

## 論文の内容の要旨

論文題目 尿酸結晶のマウスランゲルハンス細胞に与える影響についての検討

指導教官 佐藤 伸一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 川嶋 智彦

尿酸は、痛風の原因物質として知られているが、これは全ての細胞に普遍的に含まれている DNA や RNA といった核酸の最終代謝産物であり、障害細胞やネクローシス・アポトーシス細胞から放出される。細胞外環境下では主に monosodium urate (MSU) crystal として存在している。MSU は樹状細胞 (dendritic cells : DC) の成熟を促進し、さらに抗原との同時刺激により cluster of differentiation 8 (CD8) 陽性 T 細胞を活性化することが報告されている。そのため、近年 MSU は、死細胞や細胞外基質に含まれ樹状細胞を成熟させて免疫システムの活性化を導く danger signal の 1 つとして認識されている。

食細胞が MSU による刺激を受けると、その細胞内受容体である NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP 3) はそのアダプター蛋白である apoptosis-associated speck-like protein (ASC) を動員し、NALP 3 inflammasome を形成する。この複合体は caspase 1 前駆体に結合し、その自己触媒作用により processing を受けて活性型 caspase 1 が産生される。活性型 caspase 1 は細胞質内にあらかじめ貯蔵されている Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )・IL-18 前駆体の一部を切断 (プロセッシング) することにより、活性型 IL-1 $\beta$ ・IL-18 が産生され、これらが細胞外へ分泌される。MSU がどのように NALP 3 に認識され DC を活性化する

のかについてははっきりとは解明されていないが、DC が MSU 結晶を食作用により取り込むことにより、細胞内のリソソーム膜の透過性上昇を通じてリソソームに含まれる蛋白分解酵素であるカテプシン B が細胞質内に放出され、その後未知のメカニズムを介して NALP3 が活性化されると報告されている。また、MSU は細胞膜を構成しているコレステロールに接着することにより、細胞膜に結合している細胞内免疫受容体におけるチロシン依存性活性化配列構造 (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs : ITAMS) に spleen tyrosine kinase (Syk キナーゼ) が動員され、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の活性化が起こりそれに引き続き DC が活性化するということが報告されている。

IL-18 は IL-1 cytokine superfamily に属しており、その mRNA は T 細胞・B 細胞・DC・単球・ケラチノサイトなどに幅広く発現認めている。IL-18 合成経路は 24kDa precursor の一部が切断されて 21kDa proform が形成され、さらに caspase 1 により一部が切断された後に 18kDa mature form となる。細胞側の受容体である IL-18 受容体は $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の heterodimer で構成される。 $\alpha$ 鎖が IL-18 の結合、 $\beta$ 鎖が細胞内へのシグナル伝達に寄与している。IL-18 の作用としては、IL-12 存在下にて主に T 細胞からの Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) 産生に強い誘導効果があることが知られている。また近年、マウスに IL-18 を皮下注射することにより、LC の所属リンパ節への遊走が促進されることも報告されているが、その詳細なメカニズムについての報告は皆無である。

皮膚は他の臓器に比べ体のもっとも最外層に位置するため、物理的障害・紫外線照射・病原体・アレルゲンなどの様々な刺激・抗原に暴露されている。さらに、ケラチノサイト (keratinocytes : KC) のアポトーシスとネクローシスはアトピー性皮膚炎・接触皮膚炎・扁平苔癬・中毒性表皮壊死を含む様々な炎症性皮膚疾患において観察されている。よって、細胞傷害や細胞死は KC ではよく生じており、MSU は容易に表皮内に沈着しうる。尿酸は核酸の最終代謝産物であ

るため、MSU は表皮の過増殖をきたす皮膚疾患においても出現しうる。実際、MSU 結晶は KC の過増殖が認められている乾癬病変部の表皮内（特に汗孔と Munro 微小膿瘍の周囲）に認められており、偏光顕微鏡にてその存在が確認されている。さらに、乾癬患者では正常人より血清尿酸値が有意に高いこと・高尿酸血症を有する乾癬患者に対してアロプリノールを投与すると皮疹が著明に軽快すること・南米の蛇である *Boa constrictor* に尿酸を与え続けると乾癬様皮疹が誘発されたという報告がある。

ランゲルハンス細胞 (langerhas cells : LC) は骨髄由来で major histocompatibility complex (MHC) クラス II 抗原陽性の抗原提示細胞であり、表皮に局在する唯一の DC である。表皮の炎症がある場合、LC は抗原を取り込み皮膚から外に遊走する。遊走中に、LC は MHC クラス II や共刺激分子といった細胞表面分子の発現が増加し成熟し、強力な免疫原性能力を獲得する。LC は所属リンパ節へ遊走し、抗原を未熟 T 細胞へ提示してメモリー T 細胞を誘導する。この結果、これらの T 細胞が皮膚において獲得免疫反応を惹起する。

本研究では、表皮細胞障害の皮膚免疫に与える影響を検討するために、MSU のマウス LC に与える影響について解析した。まず、LC が *in vitro* と *in vivo* の両方の条件下で、MSU 結晶と接触しうるかどうかを検討した。次に、NALP 3 inflammasome を構成するための必須成分を発現しており caspase 1 の活性化を引き起こし得るかを検証した後で、高純度に精製されたマウス LC を MSU と共培養し、IL-18・IL-1 $\beta$ を含むサイトカイン産生や LC の成熟へ与える効果について検討した。また、MSU の所属リンパ節への遊走に与える MSU の影響についても検討した。なお、通常は LC を高純度に精製することは極めて困難であり、混在する KC や KC の産生するサイトカインの LC への影響が問題となる。しかし、私の所属する研究室では以前より抗 I-A<sup>d</sup>抗体を用いた高純度の LC (>95%) を精製するパンニング法により KC の影響をほとんど無視できるまでの実験系を確

立しており、今回の実験ではこの高純度の LC を用いて検討を行なった。

その結果、30 年前に唯一、皮膚疾患においては乾癬における報告しか存在しなかった MSU 結晶が、皮膚搔破刺激により容易に表皮内に沈着することが今回示された。さらに、表皮内に形成された MSU 結晶は貪食作用と細胞膜プリン受容体である P2Y<sub>6</sub>を介して LC に作用し、NALP3 inflammasome の形成を介して IL-18 分泌が促進されることがわかった。そして、LC から分泌された IL-18 は LC 自身に自己分泌あるいは傍分泌様式で作用し、E カドヘリンの発現が低下することによって周囲のケラチノサイトとの結合がはずれ、RhoA の発現上昇・Rac1 の発現低下によってその細胞形態の変化が生じて高速なアメーバ様運動を開始しうることも示唆された。LC の所属リンパ節への遊走に重要なケモカイン受容体のうち、CXCR4 の発現はケラチノサイトとの相互作用がなくとも MSU 刺激のみで促進されうるが、CCR7 の発現促進にはケラチノサイトとの相互作用が必要である可能性が強いこともわかった。実際に、in vivo の migration assay にて MSU 刺激は LC の所属リンパ節への遊走を促進すること、IL-18 が無い条件下ではその促進作用が 9 割近く抑制されることが示された。MSU 共刺激が DNFB による Th1 型の皮膚接触過敏反応を増強したことから、MSU 刺激は皮膚免疫反応において少なくとも Th1 反応を増強・誘導する可能性が示唆された。

さらに、MSU 刺激された LC から分泌されるサイトカインプロファイルを検討したところ、LC が所属リンパ節へ到着後には、比較的低濃度の MSU 刺激を受けていた場合は Th17 と Th1 を同時にあるいはそれぞれ個別に誘導しうること・比較的高濃度の MSU 刺激を受けていた場合は Th17 と Th2 を同時にあるいはそれぞれ個別に誘導しうることをわかった。よって、組織障害の度合いを反映すると思われる MSU の量により免疫応答の発動は厳密に調節されている可能性があることがわかった。以上より、MSU 結晶は自然免疫・獲得免疫・腫瘍免疫の誘導や増幅を目的としたアジュバンド刺激物質として利用可能かもしれない

い。MSU の臨床応用の可能性を含めて、今後もさらなる検討の価値があると考えられる。

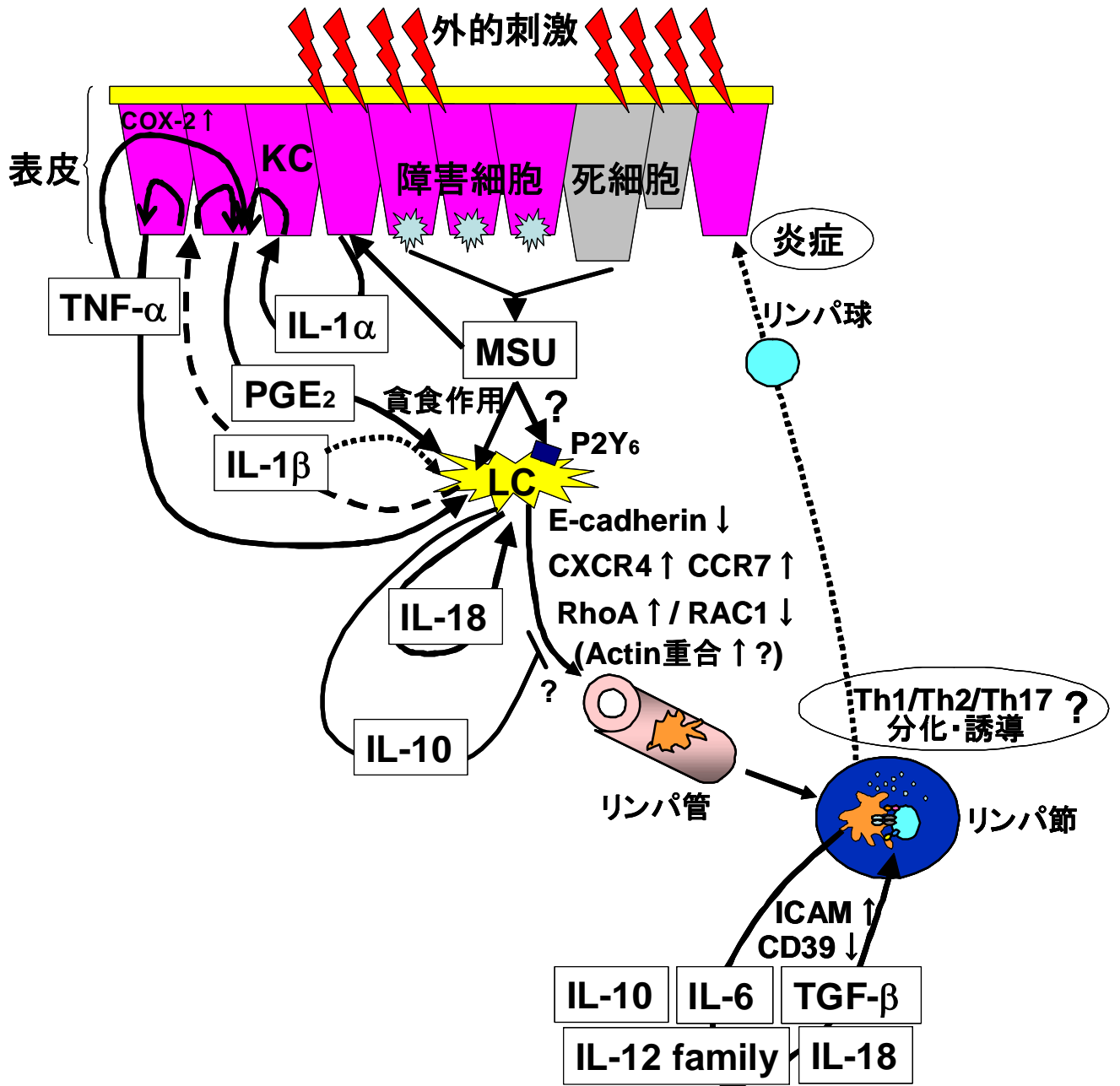


図. MSU の皮膚免疫における位置付けの模式図。  
 LC からの IL-1β分泌については MSU 刺激による影響を受けない。