text{amphiregulin}$  の産生が亢進し、一方で  $\text{EGF}$  受容体阻害により  $\text{IFN}\gamma$  による  $\text{CTACK}$  産生誘導抑制が解除されたことから、正常の表皮角化細胞において、これらの  $\text{EGF}$  受容体リガンドが傍分泌・自己分泌的に作用して  $\text{CTACK}$  産生を制御している可能性が示唆された。

本研究において、TNF $\alpha$ により誘導される CTACK 産生の IFN $\gamma$ による抑制は EGF 受容体阻害剤の添加により解除された。表皮角化細胞において EGF 受容体の活性化で、JAK 依存的および非依存的に STAT3 が活性化されること、ERK が活性化されることが報告されており、EGF 受容体リガンドが EGF 受容体を介して STAT3 や ERK を活性化し、IFN $\gamma$ による CTACK 産生誘導抑制に関与していると考えられた。

本研究では皮膚における炎症反応に重要な役割を果たすケモカインである CTACK の産生の制御系のひとつについて、IFN $\gamma$ が EGF 受容体を介して CTACK 産生を抑制することが明らかとなった。今回の検討は正常および cell line を用いた in vitro の系での検討であるという限界を有しており、CTACK 自体が乾癬をはじめとする炎症性皮膚疾患にどのような役割を果たしているのかまでは明らかにできず今後の検討課題としたいが、IFN $\gamma$ の表皮角化細胞からのケモカイン産生に対する新たな作用パターンを明らかにできたことは、IFN $\gamma$ の炎症性皮膚疾患における役割を考える上での大きな知見であると考えられた。