

皮膚疾患における炎症に関与するサイトカイン産生 細胞および線維化に関わる遺伝子発現についての研 究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2018-08-28
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 増子, 峻矢
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/74897

皮膚疾患における

炎症に関与するサイトカイン産生細胞および 線維化に関わる遺伝子発現についての研究

増子 峻矢

序論	5
第1章 乾癬病変部における IL-17 および IL-22 陽性細胞についての検討 1	.1
1. 緒言 1	.1
2. 実験材料および方法1	.4
2.1 皮膚検体1	.4
2.2 実験方法および試薬1	.4
2.2.1 ウステキヌマブを用いた研究計画1	.4
2.2.2 ヒト皮膚組織からの細胞単離1	5
2.2.3 qRT-PCR 1	.7
2.2.4 細胞の形態学的検討1	.7
2.2.5 QuantiGene®Flow RNA 解析1	.8
2.2.6 FACS 解析1	.8
2.3 統計学的解析1	.8
3. 実験成績1	9
3.1 乾癬の病変部から回収した皮膚免疫細胞の特徴1	9
3.2 乾癬の病変部における IL-17 および IL-22 陽性細胞 2	21
3.3 マスト細胞おいて陽性であるサイトカインの検討2	23
3.4 マスト細胞とT細胞における IL-22 および IL-17の mRNA の定量解析.2	25
3.6 ウステキヌマブ抵抗性病変部における IL-17 陽性細胞 2	27
4. 考察	28
第2章 アトピー性皮膚炎病変部における IL-4 および IL-13 陽性細胞についての)
検討	33
1. 緒言	33

目次

2.	実験材料および方法	37
2.	.1 皮膚検体	37
2.	.2 実験方法および試薬	37
	2.2.1 ヒト皮膚組織からの細胞単離	37
	2.2.2 ヒト血液中の循環性細胞の精製	38
	2.2.3 培養刺激	39
	2.2.4 細胞の形態学的検討	39
	2.2.5 FACS 解析	39
2.	.3 統計学的解析	39
3.	実験成績	40
3.	.1 アトピー性皮膚炎の病変部へ浸潤が示された T 細胞の検討	40
3.	.2 アトピー性皮膚炎患者の血液中における T細胞の検討	42
3.	.3 アトピー性皮膚炎の病変部へ浸潤が示された ILC の検討	44
3.	.4 アトピー性皮膚炎患者の血液中における ILC の検討	46
3.	.5 アトピー性皮膚炎の病変部における CD3 ⁻ Fc ε R I ⁺ 細胞の検出	48
3.	.6 アトピー性皮膚炎の病変部における好塩基球およびマスト細胞の検出	49
3.	.7 アトピー性皮膚炎患者の血液中における好塩基球	51
3.	.8 アトピー性皮膚炎病変部における好塩基球および ILC の相関	52
3.	.9 アトピー性皮膚炎患者における血清 IgE および Th2 細胞の相関	53
3.	.10 アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における T 細胞のサイトカイン陽性率	š
Ø,	D検討	54
3.	.11 アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における好塩基球のサイトカイン陽性	
卒	図の検討	55
3.	.12 血液中の循環性細胞における Th2 サイトカイン陽性細胞	56
3.	.13 アトピー性皮膚炎における IL-22 陽性マスト細胞	58
4.	考察	60

第3章 新たなマウス強皮症モデルの作成および治療薬の影響6	4
1. 緒言	4
2. 実験材料および方法 6	7
2.1 マウスモデル6	7
2.2 実験方法6	7
2.2.1 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデル 6	7
2.2.2 ダビガトラン投与6	8
2.2.3 ヒドロキシプロリン解析6	9
2.2.4 免疫組織化学的検査(マッソントリクローム染色) 7	0
2.2.5 qRT-PCR	0
2.3 統計学的解析7	1
3. 実験成績7	2
3.1 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける皮	,
膚組織の線維化	2
3.2 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける肺	i
組織の線維化	3
3.3 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織	-
における細胞外基質に関連する遺伝子の mRNA の発現7	5
3.4 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織	-
における血管障害および線維化に関連する遺伝子の mRNA の発現7	6
3.5 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織	-
における転写調節因子の mRNA 発現7	7
3.6 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織	-
における線維化に関連する遺伝子の mRNA 発現7	8
3.7 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける皮	,
膚線維化に及ぼすダビガトランの影響8	0

3.8 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける細
胞外基質に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響 82
3.9 トポイソメラーゼ 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける血
管障害および線維化に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響
3.10 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける
線維化に関与する遺伝子の mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響 84
4. 考察
総括および結論
謝辞94
略語一覧
参考文献

皮膚は体表面の生体防御機能において重要な器官であり、物理的、化学的およ び生物的な外的要因から身を守っている。皮膚は表皮、真皮および皮下組織の3 層により構成されており、表皮と真皮の境界面には基底膜が存在している。さら に、外層に位置する表皮は下より基底層、有棘層、顆粒層および角層の4つの層 から、真皮は下から網状層や乳頭下層、乳頭層の3層から構成されている¹。

表皮の大部分は成熟するに従い表層へと移行するケラチノサイト(表皮角化細胞) で構成されており、異なる細胞形態および性質を呈したケラチノサイトの階層構造を持つ。他にもメモリー細胞障害性T(メモリーCD8陽性T:メモリーTc) 細胞、ランゲルハンス細胞²、メラニン細胞や表皮樹状細胞が存在しており¹、表皮は皮膚における水分保持や外からの病原菌およびアレルゲン物質の侵入を防ぐ上で重要な働きをしている^{3,4}。

一方、真皮はその大部分が線維質から構成されている性質上、表皮に比し剛性 および弾性に優れている。真皮の網状層は密な線維成分から成る強靭な結合織を なし、所々に血管や神経が走行している。乳頭層および乳頭下層はやや疎な結合 織からなり、その間隙中は脈管や神経、細胞成分に富んでいる。真皮もまた多く の細胞を有しており、自然リンパ細胞(innate lymphoid cell:ILC)、メモリー ヘルパーT(メモリーCD4 陽性 T:メモリーTh)細胞や獲得免疫に関与する Th/Tc 細胞、 $\gamma \delta T$ 細胞(主にマウス)、マスト細胞、間質細胞および抗原提示細胞など 多様な細胞群から成り立っている¹。

乾癬やアトピー性皮膚炎、強皮症などの免疫異常を伴う慢性的な皮膚疾患では、 自然免疫細胞および獲得免疫細胞の浸潤がみられる。乾癬およびアトピー性皮膚 炎は有病率が高く、表皮のケラチノサイト分化調節異常を特徴とした炎症性皮膚

序論

疾患である⁵。一方、強皮症は稀な疾患であり、真皮において線維化に先立ち炎症 が生じる自己免疫皮膚疾患である^{6,7}。皮膚は体表面を覆っている器官であり、侵 襲を伴う皮膚疾患は見た目に影響を与えるため、身体的だけでなく心理社会的ス トレスを患者に与える。それぞれの疾患の重症度と心理的な憂鬱は相関する^{8,9}こ とが報告されており、すなわち生活の質(Quality of life: QOL)にも関わって くる。それ故に、皮膚疾患原因の解明ならびに治療法の確立および改善は皮膚疾 患患者の QOL 向上のために必要不可欠であると考えられる。

乾癬は皮膚や関節に影響を及ぼす炎症性疾患であり、皮膚に対する外部からの 刺激または皮膚へのウイルス感染が引き金となり、皮膚の免疫応答が活性化され ることで発症する¹⁰と考えられている。また、一部の乾癬患者において共通の遺 伝子座に変異がみられるため遺伝子が原因で発症する¹⁰とも考えられている。し かしながら、詳しい発症機序は解明されておらず 、原因は未だ不明である。乾癬 において、活性化した皮膚免疫細胞はケラチノサイトの抗菌ペプチド産生を亢進 させる。次いで、産生された抗菌ペプチドは自己の DNA 断片と複合体を形成し、 皮膚免疫細胞をさらに活性化させる¹⁰。その結果、このようにして生じた持続的 な免疫異常は慢性的な炎症およびケラチノサイトの分化調節機能異常をもたらし ^{10,11}、乾癬の典型的な症状を生じさせる。すなわち、境界が鮮明であり皮膚よりや や隆起した紅斑を伴う厚い銀白色の鱗屑で覆われた皮疹が生じることとなる。乾 癬患者は合併症を伴う場合が多く、心血管疾患や肥満、糖尿病になるリスクが高 いだけでなく寿命が短くなる傾向がある。これまでの乾癬の治療は、経験則に基 づいた UV 照射による非特異的な方法で行われてきたため、乾癬の病態に関わる細 胞はよく解析されていなかった。一方、乾癬病変部には正常な皮膚に比し多くのT 細胞が浸潤しており、T細胞の何らかの関与が疑われていた。そこで、T細胞をタ ーゲットにした治療が行われ、それらは臨床的に良好な成績を収める結果となっ た。すなわち、乾癬は主にT細胞に起因する病態であると認識された。現在、活 性化された T 細胞由来の物質がケラチノサイトの分化調整異常を引き起こすこと

で、乾癬の病態を生じさせると報告されている^{12,13}。T細胞は細胞障害性細胞であ るTc細胞および免疫の調整に関与するTh細胞に分けられるが、さらにTh細胞は 細胞性免疫の活性に関わるTh1細胞および液性免疫に関与するTh2細胞の2つの サブセットに分類できる。以前、Th細胞はこれら2つから構成されると考えられ ていたため、乾癬はTh1細胞に起因する疾患であると考えられていた。しかしな がら、2005年のIL-17やIL-22などの炎症誘導性サイトカインを産生するTh17細 胞の発見¹⁴以降、乾癬においてTh17細胞が重要であることが明らかとなった。現 在では、乾癬は皮膚疾患の中で最も病態メカニズムの解明が進んでいる疾患の1 つとなり、多くの分子標的薬が上市されている。IL-23/Th17細胞経路が病態メカ ニズムにおいて重要であることが確認されているが、Th17細胞から産生される IL-17を抑制するだけでは十分ではない¹¹ため、さらなる病態メカニズムの解明が 求められる。

アトピー性皮膚炎もまた遺伝的および免疫学的メカニズムが関与する慢性炎症 性疾患であり、活性化された T 細胞由来の物質がケラチノサイトの分化調整異常 を生じさせることが明らかとなっている¹⁵。前述通り、乾癬では IL-23/Th17 細胞 経路の活性化が特徴であるが、一方、アトピー性皮膚炎では様々な免疫細胞によ る反応系路が活性化している。そのため特定の経路を標的とする分子標的薬の探 索が困難であったが、現在治験において IL-4R α を標的とした分子標的薬がアトピ ー性皮膚炎に効果的である¹¹と報告されており、近いうちに上市されると予想さ れる。アトピー性皮膚炎において IL-4R α に作用するサイトカインである IL-4 お よび IL-13 の産生が亢進しており、これら 2 型免疫応答に関与するサイトカイン はケラチノサイトの正常分化を抑制し、皮膚のバリア機能を低下させることが報 告されている¹⁶。一方、乾癬において重要なサイトカインであり、ケラチノサイ トの機能調節に関与している IL-22 も同様の作用を示す¹⁷ことが報告されており、 アトピー性皮膚炎において IL-22 産生もアトピー性皮膚炎の病態形成に関与して いる¹⁶ことが明らかとなっている。すなわち、アトピー性皮膚炎においてケラチ

ノサイトの密な階層構造を構成する上で重要なフィラグリンやロリクリンなどの タンパク質がこれらのサイトカインによって抑制され、バリア機能の維持に重要 であるケラチノサイトの正常な分化が困難となることが明らかとなっている ¹⁶。 フィラグリンはケラチノサイトのケラチン線維を凝集する作用を持ち、ロリクリ ンはケラチノサイトの角化に際する細胞膜の主要な構成要素であり共にケラチノ サイトの角化に必要不可欠である。また、角化したケラチノサイトの水分保持に 関わる天然保湿因子はフィラグリン由来であり、フィラグリンは表皮における水 分維持にも重要である。加えて、アトピー性皮膚炎では、しばしばフィラグリン 遺伝子の変異が認められるなど、アトピー性皮膚炎において特徴的なアトピー性 皮膚炎の病態であるバリア機能の低下^{17,18}を生じさせる要因がいくつも生じてい ることが確認されている。その結果、生じた皮膚バリア機能の低下は、アレルゲ ンおよび微生物への曝露を容易にさせ、アトピー性皮膚炎患者のT細胞のサブセ ットを Th2 細胞優位へ傾けている。Th2 細胞は転写因子である GATA-binding protein 3 (GATA3) によってその分化が制御され、上述したように液性免疫に関 与しており、B細胞から形質細胞への分化を導くことで抗体産生に関与している。 抗体は数種類のタイプが存在するが、皮膚から侵入した抗原に対する免疫応答に 重要である抗体は IgE である。実際、IgE はアレルギー反応と関係があることが知 られている。アトピー性皮膚炎において、IgEの受容体である Fc & R I を発現して いるマスト細胞¹⁵および好塩基球¹⁹の浸潤が報告されており、抗原と結合した IgE による架橋形成はマスト細胞および好塩基球の活性化を引き起こし、化学伝達物 質を介したアレルギー性の炎症反応を生じさせる。すなわち、Th2/Th22 細胞だけ でなくマスト細胞や好塩基球などの自然免疫細胞もアトピー性皮膚炎における2 型免疫応答に関与している。アトピー性皮膚炎は IL-4 および IL-13 を産生する Th2 細胞ならびに IL-22 を産生する Th22 細胞主体のアレルギー性疾患と考えられ ている20が、一方、アトピー性皮膚炎の病態形成に関わる重要な炎症性反応は自 然免疫細胞など多くの免疫細胞によっても生じていると考えられている¹⁵。

強皮症は皮膚だけでなく肺や消化器官も線維化する自己免疫疾患であるが、 様々な細胞が病態形成に関与しており、詳しい病態メカニズムが明らかになって いない。強皮症では頻繁に抗セントロメア抗体、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗 U1RNP 抗体、抗 RNA ポリメラーゼ抗体などの自己抗体が検出され、毛細血管の消失 なども報告されている^{7,21-23}。現在、強皮症は限局性強皮症と汎発性強皮症の2つ に大別することができる。限局性強皮症は抗セントロメア抗体が陽性であり、血 管障害および緩やかな進行を特徴とする。一方、汎発性強皮症は抗トポイソメラ ーゼ I 抗体や抗 RNA ポリメラーゼ抗体が検出され、炎症性かつ進行性の皮膚線維 化を特徴とする。汎発性強皮症と関係がある間質性肺炎は、肺間質細胞の線維化 を伴う疾患であり、死をもたらす原因ともなる。強皮症は線維化に先立って炎症 をともなう致死性の高い自己免疫疾患であり、発症メカニズムも不明な非常に稀 な難治性の疾患であるが、最近、強皮症における免疫細胞の役割が明らかになり つつある²⁴。例えば、組織学的特徴である線維化が生じる前に、早期の段階で血 管周囲へのマクロファージや単球、T 細胞、B 細胞が浸潤していることが報告され ている^{25,26}。また、強皮症における T 細胞の免疫反応を誘導する自己抗原はまだ 同定されていないが、汎発性および限局性強皮症でそれぞれ特定の自己抗体が検 出されることは、それらの抗原が病態の形成に重要な役割を有する可能性がある と報告されている^{21, 27-30}。したがって、強皮症において免疫細胞および自己抗体 は病態メカニズムの解明に重要であると考えられる。

過去10年間における乾癬およびアトピー性皮膚炎に関する研究の結果、病態メ カニズムが明らかにされ、それらを基に様々な種類の分子標的治療薬が研究開発 されている。乾癬はIL-23/Th17細胞経路の活性化を特徴とし、一方、アトピー性 皮膚炎は2型免疫応答を伴う疾患であると考えられている。しかしながら、最近、 乾癬およびアトピー性皮膚炎の両疾患において2型免疫応答に関与するサイトカ イン、Th17細胞由来サイトカインの産生が確認されており、乾癬とアトピー性皮 膚炎で共通のサイトカイン産生が生じていることが明らかとなった。したがって、

これらの疾患に対する治療効果を向上させるためには、両疾患間での免疫反応の 違いをより明確にし、それぞれの免疫反応に対応する治療法を確立することが必 要である。これに対し、強皮症はどのT細胞サブセットが病態形成に関与してい るかも不明な疾患である^{6,7,24,31}。1つの有力な仮説として、血液凝固因子が汎発 性強皮症に関与していると考えられている³²。重要な血液凝固因子の1つである トロンビンが、組織の損傷およびその後に続く炎症により活性化されることがす でに示されている³³⁻³⁵が、興味深いことにトロンビンは線維化を促進させる特性 を有し、さらにこのトロンビンは汎発性強皮症患者の線維化を示した肺において 上昇していることが報告されている^{35,36}。

そこで本研究では、フローサイトメトリーおよび qRT-PCR 法を用いて乾癬とア トピー性皮膚炎患者における全身性および皮膚病変部での免疫細胞の分布やサイ トカイン陽性細胞をタンパク質および mRNA レベルで検討し、それぞれの疾患で重 要なサイトカインを産生している細胞の同定を試みた。さらに、それぞれの病態 形成に関与している細胞の違いを明らかにするために、両疾患の皮膚免疫細胞お よび血液中の循環性細胞を比較検討した。次いで、強皮症を検討するために新た なマウスモデルを構築し、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞によって誘導 したマウス強皮症モデルがヒトの汎発性強皮症に近い病態を示すかを検討し、す なわち、本マウスモデルのヒト病態モデルとして意義を検討した。一方、現在、 有効な治療薬が存在していない稀な疾患である汎発性強皮症において、新たな治 療薬として考えられている抗トロンビン薬であるダビガトランの本マウスモデル への影響も併せて検討した。

第1章 乾癬病変部における IL-17 および IL-22 陽性細胞についての検討

1. 緒言

尋常性乾癬は有病率が約2%程度の代表的な慢性皮膚疾患であり、環境や遺伝的な要因、表皮細胞および免疫細胞の調節異常など、様々な要素が組み合わさって生じる複合的疾患である^{10.37}。過去10年間の研究によって、乾癬の病態はT細胞に起因するケラチノサイトおよび免疫細胞の調節異常疾患であることが明らかとなった。当初はtumor necrosis factor alpha (TNF- α)や interferon- γ

(IFN- γ)を産生する Th1 細胞の関与が考えられていたが、研究の進展に伴い炎 症誘導性サイトカインを産生している Th17 細胞および Tc17 細胞の役割に注目が 集まっている。樹状細胞によって産生された IL-23 は乾癬の病変部において Th17 細胞の生存と増殖を促す³⁸。全ゲノム関連研究や遺伝子研究によって TNF- α の情 報伝達経路や IL-23/Th17 細胞経路の遺伝子が乾癬に関連することが明らかにされ ている³⁹⁻⁴¹。乾癬の病態形成において、これらの炎症誘導性サイトカインの重要性 は臨床での抗 TNF- α 抗体、抗 IL-23 p40 (IL-12 p40) 抗体、抗 IL-17 抗体などの 分子標的薬を用いた治療成功率を通して確かになった⁴²⁻⁴⁸。このうち、ウステキヌ マブは IL-23 p40 (IL-12 p40) に対するヒト型モノクローナル抗体の全身性乾癬 治療薬であり、Th1 細胞および Th17 細胞の反応を特異的に抑制する^{49,50}ことから、 非常に優れた治療効果を示しているが、多くの患者において数箇所の病変部が残 存することが知られており、完治する患者は全体の 30%未満である^{51,52}。一方、 このように分子標的薬による治療後に持続的に存在する抵抗性病変部に関する研 究はまだ少なく、その抵抗性については早急な原因解明が必要である。

IL-22 は皮膚組織において細胞外病原体からの感染防御ならびに損傷組織の再生 および修復などに重要な役割を果たしている IL-10 サイトカインファミリーの一 つであり、Th17 細胞から産生される⁵³。また、IL-22 は Th17 細胞のみならず Th22 細胞および Tc22 細胞からも産生され、IL-17 産生を伴わずに分泌されることが報 告されている^{2,54}。IL-22 は皮膚のケラチノサイト、肝細胞、胃の表皮細胞などに 発現している IL-22 受容体 (IL-22R) を介して signal transducer and activator of transcription 1/3 (STAT1/3) を活性化することにより作用する。IL-22R は 共通 IL-10 受容体 B 鎖(IL-10RB)と IL-22 受容体 A1 鎖(IL-22RA1)からなるへ テロ二量体の受容体である。一方、IL-22 は造血細胞も活性化させることが報告さ れている^{55,56}が、IL-22Rが免疫細胞に発現しているか否かは不明である^{57,58}。 IL-22の他、IL-20および IL-24も IL-22RA1と結合可能である^{59,60}。IL-20および IL-24 は IL-22 と同様に IL-10 サイトカインファミリーであり、IL-22 と共に IL-22R を介してケラチノサイトの分化調節に関わっている。なかでも IL-22 は IL-17 と共にケラチノサイトの分化を抑制し、増殖および運動能を亢進させ、乾癬の特 徴的な組織学的変化である不全角化を伴う角質肥厚(錯角化症)や表皮肥厚およ び真皮の乳頭部上方への突出などをもたらす⁶¹。IL-22は非病変部に比し乾癬の病 変部において産生が亢進しており、β-ディフェンシンやLL-37、S100A7、S100A8 などの抗菌ペプチドの産生を促進することにより、皮膚の生体防御機構や抗菌作 用において重要な役割を果たしている 53, 62。

ヒトの乾癬や乾癬様皮膚炎症マウスモデルにおいて、好中球、γδT細胞、ILC などの自然免疫に関与する細胞も IL-17 および IL-22 産生細胞として考えられて おり、それらの細胞が病態形成に寄与することが明らかとなっている⁶³⁻⁶⁵。例えば、 皮膚組織においてマスト細胞は表皮と結合組織の間に存在している⁶⁶⁻⁶⁸ が、最近、 乾癬の病変部においてマスト細胞が IL-17 を産生することが報告⁶⁹ されている。 さらに、乾癬病変部のマスト細胞は IL-17 だけでなく IL-8、TNF-α、IFN-γも産 生することが報告されている^{70,71}。他にも、アレルギー疾患においてマスト細胞

は IL-4 や IL-13 などの 2 型免疫応答に関わるサイトカインを産生することが知ら れており、マスト細胞は様々なサイトカインを産生することで炎症を伴う疾患の 病態形成に関与している。一方、マスト細胞は表皮組織の侵襲に対し積極的に修 復に関わっていることが報告⁷²されてもおり、すなわち、乾癬においてマスト細 胞が病態形成に関与しているか、または皮膚組織の修復に関わっているかは不明 である。IL-17 や IL-22 などの炎症誘導性サイトカインが T 細胞および自然免疫細 胞など様々な免疫細胞から産生されていることが報告されているが、乾癬の病態 形成に関わるサイトカイン産生細胞については明確になっておらず、早急な解明 が求められる。

乾癬皮膚組織の免疫細胞を用いた多くの研究では、その機能評価は皮膚検体の 組織学的解析あるいは採取後、数週間の培養期間を経て解析する方法で行われて いる。また、サイトカイン産生はphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) およ びionomycin (Iono) (PMA/Iono) により強制的に活性化した状態で測定されてい る。そのため、生体内における細胞本来の表現型およびサイトカイン産生能を確 認することが困難である。そこで本章では、我々が新規に開発した皮膚組織から 単細胞浮遊液に調整した後、培養刺激を加えずに、染色・固定を5時間以内に行 う手法を用いた。本手法では、従来法に比し、より生体内に近い状態でのサイト カイン産生細胞の同定が可能であることから、本研究では *ex vivo*においてフロ ーサイトメトリーや qRT-PCR を用いて、乾癬病態における細胞の特性解析やサイ トカインのタンパク質および mRNA の発現を検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 皮膚検体

皮膚検体の採取は 18 歳以上である患者を対象とし、全ての患者および健常者か らインフォームドコンセントは得た上で研究を遂行した。また、皮膚検体 (3-5 mm x 3-5 mm)の採取および研究への使用を 11 人からなる Institutional Review Board からの承認の下に、患者 1 人の病変部または非病変部から 1~3 箇所採取し た (Protocol number: Innoverderm-6028/6029、Innoverderm research、Quebec、 Canada)。

2.2 実験方法および試薬

2.2.1 ウステキヌマブを用いた研究計画

本研究は18歳以上の患者および健常者を対象にして行った。ウステキヌマブ (45 または 90 mg)は8または12週間隔投与し、期間中は他の薬剤や過度の日光 に当たるなどの治療効果に影響を及ぼす事項は避けた。また、事前に他の薬剤の 使用は中止した(Table 1)

Parameter	Treated* Patients	Untreated Patients	Normal Subjects
	(n=10)	(n=10)	(n=10)
Age (years; mean ± SD)	51.8 ± 9.4	57.0 ± 7.8	37.7 ± 12.2
Gender (n(%))			
Male	7 (70%)	6 (60%)	5 (50%)
Female	3 (30%)	4 (40%)	5 (50%)
Baseline clinical assessments			
PASI (mean ± SD)	5.8 ± 2.7	5.8 ± 1.8	n/a
PGA (mean ± SD)	3.2 ± 0.4	3.4 ± 0.5	n/a
PGA (proportion moderate:severe)	8:2	6:4	n/a

Table 1: Summary of demographic data

*treatment with ustekinumab (45 or 90 mg, 8-12 weeks)

2.2.2 ヒト皮膚組織からの細胞単離

患者および健常者から採取された皮膚組織検体(4 mm x 4 mm)は採取から90 分以内に処理を開始した。皮膚検体を速やかに3つに切り分け、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)溶媒(Life Technologies Inc.、Burlington、 Ontario、Canada)中でgentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotech、Bergisch Gladbach、Germany)を用いた機械的分離に続き、0.2 mg/mlのLiberase (Roche、 Mannheim、Germany) による 37 °C、1時間の酵素処理を施した。この処理は2回 繰り返し、フィルターに通した後にトリパンブルーを使用して細胞数を数えた。 LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit、for 405 nm excitation (Molecular Probes®、Life Technologies Inc.) で染色した細胞はヒト IgG また は anti-human CD32 blocker (STEMCELL Technologies[™]) による 4°C、15分間の 培養後、細胞表面抗原染色を 4°C で 30分間行った。細胞を固定した後に透過処 理を施し、細胞内のサイトカイン染色を 4°C で 30分間行った。使用した抗体は Table 2 に示したとおりである。(Table 2)

Name	Host	Clone		xdilution	Conjugation	Manufacture
CD3	Mouse	UCHT1		x 50	Alexa Fluor 700	Biolegend
CD3	Mouse	UCHT1		x 25	PE-Cy7	Biolegend
CD3	Mouse	UCHT1		x 50	PerCP	Biolegend
CD45RA	Mouse	HI100		x 100	Alexa Fluor 488	Biolegend
CD45RO	Mouse	UHL1		x 25	PerCP/Cy5.5	Biolegend
CD117/c-Kit	Mouse	104D2		x 200	APC	Biolegend
CD117/c-Kit	Mouse	104D2		x 200	Brillant violet 605	Biolegend
CD123	Mouse	6H6		x 25	PerCP/Cy5.5	Biolegend
CD127	Mouse	A019D5		x 10	PE-Cy7	Biolegend
CD172αβ	Mouse	SE5A5		x 100	PE-Cy7	Biolegend
FcεRI	Mouse	AER-37		x 20	Pacific blue	Biolegend
FcεRI	Mouse	AER-37		x 25	PerCP	Biolegend
IL-17A	Mouse	BL168		x 20	Alexa Fluor 647	Biolegend
IL-17AR	Mouse	BG-/hIL-17AR		x 25	Alexa Fluor 647	Biolegend
Lineage Cocktail	Mouse	UCHT1, HCD14, 3G8,	HIB19, 2H7, HCD56	x 25	Pacific blue	Biolegend
CD45	Mouse	2D1		x 10	Alexa Fluor 700	R&D Systems
IL-17A	Mouse	41802		x 25	APC	R&D Systems
IL-17A	Mouse	41802		x 10	PerCP	R&D Systems
IL-22	Mouse	142928		x 12.5	PE	R&D Systems
FcεRI	Mouse	AER-37		x 25	FITC	eBioscience
CD45	Mouse	2D1		x 100	APC-H7	Becton Dickinson
CD3	Mouse	UCHT1		x 10	FITC	ID Labs Biotechnology
isotype control						
lgG1	Mouse	MOPC-21		x 20	Alexa Fluor 647	Biolegend
lgG1	Mouse	MOPC-21		x 8.34	PE-Cy7	Biolegend
lgGb2	Mouse	MPC-11		x 125	FITC	Biolegend
lgG1	Mouse	11711		x 20	PerCP	R&D Systems
lgG1	Mouse	11711		x 12.5	PE	R&D Systems
lgGb2	Mouse	133303		x 10	PerCP	R&D Systems
Human IgG						
FcR block	Mouse			x 100		Stem Cell

Table 2 : Reagents used in flow cytometry

2.2.3 qRT-PCR

皮膚組織検体を瞬時に凍らし、乳棒および乳鉢を用いてグアニジンイソシアネ ートバッファー中でホモジナイズした。RNA はエタノールを用いて溶出し、Qiagen Fibrous mini columns (Qiagen、Toronto、Ontario、Canada) を用いて抽出した。 Qiagen の操作手順に従って Quantitect Reverse Transcription kit を用いて抽出 した RNA を cDNA に転写した。遺伝子の発現は qPCR using 7900 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems (Life Technologies Inc.) を使用して測定した。 qRT-PCR で用いた taqman probe は Applied Biosystems-Life Technologies で購 入し、遺伝子の発現は 2^(-ΔCT)法を用いて定量化し、ハウスキーピング遺伝子とし て human acidic ribosomal protein (hARP; CGCTGCTGAACATGCTCAA (F)、 TGTCGAACACCTGCTGGATG (R)、6-FAM-TCCCCC TTCTCCTTTGGGCTGG-TAMRA (probe)) (Integrated DNA Technologies、Toronto、Ontario、Canada) を使用した⁷³。

2.2.4 細胞の形態学的検討

c-Kit⁺ Fc ε RI⁺ マスト細胞および CD3⁺ T 細胞を造血 CD45⁺ 細胞の中から BD FACSAria[™] II (Becton Dickinson、Mississauga、Ontario、Canada)を用いて単 離した。単離した細胞は the department of Hematology、CHUM においてライト染 色した後に StatSpin[™] CytoFuge[™] 2 Personal Cytocentrifuge (Fisher Scientific 、Otawwa、Ontario、Canada)を用いて標本作成した。

2.2.5 QuantiGene®Flow RNA 解析

IL-17、IL-22 および β2-microglobulin のヒト mRNA の検出を QuantiGene®Flow RNA assay (Affymetrix Inc. Santa Clara、CA、USA) を用いて操作手順書に従っ て実施した。IL-17 (type 1) や IL-22 (type 1) 、β2-microglobulin (type 1 および 4) の human mRNA に対するプローブは Affymetrix から購入した。 サイト カイン発現は the BD Cytofix/Cytoperm[™] Fixation/Permeabilization Solution Kit (Becton Dickinson) を使用して FACS 解析を行った。

2.2.6 FACS 解析

FACS 解析は forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) で単一細胞にゲートをかけた後に生存している造血 CD45 陽性 (CD45⁺) 細胞を対象とした。細胞は BD FACSAria[™] II (Becton Dickinson) および BD[™] LSR II (Becton Dickinson) を 用いて測定し、FCS express flow cytometry analysis software で解析した。

2.3 統計学的解析

解析には GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software、La Jolla、CA、USA) を使用して、paired Student's t tests または Wilcoxon paired tests を実施 した。Non-paired data には Mann-Whitney tests または unpaired Student's ttests with Welch correction を用いた。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

3. 実験成績

3.1 乾癬の病変部から回収した皮膚免疫細胞の特徴

乾癬の病変検体から回収した皮膚免疫細胞における IL-17 および IL-22 の産生 を同定するために、新たに開発した PMA/Iono による刺激を加えない手法を用いた。 すなわち、小切片(4 mm 前後)の皮膚組織からフローサイトメトリー法で解析す るのに十分な細胞数を得る事に成功し(Fig. 1A および 1B)、病変部では非病変 部に比し有意な細胞浸潤がみられた(Fig. 1B)。一方、CD45⁺ 細胞を対象に解析を 行い、乾癬患者の皮膚において IL-17 および IL-22 陽性細胞を確認した(Fig. 1C)。



Fig. 1 Distribution of immune cells in skin cell suspensions freshly isolated from skin biopsies of psoriatic patients.

Biopsies were performed on plaques of lesional skin (L = 22 patients) and non lesional skin (NL = 7 patients) of psoriatic patients. **A**, Gating strategy on Aqua/live dead negative cells in relation to cell size (FSC); on viable CD45⁺ hematopoietic cells (right panel). **B**, CD45⁺ cells (%). **C**, Intracytoplasmic staining of lesional skin cell suspensions using anti–IL-22 mAb, anti–IL-17A mAb, or isotype-matched control mAb after gating on CD45⁺ cells. **C:** *****P* < 0.0001 by unpaired *t* test (Mann-Whitney).

3.2 乾癬の病変部における IL-17 および IL-22 陽性細胞

前節で示したように、乾癬の病変部には IL-17 および IL-22 陽性細胞が浸潤し ていた。次いで、これらの陽性細胞におけるサイトカイン産生を調べるため、IL-17 および IL-22 陽性細胞の同定を試みた。その結果、病変部では IL-22 陽性であ る CD3⁻ c-Kit⁺ 細胞と IL-17 陽性である CD3⁺ c-Kit⁻ 細胞の集積がみられた(Fig. 2A)。大部分のサイトカインはそれぞれの細胞内に局在していることも明らかと なった(Fig. 2B)。





Fig. 2 c-Kit⁺ cells are major IL-22 producers, and CD3⁺ T cells are the main source of IL-17 in psoriatic plaques.

A, IL-22 and IL-17 expression gated on c-Kit⁺CD3⁻ and c-Kit⁻CD3⁺ cells; %CD3⁺ versus c-Kit⁺IL-22⁺/IL-17⁺CD45⁺ cells. **B**, Cell-surface versus intracytoplasmic staining with anti–IL-22 or anti–IL-17 mAb in relation to c-Kit expression after gating on CD45⁺ cells. **A:** Data show 1 representative experiment of 5. **P < 0.01 and ****P < 0.0001 by unpaired *t* test (Mann-Whitney).

3.3 マスト細胞において陽性であるサイトカインの検討

次いで、CD3⁻ c-Kit⁺ Fc ϵ R I⁺ 細胞および CD3⁺ c-Kit⁻ Fc ϵ R I⁻ 細胞の形態を検討 するため、これらの細胞を単離後、解析した。その結果、CD3⁻ c-Kit⁺ Fc ϵ R I⁺ 細 胞はマスト細胞であり、主要な IL-22 陽性細胞であることを確認した(Fig. 3A)。 さらに、マスト細胞は IL-17 陽性に加え、IL-17 受容体(IL-17R)も発現してい ることが明らかとなった(Fig. 3B および 3C)。一方、主な IL-17 陽性細胞とし てT 細胞を見出した(Fig. 3A)。



Fig. 3 Mast cells (c-kit⁺ FcɛRI⁺ cells) produce IL-22 and IL-17 and express IL-17R in psoriatic plaques.

A, Morphology of fluorescence-activated cell sorting–sorted c-Kit⁺Fc ϵ RI⁺ mast cells and c-Kit⁻Fc ϵ RI⁻CD3⁺ T cells after gating on CD45⁺ hematopoietic viable cells. **B**, IL-17RA and c-Kit cell-surface expression after gating on c-Kit⁺Fc ϵ RI⁺ mast cells and c-Kit⁻Fc ϵ RI⁻CD3⁺ T cells. **C**, Intracytoplasmic IL-22 and IL-17 production in relation to CD127 expression after gating on c-Kit⁺ Fc ϵ RI⁺ mast cells. 3.4 マスト細胞とT細胞における IL-22 および IL-17 の mRNA の定量解析

マスト細胞における IL-17 および IL-22 の発現を確かめるために、*in situ* hybridization とフローサイトメトリーを組み合わせた QuantiGene®Flow RNA 法を 用いて、IL-22 と IL-17 mRNA の発現を単一細胞レベルで検討した。その結果、マ スト細胞は T 細胞と同様に IL-22 と IL-17 mRNA 発現を示した(Fig. 4)。



Fig. 4 Quantification of IL-22 and IL-17 mRNA expression at the single-cell level in human mast cells and T cells in skin biopsy specimens of patients with psoriasis.

 β 2-Microglobulin, IL-22, and IL-17 mRNA expression after gating on mast cells (c-Kit⁺Fc ϵ RI⁺CD3⁻) and T cells (c-Kit⁻Fc ϵ RI⁻CD3⁺) in human psoriatic skin biopsy specimens.

3.5 ウステキヌマブ抵抗性病変部と治療前の病変部における Th17 細胞関連サイトカインの発現

ウステキヌマブは IL-23p40(IL-12p40)に対するモノクローナル抗体であり乾 癬の治療薬である。このウステキヌマブに抵抗性を示した病変部と治療前の病変 部における IL-17A、IL-20、IL-22、IL-23A、IL-24 および β-ディフェンシン

(hBD2)の mRNA 発現を非病変部と比較した。その結果、非病変部に比し病変部で は IL-17、IL-22 および β -ディフェンシンの mRNA 発現が、治療前と同様に抵抗性 病変部において増加していた。IL-23A は治療前でのみ上昇していたのに対し、IL-20 は治療後でのみ上昇していた(Fig. 5)。



Fig. 5 Psoriatic plaques that persist despite ustekinumab treatment maintain a gene expression associated with Th17 comparable to untreated plaques.

qRT-PCR comparing lesional versus non-lesional skin in both untreated and ustekinumab-treated patients with moderate-to-severe psoriatic plaques was performed. Normal skin from control subjects without psoriasis was also included. NS: normal skin, NL: non-lesional skin, Plaque: lesional skin. *P < 0.05 and **P < 0.01 by paired Student's *t*-test.

3.6 ウステキヌマブ抵抗性病変部における IL-17 陽性細胞

前節において、ウステキヌマブ治療後にもかかわらず非病変部に比し有意に高い IL-17 mRNA 発現が確認されたため、ウステキヌマブ抵抗性病変部における IL-17 陽性細胞の同定を試みた。抵抗性病変部における IL-17 陽性 T 細胞の割合は治療前と同程度であったが (Fig. 6A および 6B)、驚くべきことに非 T 細胞における IL-17 陽性率が治療前よりも増加していた (Fig. 6A および 6C)。



Fig. 6 CD3⁻IL-17⁺ cells are increased in the refractory plaques of ustekinumabtreated patients.

Leukocytes were isolated immediately ex-vivo from psoriatic plaques in untreated (n=9) vs. ustekinumab-treated (n = 8) patients. **A**, Expression of IL-17A (below panel) and isotype control (upper panel) in relation to CD3 expression. **B**, Persistence of IL- 17^{+} CD3⁺ T cells in plaques from treated patients. **C**, Significant increase in the percentage of IL- 17^{+} CD3⁻CD45⁺ cells in ustekinumab-treated patients. ***P* < 0.01 by unpaired *t* test (Mann-Whitney).

4. 考察

本章では乾癬の病態形成に重要な役割を果たしている IL-17 および IL-22 の陽 性細胞を同定した。さらに、ウステキヌマブ治療後においても持続的に存在する 抵抗性病変部のサイトカイン発現および産生を検出する目的で、フローサイトメ トリーおよび qRT-PCR 法を用いて皮膚病変部のサイトカインのタンパク質と mRNA レベルを検討した。

IL-22 は乾癬患者の皮膚病変部や血中で値が上昇しており、血中の値と疾患の重 症度には相関があることが示されている^{74,75}。乾癬における一般的な概念として、 IL-22 は主に Th17 細胞、Th22 細胞、Tc22 細胞および ILC のサブセットである ILC3 によって産生されると考えられている^{63,74}。しかしながら、本研究では、乾 癬病変部においてマスト細胞が IL-22 陽性であることを同定し、マスト細胞が新 たな IL-22 産生細胞である可能性を示した。マスト細胞は CD3⁻ c-Kit⁺ Fc & RI⁺ 細 胞として検出し、タンパク質および mRNA レベルで個々にマスト細胞が IL-22 を発 現していることが明らかとなった。刺激を加えることで循環性 T 細胞が IL-17 お よび IL-22 を高発現することは知られているが、細胞培養をせずに、皮膚検体採 取から 90 分以内に処理を開始し、PMA/Iono による刺激を加えずに 5 時間以内に細 胞を固定する方法を用いることで、乾癬病変部において T 細胞よりもマスト細胞 が IL-22 の重要な供給源であることが示唆された。

IL-22 は 2001 年に IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF) として報告されたサイトカインである⁷⁶。IL-9 によって MC9 mast cell line から IL-TIF の mRNA 発現が誘導されることが明らかとなっている⁷⁷。マスト細胞の皮膚 における働きは IL-22 産生だけでなく多岐にわたっており、非常に複雑である。 アレルギー疾患時において、マスト細胞は重要なエフェクター細胞であると考え られているが、乾癬の病変部においても表皮に近い真皮でマスト細胞の増加が報

告されている⁷⁸。のちに乾癬様の病変を呈するケブネル現象は乾癬患者の非病変 部の皮膚に刺激が加わることで皮疹を生じることが報告されている⁷⁹が、マスト 細胞の早期の集積と関連があることも知られている⁸⁰。したがって、乾癬におい ても、マスト細胞は重要なエフェクター細胞であると推察される。IL-22 はケラチ ノサイトによる抗菌ペプチドの産生を誘導し皮膚の防御機構に関わるが、一方で、 乾癬の特徴である表皮の肥厚も引き起こす^{62,81}。本研究ではマスト細胞が IL-22 産生細胞である可能性を示したが、in vitro においてマスト細胞と活性化 T 細胞 の接触により T 細胞による IL-22 産生が亢進する⁸²ことが報告されており、乾癬 病変部においても同様のことが報告されている⁸²。しかし、これはT細胞による IL-22 産生亢進を意味しているのではなく、IL-22 陽性マスト細胞と T 細胞の接触 が報告されたと考えられる。一方、本研究において T 細胞による IL-22 mRNA 発現 が確認されたが、実際、UV 治療や抗 TNF-α抗体治療により症状が改善されたにも かかわらず、皮膚 T 細胞は IL-22mRNA を発現することが明らかとなっている^{74,83,} ⁸⁴。本研究においても、T 細胞の IL-22 陽性率は mRNA のそれに対して低かったこ とから、タンパク質および mRNA の発現は必ずしも対応する必要はないことが示唆 される。以上のように、本検討では IL-22 は T 細胞およびマスト細胞で検出され たが、生体内における IL-22 産生細胞に関してはまだ不明な点も多く、さらなる 検討が必要である。

一方、IL-10 サイトカインファミリーでは IL-22 の他、IL-20 および IL-24 が知 られている。IL-20 および IL-24 は IL-22 と同様にどちらも IL-22Ra を通して STAT3 のリン酸化を介してケラチノサイトを活性化させる ⁵³ため、IL-22 と類似作 用を有する。実際、T 細胞の活性化に応じて、マスト細胞は IL-10⁸⁵に加えて IL-24⁸⁶も産生することが知られており、マスト細胞はこれらのサイトカインを産生す ることで乾癬の病態に寄与している可能性が考えられる。マウスモデルにおける Imiquimod⁸⁷や IL-23⁸¹投与によって誘導される乾癬様炎症は IL-22 依存的であるが、 IL-24 の異常発現による乾癬様の炎症は IL-22 欠失マウスモデルにおいても生じる ⁸⁸。つまり、乾癬様の炎症は IL-22 依存的ではないと考えられ、すなわち IL-22 単 体では慢性的乾癬の病態を形成するのに十分ではなく、IL-24 と協調し病態形成に 関与していると推察される。加えて、乾癬患者における IL-22 アンタゴニストの 臨床的効果についての報告はほとんどなく、臨床試験が行われたものの、有効性 が認められず早期に打ち切られている(Clinical trial Registration Number NCT01010542)ことからも同様のことが考えられる。一方、IL-20 は主に活性化さ れた単球で発現している⁸⁹が、ウステキヌマブ治療後に治療効果が良好であった 患者に比し、良好でなかった患者では IL-20 mRNA 発現が有意に高いことが知られ ている⁹⁰。本研究でも非病変部に比しウステキヌマブ抵抗性病変部において有意 に高かった。上述のように、IL-20 および IL-24 は共通の受容体に結合する ⁵⁸こと から、抵抗性病変部の病態形成には IL-22 だけでなく、IL-20 および IL-24 が共に 関与している可能性が示唆される。

乾癬の病態には IL-22 ならびに IL-17 産生も重要である。ケラチノサイトから 過剰に産生されたこれらのサイトカインは免疫細胞の調節異常を引き起こすこと により、複雑な炎症の誘導に寄与している³⁷。樹状細胞やマクロファージによっ て産生される IL-23 ならびに Th17 細胞は乾癬の病態で重要な位置付けにあるが、 マスト細胞による IL-17 産生は明確にはなっていない。蛍光抗体法によって、IL-17 を産生している細胞の一部が、マスト細胞に特徴的なトリプターゼ陽性である、 すなわち IL-17 陽性マスト細胞の存在が示された⁹¹⁻⁹³が、IL-17R を発現している 細胞に IL-17 が結合した状態を示した可能性も考えられる。これに対し、本研究 ではフローサイトメトリー法を用いてマスト細胞における IL-17R の発現だけでな く、IL-17 mRNA の発現およびタンパク質が陽性であることも明らかにした。すな わち、乾癬においてマスト細胞は Th17 細胞以外の IL-17 産生細胞である可能性を 示したが、病変部において主に IL-17 を産生する T 細胞に比し、産生細胞として の寄与度は小さいと考えられる。一方、ILC3 も乾癬において IL-17 および IL-22 の重要な産生細胞として知られているが、最近の報告では主に IL-22 の産生に関

与しているとされている⁶³。しかし、ILC3 による IL-22 産生には *in vitro*におい て IL-1 および IL-23 による刺激が必要である ⁶³と報告されており、さらに本研究 において、主要な IL-22 陽性細胞であるマスト細胞は CD45⁺ 細胞群中で 10%程度 存在していたのに対し、0.5%程度⁹⁴とされる ILC3 は乾癬において IL-22 を産生 する主要な細胞ではないと考えられる。次いで、本研究において乾癬の分子標的 治療薬であるウステキヌマブに対して抵抗性を示した病変部における mRNA 発現お よびサイトカイン陽性率を検討したところ、非病変部に比し IL-23 の mRNA 発現は 同程度であった。一方、IL-17 は治療前と同程度の mRNA 発現および IL-17 陽性 T 細胞がみられた他、治療前の患者群に比し非 T 細胞における IL-17 陽性率が有意 に増加していた。これらの成績は IL-23 以外による IL-17 産生細胞の制御が局所 的に生じていることを示唆しており、加えて、マスト細胞または ILC3 が抵抗性病 変部の IL-17 産生に関与している可能性を示している。つまり、ウステキヌマブ 抵抗性病変部に対する治療において、自然免疫細胞からの IL-17 産生を抑制する ことが重要であると考えられる。

IL-17 および IL-22 が相加的および相乗的にマウスのケラチノサイトの調節異常 を誘導する⁹⁵が、過度に IL-22 を発現させたトランスジェニックマウスでは免疫 細胞の浸潤を伴わない皮膚肥厚がみられたと報告⁹⁶されたことから、乾癬の病変 部において、主にマスト細胞により産生された IL-22 は錯角化症や表皮肥厚に関 与し、IL-23/Th17 細胞経路の活性化は炎症に関与していると推察される。ヒトの 皮膚細胞で IL-17 ではなく IL-22 がケラチノサイトの調節異常を引き起こすと報 告⁹⁷されていることからも同様のことが考えられる。本研究において乾癬の病変 部で観察されたマスト細胞は IL-22 陽性または IL-22/IL-17 陽性であったが、IL-17 特異的陽性マスト細胞は少数であった。すなわち、乾癬病変部において T 細胞 だけではなく IL-22 陽性マスト細胞がケラチノサイトの調節異常に関与している と考えられる。

以上、第1章では、乾癬の皮膚病変部における IL-17 および IL-22 陽性細胞に 加えて、乾癬治療薬であるウステキヌマブに対する抵抗性病変部におけるサイト カイン発現を検討した。その結果、CD3⁻ c-Kit⁺ Fc & R I⁺ 細胞として検出したマス ト細胞が乾癬の病変部で主要な IL-22 陽性細胞であることを初めて明らかにした。 さらに、マスト細胞が IL-17 だけではなく、IL-17R も発現していることも示した。 次いで、ウステキヌマブ抵抗性病変部では非病変部に比し、IL-17、IL-20、IL-22 および hBD2 の mRNA 発現上昇がみられた。一方、治療前の病変部に比しウステキ ヌマブ抵抗性病変では非 T 細胞における IL-17 陽性率が増加しており、抵抗性病 変の形成にマスト細胞からの IL-17 が関与している可能性が示唆された。 第2章 アトピー性皮膚炎病変部における IL-4 および IL-13 陽性細胞についての 検討

1. 緒言

アトピー性皮膚炎もまた乾癬と同様に QOL に影響を及ぼす代表的な炎症性皮膚 疾患であり、その病態形成および進展に遺伝的要因と環境要因が関与することが 示唆されている。アトピー性皮膚炎の有病率は大人で 2-10%程度、子供で 15-30%ほどであり、アトピー性皮膚炎の免疫学的病態は自然免疫細胞および獲得免 疫細胞による複合的な関与によりもたらされ、皮膚バリア機能の低下を特徴とす る^{5,15}。

皮膚のバリア機能に影響を及ぼす要因の一つにフィラグリンの変異が挙げられ る^{98,99}。表皮における水分保持は皮膚の恒常性を保つ上で重要であり、保湿には 天然保湿因子が関与している。この因子はフィラグリン由来であり、さらにフィ ラグリンは表皮の恒常性を維持するために必要なケラチノサイトの分化と関係が あるため、ケラチノサイトの分化マーカーとしても重要である。アトピー性皮膚 炎でみられるフィラグリンの変異は角質層において水分保持を困難にすることで 乾燥させ、結果として皮膚が恒常性を失う原因となる¹⁰⁰。フィラグリンの変異が あるアトピー性皮膚炎患者は単純ヘルペスの感染により重症化するなど、様々な 感染症に対してリスクとなる¹⁰¹。表皮のバリア機能の低下は様々なアレルゲンの 侵入を容易にし、結果として真皮の樹状細胞などの抗原提示細胞による免疫応答 の起点となり、獲得免疫系においては炎症の増悪を引き起こす¹⁰²。しかしながら、 フィラグリンの変異はアトピー性皮膚炎患者においても 20-30%程度であり、フィ ラグリンの欠失だけでは表皮のバリア機能の低下を説明できない。実際、フィラ

グリン欠失マウスでは獲得免疫細胞が中心となり皮膚疾患をもたらすことが示されている¹⁰³。

アトピー性皮膚炎では Th2 細胞や IgE 産生細胞である記憶 B 細胞、マスト細胞 および好塩基球などの2型免疫応答に関与する細胞の他に ILC2 が関与する ¹⁵。 ILC2 は IL-13 を産生することでアトピー性皮膚炎の病態形成に関わっていること が報告されている¹⁰⁴。すなわち、アトピー性皮膚炎において IL-25、IL-33¹⁰⁵なら びに thymic stromal lymphopoietin (TSLP)¹⁰⁶などケラチノサイト由来サイトカ インによる ILC2 の活性化が生じている。さらには、ILC2 は Th2 細胞や好塩基球と 同様に prostaglandin D₂ (PGD₂) の受容体である chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T helper type 2 (CRTH2; CD294) を発現し ており、マスト細胞により産生される PGD。によっても活性化する。実際のところ、 皮膚へのアレルゲンの曝露において CRTH2 のシグナル伝達が炎症性反応に重要で あることが示されている^{104, 107-110}ため、CRTH2を発現している2型免疫応答に関与 している細胞がアトピー性皮膚炎において病態形成において重要であると考えら れる。一方、CRTH2 は Th2 細胞における皮膚ホーミングマーカーでもあり、アトピ ー性皮膚炎の病変部では正常の皮膚に比し10倍程度のT細胞による浸潤が見られ る。さらに、病変部において活性化 T 細胞により産生された炎症性化学伝達物質 が増加している¹¹¹⁻¹¹⁸。中でもアトピー性皮膚炎では IL-4 および IL-13 が病態の形 成に重要な役割を果たしており、共に IL-4R α を介し STAT6 を活性化する^{119, 120}。 実際のところ、それぞれのサイトカインの作用は異なるが、このオーバーラップ によりケラチノサイトでの IL-4 や IL-13 のシグナル伝達は相加作用を示している。 その結果、これらのサイトカインはフィラグリンやロリクリンの発現を抑制し、 真皮でのコラーゲン合成に影響を及ぼすことが知られている¹²¹。アトピー性皮膚 炎では末梢血や病変部において免疫異常が報告されているが、IL-4 および IL-13 の末梢血や病変部での産生細胞は明らかとはなっていない。
アトピー性皮膚炎に対し、乾癬では Th 細胞や Tc 細胞、マスト細胞、ILC3 が IL-17 および IL-22 の発現に関与しており^{37, 122}、現在、それぞれの疾患に寄与す るサイトカインに対する抗体療法が進められている。すなわち、乾癬では前述の ように抗 IL-23p40 抗体や抗 TNF- α 抗体、抗 IL-17 抗体などの分子標的薬が効果的 な治療薬として用いられている。一方、アトピー性皮膚炎でも 2 型免疫応答に関 与するサイトカインおよびシグナル伝達をターゲットにした治療が効果的である と考えられており、実際、臨床的な有効性が報告されている^{5, 123, 124}。しかしなが ら、アトピー性皮膚炎は 2 型免疫応答によるものというパラダイムが崩れつつあ る。なぜならば、Th17 細胞は CD3⁺ CD161⁺ CCR6⁺ T 細胞のサブセットであると 定義され¹²⁵、Th2 細胞のマーカーである CRTH2 を発現していない非 Th2 細胞であ るが、Th17 細胞および Th22 細胞がアトピー性皮膚炎患者の病変部および血液でも 検出され^{114, 126}、一方、乾癬患者でも IL-13 を産生する T 細胞が確認されたためで ある^{127, 128}。これらのことから、IL-17 や IL-22、IL-13 はアトピー性皮膚炎と乾 癬で共通に産生されるサイトカインであるといえる^{20, 54, 129, 130}。

なかでも IL-22 は乾癬だけでなくアトピー性皮膚炎においても重要であり、過 剰な発現が確認されている^{20,114}。2 型免疫応答に関与するサイトカインである IL-4 および IL-13 ならびに IL-22 はともにケラチノサイトの調節異常に関与しており、 ケラチノサイトの分化や抗菌ペプチドの合成を抑制する^{61,62,97,120,121,131,132}こと が知られている。前章で示したように乾癬では IL-22 産生にマスト細胞が寄与し ていたが、アトピー性皮膚炎においても同様であるかは不明である。一方、アト ピー性皮膚炎では、マスト細胞は IL-12 を抑制することで Th2 細胞優位を促し¹³³、 B 細胞の成熟と IgE の産生に重要であることが明らかとなっている。加えて、マス ト細胞によって誘導された炎症性メディエーターはケラチノサイトからのサイト カイン産生を促進することも明らかとなっている^{134,135}。すなわち、マスト細胞は アトピー性皮膚炎で生じている炎症反応において重要な細胞であると考えられる。 また、マスト細胞は急性期では集積はみられないが、慢性病変部では増加がみら

れ^{136,137}、マスト細胞の脱顆粒により誘引される Th2 細胞の活性化および浸潤は痒 みを伴った掻爬によるバリア機能の低下を招くことが報告されており¹³⁸、マスト 細胞は病態の維持にも関わっていると考えられる。

本研究ではフローサイトメトリー法を用いて、アトピー性皮膚炎患者における 循環性2型免疫応答に関与する細胞、ならびに皮膚に局在している2型免疫応答 に関与する細胞の分布やIL-4またはIL-13陽性細胞を乾癬患者と比較することに より、両疾患の病態における局所的および全身的な病態の相違を検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 皮膚検体

18歳以上である患者を対象とし、全ての患者からインフォームドコンセントは
得た上で研究を遂行した。また、皮膚検体(2-4 mm x 2-4 mm)および血液(30 mL)の採取および研究への使用を9人からなる Institutional Review Board からの承認の下に、患者1人の病変部または非病変部から1~3 箇所採取した

(Protocol number: Innoverderm-6036, Innoverderm research) $_{\circ}$

2.2 実験方法および試薬

2.2.1 ヒト皮膚組織からの細胞単離

第1章2.2.2に準じて行った。使用した抗体をTable 3に示す。

Name	Host	Clone	xdilution	Conjugation	Manufacture
CD1a	Mouse	HI149	x 25	Alexa Fluor 488	Biolegend
CD294/CRTH2	Mouse	BM16	x 25	Alexa Fluor 647	Biolegend
CD3	Mouse	UCHT1	x 50	Alexa Fluor 700	Biolegend
CD117/c-Kit	Mouse	104D2	x 200	APC	Biolegend
CD294/CRTH2	Mouse	BM16	x 10	APC-Cy7	Biolegend
CD117/c-Kit	Mouse	104D2	x 25	Brillant violet 605	Biolegend
CD127	Mouse	A019D5	x 25	Brillant violet 711	Biolegend
CD14	Mouse	HCD14	x 50	FITC	Biolegend
CD16	Mouse	3G8	x 25	FITC	Biolegend
CD34	Mouse	561	x 25	FITC	Biolegend
CD56	Mouse	HCD56	x 25	FITC	Biolegend
CD303	Mouse	201A	x 25	FITC	Biolegend
CD3	Mouse	UCHT1	x 25	PE-Cy7	Biolegend
CD161	Mouse	HP-3G10	x 25	PE-Cy7	Biolegend
IL-4	Mouse	MP4-25D2	x 50	PerCP/Cy5.5	Biolegend
CD123	Mouse	6H6	x 25	PerCP/Cy5.5	Biolegend
FcεRI	Mouse	AER-37	x 20	Pacific blue	Biolegend
CD45	Mouse	2D1	x 100	APC-H7	Becton Dickinson
CD19	Mouse	4G7	x 25	FITC	Becton Dickinson
CD20	Mouse	L27	x 5	FITC	Becton Dickinson
IL-13	Mouse	IC2131P	x 10	PE	Becton Dickinson
CD3	Mouse	UCHT1	x 10	FITC	ID Labs Biotechnology
IL-22	Mouse	142928	x 12.5	PE	R&D Systems
isotype control					
lgG1	Mouse	11711		PE	R&D Systems
LIVE/DEAD			x2000	Aqua	ThermoFisher
Human IgG			x100		

Table 3: Reagents used in flow cytometry

2.2.2 ヒト血液中の循環性細胞の精製

循環性細胞はHanks' balanced salt solution 10x (Sigma-Aldrich、Winston Park Dr. Oakville、Ontario、Canada) によって希釈したヘパリン血から lymphocyte separation medium® (Wisent Inc.、St-Bruno、Canada) を用いた浮 遊密度遠心法によって得た。

2.2.3 培養刺激

溶媒には 10% fetal calf serum (Wisent Inc.) を加えた Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 溶媒 (Life Technologies Inc.) を用いた。 Brefeldin A (1 µg/ml; Calbiochem-Behring、 San Diego、CA、USA) 存在下で PMA (5 ng/ml; Sigma-Aldrich) および Iono (0.5 µg/ml; Calbiochem-Behring) による 3 時間の培養刺激を加えた。

2.2.4 細胞の形態学的検討

第1章における2.2.4と同様に標本作成を行った。

2.2.5 FACS 解析

第1章における2.2.6と同様に解析した。

2.3 統計学的解析

第1章における2.3と同様に解析した。

3. 実験成績

3.1 アトピー性皮膚炎の病変部へ浸潤が示された T細胞の検討

アトピー性皮膚炎の病変部においても細胞の浸潤がみられることより、細胞分 布について乾癬患者と比較検討した。その結果、両疾患における T 細胞の割合に 相違は認められなかったが (Fig. 7A および 7B)、アトピー性皮膚炎病変部では Th2 細胞の割合が著しく高かった (Fig. 7C)。一方、非 Th2 細胞 (CRTH2⁻ CD161⁺ T 細胞)の割合は低下する傾向を示した (Fig. 7C)。



Fig. 7 Increased infiltration of Th2 cells in lesional skin of AD relative to psoriasis.

Single cell suspensions from lesional skin biopsies were prepared from atopic dermatitis (AD; skin= 8) and psoriasis (Pso; skin=10) patients. **A**, Strategy to gate for CRTH2⁺ and CRTH2⁻ CD161⁺ cells on T cells in skin **B**, % CD3⁺ T cells. **C**, % CRTH2⁺ and % CRTH2⁻ CD161⁺ gated on CD3⁺ T cells in skin. Data shown are mean \pm SEM. ****P* < 0.001 by unpaired Student's *t*-test.

3.2 アトピー性皮膚炎患者の血液中におけるT細胞の検討

次いで、血液中の循環性細胞を検討した。その結果、両疾患でのT細胞の割合 は血液中においても差は認められなかった(Fig. 8A および 8B)。アトピー性皮 膚炎患者の血液中における Th2 細胞の割合は乾癬患者に比し高い傾向がみられた が、統計学的に有意な差は認められなかった(Fig. 8C)。一方、非 Th2 細胞の割 合は皮膚病変部と同様に低下する傾向を示した(Fig. 8C)。



Fig. 8 Cell distribution of T cells in PBMC with AD patient relative to psoriasis.

Single cell suspensions from blood were prepared from atopic dermatitis (AD; blood=10) and psoriasis (Pso; blood=13) patients. **A**, Strategy to gate for CRTH2⁺ and CRTH2⁻ CD161⁺ cells on T cells in blood. **B**, % CD3⁺ T cells. **C**, % CRTH2⁺ and, % CRTH2⁻ CD161⁺ gated on CD3⁺ T cells in blood. Data shown are mean ± SEM.

3.3 アトピー性皮膚炎の病変部へ浸潤が示された ILC の検討

アトピー性皮膚炎において浸潤がみられた非T細胞の表皮マーカーについて乾癬と比較検討した。すなわち、非T細胞中のILCをCD3⁻1in⁻Fc ϵ RI⁻CD127⁺細胞として検出し、さらにCRTH2⁺ILCをILC2、CRTH2⁻ c-Kit⁺ILCをILC3として分類した。その結果、CD45⁺細胞中におけるILCの割合は両疾患において差は見られなかった(Fig. 9A および 9B)が、アトピー性皮膚炎病変部では乾癬に比しILC2の割合が有意に高く(Fig. 9C)、逆に乾癬ではアトピー性皮膚炎に比しILC3の割合が有意に高値を示した(Fig. 9C)。



Fig. 9 ILC2s are increased in skin of patients with AD but not psoriasis.

A, Gating strategy for ILC2 (CRTH2⁺), and ILC3 (CRTH2⁻c-Kit⁺) subsets in skin. **B**, % ILC (CD45⁺CD3⁻lin⁻FccRI⁻CD127⁺). **C**, % ILC2 and, % ILC3 gated on skin ILC. Data shown are mean \pm SEM (AD=8, Pso=10). Lineage markers included CD1a, CD14, CD16, CD19, CD20, CD34 and CD56. **P* < 0.05 and ****P* <0 .001 by unpaired Student's *t*-test.

3.4 アトピー性皮膚炎患者の血液中における ILC の検討

前節と同様に、血液中における非T細胞の表面マーカーについて乾癬と比較検 討した。その結果、前節と類似した結果が得られた。すなわち、CD45⁺細胞中にお ける ILC の割合は両疾患において相違は認められなかった(Fig. 10A および 10B) が、アトピー性皮膚炎では ILC2 の割合が(Fig. 10C)、一方、乾癬では ILC3 の 割合が(Fig. 10C)高い傾向にあった。



Fig. 10 Cell distribution of ILCs in PBMC with AD patient relative to psoriasis.

A, Gating strategy for ILC2 (CRTH2⁺), and ILC3 (CRTH2⁻c-Kit⁺) subsets in blood. **B**, % ILC (CD45⁺CD3⁻lin⁻Fc ϵ RI⁻CD127⁺). **C**, % ILC2 and, % ILC3 gated on blood ILC. Data shown are mean ± SEM (AD= 10, Pso=13). Lineage markers included CD1a, CD14, CD16, CD19, CD20, CD34 and CD56. 3.5 アトピー性皮膚炎の病変部における CD3⁻ Fc & R I⁺ 細胞の検出

アトピー性皮膚炎において病変部に集積している他の2型免疫応答に関与する 細胞について検討した。両疾患での $CD45^+$ 細胞中における $CD3^-$ Fc ϵ R I ⁺細胞の割 合に相違はみられなかった(Fig. 11)。



Fig. 11 Infiltration of FccRI⁺ cells in lesional skin of AD and psoriasis.

Representative FACS dot plot of frequency (left panel) and % $Fc\epsilon RI^+CD3^-$ cells (right panel) in skin (AD; n=8, Pso; n=10).

3.6 アトピー性皮膚炎の病変部における好塩基球およびマスト細胞の検出

前節で示した CD3⁻ Fc ϵ R I⁺ 細胞の表面マーカーをより詳細に解析した。すなわ ち、CD3 ならびに lineage 陰性の細胞集団にゲートした後に、 Fc ϵ R I あるいは c-Kit (CD117)を用いて分離した (Fig. 12A および 12C) 。その結果、Fc ϵ R I⁺ c-Kit⁻ 細胞は、アトピー性皮膚炎で特異的に検出された (Fig. 12B) 。これに対し、 Fc ϵ R I⁺ c-Kit⁺ 細胞は両疾患で同程度検出された (Fig. 12B) 。次いで、それぞ れの細胞を精度よく単離し、形態学的な観察を行った結果、CD3⁻ lin⁻ Fc ϵ R I⁺ c-Kit⁺ 細胞の形態は 1 章で示した乾癬患者から単離したマスト細胞と同様で、比較 的大型で多くの顆粒を有する細胞であった。これに対して、アトピー性皮膚炎患 者の病変部で特異的に検出された CD3⁻ lin⁻ Fc ϵ R I⁺ c-Kit⁻ CD123⁺ 細胞は核に覆い 被さる様に好塩基性の顆粒を細胞質に有する好塩基球の形態を示した (Fig. 12C) 。



Fig. 12 Increased infiltration of FcERI⁺c-kit⁻ cells in lesional skin of AD but not psoriasis.

A, Representative FACS dot plot of frequency. **B**, Frequency of basophils (Fc ϵ RI⁺c-Kit⁻) and mast cells (Fc ϵ RI⁺c-Kit⁺) gated on CD3⁻lin⁻ in skin (AD; n=8, Pso; n=10). **C**, Morphology of FACS sorted CD3⁻lin⁻ Fc ϵ RI⁺c-Kit⁻CD123⁺ basophil and CD3⁻lin⁻ Fc ϵ RI⁺c-Kit⁺ mast cell gated on CD45⁺ cells. Scale bar 10µm. Data shown are mean ± SEM. *****P* < 0.0001 by unpaired Student's *t*-test.

3.7 アトピー性皮膚炎患者の血液中における好塩基球

前節でアトピー性皮膚炎の病変部で特異的に好塩基球が検出され、乾癬では検 出されなかったことに基づき、両疾患における血液中の好塩基球比率について検 討した。その結果、血液中の好塩基球の割合は両疾患で同程度であり、違いはみ られなかった。したがって、アトピー性皮膚炎における好塩基球の集積は皮膚の 病変部で特異的に生じていることが明らかとなった(Fig. 13)。



Fig. 13 Cell distribution of PBMC with basophils in AD relative to psoriasis.

Basophils are identified as $CD45^+CD3^-lin^-Fc\epsilon RI^+CRTH2^+c$ -Kit⁻. Gating strategy for basophils in blood (Left panel) and % basophils in blood (right panel; AD= 9, Pso=6). Data shown are mean ± SEM. Lineage includes CD1a, CD14, CD16, CD19, CD20, CD34 and CD56.

3.8 アトピー性皮膚炎病変部における好塩基球および ILC の相関

アトピー性皮膚炎病変部において増加がみられた好塩基球と ILC2 の相関関係を 解析した。その結果、皮膚中の好塩基球および ILC2 の存在比率には正の相関関係 が、皮膚中の好塩基球と血液中の ILC2 の間には負の相関がそれぞれ示された (Fig. 14A)が、好塩基球と ILC3 との相関はみられなかった(Fig. 14B)。



Fig. 14 Basophils in lesional skin correlate with ILC2s and not ILC3s in AD patients.

Pearson correlation analysis between skin basophils and ILC2 or ILC3 in skin and blood of AD (AD n=8).

3.9 アトピー性皮膚炎患者における血清 IgE および Th2 細胞の相関

アトピー性皮膚炎において血清 IgE および2型免疫応答に関与する細胞の相関 関係を検討した。循環性 Th2 細胞と血清 IgE の間には正の相関関係がみられたが、 皮膚中の Th2 細胞との間には相関はみられなかった。IgE は血液中の Th2 細胞との み相関があることが明らかとなった(Fig. 15)。



Fig. 15 Serum IgE level correlate with circulated Th2 cells in AD patients.

Pearson correlation analysis between IgE and Th2 cells in blood but not skin of AD (n=8).

3.10 アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における T 細胞のサイトカイン陽性率の検討

アトピー性皮膚炎の病変部における IL-4 および IL-13 を産生しうる T 細胞の比率を培養刺激前後で乾癬と比較検討した。その結果、アトピー性皮膚炎患者では乾癬患者に比し、定常状態においても IL-4 および IL-13 陽性の T 細胞比率が有意に高いことが明らかになった。IL-13 陽性 T 細胞は定常状態の乾癬患者の皮膚中においても確認されたが、PMA/Iono 刺激後ではアトピー性皮膚炎患者の IL-4 および IL-13 陽性の T 細胞比率は乾癬患者に比し有意に高い、あるいは高い傾向を示した(Fig. 16)。



Fig. 16 Infiltrating T cells produce IL-4 and IL-13 in lesional skin of AD but not psoriasis without PMA/Iono.

A, Representative FACS dot plot of IL-4 and IL-13 expression by unstimulated T cells in skin. **B**, % IL-4 and IL-13 expression in AD (before; n=7, after; n=6) and Pso (before; n=9, after; n=5) by CD3⁺T cells. T cells were analyzed for intracytoplasmic IL-4 and IL-13 expression before and after stimulation with PMA/Ionomycin for 3 hours. Data shown are mean \pm SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 by unpaired Student's *t*-test.

3.11 アトピー性皮膚炎の皮膚病変部における好塩基球のサイトカイン陽性率の 検討

アトピー性皮膚炎の病変部における IL-4 陽性好塩基球の比率を定常状態と PMA/Iono 刺激により比較検討した。その結果、アトピー性皮膚炎患者の病変部に 特異的に検出される好塩基球は、IL-4 産生能を有することが示された(Fig. 17)。



Fig. 17 Basophils detected in lesional skin of AD express IL-4.

Representative FACS dot plot of IL-4 expression by basophil in lesional skin of AD; % IL-4 expression by basophils before and after 3 hours PMA/Ionomycin stimulation in AD skin (before, n=7; after, n=5).

3.12 血液中の循環性細胞における Th2 サイトカイン陽性細胞

アトピー性皮膚炎患者および乾癬患者の血液中における T 細胞、ILC および好塩 基球の IL-4 および IL-13 陽性率を培養刺激前後で比較検討した。その結果、両患 者群の T 細胞における培養刺激後の IL-4 および IL-13 陽性率は同程度であった

(Fig. 18A)。これに対し、ILC2 では両疾患共に IL-13 陽性率は高値を示したが、 IL-4 陽性細胞はほとんど検出されなかった(Fig. 18B)。一方、ILC とは異なり、 好塩基球では IL-4 陽性率は高値を示したが、IL-13 陽性細胞はほとんど検出され なかった(Fig. 18C)。両患者群の刺激後の IL-4 および IL-13 陽性率は同程度で あり、培養刺激前にはこれらのサイトカインは検出されなかった。



Fig. 18 Similar frequencies of T cells that express IL-4 and IL-13, ILC that express IL-13 and, basophils that express IL-4 are detected in blood of AD and psoriasis.

Cells isolated from PBMC (AD, n=10; Pso, n=10) were analyzed for intracytoplasmic IL-4 and IL-13 expression before and after stimulation with PMA/Ionomycin for 3 hours. % IL-4 and IL-13 expression by **A**, T cells, **B**, ILC and **C**, basophils. Data shown are mean \pm SEM. ****P* < 0.001 and *****P* < 0.001 by paired Student's *t*-test.

3.13 アトピー性皮膚炎における IL-22 陽性マスト細胞

前章の乾癬病変部において検出された IL-22 陽性マスト細胞をアトピー性皮膚 炎において検討した。その結果、IL-22 陽性マスト細胞はアトピー性皮膚炎の病変 部でも確認された(Fig. 19A)。さらに、無刺激においてもマスト細胞は IL-22 陽性であり(Fig. 19A)、アトピー性皮膚炎における主な IL-22 陽性細胞である ことが明らかになった(Fig. 19B)。一方、クローン病患者の腸から取り出した マスト細胞においては、IL-22 はほとんど確認できなかった(Fig. 19C)。



Fig. 19 Mast cells (c-kit⁺FcɛRI⁺cells) are a major source of IL-22 in atopic dermatitis.

Skin and colonic biopsies were collected from patients with atopic dermatitis (AD, n=6), psoriasis (PS, n=8), and crohn's disease (CD) (n=2). **A**, Intra-cytoplasmic staining of IL-22 using anti-IL-22 mAb or isotype-matched control mAb after gating on mast cells (c-Kit⁺Fc ϵ RI⁺). **B**, CD3⁺ and c-Kit⁺IL-22⁺ cells (%). **C**, Frequency of IL-22 positive cells among mast cells in PS, AD and CD. **P* < 0.05 by unpaired *t* test (Mann-Whitney).

4. 考察

本章ではアトピー性皮膚炎患者における、2型免疫応答に関与する細胞の特徴を 解析する目的で、アトピー性皮膚炎および乾癬患者の皮膚病変部と血液中の循環 性細胞を用いて、2型免疫応答に関与する細胞の分布ならびに IL-4 または IL-13 陽性細胞を比較検討した。

アトピー性皮膚炎と乾癬は病態形成および進展に遺伝的要因と環境要因が関与 することが示唆され、病変部では免疫細胞の浸潤ならびに活性化された T 細胞由 来サイトカインによる表皮のケラチノサイト分化調節異常が生じている。両疾患 はこれら共通の特徴をもつ異なる代表的な炎症性皮膚疾患であるが、アトピー性 皮膚炎は2型免疫応答を主体とする炎症反応により病態が形成される^{15,37}。アト ピー性皮膚炎の病変部では T 細胞や ILC、マスト細胞、好塩基球、好中球の浸潤が みられ、これらの細胞がアトピー性皮膚炎の特徴的な病態の形成に関与している。 本研究では、乾癬患者に比しアトピー性皮膚炎患者の病変部において、IL-4 陽性 の Th2 細胞や好塩基球だけではなく、ILC2 の増加による免疫調整異常が生じてお り、局所において 2型免疫応答の炎症性反応が生じていることを明らかにした。 一方、血液中の循環性細胞では皮膚と同様に Th2 細胞および ILC2 が増加する傾向 がみられたが、両疾患で有意差はみられなかった。したがって、アトピー性皮膚 炎では皮膚特異的に IL-4 陽性 Th2 細胞、好塩基球ならびに ILC2 の有意な増加を 特徴とする疾患であることが示唆された。

近年、乾癬あるいはアトピー性皮膚炎病変部において、T 細胞から IL-4^{139, 140}あ るいは IL-17¹⁴¹がそれぞれ産生されることが報告されている。そのため、IL-4 お よび IL-17 産生能だけではアトピー性皮膚炎と乾癬を区別することは難しいとさ れている¹⁴²。本研究では、乾癬に比しアトピー性皮膚炎の病変部において、培養 刺激の有無に関わらず IL-4 および IL-13 陽性 T 細胞率の有意な増加がみられた。

すなわち、アトピー性皮膚炎病変部では IL-4 および IL-13 産生が亢進していると 推測され、乾癬に比しアトピー性皮膚炎病変部に浸潤している T 細胞からの IL-4 および IL-13 産生量は有意に多いと考えられる。両疾患を区別する上で重要とな るのは、サイトカインの遺伝子発現や産生能の有無ではなく、サイトカイン産生 細胞数およびサイトカイン量である可能性が示された。一方、本研究では確認は していないが、アトピー性皮膚炎において Th 細胞および Tc 細胞はともに多数存 在していることが報告されている²⁰。さらに、3 週間の *ex vivo* 培養後では乾癬患 者に比しアトピー性皮膚炎患者の病変部において Tc 細胞ではなく Th 細胞から IL-4 および IL-13 の有意な産生の増加が報告されている¹²⁹。しかし、これらの報告 は皮膚から採取した細胞を長期間培養後に実験に供しており、長期培養によって T 細胞の生存率や増殖、表現型、サイトカイン産生パターンが変化することも否め ない。したがって、いずれの T 細胞サブセットによって 2 型免疫応答に関与する サイトカイン産生が行われているかは更なる検討が必要であると思われる。

好塩基球および ILC2 は、ヒトやマウスの肺や皮膚におけるアレルギー反応の惹 起およびその病態形成において重要な役割を果たしている^{19,143-147}。実際、好塩基 球はアトピー性皮膚炎の皮膚においてメモリーT 細胞との接触が確認され、*in vitro* ではメモリーTh2 細胞を刺激する作用が確認されている^{143,147}。本研究では、 アトピー性皮膚炎の病変部において CD45⁺ 細胞中に好塩基球は 1.7%程度がみられ たのに対し、乾癬ではこれらの細胞は確認できなかった。一方、アトピー性皮膚 炎において ILC の主なサブセットは 2 型免疫応答に関与する ILC2 であるのに対し て、乾癬では Th17 関連細胞である ILC3 が主要なサブセットであった。患者血液 中においても、CD45⁺ 細胞中での ILC の割合は皮膚病変のものに比し 10 分の 1 程 度であったが、アトピー性皮膚炎患者では ILC2 が主要なサブセットであり、皮膚 病変でみられたものと同様の結果が得られた。これらの結果は他の報告^{63,105} と一 致するものであり、乾癬は Th17 関連細胞を特徴とし、一方、アトピー性皮膚炎は 2 型免疫応答に関与する細胞を伴う疾患であることをさらに裏付ける結果となった。

ケラチノサイトで発現している TSLP は好塩基球を誘引し、かつ活性化させるこ とで炎症性反応に関与していることが知られている¹⁰⁶。また、好塩基球および ILC2 は CRTH2 を発現しており、マスト細胞により産生される PGD₂により集積する ^{104, 148, 149}ことが報告されている。しかしながら、本研究において、マスト細胞と 好塩基球および ILC2 との間の相関関係は見られなかった。マスト細胞と好塩基球 および ILC2 との関連はさらなる検討が必要である。一方、前章で示したように、 マスト細胞は乾癬において主要な IL-22 陽性細胞であったが、それはアトピー性 皮膚炎においても同様であり、浸潤の程度も乾癬と同程度であった。マスト細胞 はアトピー性皮膚炎においても重要なエフェクター細胞であると考えられる。

ILC2 は IL-13 の産生を介してメモリーTh2 細胞の局所への集積において重要な 働きを有することが報告されている¹⁵⁰。そのため、本研究において Th2 細胞と ILC2 の相関関係を検討したが、相関関係は見られなかった。 ILC2 は種々の刺激に よりケラチノサイトから産生される IL-33¹⁰⁵ならびに TSLP¹⁰⁶により活性化し、IL-13 を産生することが報告されているが、本研究では ILC による 2 型免疫応答に関 与するサイトカイン発現を解析するのに十分な量のサイトカインを得ることがで きなかったため、両者の間に相関関係が見られなかったと推察される。次いで、 Th2 細胞と相関関係にあるものを検討したところ、血清 IgE 値が循環 Th2 細胞と正 の相関関係にあることが明らかとなった。しかしながら、皮膚病変部の Th2 細胞 との相関はみられなかった。アトピー性皮膚炎患者の多くは血清において高い IgE 値を示すが、高値を示さないアトピー性皮膚炎患者群も存在する。また、シクロ スポリンによる治療によって病状が改善したにもかかわらず、IgE 値をコントロー ルできない症例も報告されている¹⁵¹。すなわち、アトピー性皮膚炎の病態形成へ の IgE の関与は小さいことが推察され、また、血清 IgE 値が病変部の Th2 細胞と 相関関係にないことが抗 IgE 抗体による治療がアトピー性皮膚炎において有効性 を示さなかった¹¹⁹一因であると考えられる。

本研究では、アトピー性皮膚炎において IL-4 陽性の好塩基球が検出され、さら に培養刺激により IL-4 陽性細胞率は増加した。好塩基球によって産生される IL-4 は T 細胞や B 細胞、ILC2、単球マクロファージなど他の免疫細胞だけではなく、 線維芽細胞におけるコラーゲン合成やケラチノサイト分化の調整にも関与してい ることが報告されている^{16, 152-155}。好塩基球は IL-4 を産生することで 2 型免疫応 答の発生および持続に関与していると考えられており、アトピー性皮膚炎の形成 に重要な役割を有することが推察される。また、アトピー性皮膚炎の病変部にお いて、好塩基球および ILC2 の浸潤は本疾患に特徴的であったが、それらの CD45⁺ 細胞中に占める割合を解析したところ、皮膚中の好塩基球および ILC2 の割合は正 の相関関係にあり、さらに、皮膚中の好塩基球と血液中の ILC2 との割合は負の相 関関係にあることが示された。これらの結果より、アトピー性皮膚炎病変部では、 好塩基球から産生された IL-4 が循環性 ILC2 を皮膚病変部へ誘導している可能性 が示唆された。

以上、第2章では乾癬病変部に比しアトピー性皮膚炎の病変部において、CRTH2 陽性 Th2 細胞および好塩基球の浸潤がみられ、それらが主要な IL-4 陽性細胞であ ることを明らかにした。また、Th2 細胞や好塩基球により誘導される可能性があり、 かつ IL-13 陽性細胞として知られている ILC2 の病変部への集積も明らかにした。 また、乾癬同様、アトピー性皮膚炎患者のマスト細胞も IL-22 陽性細胞であり、 マスト細胞が炎症性皮膚疾患に関与することが示唆された。

第3章 新たなマウス強皮症モデルの作成および治療薬の影響

1. 緒言

第1章で述べた乾癬は IL-23/Th17 細胞経路の活性化を特徴とし、一方、第2章 で論じたアトピー性皮膚炎は2型免疫応答に関与する炎症を伴う疾患である。こ れらに対し強皮症は、現在有効な治療薬がなく、どのT細胞サブセットが病態形 成に関与しているか不明な致死性の疾患である。また、稀な難治性の疾患である ため、臨床研究において十分な数の患者検体を得ることが難しい。そのため、本 疾患の病態解析ならびに治療薬の開発には、マウスモデルなどの動物モデルを用 いた研究が非常に重要となる。

汎発性強皮症は限局性強皮症に比し、皮膚および肺または消化器官において炎 症性かつ進行性の線維化をもたらす抗トポイソメラーゼ Ι 抗体陽性の疾患である ²²。トポイソメラーゼ I は血管内皮から分泌されるアポトーシス性のタンパク質で あり自己免疫疾患の自己抗原になりうると考えられている¹⁵⁶。循環性トポイソメ ラーゼ I に対する特異的な自己抗体の検出は病態の重症度と相関することが報告 されていることから^{23,157}、自己反応性 Th 細胞が病態形成に関与している可能性が 推察される。また、汎発性強皮症の特徴的な病態である線維化には線維芽細胞が 関与しているため、活性化された Th 細胞および線維芽細胞との相互作用が線維化 の発生や病態の進展において重要であると考えられている¹⁵⁶。一方、線維化の病 態形成には樹状細胞の関与も示唆されており、ブレオマイシン誘発型マウスモデ ルにおいて真皮中の CD11c 陽性樹状細胞と α-smooth muscle actin positive (α SMA⁺) 筋線維芽細胞が増加することが報告されている^{158,159}。

ブレオマイシン誘発皮膚線維症マウスモデルは治療薬探索や薬効評価などに汎 用されているが、形成された線維化はある程度自己修復されるため、薬効などを 客観的に評価することが困難である¹⁶⁰。他にもブレオマイシンのような薬物では ではなくサイトカインの投与によって作成したマウスモデルやいくつか遺伝的な 操作が加えられたマウスモデルも存在している。例えば、Transforming growth factor - β (TGF-β) や connective tissue growth factor (CTGF) などのサイ トカイン投与により線維化を示すマウスモデルを作成することができる¹⁶¹。しか しながら、生じる線維化は投与部位近傍に局限された線維化でしかないことから モデルとして有用であるとは言えない。一方、遺伝子突然変異による fibliin-1 遺伝子異常を伴うモデルである tight skin (Tsk)マウスモデルは皮下組織におい て線維化を生ずるが、肺においては肺線維よりむしろ肺気腫を呈すること ¹⁶²、ウ ロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体遺伝子のノックアウトにより 作成することができる uPAR 欠損マウスモデルは末梢毛細血管障害を特徴とするこ と¹⁶³から、これらのモデルはいずれも線維化および血管障害に焦点を当てたマウ スモデルであると考えられる。したがって、よりヒトの汎発性強皮症に近いマウ スモデルの作成ならびに病態解析が急務である。

Yoshizaki らは 2011 年に、マウスにトポイソメラーゼ I を完全型フロイントア ジュバントと隔週投与することにより、皮膚および肺において自己免疫性の炎症 および線維化の誘発を特徴とするマウスモデルを報告した¹⁶⁴。すなわち、トポイ ソメラーゼ I が病態を形成する自己免疫反応においてターゲット分子になりうる 可能性が示された。一方、自己タンパクを負荷させた樹状細胞は脳脊髄炎実験モ デルおよび自己免疫心筋炎モデルなどの自己免疫疾患マウスモデルの作成に用い られている^{165,166}。以上の報告より、トポイソメラーゼ I ペプチドを負荷した樹状 細胞によって誘導したマウスモデルは炎症および線維化を伴う自己免疫疾患のマ ウスモデルとして有用であると考えられる¹⁶⁷。

汎発性強皮症の病態は複雑であるが、線維化の進行中に調節異常を伴った免疫 細胞および血液凝固系が共に確認されている³³。汎発性強皮症の病態に関与して いる血液凝固因子において、重要な凝固因子であるトロンビンの活性化は組織の 損傷および炎症時に起こる早期反応の一つとして確認されている³²。トロンビン は組織修復を行う一方で、いくつかの免疫誘導因子および線維化誘導因子を誘導 する³⁵。さらに、トロンビンは肺線維芽細胞をアポトーシス抵抗性の筋線維芽細 胞へ分化させる作用を介し線維化を促進していることが知られている^{32,36}。実際、 トロンビンは汎発性強皮症患者の線維化を示した肺において上昇している^{35,36}た め、トロンビンの作用を阻害することにより汎発性強皮症における線維化の進行 を抑制できる可能性がある。

ダビガトランは経口摂取可能なトロンビンインヒビターであり、トロンビンに よって誘導されるコラーゲンの生成を、線維芽細胞からの筋線維芽細胞への形質 転換を抑えることにより抑制する¹⁶⁸。実際、*in vitro¹⁶⁸および*マウスブレオマイ シン誘発性強皮症モデル¹⁶⁹において、ダビガトランは線維化を導く反応に対し抑 制的に作用して、線維化を抑えることが報告されている。さらに、現在、ダビガ トランの治験も行われている(Clinical trial Registration Number NCT02426229)。

そこで本章では、汎発性強皮症のトポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞を用 いてマウス強皮症モデルを作成し、ヒトの病態モデルとしての意義を検討した。 また、抗トロンビン薬であるダビガトランを本マウスモデルに投与し、その影響 を免疫組織化学的検査、ヒドロキシプロリン定量および qRT-PCR により評価した。

2. 実験材料および方法

2.1 マウスモデル

近交系 BALB/c マウスモデルは CRCHUM (Montreal、Canada) の specific pathogen-free facility で飼育・繁殖され、5-7 週齢のマウスを使用した。すべ ての動物実験プロトコールは CHUM における動物保護委員会 (CIPA-Comité Institutionnel de Protection des Animaux du CHUM) により承認された。CIPA の規則はカナダ動物衛生協議会に準拠している。

2.2 実験方法

2.2.1 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデル

トポイソメラーゼ I タンパク質の特定領域中の合成ペプチド(TOPOIA10-26、 CanPeptide、Montreal、Canada)を使用して、マウス骨髄から分化させた樹状細 胞に負荷した。免疫感作のプロトコールは下記のように実施した¹⁷⁰。すなわち、 トポイソメラーゼ I ペプチド(TOPOIA ; SQIEADFRLNDSHKHKD)は McGill 大学のシ ェルドンバイオテクノロジーセンターで合成されたものを用いた。樹状細胞は BALB/c マウスの大腿骨を 10% FCS、500 U/ml ペニシリン、500 µg/ml ストレプト マイシン、1 mmol/1 2-メルカプトエタノールおよび 10 mmol/1 HEPES を加えた RPMI(RPMI1640 培養液)で洗い出し、採取した細胞に顆粒球単球コロニー刺激因 子 (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor; GM-CSF) (Peprotech、 Rocky、Hill、NJ) を加えて11日間培養して得た。骨髄由来樹状細胞に分化した 後に、10 µg/mlのトポイソメラーゼIペプチドを1日負荷し、最後に大腸菌 055:B5 (Sigma-Aldrich) 由来のリポ多糖類 (LPS、100 ng/ml) 存在下で4時間培 養した。この操作により、活性化マーカーである CD40 および CD86 を発現する均 ーな CD11c⁺ CD11b⁺ CD103⁻ Signal regulatory protein α (SIRPα) ⁺ Major histocompatibility complex (MHC) class II⁺ の樹状細胞が得られた。

その後、4週間トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞をマウスの皮下および気管支内 に投与し、5週間休止させた後に L-システインで活性化したパパイン (Calbiochem-Behring) 100 µg を、トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞が経皮投与さ れた部位の近傍に投与した。追加免疫した 2 週間後に CFA (MP Biomedicals、 Santa Ana、CA)および 100 µg のトポイソメラーゼ I ペプチドを 1:1 の比で混合し た乳剤を皮下注射した。コントロールマウスはペプチド負荷を行わず、LPS 存在下 4 時間培養した樹状細胞を用いた¹⁶⁷。

2.2.2 ダビガトラン投与

プラザキサ[®]カプセルから取り出したダビガトランエテキシレート(Pradaxa from Boehringer Ingelheim、Burlington、Canada)は顆粒を秤量した後に、飼料 を製造している Envigo へ送り、10 mg/g の濃度に調節した後に CRCHUM の動物施設 で使用される通常のマウス飼料(Envigo、Madison、WI)に混餌した¹⁶⁹。ダビガト ランエテキシレートの含有量はカプセルの内容物である顆粒の重量の35.4%とし た。マウスには通常飼料またはダビガトランエテキシレート含有飼料を自由に与 えた。研究中に体重減少および脱水は観察されなかった。ダビガトランは炎症進 行中の早期 (early treatment) あるいは炎症に伴う線維化が生じ始める後期 (late treatment) に投与した。(Fig. 20)



Fig. 20 Experimental protocol for immunization with TopoI peptide (TOPOIA)loaded dendritic cells and for the treatment of dabigatran in mice.

For early treatment, dabigatran was administrated after second immunization with TOPOIA-loaded dendritic cells (DC) and stopped prior to DC boost. For late treatment, dabigatran was given one week before DC boost and continued until experimental endpoint.

2.2.3 ヒドロキシプロリン解析

実験開始12週後に、注射部位近傍の剃毛した皮膚サンプル(直径 6mm)および 左肺葉をヒドロキシプロリン定量のために急速凍結した。摘出した組織は湿重量 を定量後、6N HC1 での酸加水分解(95℃、肺は3日、皮膚は6日)を行い、その 後、酸は乾燥によって蒸発させた。 残渣を2 mlの蒸留水に再懸濁し、遊離ヒド ロキシプロリン量をクロラミンT(Sigma-Aldrich)で酸化した後にエールリッヒ 試薬(Sigma-Aldrich)と反応させ、発色を吸光度 555nm で測定した。 標準曲線 はトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン (Sigma-Aldrich) をクロラミンTで酸化さ せて作成した。組織加水分解物中のヒドロキシプロリン量は標準曲線から計算し た。成績はヒドロキシプロリン/組織 (µg/mg) で示し、雄雌別に検討した。

2.2.4 免疫組織化学的検査(マッソントリクローム染色)

マウス左肺葉は、OCT (Tissue-Tek、Torrance、CA) および 30%スクロースの 1:1 溶液で膨張させた後に凍結した。皮下組織および深部筋膜を含む各マウスで同 じ部位を十分な厚さの皮膚サンプルとして薄切し OCT 中で凍結した。核を染色す るための鉄へマトキシリンステップを含むマッソントリクローム染色を用いて、 肺および皮膚の凍結切片 (5µm) におけるコラーゲンを染色した。すべての切片は 20±0.75NA の対物レンズおよび 0.3225mm の解像度を有する VS110 顕微鏡 (01ympus、Center Valley、PA) を用いてスキャンした。画像は 01yVIA ソフトウ ェア (01ympus) で解析した。

2.2.5 qRT-PCR

剃毛した 6mm の皮膚サンプルは皮下注射部位の近傍から採取し、RNA later (Qiagen) に 24 時間浸した後に、-80℃で保管した。皮膚サンプルは MACS Dissociator (Miltenyi Biotech) を用いてホモジナイズし、 RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen) によって RNA を抽出した。抽出された RNA は Nanodrop (Thermo Fisher、Waltham、MA) で濃度測定した後に、cDNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) により cDNA へ転写した。
それぞれの反応は TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) を用 いて、100 ngの cDNA から *tnfrsf12a (Tweakr)、Ifng、I14、I16、I113、I117a、 I122、I133、Tgfb1、Ts1p、Mmp12、Serpine1、Vwf* および *Timp1* (TaqMan probes、 Thermo Fisher)を測定した。qRT-PCR reaction は Quant Studio 7 Flex Real Time PCR system (Thermo Fisher) で 2^(-ΔCT)法を用いて定量化し、ハウスキーピ ング遺伝子として *Hprt*を使用した。表示された相対的発現は 1,000 倍した後にグ ラフ化した。

2.3 統計学的解析

第1章および第2章の2.3と同様に解析した。

3. 実験成績

3.1 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける皮膚 組織の線維化

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの皮膚 におけるコラーゲン量の変化を組織学的ならびに生化学的に解析した。その結果、 対照群の樹状細胞移入群に比しトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞移入群では、皮 膚の顕著な線維化および肥厚が確認された(Fig. 21)。



Fig. 21 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces skin fibrosis in mice.

At week 12, skin cryosections (5 μ m) were assessed for fibrosis by trichrome (Masson) stain and measurement of hydroxyproline content. Data are from male skin samples from at least 2 independent experiments with n=8 unpulsed DC and n=16 TOPOIA DC. Magnification 20 x. Scale bar=100 μ m. ***P* < 0.01 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

3.2 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける肺組織の線維化

トポイソメラーゼI負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの肺にお けるコラーゲン量の変化を組織学的ならびに生化学的に解析した。その結果、対 照群の樹状細胞移入群に比しトポイソメラーゼI負荷樹状細胞移入群では、肺にお いても線維化が確認された(Fig. 22)。



Fig. 22 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces lung fibrosis in mice.

At week 12, lung cryosections (5 μ m) were assessed for peribronchial (open arrows) and perivascular (closed arrows) collagen deposition and inflammation by trichrome (Masson) stain and measurement of hydroxyproline content. Data are from male lung samples from at least 2 independent experiments with n=14 unpulsed DC and n=21 TOPOIA DC. Magnification 20 x. Scale bar=100 μ m. ***P* < 0.01 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

3.3 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織に おける細胞外基質に関連する遺伝子の mRNA の発現

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの皮膚 における I 型コラーゲン (*Col1a1*) および V 型コラーゲン (*Col5a1*) の mRNA 発現 を検討した。その結果、対照群の樹状細胞移入群に比しトポイソメラーゼ I 負荷 樹状細胞移入群では、*Col1a1* の有意な上昇ならびに *Col5a1* の上昇傾向が認められ た。*Col1a1* の発現は本実験で検討した mRNA の中で最も高値を示したことから、 *Col1a1* が本モデルにおける線維化に重要な役割を有することが示唆された (Fig. 23)。



Fig. 23 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces skin fibrosis associated with upregulated *Col1a1* gene expression in mice.

3.4 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織に おける血管障害および線維化に関連する遺伝子の mRNA の発現

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの皮膚 における血管障害および線維化に関する mRNA 発現を検討した。その結果、対照群 の樹状細胞移入群に比しトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞移入群では、血管障害 および皮膚の線維化に関与する *plasminogen activator inhibitor-1* (*Serpine1*) の mRNA 発現の有意な上昇が観察された(Fig. 24)。



Vascular function genes

Fig. 24 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces skin fibrosis associated with upregulated *Sepine1* gene expression in mice.

3.5 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織に おける転写調節因子の mRNA 発現

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの皮膚 における retinoic-acid-orphan-receptor-C (Rorc) および forkhead box P3 (Foxp3)の mRNA 発現を検討した。その結果、対象群の樹状細胞移入群に比しト ポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって Rorc および Foxp3 の有意な上昇が確認さ れた。Rorc の発現は Foxp3 の 5 倍程度を示した (Fig. 25)。



Transcription factor genes

Fig. 25 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces skin fibrosis associated with upregulated *Rorc* and *Foxp3* gene expression in mice.

3.6 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルの皮膚組織に おける線維化に関連する遺伝子の mRNA 発現

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルの皮膚 における線維化に関連する遺伝子の mRNA 発現を検討した。その結果、対照群の樹 状細胞移入群に比しトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞移入群では、皮膚の線維化 および炎症に関与することが知られている *IL-13* および TNF ファミリーサイトカ インの受容体の tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A (*TweakR*)の有意な上昇が確認された(Fig. 26)。



Profibrotic genes

Fig. 26 Immunization with TOPOIA-loaded DCs induces skin fibrosis associated with upregulated *IL-13* and *TweakR* gene expression in mice.

3.7 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける皮膚線 維化に及ぼすダビガトランの影響

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける皮膚線維 化に及ぼすダビガトランの影響を検討する目的で、皮膚におけるコラーゲン量の 変化を組織学的および生化学的に解析した。その結果、ダビガトランはトポイソ メラーゼ I 負荷樹状細胞移入による線維化形成を早期投与(炎症時)により有意 に促進した。これに対し、早期投与において認められた促進作用は後期投与(線 維化時)では観察されなかった(Fig. 27)。一方、性差による違いは認められな かった。



Fig. 27 Dabigatran aggravates skin fibrosis during early treatment in mice.

At week 12, representative trichrome (Masson) stained skin sections from two experiments. Magnification 20x. Scale bar=100 μ m. Fibrosis was quantified by hydroxyproline assay. Data shown are mean ± SEM and a pool of at least two experiments with n=13 control (no dabigatran), n=13 late and n=14 early. **P* < 0.05 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

3.8 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける細胞外 基質に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける細胞外基 質に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響を検討した。その結果、 ダビガトランはトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞移入による *Collal* mRNA 発現亢 進に対し投与期間によらず抑制的に作用し、特に後期投与では有意に抑制した。 一方、ダビガトランは *Col5al* に対しては投与期間によらず有意に亢進させ、特に 早期投与では顕著であった(Fig. 28)。



Matrix genes

Fig. 28 Dabigatran treatment aggravates skin fibrosis induced by immunization with TOPOIA-loaded DCs with upregulated *Col5a1* gene expression in mice.

At week 12, relative skin mRNA gene expression in control (TOPOIA-loaded DCs), late/early administration of dabigatran group was examined by qRT-PCR. Data shown are mean \pm SEM and qRT-PCR data are from male skin samples from at least 2 independent experiments with n=7 control (no Dab), n=5 late and n=8 early. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

3.9 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける血管障 害および線維化に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける血管障害 および線維化に関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響を検討した。 その結果、投与期間によらずダビガトラン投与により tissue inhibitor of metalloproteinases (Timp1) mRNA 発現の有意な亢進が認められた。また、後期投 与に比しダビガトランの早期投与は von willebrand factor (vWf)の発現を有意 に亢進した (Fig. 29)。



Vascular function genes

Fig. 29 Dabigatran treatment aggravates skin fibrosis induced by immunization with TOPOIA-loaded DCs with upregulated *Timp1* gene expression in mice.

At week 12, relative skin mRNA gene expression in control (TOPOIA-loaded DCs), late/early administration of dabigatran group was examined by qRT-PCR. Data shown are mean \pm SEM and qRT-PCR data are from male skin samples from at least 2 independent experiments with n=7 control (no Dab), n=5 late and n=8 early. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

3.10 トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける線維 化に関与する遺伝子の mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響

トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によるマウス強皮症モデルにおける線維化に 関連する遺伝子 mRNA 発現に及ぼすダビガトランの影響を検討した。その結果、ダ ビガトランはトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞移入による *TweakR* mRNA 発現亢進 に対し、投与期間によらず有意に亢進した。また、ダビガトランは *IL-33、IL-6、 IFN-* γ ならびに *IL-4* mRNA 発現を特に早期投与において有意に亢進させた(Fig. 30)。



Profibrotic genes

Fig. 30 Dabigatran treatment aggravates skin fibrosis induced by immunization with TOPOIA-loaded DCs with upregulated *IFNr*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-33* and *TweakR* gene expression in mice.

At week 12, relative skin mRNA gene expression in control (TOPOIA-loaded DCs), late/early administration of dabigatran groups was examined by qRT-PCR. Data shown are mean \pm SEM and qRT-PCR data are from male skin samples from at least 2 independent experiments with n=7 control (no Dab), n=5 late and n=8 early. **P* < 0.05 by unpaired Student's *t*-test with Welch's correction.

4. 考察

本章では、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞によって誘導したマウス強 皮症モデルにおけるヒトの汎発性強皮症の病態モデルとしての意義を検討した。 また、強皮症の新たな治療薬として考えられている抗トロンビン薬であるダビガ トランの本モデルへの影響も併せて検討した。

強皮症は、前述の乾癬およびアトピー性皮膚炎と同様に、遺伝的要因に加えて 免疫調節機構の異常と環境要因に起因する原因不明の自己免疫疾患であり、線維 化、炎症、血管障害および自己抗体陽性を特徴とする。乾癬およびアトピー性皮 膚炎において Th17 細胞および Th2 細胞がそれぞれの病態形成ならびに症状発現に 関与しているが、強皮症ではどの Th サブセットが病態形成に関与しているかは未 だに不明である。

TSLP は汎発性強皮症の患者で高発現がみられ、毛細血管障害および線維化と関連があると考えられている¹⁷¹⁻¹⁷³。また、Th17 細胞の分化に必須である TGF- β による線維化の一部は TSLP 依存的であることが知られている¹⁷¹。さらに、マウスモデルを用いた研究において、TSLP は IL-13 により誘導される線維化誘導遺伝子である CXC chemokine ligand 9/CC chemokine ligand 2 (CXCL9/CCL2) や matrix metalloproteinase-12 (MMP12) などを活性化する¹⁷¹。中でもマクロファージによって放出されるエステラーゼの一つである MMP12 は、汎発性強皮症における皮膚および肺において増加がみられ、皮膚の重症度との相関があると報告されている¹⁷⁴。また、MMP12 ノックアウトマウスにおいて、線維化の進行がみられない¹⁷⁵ ことより、MMP12 は線維化反応への関与が推察されている。さらに、MMP12 は IL-13 だけでなく TGF- β に応じても発現する伝達物質であることが知られている¹⁷¹。

汎発性強皮症の患者血清あるいは皮膚、肺ならびに臓器などにおいて IL-33 お よび TGF-β値の上昇がみられるが、IL-33 によって誘導された線維化は IL-13 産 生を介して生じる線維化であり、IL-13の活性化を必要とする¹⁷⁶。また、汎発性 強皮症において増加が確認されている循環性 Tc 細胞では IL-13 の遺伝子発現が検 出されており、IL-13 およびその受容体である IL-13R α 2 鎖の遺伝子多型は汎発性 強皮症および皮膚線維化と正の相関が報告されている¹⁷⁷⁻¹⁸²。さらに、近年、網羅 的遺伝子発現解析において、IL-13 は汎発性強皮症の炎症反応と関連があることが 明らかとなった¹⁷⁷。すなわち、汎発性強皮症の病態形成において IL-13 は重要な 作用を有していると考えられる。本研究において、強皮症モデルの皮膚では線維 化が生じることが確認され、IL-13 mRNA 発現が有意に増加していた。さらに、IL-13 と共に TweakR および Serpine1 の mRNA 増加がみられた。TweakR は汎発性強皮 症において炎症および線維化増殖と関連があり¹⁸³、Serpinelは血管障害および皮 膚の線維化に関与している。以上の成績より、トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞 によって誘導したマウス強皮症モデルは、強皮症の特徴である線維化、炎症、血 管障害および自己抗体陽性を示すマウスモデルであることが明らかとなった。本 モデルは皮膚および肺において進行性の線維化を伴い、皮膚において IL-13mRNA の高発現がみられたことより、ヒトの汎発性強皮症に近いマウスモデルであると 考えられる。

本モデルでは、皮膚において Th17 細胞の転写因子である Rore および制御性 T 細胞における転写因子である Foxp3 の発現が有意に増加していることが示された。 最近の研究により Foxp3 陽性である制御性 T 細胞からも IL-17 が産生されている ことが報告されている¹⁸⁴⁻¹⁸⁶。汎発性強皮症あるいはマウスモデルにおいて IL-17 の役割は不明であり、IL-17 が線維化または炎症を誘導するかは明らかではない ¹⁸⁷⁻¹⁹³。しかしながら、IL-17 が炎症性反応の誘導に伴い線維化を引き起こしうるこ とや炎症が生じている組織において Th17 細胞および制御性 T 細胞の増加が報告さ

れている¹⁹⁴ことを考え併せると、本モデルにおいても IL-17 の産生に関与する Th17 細胞および制御性 T 細胞の増加が生じているものと思われる。

通常時、凝固因子であるトロンビンはトロンボモジュリンと複合体を形成する ことで凝固活性が抑えられている。また、過度のトロンビン生成を防ぐ為にトロ ンビン-トロンボモジュリン複合体は凝固阻止因子であるプロテイン C を活性化す る。活性化プロテインCはトロンビンの生成に関与する Va 因子を分解することで 抗凝固作用を示す。In vitroにおいて、ダビガトランに代表されるトロンビン直 接阻害薬はプロテイン C の活性化を妨げることにより Va 因子の分解を抑制し、逆 にトロンビンの生成を強めることが報告されている¹⁹⁵。これは通常時に働いてい るトロンビンの過剰生成を防ぐネガティブフィードバックを抑制することで生じ ている。本研究において、ダビガトランはトポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によ って誘発された線維化に対し予想に反して抑制作用を示すことなく、むしろ炎症 時での投与(早期投与)により線維化を増悪させ、線維化および炎症性の遺伝子 発現を誘導した。ダビガトランはトロンビン単体に比しトロンビン-トロンボモジ ュリン複合体に対する高い親和性を持つと報告されている¹⁹⁶。したがって、ダビ ガトランが活性化プロテインCの生成を抑制することで、結果として Va 因子の分 解が抑制され、それによりトロンビン生成の促進が引き起こり、さらなる線維化 を生じたと考えられる。

IL-33、IL-6、TweakR、Timp-1および vWFの発現は汎発性強皮症において血清、 皮膚、肺および臓器などで増加がみられる^{7,183,197,198}。IL-33および IL-6は Timp-1の発現を誘導することが報告されており^{176,199}、既に述べたように、 TweakRは汎発性強皮症において炎症および線維化との関連があることが明らかに なっている¹⁸³。恒常性の維持において、vWFはトロンビン生成を促進させるVIII因 子と結合し安定した複合体を形成し、VIII因子の活性化に関与している²⁰⁰。本研究 においても炎症時におけるダビガトランの投与によりマウス強皮症モデルにおい

て vWF の発現の亢進がみられた。したがって、ダビガトランの早期投与により、 トロンビンの増加を介した線維化が促進されたと考えられる。最近、ダビガトラ ンは間質性肺線維症の患者において肺胞性出血を引き起こすことが報告された²⁰¹。 ダビガトランの高用量投与は出血を伴う副作用が生じる可能性が考えられるが、 低用量投与によりむしろトロンビンの作用が増強されることが報告されており²⁰²、 本研究の実験系においても、今後、より高用量のダビガトランを用いた検討が必 要であると思われる。

IL-6 は TGF-βと同様に Th17 細胞の分化に必要であるサイトカインである。本 研究では、ダビガトランの早期投与により皮膚組織において IL-6 および TGF-βの mRNA 発現が亢進していたことから Th17 細胞の関与が考えられる。第2章で述べた ように、IL-13 は Th2 細胞から産生されるサイトカインであり IL-4 と受容体を共 有している。トポイソメラーゼ I 負荷樹状細胞によって誘導したマウスモデルで 高い IL-13 の発現が示されたが、ダビガトランの早期投与により、同程度の IL-13 発現がみられただけでなく、IL-4 の有意な増加が確認された。また、ダビガトラ ンの早期投与によって Th1 から産生される IFN-γの増加も示された。これらの結 果は、ダビガトランの早期投与により誘導された線維化に関与する炎症反応には、 特有の T 細胞サブセットに起因しない可能性が考えられる。または、炎症や線維 化の進行と共に病勢によって T 細胞サブセットが変化する可能性も考えられるこ とから、今後、時間軸を考慮したさらなる検討が必要であると思われる。

以上、第3章では、トポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞によって誘導した マウス汎発性強皮症モデルはヒトの汎発性強皮症と同様、進行性の皮膚および肺 の線維化を呈し、ヒトの病態と近い病態を示した。したがって、ヒトの強皮症に おける病態形成の解析ならびに新規治療薬の薬効を検討するうえで有用なマウス モデルであると考えられる。また、このマウスモデルの炎症時にダビガトランを 投与することにより、線維化に関与する Co15a1、IL-33、IL-6、TweakR 遺伝子、

また脈管障害および炎症に関与する *Timp-1、vWF、IFN-γ、IL-4*遺伝子の有意な 上昇が認められ、予想に反し、むしろ線維化を悪化させることが示された。以上 の成績は、汎発性強皮症へのダビガトランの投与は病態を悪化させる可能性を示 唆しており、今後早急に臨床サンプルを用いた検討を行う必要があると思われる。

総括および結論

本研究では、フローサイトメトリーおよび qRT-PCR 法を用いて乾癬およびアト ピー性皮膚炎患者の皮膚検体および血液細胞における免疫細胞の分布ならびにサ イトカイン陽性パターンを解析した。また、ヒト強皮症においてトポイソメラー ゼ I 陽性である自己抗体を誘導した、ヒトの疾患に近いマウス強皮症モデルを構 築し、その病態を解析した。さらに、強皮症の治療薬として有用と考えられてい る抗トロンビン薬であるダビガトランの本マウスモデルへの影響も併せて検討し た。

第 1 章では、乾癬患者の皮膚疾患部における IL-17 および IL-22 の陽性細胞を フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン染色ならびに定量的 PCR 法 (qRT-PCR) を用いて解析した。すなわち、皮膚検体採取後、in vitro において未 刺激で細胞集団を解析する新規手法を用いて、CD45⁺細胞を対象に解析を行った。 その結果、病変部では IL-22 陽性 CD3⁻ c-Kit⁺ 細胞ならびに IL-17 陽性 CD3⁺ c-Kit⁻ 細胞の浸潤が確認された。CD3⁻ c-Kit⁺ Fc ε R I⁺ 細胞はマスト細胞の形態を示 し、このマスト細胞が主要な IL-22 陽性細胞であることを世界で初めて明らかに した。また、マスト細胞は IL-17 陽性に加え、IL-17R も発現していることを示し た。さらに、乾癬における IL-17 産生は T 細胞が主に関与している可能性を示し た。次いで、乾癬における有効的な治療薬の IL-23p40(IL-12p40)に対する抗 体医薬品であるウステキヌマブに抵抗性を示した病変部における治療前後の遺伝 子発現およびサイトカインプロファイルを gRT-PCR とフローサイトメトリーで解 析した。その結果、抵抗性病変部では治療前と同様に、非病変部に比し IL-17、 *IL-20、IL-22* および *hBD2* の mRNA 発現が亢進していた。さらに、抵抗性を示し た病変部における IL-17 陽性 T 細胞の割合は治療前の患者群と同程度であった が、治療前に比し IL-17 陽性非 T 細胞の割合が有意に増加していた。したがって、

自然免疫細胞による IL-17 産生が乾癬の病態形成ならびに抵抗性病変の維持に関 与している可能性が示唆された。

第2章では、フローサイトメトリーを用いて、アトピー性皮膚炎患者と乾癬患 者における皮膚病変部および循環血液中の細胞分布ならびに培養刺激前後におけ る IL-4 および IL-13 陽性細胞を検討した。両患者群における末梢血中の細胞分布 およびサイトカイン陽性率に差異はみられなかった。末梢血中の T 細胞は IL-4 お よび IL-13 陽性であり、ILC2 では IL-13 のみ、好塩基球では IL-4 のみ陽性であっ た。一方、皮膚病変部では、乾癬患者に比しアトピー性皮膚炎患者において Th2 細胞および ILC2 の割合が顕著に高く、IL-4 および IL-13 陽性 T 細胞比率が無刺激 時においても有意に高いことが示された。また、乾癬患者と同様にアトピー性皮 膚炎患者においても IL-22 陽性のマスト細胞が確認されたことから、T 細胞由来の IL-4 および IL-13、ならびにマスト細胞由来の IL-22 がアトピー性皮膚炎の病態 形成に関与していることが示唆された。

アトピー性皮膚炎患者の病変部で特異的に検出された Fc & R I⁺ c-Kit⁻ CD123⁺ 細胞は好塩基球の形態を示し、培養刺激に伴い IL-4 生産能を有することが示された。 また、皮膚中の好塩基球の細胞比率と ILC2 の細胞比率は正の相関を、血液中の ILC2 とは負の相関を示すことが明らかとなった。好塩基球と ILC2 の相関関係から、 好塩基球が血中から皮膚病変部への ILC2 の遊走に関与する可能性が示唆された。 一方、好塩基球と ILC3 との相関はみられなかった。以上の成績より、異なる皮膚 疾患における末梢血中の免疫細胞に顕著な特性の違いはみられないが、アトピー 性皮膚炎患者の皮膚病変部では 2 型免疫応答に関与する様々な細胞の浸潤が生じ ており、それぞれの細胞がアトピー性皮膚炎の病態形成に関与している可能性を 示した。

第3章では、汎発性強皮症のトポイソメラーゼ I を負荷した樹状細胞を用いて マウス強皮症モデルを作成し、ヒトの病態モデルとしての意義を検討した。また、

抗トロンビン薬であるダビガトランを本マウスモデルに投与し、その影響を免疫 組織化学的検査、ヒドロキシプロリン定量および qRT-PCR により評価した。トポ イソメラーゼ I を負荷した樹状細胞によって誘導したマウス強皮症モデルは、汎 発性強皮症において炎症および線維化と関連が示唆されている *IL-13*の発現増加 を伴う線維化を示したことから、汎発性強皮症の病態形成の解析ならびに新規治 療薬の薬効を検討するうえで、有用なマウスモデルであることが示唆された。ま た、このマウスモデルの炎症時にダビガトランを投与することにより、線維化に 関与する *Col5al、IL-33、IL-6、TweakR* 遺伝子、また脈管障害および炎症に関与 する *Timp-1、vWF、IFN-y、IL-4* 遺伝子の有意な亢進が認められ、予想に反し、 むしろ線維化を悪化させることが示された。したがって、ダビガトランの早期投 与により誘導される炎症には Th1、Th2、Th17 細胞がそれぞれ関与する、ならびに 線維化の進行と共に関与する T 細胞サブセットが変化する可能性が推測された。

本研究で行った皮膚組織を用いた免疫学的解析は血液中の循環性細胞を用いた 解析に比し、2型免疫応答が関与する疾患であるアトピー性皮膚炎やTh17細胞関 連疾患である乾癬などの異なる炎症性皮膚疾患において、病態に関与する免疫応 答の特徴を反映させるのに有用であり、それぞれの病態を理解する上で優れてい ることが示唆された。したがって、本研究で用いた皮膚組織の免疫学的解析は強 皮症の病態の解明にも寄与する可能性があると考えられる。本研究で得られた知 見は、これらの炎症性皮膚炎の病態解明や薬物治療の発展に大きく貢献すること が期待される。

謝辞

稿を終わるに臨み、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合創薬 医療情報研究科医療情報学専攻生体制御研究領域 兼任 岐阜薬科大学機能分子学 大講座薬理学研究室 田中宏幸 准教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際して、始終ご指導ならびにご支援を賜りました Centre de Research du Centre Hospitalier de CHUM、Professeur titulaire、Département de Médecine、Université de Montréal、Dr. Marika Sarfati に深甚なる謝意を 表します。また、本論文の執筆にあたり御指導賜りました横浜薬科大学生体防御 研究室 中島敏治 教授に深く感謝いたします。

本論文を御閲覧頂きました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科医療情報学 専攻生体制御研究領域 兼任 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 稲垣 直樹 教授、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科創薬科学専攻 兼任 岐阜大学 大学院工学研究科生命工学専攻 上田浩 教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました Centre for Genomic Regulation、Gene regulation、Stem cells and Cancer、Regeneration and differentiation lab、Dr. Shoma Nakagawa、本論文の作成にあたり御助言を賜り ました Centre Hospitalier de CHUM Accredited Professor、Department of Microbiology and Immunology、Université de Montréal、Dr. Guy Delespesse、 Centre de Research du Centre Hospitalier de CHUM、Immune regulatory lab Dr. Heena Mehta、Dr. Laurence Chapuy、Ms. Marwa Bsat、Mr. Manuel Rubio、 ましこ皮フ科クリニック理事長 増子倫樹博士、日本赤十字社医療センター 吉田遥奈氏に心から感謝いたします。

略語一覧

- AD: Atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎)
- Pso: Psoriasis (乾癬)
- ILC: Innate lymphoid cell (自然リンパ細胞)
- PMA/Iono: Phorbol 12-myristate 13-acetate/Ionomycin
- MHC: Major histocompatibility complex
- Th: T helper cell (CD4 陽性ヘルパーT 細胞)
- Tc: Cytotoxic T lymphocyte (CD8 陽性細胞障害性細胞)
- hBD: β -defensin-2 (β - \vec{r} τ 7 \pm ν ν ν)
- IL: Interleukin $(1 \lor \beta \Box \uparrow \pm \lor)$
- (IL-)R: Receptor (受容体)
- TSLP: Thymic stromal lymphopoietin
- TNF-α: Tumor necrosis factor-α (腫瘍壊死因子)
- $\mathrm{TGF}\mathchar`-\beta$: Transforming growth factor- β
- IFN- γ : Interferon- γ ($\mathcal{I} \lor \beta \mathcal{I} \lor \Box \lor \gamma$)
- UV: Ultraviolet (紫外線)
- CRTH2: Chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T-helper 2 type cell
- PGD₂: Prostaglandin D₂

IgE: Immunogloblin E

QOL: Quality of life (生活の質)

mRNA: Messenger RNA

DC: Dendritic cell (樹状細胞)

Dab: Dabigatran

GM-CSF: Granulocyte-monocyte colony stimulating factor (顆粒球単球コロニ ー刺激因子)

SIRP α : Signal regulatory protein α

GATA3: GATA-binding protein 3

STAT: Signal transducer and activator of transcription

Rorc: Retinoic acid orphan receptor C

Foxp3: Forkhead box P3

TweakR: Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A

Timp: Tissue inhibitor of metalloproteinases

vWF: von Willebrand factor

MMP: Matrix metalloproteinase-12

参考文献

- 1. Pasparakis M, Haase I, and Nestle F O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2014; 14:289-301.
- Fujita H, Nograles K E, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci J A, and Krueger J G. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:21795-800.
- Kashem S W, Haniffa M, and Kaplan D H. Antigen-Presenting Cells in the Skin. Annu Rev Immunol. 2017; 35:469-499.
- Nguyen V T, Ndoye A, Hall L L, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky A I, et al.
 Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. J Cell Sci. 2001; 114:1189-204.
- Noda S, Krueger J G, and Guttman-Yassky E. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases. J Allergy Clin Immunol. 2015; 135:324-36.
- Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger T F, Feichtinger J, Zelger B, et al. The immunology of fibrosis. Annu Rev Immunol. 2013; 31:107-35.
- 7. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite B C, and Postlethwaite A E. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2015; 6:272.
- Cheok S, Yee F, Ma J Y S, Leow R, Ho M S L, Yew Y W, et al. Prevalence and Descriptive Epidemiology of Atopic Dermatitis and Its Impact on Quality of Life in Singapore. Br J Dermatol. 2017.
- Faezi S T, Paragomi P, Shahali A, Akhlaghkhah M, Akbarian M, Akhlaghi M, et al. Prevalence and Severity of Depression and Anxiety in Patients With Systemic Sclerosis: An Epidemiologic Survey and Investigation of Clinical Correlates. J Clin Rheumatol. 2017; 23:80-86.

- Perera G K, Di Meglio P, and Nestle F O. Psoriasis. Annu Rev Pathol. 2012; 7:385-422.
- 11. Guttman-Yassky E and Krueger J G. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? Curr Opin Immunol. 2017; 48:68-73.
- Lowes M A, Russell C B, Martin D A, Towne J E, and Krueger J G. The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses. Trends Immunol. 2013; 34:174-81.
- Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, and Santos-Silva A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. Int J Dermatol. 2012; 51:389-95; quiz 395-8.
- Harrington L E, Hatton R D, Mangan P R, Turner H, Murphy T L, Murphy K M, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005; 6:1123-32.
- Werfel T, Allam J P, Biedermann T, Eyerich K, Gilles S, Guttman-Yassky E, et al.
 Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis.
 J Allergy Clin Immunol. 2016; 138:336-49.
- Mu Z, Zhao Y, Liu X, Chang C, and Zhang J. Molecular biology of atopic dermatitis.
 Clin Rev Allergy Immunol. 2014; 47:193-218.
- 17. Boniface K, Bernard F X, Garcia M, Gurney A L, Lecron J C, and Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. J Immunol. 2005; 174:3695-702.
- Scharschmidt T C, Man M Q, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg J P, et al. Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124:496-506, 506 e1-6.
- Schwartz C, Eberle J U, and Voehringer D. Basophils in inflammation. Eur J Pharmacol. 2016; 778:90-5.

- Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, et al. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. J Allergy Clin Immunol. 2015; 136:104-115 e7.
- Senecal J L, Henault J, and Raymond Y. The pathogenic role of autoantibodies to nuclear autoantigens in systemic sclerosis (scleroderma). J Rheumatol. 2005; 32:1643-9.
- 22. Nihtyanova S I and Denton C P. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. 2010; 6:112-6.
- Domsic R T. Scleroderma: the role of serum autoantibodies in defining specific clinical phenotypes and organ system involvement. Curr Opin Rheumatol. 2014; 26:646-52.
- 24. van Bon L, Cossu M, and Radstake T R. An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2011; 23:505-10.
- Sondergaard K, Stengaard-Pedersen K, Zachariae H, Heickendorff L, Deleuran M, and Deleuran B. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) in scleroderma skin. Br J Rheumatol. 1998; 37:304-10.
- Prescott R J, Freemont A J, Jones C J, Hoyland J, and Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. J Pathol. 1992; 166:255-63.
- Henault J, Robitaille G, Senecal J L, and Raymond Y. DNA topoisomerase I binding to fibroblasts induces monocyte adhesion and activation in the presence of antitopoisomerase I autoantibodies from systemic sclerosis patients. Arthritis Rheum. 2006; 54:963-73.

- 28. Robitaille G, Henault J, Christin M S, Senecal J L, and Raymond Y. The nuclear autoantigen CENP-B displays cytokine-like activities toward vascular smooth muscle cells. Arthritis Rheum. 2007; 56:3814-26.
- Koenig M, Dieude M, and Senecal J L. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. Autoimmun Rev. 2008; 7:588-93.
- Fava A, Cimbro R, Wigley F M, Liu Q R, Rosen A, and Boin F. Frequency of circulating topoisomerase-I-specific CD4 T cells predicts presence and progression of interstitial lung disease in scleroderma. Arthritis Res Ther. 2016; 18:99.
- 31. Chizzolini C, Brembilla N C, Montanari E, and Truchetet M E. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2011; 10:276-81.
- Ludwicka-Bradley A, Silver R M, and Bogatkevich G S. Coagulation and autoimmunity in scleroderma interstitial lung disease. Semin Arthritis Rheum. 2011; 41:212-22.
- Chambers R C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? Br J Pharmacol. 2008; 153 Suppl 1:S367-78.
- 34. Krupiczojc M A, Scotton C J, and Chambers R C. Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40:1228-37.
- 35. Ludwicka-Bradley A, Bogatkevich G, and Silver R M. Thrombin-mediated cellular events in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis (scleroderma). Clin Exp Rheumatol. 2004; 22:S38-46.
- 36. Ohba T, McDonald J K, Silver R M, Strange C, LeRoy E C, and Ludwicka A. Scleroderma bronchoalveolar lavage fluid contains thrombin, a mediator of human lung fibroblast proliferation via induction of platelet-derived growth factor alphareceptor. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994; 10:405-12.

- Lowes M A, Suarez-Farinas M, and Krueger J G. Immunology of psoriasis. Annu Rev Immunol. 2014; 32:227-55.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi S I, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat Immunol. 2008; 9:650-7.
- Elder J T, Bruce A T, Gudjonsson J E, Johnston A, Stuart P E, Tejasvi T, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. J Invest Dermatol. 2010; 130:1213-26.
- 40. Cargill M, Schrodi S J, Chang M, Garcia V E, Brandon R, Callis K P, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. Am J Hum Genet. 2007; 80:273-90.
- Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott N J, Dunster C, Baumber L, et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. Hum Genet. 2007; 122:201-6.
- 42. Sofen H, Smith S, Matheson R T, Leonardi C L, Calderon C, Brodmerkel C, et al.
 Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133:1032-40.
- 43. Gottlieb A B, Chamian F, Masud S, Cardinale I, Abello M V, Lowes M A, et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. J Immunol. 2005; 175:2721-9.
- Papp K A, Leonardi C, Menter A, Ortonne J P, Krueger J G, Kricorian G, et al.
 Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. N Engl J Med.
 2012; 366:1181-9.
- 45. Krueger J G. Hiding under the skin: A welcome surprise in psoriasis. Nat Med. 2012;18:1750-1.

- Yeilding N, Szapary P, Brodmerkel C, Benson J, Plotnick M, Zhou H, et al. Development of the IL-12/23 antagonist ustekinumab in psoriasis: past, present, and future perspectives. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1222:30-9.
- Zaba L C, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Nograles K E, Guttman-Yassky E, Cardinale I, et al. Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124:1022-10 e1-395.
- Kopp T, Riedl E, Bangert C, Bowman E P, Greisenegger E, Horowitz A, et al. Clinical improvement in psoriasis with specific targeting of interleukin-23. Nature. 2015; 521:222-6.
- 49. Fredriksson T and Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid.Dermatologica. 1978; 157:238-44.
- 50. Langley R G, Lebwohl M, Krueger G G, Szapary P O, Wasfi Y, Chan D, et al. Longterm efficacy and safety of ustekinumab, with and without dosing adjustment, in patients with moderate-to-severe psoriasis: results from the PHOENIX 2 study through 5 years of follow-up. Br J Dermatol. 2014.
- 51. Leonardi C L, Kimball A B, Papp K A, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). Lancet. 2008; 371:1665-74.
- 52. Papp K A, Langley R G, Lebwohl M, Krueger G G, Szapary P, Yeilding N, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). Lancet. 2008; 371:1675-84.
- 53. Rutz S, Eidenschenk C, and Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunol Rev. 2013; 252:116-32.

- Nograles K E, Zaba L C, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. J Allergy Clin Immunol. 2009; 123:1244-52 e2.
- 55. Liu L, Ding C, Zeng W, Heuer J G, Tetreault J W, Noblitt T W, et al. Selective enhancement of multipotential hematopoietic progenitors in vitro and in vivo by IL-20. Blood. 2003; 102:3206-9.
- 56. Sabat R, Ouyang W, and Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. Nat Rev Drug Discov. 2014; 13:21-38.
- 57. Wei C C, Chen W Y, Wang Y C, Chen P J, Lee J Y, Wong T W, et al. Detection of IL-20 and its receptors on psoriatic skin. Clin Immunol. 2005; 117:65-72.
- 58. Rutz S, Wang X, and Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. Nat Rev Immunol. 2014; 14:783-95.
- 59. Sa S M, Valdez P A, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. J Immunol. 2007; 178:2229-40.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko S V, and Renauld J C. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. J Immunol. 2001; 167:3545-9.
- 61. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, and Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity. 2004; 21:241-54.
- 62. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke W D, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. Eur J Immunol. 2006; 36:1309-23.

- Teunissen M B, Munneke J M, Bernink J H, Spuls P I, Res P C, Te Velde A, et al. Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. J Invest Dermatol. 2014; 134:2351-60.
- 64. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, et al. Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. Immunity. 2011; 35:596-610.
- 65. Keijsers R R, Hendriks A G, van Erp P E, van Cranenbroek B, van de Kerkhof P C, Koenen H J, et al. In vivo induction of cutaneous inflammation results in the accumulation of extracellular trap-forming neutrophils expressing RORgammat and IL-17. J Invest Dermatol. 2014; 134:1276-84.
- 66. Rodewald H R and Feyerabend T B. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? Immunity. 2012; 37:13-24.
- 67. Grimbaldeston M A, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, and Galli S J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. Nat Immunol. 2007; 8:1095-104.
- Gurish M F and Austen K F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. Immunity. 2012; 37:25-33.
- Lin A M, Rubin C J, Khandpur R, Wang J Y, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. J Immunol. 2011; 187:490-500.
- Ackermann L, Harvima I T, Pelkonen J, Ritamaki-Salo V, Naukkarinen A, Harvima R J, et al. Mast cells in psoriatic skin are strongly positive for interferon-gamma. Br J Dermatol. 1999; 140:624-33.
- Jiang W Y, Chattedee A D, Raychaudhuri S P, Raychaudhuri S K, and Farber E M.
 Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. Int J
 Dermatol. 2001; 40:699-703.

- 72. Chen L, Schrementi M E, Ranzer M J, Wilgus T A, and DiPietro L A. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation. PLoS One. 2014; 9:e85226.
- 73. Jack C, Mashiko S, Arbour N, Bissonnette R, and Sarfati M. Persistence of IL-17A+T lymphocytes and IL-17A expression in treatment-resistant psoriatic plaques despite ustekinumab therapy. Br J Dermatol. 2016.
- Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard F X, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. Clin Exp Immunol. 2007; 150:407-15.
- Meephansan J, Ruchusatsawat K, Sindhupak W, Thorner P S, and Wongpiyabovorn
 J. Effect of methotrexate on serum levels of IL-22 in patients with psoriasis. Eur J
 Dermatol. 2011; 21:501-4.
- 76. Dumoutier L, Louahed J, and Renauld J C. Cloning and characterization of IL-10related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. J Immunol. 2000; 164:1814-9.
- 77. Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, and Renauld J C. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. J Immunol. 2001; 166:7090-5.
- Toruniowa B and Jablonska S. Mast cells in the initial stages of psoriasis. Arch Dermatol Res. 1988; 280:189-93.
- Zhao Y K, Zhang Y Q, Wang F, Wu H H, Luo Z Y, Luo D Q, et al. Developing Shingles-Induced Koebner Phenomenon in a Patient With Psoriasis: A Case Report.
 Medicine (Baltimore). 2015; 94:e1009.
- 80. Toyry S, Fraki J, and Tammi R. Mast cell density in psoriatic skin. The effect of PUVA and corticosteroid therapy. Arch Dermatol Res. 1988; 280:282-5.
- Zheng Y, Danilenko D M, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature. 2007; 445:648-51.
- Gaudenzio N, Laurent C, Valitutti S, and Espinosa E. Human mast cells drive memory CD4+ T cells toward an inflammatory IL-22+ phenotype. J Allergy Clin Immunol. 2013; 131:1400-7 e11.
- Milanez F M, Saad C G, Viana V T, Moraes J C, Perico G V, Sampaio-Barros P D, et al. IL-23/Th17 axis is not influenced by TNF-blocking agents in ankylosing spondylitis patients. Arthritis Res Ther. 2016; 18:52.
- Cheuk S, Wiken M, Blomqvist L, Nylen S, Talme T, Stahle M, et al. Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. J Immunol. 2014; 192:3111-20.
- 85. Eller K and Rosenkranz A R. Mast cells: subordinates or masterminds in autoimmunity? J Am Soc Nephrol. 2012; 23:1913-4.
- 86. Shefler I, Pasmanik-Chor M, Kidron D, Mekori Y A, and Hershko A Y. T cell-derived microvesicles induce mast cell production of IL-24: relevance to inflammatory skin diseases. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133:217-24 e1-3.
- 87. Van Belle A B, de Heusch M, Lemaire M M, Hendrickx E, Warnier G, Dunussi-Joannopoulos K, et al. IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. J Immunol. 2012; 188:462-9.
- Kumari S, Bonnet M C, Ulvmar M H, Wolk K, Karagianni N, Witte E, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. Immunity. 2013; 39:899-911.
- 89. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, and Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? J Immunol. 2002; 168:5397-402.
- Gedebjerg A, Johansen C, Kragballe K, and Iversen L. IL-20, IL-21 and p40: potential biomarkers of treatment response for ustekinumab. Acta Derm Venereol. 2013; 93:150-5.
- 91. Hueber A J, Asquith D L, Miller A M, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. J Immunol. 2010; 184:3336-40.

- 92. Noordenbos T, Yeremenko N, Gofita I, van de Sande M, Tak P P, Canete J D, et al. Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. Arthritis Rheum. 2012; 64:99-109.
- 93. Suurmond J, Dorjee A L, Boon M R, Knol E F, Huizinga T W, Toes R E, et al. Mast cells are the main interleukin 17-positive cells in anticitrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Arthritis Res Ther. 2011; 13:R150.
- 94. Villanova F, Flutter B, Tosi I, Grys K, Sreeneebus H, Perera G K, et al.
 Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. J Invest Dermatol. 2014; 134:984-991.
- 95. Lai Y, Li D, Li C, Muehleisen B, Radek K A, Park H J, et al. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. Immunity. 2012; 37:74-84.
- 96. Wolk K, Haugen H, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-γ are not. Journal of Molecular Medicine. 2009; 87:523-536.
- 97. Nograles K E, Zaba L C, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. Br J Dermatol. 2008; 159:1092-102.
- 98. Thyssen J P, Ross-Hansen K, Johansen J D, Zachariae C, Carlsen B C, Linneberg A, et al. Filaggrin loss-of-function mutation R501X and 2282del4 carrier status is associated with fissured skin on the hands: results from a cross-sectional population study. Br J Dermatol. 2012; 166:46-53.
- 99. Hu Z, Xiong Z, Xu X, Li F, Lu L, Li W, et al. Loss-of-function mutations in filaggrin gene associate with psoriasis vulgaris in Chinese population. Hum Genet. 2012; 131:1269-74.

- 100. Irvine A D, McLean W H, and Leung D Y. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. N Engl J Med. 2011; 365:1315-27.
- 101. Gao P S, Rafaels N M, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, Hata T, et al. Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124:507-13, 513 e1-7.
- 102. Hudson T J. Skin barrier function and allergic risk. Nat Genet. 2006; 38:399-400.
- Leisten S, Oyoshi M K, Galand C, Hornick J L, Gurish M F, and Geha R S.
 Development of skin lesions in filaggrin-deficient mice is dependent on adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol. 2013; 131:1247-50, 1250 e1.
- 104. Xue L, Salimi M, Panse I, Mjosberg J M, McKenzie A N, Spits H, et al. Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptorhomologous molecule expressed on TH2 cells. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133:1184-94.
- 105. Salimi M, Barlow J L, Saunders S P, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. J Exp Med. 2013; 210:2939-50.
- 106. Kim B S, Siracusa M C, Saenz S A, Noti M, Monticelli L A, Sonnenberg G F, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. Sci Transl Med. 2013; 5:170ra16.
- 107. Iwasaki M, Nagata K, Takano S, Takahashi K, Ishii N, and Ikezawa Z. Association of a new-type prostaglandin D2 receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 2002; 119:609-16.
- 108. Oiwa M, Satoh T, Watanabe M, Niwa H, Hirai H, Nakamura M, et al. CRTH2dependent, STAT6-independent induction of cedar pollen dermatitis. Clin Exp Allergy. 2008; 38:1357-66.

- He R, Oyoshi M K, Wang J Y, Hodge M R, Jin H, and Geha R S. The prostaglandin
 D(2) receptor CRTH2 is important for allergic skin inflammation after epicutaneous antigen challenge. J Allergy Clin Immunol. 2010; 126:784-90.
- 110. Satoh T, Moroi R, Aritake K, Urade Y, Kanai Y, Sumi K, et al. Prostaglandin D2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. J Immunol. 2006; 177:2621-9.
- 111. Guttman-Yassky E, Nograles K E, and Krueger J G. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. J Allergy Clin Immunol. 2011; 127:1110-8.
- 112. Guttman-Yassky E, Nograles K E, and Krueger J G. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. J Allergy Clin Immunol. 2011; 127:1420-32.
- 113. Guttman-Yassky E, Lowes M A, Fuentes-Duculan J, Whynot J, Novitskaya I, Cardinale I, et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. J Allergy Clin Immunol. 2007; 119:1210-7.
- 114. Gittler J K, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz K J, Wang C Q, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2012; 130:1344-54.
- 115. Suarez-Farinas M, Tintle S J, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. J Allergy Clin Immunol. 2011; 127:954-64 e1-4.
- 116. Gittler J K, Krueger J G, and Guttman-Yassky E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2013; 131:300-13.

- 117. Fujita H, Shemer A, Suarez-Farinas M, Johnson-Huang L M, Tintle S, Cardinale I, et al. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. J Allergy Clin Immunol. 2011; 128:574-82 e1-12.
- 118. Dhingra N, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gittler J K, Shemer A, Raz A, et al. Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pathway differences between these diseases. J Allergy Clin Immunol. 2013; 132:498-501 e3.
- Gandhi N A, Bennett B L, Graham N M, Pirozzi G, Stahl N, and Yancopoulos G D. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. Nat Rev Drug Discov. 2016; 15:35-50.
- 120. Kim B E, Leung D Y, Boguniewicz M, and Howell M D. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. Clin Immunol. 2008; 126:332-7.
- 121. Howell M D, Kim B E, Gao P, Grant A V, Boguniewicz M, Debenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. J Allergy Clin Immunol. 2007; 120:150-5.
- 122. Bonefeld C M and Geisler C. The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. Immunol Lett. 2016.
- 123. Hamilton J D, Suarez-Farinas M, Dhingra N, Cardinale I, Li X, Kostic A, et al. Dupilumab improves the molecular signature in skin of patients with moderate-tosevere atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134:1293-300.
- 124. Ibler K S and Jemec G B. Novel investigational therapies for atopic dermatitis.Expert Opin Investig Drugs. 2015; 24:61-68.
- 125. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, and Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. Mol Immunol. 2009; 47:3-7.

- 126. Guttman-Yassky E, Lowes M A, Fuentes-Duculan J, Zaba L C, Cardinale I, Nograles K
 E, et al. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared
 to psoriasis. J Immunol. 2008; 181:7420-7.
- 127. Rottman J B, Smith T L, Ganley K G, Kikuchi T, and Krueger J G. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. Lab Invest. 2001; 81:335-47.
- 128. Ekman A K, Sigurdardottir G, Carlstrom M, Kartul N, Jenmalm M C, and Enerback C. Systemically elevated Th1-, Th2- and Th17-associated chemokines in psoriasis vulgaris before and after ultraviolet B treatment. Acta Derm Venereol. 2013; 93:527-31.
- 129. Hijnen D, Knol E F, Gent Y Y, Giovannone B, Beijn S J, Kupper T S, et al. CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22. J Invest Dermatol. 2013; 133:973-9.
- 130. Esaki H, Brunner P M, Renert-Yuval Y, Czarnowicki T, Huynh T, Tran G, et al. Earlyonset pediatric atopic dermatitis is TH2 but also TH17 polarized in skin. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138:1639-1651.
- 131. Howell M D, Fairchild H R, Kim B E, Bin L, Boguniewicz M, Redzic J S, et al. Th2 cytokines act on S100/A11 to downregulate keratinocyte differentiation. J Invest Dermatol. 2008; 128:2248-58.
- Howell M D, Boguniewicz M, Pastore S, Novak N, Bieber T, Girolomoni G, et al.
 Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. Clin Immunol. 2006; 121:3328.
- 133. Theiner G, Gessner A, and Lutz M B. The mast cell mediator PGD2 suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th2 polarized immune responses in vivo. Immunobiology. 2006; 211:463-72.

- 134. Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, and Furue M. Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN-gamma and IL-4 in human keratinocytes. J Dermatol Sci. 2002; 28:34-41.
- 135. Kanda N and Watanabe S. Histamine enhances the production of granulocytemacrophage colony-stimulating factor via protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes. J Invest Dermatol. 2004; 122:863-72.
- 136. Irani A M, Sampson H A, and Schwartz L B. Mast cells in atopic dermatitis. Allergy.1989; 44 Suppl 9:31-4.
- 137. Soter N A. Morphology of atopic eczema. Allergy. 1989; 44 Suppl 9:16-9.
- 138. Ui H, Andoh T, Lee J B, Nojima H, and Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. Eur J Pharmacol. 2006; 530:172-8.
- Eyerich S, Onken A T, Weidinger S, Franke A, Nasorri F, Pennino D, et al. Mutual antagonism of T cells causing psoriasis and atopic eczema. N Engl J Med. 2011; 365:231-8.
- 140. Quaranta M, Eyerich S, Knapp B, Nasorri F, Scarponi C, Mattii M, et al. Allergic contact dermatitis in psoriasis patients: typical, delayed, and non-interacting. PLoS One. 2014; 9:e101814.
- 141. Leung D Y and Guttman-Yassky E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: shifting paradigms in treatment approaches. J Allergy Clin Immunol. 2014; 134:769-79.
- 142. Quaranta M, Knapp B, Garzorz N, Mattii M, Pullabhatla V, Pennino D, et al. Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. Sci Transl Med. 2014; 6:244ra90.

- 143. Kim B S, Wang K, Siracusa M C, Saenz S A, Brestoff J R, Monticelli L A, et al.
 Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. J Immunol.
 2014; 193:3717-25.
- 144. Sullivan B M, Liang H E, Bando J K, Wu D, Cheng L E, McKerrow J K, et al. Genetic analysis of basophil function in vivo. Nat Immunol. 2011; 12:527-35.
- 145. Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler S F, Nakanishi K, Matsushita K, et al. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. Int Immunol. 2014; 26:539-49.
- 146. Otsuka A, Nonomura Y, and Kabashima K. Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. Semin Immunopathol. 2016; 38:563-70.
- 147. Wakahara K, Van V Q, Baba N, Begin P, Rubio M, Delespesse G, et al. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans. Allergy. 2013; 68:180-9.
- 148. Wojno E D, Monticelli L A, Tran S V, Alenghat T, Osborne L C, Thome J J, et al. The prostaglandin D(2) receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. Mucosal Immunol. 2015; 8:1313-23.
- 149. Chang J E, Doherty T A, Baum R, and Broide D. Prostaglandin D2 regulates human type 2 innate lymphoid cell chemotaxis. J Allergy Clin Immunol. 2014; 133:899-901 e3.
- 150. Halim T Y, Hwang Y Y, Scanlon S T, Zaghouani H, Garbi N, Fallon P G, et al. Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. Nat Immunol. 2016; 17:57-64.
- 151. Lucae S, Schmid-Grendelmeier P, Wuthrich B, Kraft D, Valenta R, and Linhart B. IgE responses to exogenous and endogenous allergens in atopic dermatitis patients under long-term systemic cyclosporine A treatment. Allergy. 2016; 71:115-8.

- 152. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. Nat Immunol. 2009; 10:706-12.
- 153. Morita H, Moro K, and Koyasu S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138:1253-1264.
- 154. Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo T A, et al. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. Immunity. 2014; 40:758-71.
- 155. Yamanishi Y and Karasuyama H. Basophil-derived IL-4 plays versatile roles in immunity. Semin Immunopathol. 2016; 38:615-22.
- 156. Dumoitier N, Lofek S, and Mouthon L. Pathophysiology of systemic sclerosis: state of the art in 2014. Presse Med. 2014; 43:e267-78.
- 157. Koenig M, Joyal F, Fritzler M J, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, et al. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2008; 58:3902-12.
- 158. Lu T T. Dendritic cells: novel players in fibrosis and scleroderma. Curr Rheumatol Rep. 2012; 14:30-8.
- 159. Bantsimba-Malanda C, Marchal-Somme J, Goven D, Freynet O, Michel L, Crestani B, et al. A role for dendritic cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice? Am J Respir Crit Care Med. 2010; 182:385-95.
- Chung M P, Monick M M, Hamzeh N Y, Butler N S, Powers L S, and Hunninghake G
 W. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced
 fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003; 29:375-80.

- 161. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factorbeta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. J Cell Physiol. 1999; 181:153-9.
- 162. Rossi G A, Hunninghake G W, Gadek J E, Szapiel S V, Kawanami O, Ferrans V J, et al. Hereditary emphysema in the tight-skin mouse. Evaluation of pathogenesis. Am Rev Respir Dis. 1984; 129:850-5.
- 163. Manetti M, Rosa I, Milia A F, Guiducci S, Carmeliet P, Ibba-Manneschi L, et al. Inactivation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) gene induces dermal and pulmonary fibrosis and peripheral microvasculopathy in mice: a new model of experimental scleroderma? Ann Rheum Dis. 2014; 73:1700-9.
- 164. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, and Sato S. Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. Arthritis Rheum. 2011; 63:3575-85.
- 165. Muramatsu R, Kubo T, Mori M, Nakamura Y, Fujita Y, Akutsu T, et al. RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med. 2011; 17:488-94.
- 166. Javadi B and Sahebkar A. Natural products with anti-inflammatory and immunomodulatory activities against autoimmune myocarditis. Pharmacol Res. 2017; 124:34-42.
- 167. Mehta H, Goulet P O, Nguyen V, Perez G, Koenig M, Senecal J L, et al. Topoisomerase I peptide-loaded dendritic cells induce autoantibody response as well as skin and lung fibrosis. Autoimmunity. 2016; 49:503-513.
- Bogatkevich G S, Ludwicka-Bradley A, and Silver R M. Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts. Arthritis Rheum. 2009; 60:3455-64.

- 169. Bogatkevich G S, Ludwicka-Bradley A, Nietert P J, Akter T, van Ryn J, and Silver R M. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. Arthritis Rheum. 2011; 63:1416-25.
- 170. Mehta H, Goulet P O, Nguyen V, Perez G, Koenig M, Senecal J L, et al. Topoisomerase I peptide-loaded dendritic cells induce autoantibody response as well as skin and lung fibrosis. Autoimmunity. 2016:1-11.
- 171. Christmann R B, Mathes A, Affandi A J, Padilla C, Nazari B, Bujor A M, et al. Thymic stromal lymphopoietin is up-regulated in the skin of patients with systemic sclerosis and induces profibrotic genes and intracellular signaling that overlap with those induced by interleukin-13 and transforming growth factor beta. Arthritis Rheum. 2013; 65:1335-46.
- 172. Usategui A, Criado G, Izquierdo E, Del Rey M J, Carreira P E, Ortiz P, et al. A profibrotic role for thymic stromal lymphopoietin in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2013; 72:2018-23.
- 173. Truchetet M E, Demoures B, Guimaraes J E, Bertrand A, Laurent P, Jolivel V, et al.
 Platelets induce thymic stromal lymphopoietin production by endothelial cells:
 Contribution to human systemic sclerosis fibrosis. Arthritis Rheumatol. 2016.
- 174. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Bellando-Randone S, Conforti M L, Ibba-Manneschi L, et al. Increased serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase-12 in patients with systemic sclerosis: correlation with severity of skin and pulmonary fibrosis and vascular damage. Ann Rheum Dis. 2012; 71:1064-72.
- Matute-Bello G, Wurfel M M, Lee J S, Park D R, Frevert C W, Madtes D K, et al. Essential role of MMP-12 in Fas-induced lung fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007; 37:210-21.

- 176. Rankin A L, Mumm J B, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan T K, et al. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. J Immunol. 2010; 184:1526-35.
- 177. Greenblatt M B, Sargent J L, Farina G, Tsang K, Lafyatis R, Glimcher L H, et al. Interspecies comparison of human and murine scleroderma reveals IL-13 and CCL2 as disease subset-specific targets. Am J Pathol. 2012; 180:1080-94.
- 178. Fuschiotti P, Medsger T A, Jr., and Morel P A. Effector CD8+ T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. Arthritis Rheum. 2009; 60:1119-28.
- 179. Fuschiotti P, Larregina A T, Ho J, Feghali-Bostwick C, and Medsger T A, Jr. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2013; 65:236-46.
- 180. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, Arnaud V, Cabantous S, Marquet S, et al.
 Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. Immunogenetics.
 2006; 58:693-9.
- Granel B, Allanore Y, Chevillard C, Arnaud V, Marquet S, Weiller P J, et al. IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2006; 33:2015-9.
- 182. Cho S F, Chang C C, Liu Y C, Chang C S, Hsiao H H, Liu T C, et al. Utilization of 18F FDG PET/CT as a staging tool in patients with newly diagnosed lymphoma.
 Kaohsiung J Med Sci. 2015; 31:130-7.
- Sargent J L, Li Z, Aliprantis A O, Greenblatt M, Lemaire R, Wu M H, et al.
 Identification of Optimal Mouse Models of Systemic Sclerosis by Interspecies
 Comparative Genomics. Arthritis Rheumatol. 2016; 68:2003-15.
- 184. Kluger M A, Meyer M C, Nosko A, Goerke B, Luig M, Wegscheid C, et al.
 RORgammat(+)Foxp3(+) Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell
 Lineage and Mediate Crescentic GN. J Am Soc Nephrol. 2016; 27:454-65.

- 185. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, et al. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:8635-40.
- 186. Voo K S, Wang Y H, Santori F R, Boggiano C, Wang Y H, Arima K, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:4793-8.
- Brembilla N C and Chizzolini C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. Eur Cytokine Netw. 2012; 23:128-39.
- 188. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu D L, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. Arthritis Rheum. 2012; 64:3726-35.
- 189. Truchetet M-E, Brembilla N-C, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ Cell Counts Are Increased in Systemic Sclerosis Skin and Their Number Is Inversely Correlated With the Extent of Skin Involvement. Arthritis & Rheumatism. 2013; 65:1347-1356.
- 190. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, and Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. Arthritis Res Ther. 2014; 16:R4.
- 191. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000; 43:2455-63.
- 192. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, et al. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease? J Dermatol Sci. 2008; 50:240-2.
- 193. Radstake T R, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge D M, et al.The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular

expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. PLoS One. 2009; 4:e5903.

- 194. Gao L, Zhao Y, Wang P, Zhang L, Zhang C, Chen Q, et al. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis. Iran J Basic Med Sci. 2017; 20:294-300.
- 195. Kamisato C, Furugohri T, and Morishima Y. A direct thrombin inhibitor suppresses protein C activation and factor Va degradation in human plasma: Possible mechanisms of paradoxical enhancement of thrombin generation. Thromb Res. 2016; 141:77-83.
- 196. Mattsson C, Menschik-Lundin A, Nylander S, Gyzander E, and Deinum J. Effect of different types of thrombin inhibitors on thrombin/thrombomodulin modulated activation of protein C in vitro. Thromb Res. 2001; 104:475-86.
- 197. Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, and Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 284:1104-8.
- 198. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia A F, Benelli G, et al. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2010; 69:598-605.
- 199. Silacci P, Dayer J M, Desgeorges A, Peter R, Manueddu C, and Guerne P A. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. J Biol Chem. 1998; 273:13625-9.
- 200. Reininger A J. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis.Haemophilia. 2008; 14 Suppl 5:11-26.

- 201. Husari A, Beydoun A, Sheik Ammar A, Maakaron J E, and Taher A. The untold story of Dabigatran etexilate: alveolar hemorrhage in an elderly patient with interstitial pulmonary fibrosis. J Thromb Thrombolysis. 2013; 35:81-2.
- 202. Perzborn E, Heitmeier S, Buetehorn U, and Laux V. Direct thrombin inhibitors, but not the direct factor Xa inhibitor rivaroxaban, increase tissue factor-induced hypercoagulability in vitro and in vivo. J Thromb Haemost. 2014; 12:1054-65.