

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：小牧 玲雄

専攻分野：皮膚科学

指導教授：門野 岳史

主論文の題目：

Increased Interleukin-36 β Expression

Promotes Angiogenesis in Japanese Atopic Dermatitis

(日本人のアトピー性皮膚炎において Interleukin-36 β の発現上昇は血管新生を促進する)

共著者：

Tomomitsu Miyagaki, Miho Tanaka, Kaori Nakajima,
Tatsuro Okano, Sora Takeuchi, Takafumi Kadono

緒言

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis: AD) は Th2 細胞が病態の中心的役割を果たしている疾患と考えられているが、他の種類の炎症性サイトカイン (Cytokine: CK) の増加も認められており、それらも疾患の発症に関与している可能性が示唆されている。実際に、近年 AD における抗 Interleukin (IL) -36 受容体抗体の有効性が臨床試験で実証されている。AD における IL-36 α および IL-36 γ の発現と機能に関する報告はいくつかあるが、IL-36 β の研究報告は殆どない。今回我々は AD における IL-36 β の発現と機能を AD 患者サンプルと表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を使用して、検討した。

方法・対象

まず、AD の病変部皮膚組織 10 例及び健常皮膚 10 例を用いて、免疫組織化学染色にて、IL-36 β を含めた関連蛋白の皮膚における発現を検討した。次に、AD 患者 36 名及び健常者 15 名の血清を用いて ELISA 法で血清中 IL-36 β 濃度を測定した。また AD 患者でデュピルマブ（抗 IL-4/IL-13 受容体抗体）で治療を行った患者において、治療前後の血清中 IL-36 β 濃度を比較した。さらに、IL-36 β の機能を調べるために HaCaT 細胞を様々な濃度の IL-36 β で刺激し、細胞上清と mRNA を抽出した。また一部の実験では、IL-36 β で刺激前に U0126 (MEK1/2 阻害剤)、SB203580 (p38 MAPK 阻害剤)、LY294002 (PI3K 阻害剤)、sc-514 (IKK β 阻害剤) で HaCaT 細胞の処理を行った。mRNA は相補的な DNA を作成し、real-time RT-PCR 法にて各種遺伝子の発現を測定し、ELISA 法にて培養上清中の蛋白濃度を確認した。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（承認番号 5970 号、5666 号）の承認を得たものである。統計は Mann-Whitney U 検定、Steel-Dwass 検定、対応のある t 検定、スピアマンの順位相関検定を用いた。

結果

組織検体を用いた免疫染色にて AD の病変部皮膚では健常皮膚よりも IL-36 β の発現が増加していた ($P < 0.05$)。また過去の報告と同様に IL-36 α および IL-36 γ も AD 皮膚で発現が増加していた。

一方で、AD 患者と健常者の血清中 IL-36 β 濃度を ELISA 法で測定したところ AD 患者の方が高い傾向があったが有意差は認められなかった。ただデュピルマブの投与前後で

血清中 IL-36 β 濃度は減少した ($P < 0.05$)。

HaCaT 細胞を IL-36 β で刺激したところ、vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) および placental growth factor (PlGF) の mRNA の発現の上昇が見られた ($P < 0.05$)。また培養上清の ELISA 法にて、VEGF-A の蛋白レベルでの発現上昇が確認された ($P < 0.05$)。一方で、PlGF のタンパク質濃度は ELISA Kit の発現感度以下であり、蛋白レベルで発現上昇は確認できなかった。

HaCaT 細胞に選択的経路阻害剤である U0126、SB203580、LY294002、sc-514 で処理した後に IL-36 β で刺激したところ、ERK 経路に関係する阻害剤である U0126 で処理したときのみ、VEGF-A の産生促進が阻害された ($P < 0.05$)。

以上の結果から、AD の病変部皮膚では、IL-36 β の発現が上昇し、表皮角化細胞から VEGF-A の産生を促進し、血管新生を誘導している可能性が考えられた。実際に、免疫化学染色にて、AD 病変皮膚では健常皮膚と比較して、表皮角化細胞における VEGF-A の発現が上昇しており、IL-36 β の発現度と CD34 陽性の小血管数の間には、正の相関が確認された ($r = 0.64$, $P < 0.05$)。一方で、AD の病変部皮膚と健常皮膚で PlGF の発現には差が見られなかった。

考察

AD における抗 IL-36 受容体抗体の有効性が臨床試験で実証され、AD の発症における IL-36 CKファミリーの関与が注目を集めている。本研究では、IL-36 β が AD の病変部皮膚において主に表皮角化細胞によって発現され、その発現レベルが健常皮膚と比較して高いことを免疫組織染色により初めて示した。IL-36 β 発現は、主に Th17 CK によって誘

導される。過去の研究ではアジア人の AD 患者は病変部における Th17 細胞数や Th17 関連 CK の発現が上昇していることが報告されており、それゆえ、今回対象とした日本人 AD 患者の病変部皮膚において、IL-36 β が上昇していたと考えられた。

一方で、AD 患者における血清中 IL-36 β 濃度の上昇は確認されなかった。AD の発症に重要と考えられる CK 中には、皮膚では上昇しているが血中では増加していない CK の存在も過去に報告されており、AD では病変部皮膚のみで機能を有している CK 群が想定されている。IL-36 β もそれらの CK と同様であることが示唆された。

AD の病変部皮膚における IL-36 β の機能を調べるために、HaCaT を IL-36 β で刺激したところ、強力な血管増生因子である VEGF-A の mRNA、蛋白発現が促進されることが分かった。過去の研究では IL-36 α および IL-36 γ が VEGF-A を誘導し、血管新生を促進することで、皮膚炎症性疾患の発症に関連していることが報告されている。同様に、IL-36 β も VEGF-A の発現促進により血管新生を促し AD の病態に寄与している可能性が考えられた。また実際に、AD の病変部皮膚の表皮角化細胞における IL-36 β の発現度が真皮内の血管数と有意に相関していた。蛋白レベルでの誘導は検出されなかったが、IL-36 β が HaCaT 細胞において、別の血管増生因子である PlGF の mRNA 発現を促進することも新たに発見した。この PlGF の上昇も血管新生に寄与し、AD の病態に関与している可能性も示唆された。

結論

IL-36 β は AD の皮膚において上昇しており、ERK1/2 経路

を介して VEGF-A と PlGF の発現促進をする事により、血管新生を誘導し、AD の病態形成に関与している可能性が考えられた。