

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461684

研究課題名(和文) マウス乾癬様皮膚炎モデルにおけるTLR2およびTLR4の役割の解明

研究課題名(英文) The roles of TLR2 and TLR4 in mouse imiquimod-induced psoriasis model

研究代表者

藤田 英樹 (FUJITA, Hideki)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10323544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TLR2ノックアウト(TLR2-KO)マウスではイミキモド誘発乾癬様皮膚炎が野生型(WT)マウスと比べて増強するが、TLR4-KOマウスではWTマウスと同等であった。TLR2-KO群ではWT群と比べて、Day2の病変部皮膚におけるTh1サイトカインの発現が上昇し、Th17サイトカインとFoxp3の発現は低下していた。皮膚所属リンパ節では、Day2でTLR2-KO群ではWT群と比べてTGF- $\beta$ の発現およびCD4(+)Foxp3(+)細胞が減少していた。Th1サイトカインの上昇と制御性T細胞の数的および機能的異常がTLR2-KOマウスにおける乾癬様皮膚炎の増強に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis was exacerbated in TLR2-deficient (TLR2(-/-)) mice compared to wild type (WT) mice, while it was comparable between TLR4-deficient and WT groups. In the lesional skin on day 2, the expression levels of Th1 cytokines were higher in TLR2(-/-) mice than those in WT mice. On the other hand, the expression of Th17 cytokines and Foxp3 was decreased in TLR2(-/-) mice compared to WT mice. In the skin draining lymph node, the expression of TGF-beta and the number of CD4(+)Foxp3(+) cells was decreased in TLR2(-/-) mice relative to WT mice on the day 2 of imiquimod application. Taken together, elevated Th1 cytokines and suppression of regulatory T cells may account for the exacerbation of imiquimod-induced psoriasis dermatitis observed in TLR2(-/-).

研究分野：皮膚免疫

キーワード：TLR 乾癬 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

乾癬は代表的な皮膚の慢性炎症性疾患の一つであり、組織学的に著明な表皮肥厚を特徴とし、さらに病変部皮膚へのT細胞や樹状細胞などの炎症細胞浸潤を伴う。その正確な病因は不明であるものの、病態への自己免疫的な機序の関与が強く想定されており、特にT細胞性免疫が深く関わる。免疫学的にはTh17とTh1が関わる疾患と考えられており、近年特にTh17の経路が重要であると考えられていた。乾癬は非常に難治であり患者の生活の質を大きく損なう疾患であることが明らかにされており、さらに現在ある治療法だけでは十分であるとは言えないため、新たな分子をターゲットとした更なる治療法の開発が望まれていた。

Toll様受容体(Toll-like receptor (TLR))は細菌やウイルス等の病原体に存在する特有の分子パターンを認識するレセプターであり、インターフェロンや炎症性サイトカイン産生の誘導や、プロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞の成熟・活性化を介してリンパ球に感染防御のシグナルを伝達する過程で重要な役割を果たす。ヒトにおいては10種類のTLRが存在し、それぞれ異なる分子パターンの病原体由来成分を認識し生体防御応答を誘導する近年、各種TLRは微生物由来成分のみならず、危険シグナルとして産生・放出された自己由来の内因性因子も認識し、非感染性の炎症反応にも関わるということが明らかになっていった。そのためTLRの炎症性疾患や慢性疾患、全身性自己免疫疾患の病態への関与が注目されていた。

乾癬の病態におけるTLRの関与については研究が非常に少なく、不明な点が多い。TLR2はグラム陽性菌のペプチドグリカン、リポタイコ酸やポーリン、結核菌のピポアラビノマンナンなどを認識する。その一方で、TLR4は主にグラム陰性菌のリポ多糖体を認識する。これらのTLRは乾癬とのかかわりも指摘され

ており、これまで乾癬病変部表皮でのTLR2やTLR4の発現の増強や、表皮内での正常皮膚と比べての発現パターンの変化が報告されていた。さらに、一般にT細胞性免疫応答は強力な抗原提示細胞である樹状細胞によってコントロールされるが、樹状細胞もTLR2やTLR4を発現しておりこれら分子からのシグナルが樹状細胞によるTh17やTh1細胞の活性化において重要である。また乾癬病変部では多数のマクロファージが見られ乾癬の病態においてきわめて重要なサイトカインであるTNF- $\alpha$ を産生するが、マクロファージもまたTLR2やTLR4を発現する。乾癬においては、inducible nitric oxide synthase(iNOS)とTNF- $\alpha$ を産生する炎症性の真皮樹状細胞がIL-23産生を通して乾癬に特徴的なTh17反応を誘導すると考えられていた。重要なことに、この真皮炎症性樹状細胞は常在型真皮樹状細胞と比べTLR2を高発現していることが示されている。興味深いことにTLR2は*Listeria monocytogenes*のレセプターとなっており、マウスにおけるこの病原体の感染は上記のiNOSとTNF- $\alpha$ を産生する樹状細胞を誘導する。さらに乾癬表皮で過剰産生される $\alpha$ -ディフェンシンやheat shock protein (HSP) 60はTLR2やTLR4の内因性リガンドであることが知られていた。よって真皮炎症性樹状細胞がTLR2および4シグナルによって活性化されることで乾癬病変部皮膚でのTh17およびTh1反応が増幅・維持され、さらに角化細胞からの炎症性メディエーターの産生がTLR2および4シグナルによって増幅されていることが想定された。このため乾癬におけるTLR2および4の役割の解明は乾癬の詳しい病態を明らかにする上で必須であると考えられた。

しかしながら乾癬の病態におけるTLR2/4の役割についてはヒトでの研究には限界があり、動物モデルの解析が有用であると考えられた。マウス皮膚にTLR7/8のアゴニストで

あるイミキモドを繰り返し塗布することで、表皮肥厚を伴う乾癬様の皮膚炎が引き起こされることが知られていた。さらにヒトにおいても乾癬患者でイミキモドクリームの外用にて乾癬皮疹が誘発された例が報告されていた。乾癬は免疫学的には IL-23/Th17 系の反応が病態の中心をなすと考えられているが、このイミキモドにより誘導されたマウス乾癬様の皮膚炎においても IL-23/Th17 系反応が中心的な役割を果たすことが示されており、乾癬の病態を研究する上でのよいモデルシステムであると考えられていた。

## 2. 研究の目的

以上より本研究の目的はイミキモド誘発性マウス乾癬様皮膚炎モデルにおける TLR2 および TLR4 の役割を解明することであった。そのために TLR2 および TLR4 それぞれのノックアウトマウスさらに TLR2 および TLR4 のダブルノックアウトマウスを用いた。

## 3. 研究の方法

TLR2 ノックアウトマウス、TLR4 ノックアウトマウス、TLR2/4 ダブルノックアウトマウスを先ず繁殖させた。5%イミキモドクリームを剃毛した背部皮膚に6日間連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。背部皮膚の肉眼的な皮膚炎の状態に関し、紅斑・鱗屑・浸潤の程度をそれぞれ5段階(0なし 1軽度 2中等度 3高度 4著明)で点数化し、皮疹スコアの合計点を経時的に算出した。さらに、また、惹起した皮膚炎部および皮膚所属リンパ節における、乾癬の病態形成に関与すると考えられているサイトカインやケモカイン等の mRNA 発現を real-time PCR 法で解析することによって、それぞれの TLR の欠損による皮膚炎の変化とどのサイトカインやケモカインの発現の変化が関連しているかを解析した。また、皮膚所属リンパ節から細胞を分離し、フローサイトメトリーにて CD4 陽性 T 細胞に

おける制御性 T 細胞のマスター制御遺伝子である Foxp3 の発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1) TLR2 ノックアウトマウスは day2 以降 day5 まで、野生型マウスと比べて、背部皮膚の紅斑・鱗屑・浸潤の皮疹スコアの合計点が有意に高かった。TLR4 ノックアウトマウスでは day0 以降 day5 まで、野生型マウスと比べて、背部皮膚の紅斑・鱗屑・浸潤の皮疹スコアの合計点には有意な差はなかった。TLR2/4 ダブルノックアウトマウスでは day2 以降 day5 まで、野生型マウスと比べて、背部皮膚の紅斑・鱗屑・浸潤の皮疹スコアの合計点が有意に高かった。また TLR4 ノックアウトマウス比でも TLR2/4 ダブルノックアウトマウスの背部皮膚の紅斑・鱗屑・浸潤の皮疹スコアの合計点は day2 以降 day5 まで有意に高かった。TLR2 ノックアウトマウスと比べると TLR2/4 ダブルノックアウトマウスの背部皮膚の紅斑・鱗屑・浸潤の皮疹スコアの合計点には有意な差はなかった。(図1, 2)



図1 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウス、TLR2/4 ダブルノックアウト (TLR2/4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。Day5 での臨床像。

## 臨床症状

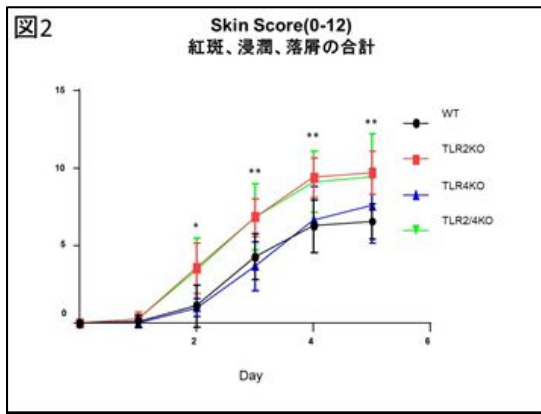


図 2 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウス、TLR2/4 ダブルノックアウト (TLR2/4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。各群の皮疹スコア (紅斑・鱗屑・浸潤の合計) の経時的変化。

(2) イミキモド外用後の皮膚において TLR2 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて、IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, p35, p28, EBI3 の発現の上昇がみられた。また、TLR2 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて、IL-10, IL-17, IL-22, CCL20, p19, p40 の発現は逆に低下していた。さらに、制御性 T 細胞のマスター転写因子である Foxp3 のイミキモド外用部での発現が TLR2 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて低下していた。TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の発現は TLR2 ノックアウトマウスで高かった。IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10, p35, p28, EBI3 は Th1 系のサイトカインであり、その一方 IL-17, IL-22, CCL20, p19 は Th17 系のサイトカインであることを考えると、イミキモド外用にて Th17 系のサイトカインの発現は低下し、Th1 系のサイトカインの発現は上昇していることになる。(図 3-6)

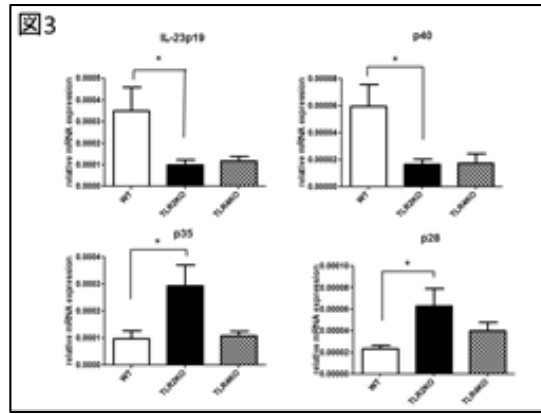


図 3 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。イミキモドを外用した皮膚を Day2 で採取し mRNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて IL-23p19, p40, p35, p28 の発現を検討した。

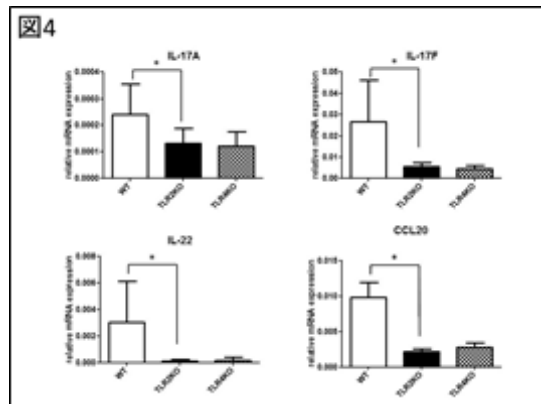


図 4 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。イミキモドを外用した皮膚を Day2 で採取し mRNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて IL-17A, IL-17F, IL-22, CCL20 の発現を検討した。

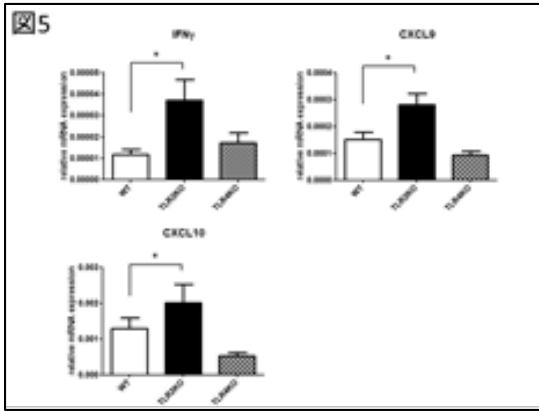


図 5 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。イミキモドを外用した皮膚を Day2 で採取し mRNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて IFN- $\gamma$ 、CXCL9、CXCL10 の発現を検討した。

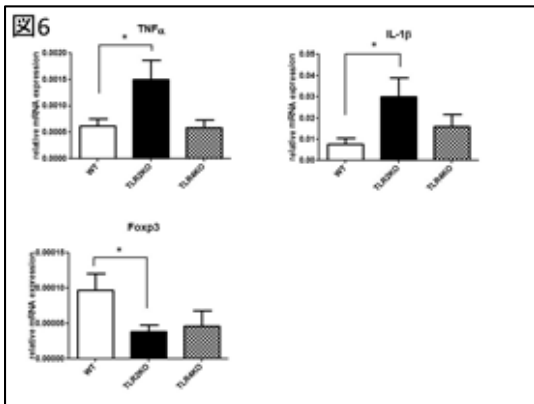


図 6 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。イミキモドを外用した皮膚を Day2 で採取し mRNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、Foxp3 の発現を検討した。  
(3) 皮膚所属リンパ節においては、TLR2 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比べて TGF- $\beta$  の発現が低下していた。また CD4 陽性細胞中の Foxp3 陽性細胞の割合が低下していた。(図7)

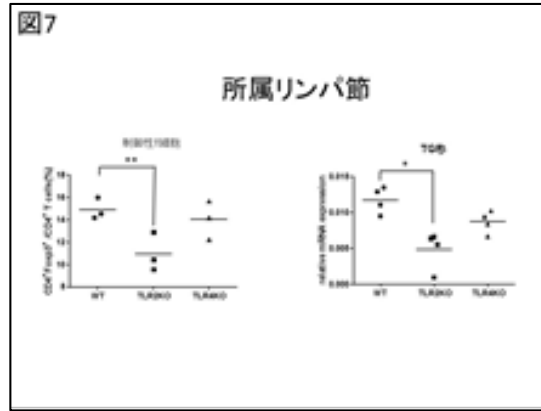


図 7 TLR2 ノックアウト (TLR2KO) マウス、TLR4 ノックアウト (TLR4KO) マウスの剃毛した背部皮膚に5%イミキモドクリームを6日間 (day0-5) 連日塗布して乾癬様皮膚炎を誘導した。イミキモドを外用した皮膚の所属リンパ節を Day2 で採取し mRNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて TGF- $\beta$  の発現を検討した。またリンパ節中の CD4 陽性 T 細胞中の Foxp3 発現細胞の割合をフローサイトメトリーにて検討した。

以上の結果から、IFN- $\gamma$ 、CXCL9、CXCL10、p35、p28、EBI3 は Th1 系のサイトカインであり、IL-17、IL-22、CCL20、p19 は Th17 系のサイトカインであることを考えると、イミキモド外用にて Th17 系のサイトカインの発現は低下し、Th1 系のサイトカインの発現は上昇していることになる。また、IL-10 や TGF- $\beta$  は抑制性のサイトカインとして知られている。乾癬は通常 Th17/Th1 が関わる疾患であることを考えると、皮膚局所における Th1 系サイトカインの上昇と皮膚および所属リンパ節での制御性 T 細胞の数的および機能的異常が TLR2 ノックアウトマウスでのイミキモド誘発乾癬様皮膚炎の増強に関与している可能性が考えられ、この点をターゲットとした乾癬の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 英樹 (FUJITA, Hideki)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号：10323544

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：