



Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia.

Shimoura, Noriko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6972号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006972>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia.

Interleukin (IL)-18 は、IL-23 と協働して顕著な炎症を誘導し、乾癬様表皮過形成を増強する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
皮膚科学
(指導教員：錦織 千佳子 教授)

下 浦 典 子

乾癬は、世界中で人口の 2-3% に影響を及ぼす慢性炎症性皮膚疾患である。その病因は完全には明らかとなっていないが、Interleukin(IL)-23/IL-17 axis が乾癬の病因に強く関連していることが報告されている。IL-23 は、自己免疫性炎症疾患に関連する T helper (Th) 17 細胞の増殖と維持を促進する重要なサイトカインである。IL-18 は、マクロファージ、樹状細胞、内皮細胞や角化細胞を含む多くの異なる細胞型で産生されるサイトカインである。IL-18 は、強力な炎症誘発性サイトカインである一方、ある疾患や免疫環境によっては抑制性の作用を有することも明らかになってきている。これまでの研究から、IL-18 は初期段階の活動性かつ進行性の局面型ヒト乾癬皮膚病変において発現が上昇しており、また乾癬患者における血清、もしくは血漿中の IL-18 レベルは、乾癬病変の範囲と重症度に相関性を示すことが明らかにされている。しかしながら、IL-18 が乾癬病変の重症化に影響する機序に関しては、まだ解明されていない。本研究において我々は、マウス IL-23 組み換え蛋白による乾癬様皮膚炎モデルを用いて、IL-18 が及ぼす影響を調べた。

(方法) 8 週齢のメスの C57BL/6 マウスを使用した。マウス背部を毛剃りし、同部にマウス IL-23 組み換え蛋白 (2 µg)、および IL-18 組み換え蛋白 (1 µg) を以下の組み合わせの 4 群で設定し皮下注射を行った (①IL-23 単独群、②IL-23+IL-18 群、③IL-18 単独群、④PBS 群)。注射は 4 日間連日行い、5 日目に皮膚を採取した。採取した皮膚の半分を病理組織学的解析に用い、残りは遺伝子発現解析用に RNA 抽出を行った。

(結果と考察) まず初めに肉眼的所見の評価を行った。IL-23 単独群においては注射部に淡い紅斑と軽度の鱗屑を認めた。IL-23+IL-18 群については IL-23 単独群に比較して紅斑や鱗屑が増強する傾向を認めた。IL-18 単独群、PBS 群では明らかな紅斑、鱗屑は認めなかった。次に皮膚組織を採取する際に、炎症部位の皮膚組織片の厚さをマイクロメーターを用いて測定した。IL-23 単独群は PBS 群に比べ組織厚が有意 ($P < 0.05$) に増しており、IL-23+IL-18 群においてはさらに組織厚が増加し、IL-23 単独群と有意差を示した ($P < 0.01$)。IL-18 単独群においては PBS 群と有意な差を認めなかった。次に病理組織学的に検討を加えた。ヘマトキシリン・エオジン染色標本にて、各群の表皮の厚さを計測したところ、組織厚の結果と同様、IL-23 単独群において PBS 群に比較し有意 ($P < 0.01$) な表皮肥厚を認め、IL-23+IL-18 群では IL-23 単独群よりさらに表皮は肥厚し有意差を示した ($P < 0.05$)。IL-18 単独群は PBS 群と有意差を認めなかった。また、真皮から皮下脂肪組織内の細胞浸潤の評価を行うと、IL-23 単独群で明らかな炎症細胞浸潤を認め、IL-23+IL-18 群においては IL-23 単独群よりもより顕著な細胞浸潤を伴っていた。IL-18 単独群では上記の表皮肥厚は示さなかったが、炎症細胞浸潤は IL-23 単独群と同程度認めた。PBS 群では、細胞浸潤はほとんど認められなかった。ヒトの乾癬の病理組織で特徴的所見の 1 つである Munro の微小膿瘍と類似の所見は IL-23 単独群においても少数認めたが、IL-23+IL-18 群においてはより顕著となっていた。

次に、4 群の皮膚組織におけるサイトカインおよびケモカインの発現をリアルタイム PCR 法で解析した。乾癬の病態に深い関与が示唆されている IL-17 や IL-22 は、IL-23 単

独群および IL-23+IL-18 群において強い発現増強を認めたが、IL-23 単独群と IL-23+IL-18 群の間には有意な差を認めなかった。IL-18 単独群では IL-17 と IL-22 の発現増加を認めなかった。ケモカインの検索では、ケモカイン(C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)の発現が、IL-23+IL-18 群において非常に高値となっており、IL-23 と IL-18 による相乗作用を確認できた。IL-18 単独群については CXCL9 の増加傾向を認めるものの、IL-23+IL-18 群ほどの強い増加は認めなかった。CXCL9 の受容体である CXCR3 を同じく受容体とする CXCL10 においては、それぞれの群間での発現増強の差を認めなかった。CXCL9 と CXCL10 は interferon (IFN)- γ から誘導されるケモカインの 1 つとして知られている。IFN- γ の発現は、CXCL9 と同様に IL-23+IL-18 群で増強を認め、IL-23 と IL-18 による相乗作用を認めた。IFN- α は、PBS 群と比較し IL-23 単独群での発現増強を認めたが、IL-23 単独群と IL-23+IL-18 群の間には差は認めなかった。

リアルタイム PCR の結果で、強い発現増加を認めた CXCL9 の局在を検索するために、CXCL9 の免疫組織染色を行った。CXCL9 は、IL-23+IL-18 群の真皮と皮下脂肪組織の炎症細胞周囲において強く陽性に染色された。ヒトの乾癬組織では、CXCL9 陽性のマクロファージの存在が報告されているため、浸潤細胞にマクロファージが含まれているかを調べるために F4/80 に対する免疫染色を行った。その結果浸潤細胞の約半分が F4/80 陽性のマクロファージであることがわかった。リアルタイム PCR 解析でも、IL-23+IL-18 群は、IL-23、IL-18 単独群に比較して有意に F4/80 の mRNA 発現の増強を認めた。ヒトと同様に CXCL9 発現細胞がマクロファージであるのかを確認するために、単球/マクロファージを生体で除去可能な抗 Ly6G/Ly6C 抗体を用いる解析を行った。IL-23+IL-18 の処置を行うマウスに抗 Ly6G/Ly6C 抗体の腹腔内投与を行う群と、非投与群とを設定し、皮膚組織を採取しリアルタイム PCR 解析を行ったところ、F4/80 については部分的だが有意な減少を確認できたものの、CXCL9 の有意な発現減少は確認できなかった。ヒトの乾癬病変部における樹状細胞が CXCL9 を発現するとの既報告も存在するため、CD11c 発現をリアルタイム PCR で確認した。その結果、CD11c も IL-23+IL-18 群では IL-23 単独群に比べ発現増強を認めた。今回の我々のモデルにおける CXCL9 発現細胞の一部は樹状細胞なのかもしれない。IL-18 が直接的に p38 MAP kinase (mitogen-activated protein kinase)を介して、T-bet を活性化するという報告があるため、IL-23+IL-18 群における CXCL9 の発現増強機序に p38 MAP kinase が関与しているかを p38 kinase inhibitor である SB203580 を用いて調べた。IL-23+IL-18 の処置を行うマウスに SB203580 の全身投与を行ったが、炎症反応の抑制は確認できず、また T-bet および CXCL9 の発現減少も確認できなかった。

IL-23 を使用した乾癬のマウスモデルでは、 $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17 と IL-22 の産生に関与することが報告されている。また、*in vitro* の解析にて IL-18 と IL-23 は $\gamma\delta$ T 細胞に作用して相乗的に IL-17 と IL-22 の産生を誘導することが示されている。そのため、我々のモデルの IL-23+IL-18 群における皮膚炎症と乾癬様表皮過形成の増強は、IL-17 と IL-22 の有意な発現増強によるものと予想していた。しかし、IL-17 と IL-22 の有意な発現変化は認めず、

Th1 反応の有意な増強が認められた。乾癬は元々 Th1 免疫反応性皮膚疾患と考えられていたが、近年では Th17 免疫反応性が主体の疾患と考えられている。しかし、乾癬病変部には Th1 細胞や IFN- γ が増加していることも明らかとなっている。Th1 細胞はケモカインレセプター CXCR3 や CCR5 を発現しており、そのリガンドである CXCL9 や CCL5 などによって遊走制御される。我々のモデルにおいても、IL-23+IL-18 群において CD4 と CCL5 の有意な発現増加を確認している。興味深いことに、ヒトの乾癬において、末梢血中の CCR5+CD4⁺T 細胞が乾癬の病勢と有意な相関を示すことが報告されており、Th1 免疫反応が病勢あるいは病態形成に寄与することが示唆されている。

(結論) 乾癬病変部の IL-18 は、IL-23/IL-17 axis を妨げることなく、IL-23 と相乗的に Th1 免疫反応を誘導することで、乾癬性炎症を増悪させている可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2701号	氏名	下浦 典子
論文題目 Title of Dissertation	Interleukin (IL)-18 は、IL-23 と協働して顕著な炎症を誘導し、 乾癬様表皮過形成を増強する Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia.		
審査委員 Examiner	主 査 森 信 晴 雄 Chief Examiner 副 査 伊 藤 智 雄 Vice-examiner 副 査 酒 井 良 忠 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【緒言】
 乾癬は、世界中で人口の2-3%に影響を及ぼす慢性炎症性皮膚疾患である。その病因は完全には明らかでないが、Interleukin (IL)-23/IL-17 axis が乾癬病因に強く関連すると報告されている。IL-18 は、マクロファージ、樹状細胞、内皮細胞や角化細胞を含む多く細胞型で産生されるサイトカインである。以前の研究から、IL-18 は初期の活動性局面型ヒト乾癬皮膚病変において発現が上昇しており、また乾癬患者における血清 IL-18 レベルは、乾癬病変の重症度に相関性を示す。しかし、IL-18 が乾癬病変の重症化に影響する機序に関しては、まだ解明されていない。本研究では、マウス IL-23 組み換え蛋白による乾癬様皮膚炎モデルに対し IL-18 が及ぼす影響を調べた。

【方法】
 8週齢メスの C57BL/6 マウスを使用した。マウス背部を毛剃りし、同部にマウス IL-23 組み換え蛋白 (2 μg)、および IL-18 組み換え蛋白 (1 μg) を以下の4群で設定し皮下注射を行った (①IL-23 単独群、②IL-23+IL-18 群、③IL-18 単独群、④PBS 群)。注射は4日間連日行い、5日目に皮膚を採取した。採取した皮膚の半分を病理組織学的解析に用い、残りは遺伝子発現解析用に RNA 抽出を行った。

【結果と考察】
 肉眼的所見では、IL-23 単独群においては注射部に淡い紅斑と軽度の鱗屑を認めた。IL-23+IL-18 群では IL-23 単独群に比較し紅斑や鱗屑が増強する傾向を認めた。炎症部位の皮膚組織片の厚さを測定したところ、IL-23 単独群は PBS 群に比べ組織厚が有意に増し、IL-23+IL-18 群ではさらに組織厚が増した。IL-18 単独群では PBS 群と有意差を認めなかった。病理組織学的検討では、ヘマトキシリン・エオジン染色標本にて、各群の表皮の厚さは組織厚と同様の結果を示した。また、真皮から皮下脂肪組織内の細胞浸潤の評価を行うと、IL-23 単独群で炎症細胞浸潤を認め、IL-23+IL-18 群においては IL-23 単独群よりも顕著な細胞浸潤を伴っていた。IL-18 単独群では炎症細胞浸潤は IL-23 単独群と同程度認めなかった。PBS 群では、細胞浸潤はほとんど認めなかった。

次に、4群の皮膚組織におけるサイトカインおよびケモカインの発現をリアルタイム PCR 法で解析した。乾癬の病態に関与が示唆される IL-17 や IL-22 は、IL-23 単独群と IL-23+IL-18 群の間には有意差を認めなかった。ケモカインの検索では、CXCL9 の発現が、IL-23+IL-18 群において著明な高値となっており、IL-23 と IL-18 による相乗作用を確認できた。CXCL9 の受容体である CXCR3 を同じく受容体とする CXCL10 では、群間での発現増強の差を認めなかった。IFN-γ の発現は、IL-23 と IL-18 による相乗作用を認めた。IFN-α の発現は、IL-23 単独群と IL-23+IL-18 群の間に差を認めなかった。

免疫組織染色では、CXCL9 は、IL-23+IL-18 群の真皮と皮下脂肪組織の炎症細胞周囲に強く染色された。ヒトの乾癬組織では、CXCL9 陽性のマクロファージの存在が報告されているため、F4/80 に対する免疫染色を行った。その結果浸潤細胞の約半分が F4/80 陽性であることがわかった。リアルタイム PCR 解析でも、IL-23+IL-18 群は、IL-23、IL-18 単独群に比較して有意に F4/80 の mRNA 発現の増強を認めた。ヒトの乾癬病変部における樹状細胞が CXCL9 を発現するとの既報告も存在するため、CD11c 発現をリアルタイム PCR で確認した。その結果、CD11c も IL-23+IL-18 群では IL-23 単独群に比べ発現増強を認めた。

IL-23 を使用した乾癬のマウスモデルでは、 $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17 と IL-22 の産生に関与し、*in vitro* の解析にて IL-18 と IL-23 は $\gamma\delta$ T 細胞に作用して相乗的に IL-17 と IL-22 の産生を誘導することが示されている。そのため、我々のモデルの IL-23+IL-18 群における皮膚炎症と乾癬様表皮過形成の増強は、IL-17 と IL-22 の有意な発現増強によるものと予想していた。しかし、IL-17 と IL-22 の有意な発現変化は認めず、Th1 反応の有意な増強が認められた。

【結論】

乾癬病変部の IL-18 は、IL-23/IL-17 axis を妨げることなく、IL-23 と相乗的に Th1 免疫反応を誘導することで、乾癬性炎症を増悪させている可能性がある。

本研究は、乾癬皮膚病変におけるサイトカインの役割を研究したものであるが、従来明らかでなかった IL-18 の乾癬における役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。