



Title	自己免疫疾患モデルにおけるTYK2の免疫薬理学的役割の研究
Author(s)	石崎, 雅之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第6893号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6893
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56983
Type	doctoral thesis
File Information	Masayuki_Ishizaki.pdf



学位論文

自己免疫疾患モデルにおける TYK2 の免疫薬理学的役割の研究

2013 年

北海道大学 大学院生命科学院 生命医薬科学コース

石 崎 雅 之

目次

序論	- 5 -
第一章　T 細胞における TYK2 の役割	- 12 -
第一節　諸言	- 12 -
第二節　実験材料と方法	- 13 -
第三節　結果および考察	- 15 -
第一項　TYK2 遺伝子欠損マウス T 細胞の表現型	- 15 -
第二項　TYK2 遺伝子欠損のヘルパーT 細胞分化への影響	- 18 -
第三項　DTH 反応	- 20 -
第四節　考察	- 21 -
第五節　まとめ	- 22 -
第二章　関節炎における TYK2 の役割	- 23 -
第一節　諸言	- 23 -
第二節　実験方法	- 24 -
第三節　実験結果	- 26 -
第一項　CIA モデル	- 26 -
第二項　CAIA モデル	- 27 -
第四節　考察	- 32 -
第五節　まとめ	- 34 -
第三章　炎症性腸疾患における TYK2 の役割	- 35 -
第一節　諸言	- 35 -
第二節　実験方法	- 36 -
第三節　実験結果	- 37 -
第一項　DSS 誘導性大腸炎モデル	- 37 -
第二項　TNBS 誘導性大腸炎モデル	- 39 -
第四節　考察	- 40 -
第五節　まとめ	- 42 -
第四章　乾癬における TYK2 の役割	- 43 -
第一節　諸言	- 43 -
第二節　実験方法	- 44 -
第三節　実験結果	- 47 -
第一項　IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎モデル	- 47 -
第二項　IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデル	- 51 -
第三項　IL-22 誘導性乾癬様皮膚炎モデル	- 59 -

第四項	ケラチノサイトの IL-22 応答における TYK2 の役割.....	- 61 -
第五項	IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデルにおける Tyrphostin A1 投与の影響.....	- 62 -
第四節	考察.....	- 65 -
第五節	まとめ.....	- 67 -
第五章	総括.....	- 68 -
参考文献		- 70 -
投稿論文		
謝辞		

主要略語一覧

本論文において用いた主な略語を以下に示す。

CAIA	Collagen antibody-induced arthritis
CCL	CC chemokine ligand
CD	Crohn's disease
CFA	Complete Freund's adjuvant
CIA	Collagen-induced arthritis
Con A	Concanavaline A
c γ	Common γ
DC	Dendritic cell
DLN	Draining lymph node
DSS	Dextran sulfate sodium
DTH	Delayed-type hyperresponsiveness
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoietin
EtOH	Ethanol
FCM	Flow cytometry
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxP3	Forkhead box P3
GWAS	Genome-wide association study
H&E	Hematoxylin and Eosin
Krt16	Keratin 16
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
IMQ	Imiquimod
JAK	Janus kinase
LPS	Lipopolysaccharide
mBSA	Methylated bovine serum albumin
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix metalloproteinase

MS	Multiple sclerosis
PE	Phytoerythrin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
qPCR	Quantitative real- time polymerase chain reaction
RA	Rheumatoid arthritis
SCID	Severe combined immunodeficiency
SLE	Systemic lupus erythematosus
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid
TNF	Tumor necrosis factor
Th1	Type 1 helper T
Th2	Type 2 helper T
Th17	IL-17-producing helper T
Treg	Regulatory T
TYK2	Tyrosine kinase 2
UC	Ulcerative colitis

序論

生物は病原体あるいは抗原などの環境変化に対して恒常性を維持する機能として免疫システムを持ち、細胞、蛋白、遺伝子レベルで制御を行うことで生存し進化を続けている。免疫反応において細胞間の情報伝達物質あるいは直接的な防御機能として分泌されるサイトカイン蛋白は、細胞表面に発現したそれぞれのサイトカインに対応する特異的な受容体により認識され、細胞内にその情報を伝えることで生体の恒常性維持に必要な細胞レベルでのイベントを誘導する。この受容体からの情報伝達を担う代表的な経路として、キナーゼによる細胞内蛋白のリン酸化を介したシグナル伝達経路が知られている。

サイトカイン受容体の重要なシグナル伝達経路として JAK-STAT (Janus kinase - signal transducer and activator of transcription) シグナル経路が知られている¹⁾。JAK-STAT シグナル経路では JAKs ファミリーに属する JAK1、JAK2、JAK3、TYK2、ならびに、STATs ファミリーに属する STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a/b、STAT6 が主要な役割を担う。キナーゼである JAKs はサイトカイン受容体の細胞内ドメインに会合し、サイトカインの受容体刺激によりリン酸化を受けて活性化する²⁾ (Figure 1)。さらに、活性化した JAKs が受容体をリン酸化し、次いで転写因子 STATs のリン酸化を介して細胞内にシグナルを伝達することで様々な標的遺伝子の発現による細胞増殖や分化、サイトカイン分泌を誘導する。そのため JAK-STAT シグナル伝達経路はサイトカインによるイベントの上流に位置する必須の経路として注目されている。

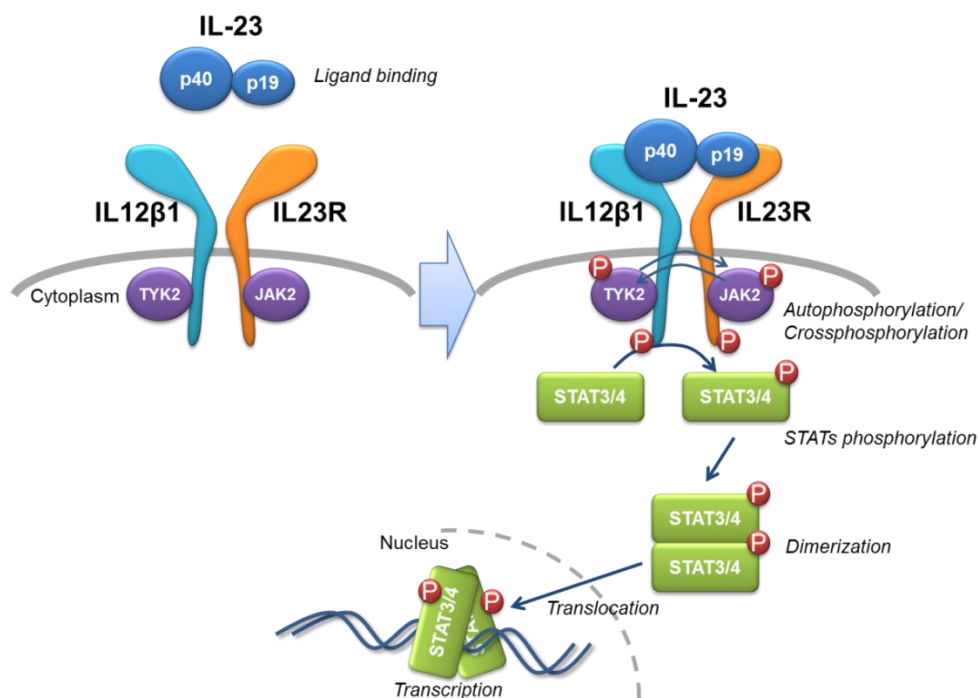


Figure 1. JAK-STAT pathway

JAK ファミリーの内、Tyrosine kinase 2 (TYK2) は 1990 年に Krolewski J.J.等により発見されたプロテインチロシンキナーゼである³⁾。彼等はヒトのリンパ球 cDNA ライブラリから c-fms tyrosine kinase domain probe を用いて新規のプロテインチロシンキナーゼを探索し、TYK1、TYK2 および TYK3 を見出した。しかし、TYK1 は既にマウスで見出されていた受容体型チロシンキナーゼ leukocyte receptor tyrosine kinase (LTK) のヒトホモログであり、また TYK3 はほぼ同時期に発見された非受容体型チロシンキナーゼの fps/fes related (FER) であった。そのため、現在は "TYK" と名の付くキナーゼは TYK2 のみである。その後、同研究グループにより TYK2 が膜貫通ドメインを持たない非受容体型チロシンキナーゼであることが明らかにされた。1992 年には Velazquez L.等が TYK2 が I 型インターフェロン (Interferon- α/β : IFN- α/β) のシグナルを伝達すること⁴⁾、さらに 1993 年には Shuai K.等が STAT が TYK2 によりリン酸化されてシグナルを伝えることを明らかにし⁵⁾、TYK2 発見から 3 年ほどの間に機能解析が大きく進んだ。他方、JAKs は 1991 年に Wilks A.F.等が JAK1 ならびに JAK2 を⁶⁾、1994 年に Takahashi T.等が JAK3 を発見した⁷⁾。JAK の名は、対応するサイトカイン受容体からのシグナルの最上流にあること、受容体がリガンドの刺激を受けて活性化すると JAK 自身が自己リン酸化を起こし、さらに活性化受容体に結合する転写因子 STAT をリン酸化するという二面性があることから、ローマ神話の門を見守る双面神ヤヌス (Janus) に因んで命名された。JAK1、JAK2、JAK3 と TYK2 には、キナーゼドメイン構造の共通性があり同じファミリーに分類され、これら 4 つは JAK ファミリーと呼ばれている。

このように TYK2 は JAK ファミリーの中で最初に発見された分子であるが、遺伝子欠損マウスの解析では他の JAKs と比較してその表現型は強く無かった (Table 1)。すなわち、JAK1 の遺伝子欠損 (Jak1 gene knock-out: Jak1^{-/-}) マウスは出生後すぐに死亡し、Jak1^{-/-}細胞がサイトカイン共通受容体 γ 鎖 (common γ chain: γ chain) を共有する IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 や、IL-6 等の γ サイトカインに対しては応答を欠失すること⁸⁾、Jak2^{-/-}マウスは赤血球の産生に必須の erythropoietin (EPO) 受容体シグナルに関わるため造血機能障害を起こして胎生致死であり⁹⁾、Jak3^{-/-}マウスは γ サイトカインに対する応答の欠失から、T 細胞、B 細胞、NK 細胞の機能不全を示し、出生するものの X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-linked severe combined immunodeficiency: X-SCID) を示す¹⁰⁾。このように、JAK1、JAK2 および JAK3 の遺伝子欠損マウスはいずれも非常に強い表現型を示した。一方で、2000 年に Shimoda K.等により作製された TYK2 の遺伝子欠損 (Tyk2^{-/-}) マウスは正常に出生したこと、そして TYK2 は IL-12 のシグナル伝達には必須であったが、他に TYK2 が介在する IFN- α/β や IL-6 のシグナルへの影響は軽微だったことから、部分的に代替可能な分子と考えられた¹¹⁾。TYK2 遺伝子については gene targeting knockout だけでなく、自然発生の突然変異による表現型も明らかにされている。Ortmann R.等は一般的なブリーダーの B10.Q マウスと比較して Jackson Laboratory で生産される B10.Q/J マウ

スが IL-12 シグナル抑制、易感染性ならびにコラーゲン誘導性関節炎（collagen-induced arthritis: CIA）モデルにおいて発症抵抗性を示すことを見出した^{12,13}。その後、B10.Q/J マウスにはTYK2のpseudokinase (Janus kinase homology 2) domainにE775K mutationがあるため機能的な TYK2 を発現していないことが判明したが¹⁴、それ以上の解析は進まなかった。Tyk2^{-/-}マウスにおいては、エンドトキシンショックに対して強い抵抗性を示すことが報告されたものの^{15,16}、免疫系、特に免疫疾患における役割に関しては十分な研究が進まなかった。

TYK2 は IL-12 および IFN- α/β の受容体シグナル伝達に関わることは知られていたが、その後、サイトカイン研究の進展により、IL-12 に似た IL-23 の受容体シグナル伝達にも関わる事が明らかになった¹⁷。IL-12 および IL-23 はそれぞれ p40/p35 および p40/p19 という蛋白質サブユニットが複合体を形成してヘテロダイマーとなったサイトカインで、共通のサブユニットとして p40 を有する¹⁸。同様に IL-12 受容体は IL12R β 1/ IL12R β 2、IL-23 受容体は IL12R β 1/ IL23R のヘテロダイマーにより形成される¹⁹。IL-12 と IL-23 がサイトカイン受容体を刺激すると、いずれのサイトカインも TYK2 および JAK2 のリン酸化を誘導し、下流の STAT4 あるいは STAT3 をリン酸化して、リン酸化 STAT がダイマーを形成して核内移行し、転写因子として機能する。一方、IFN- α/β の受容体シグナル伝達には TYK2 と JAK1 が関与する。このように、JAK-STAT 経路に関わるサイトカイン受容体では 2 つまたは 3 つの JAK が様々な組み合わせによりシグナル伝達を行う。

Table 1. Representative phenotypes by JAKs mutation in mouse and human

Defected gene	Phenotype in mouse	Phenotype in human
Tyk2	Impaired response to IL-12 Partially impaired response to IFN α Impaired production of nitric oxide upon lipopolysaccharide induction Resistant to collagen-induced arthritis*	Hyper IgE syndrome (Impaired response to IL-12, IL-6 and IFN α/β)
Jak1	Decrease in birth rate Failure to nurse Perinatal lethality Smaller thymus Abnormal lymphocyte development Impaired response to class II cytokines (IL-10, etc.), gp130 cytokine family (IL-6, etc.) and γ cytokines (IL-2, IL-7, etc.)	No report
Jak2	Embryonic lethality around day 12.5 postcoitum Absence of definitive erythropoiesis Absence of fetal liver BFU-E and CFU-E colonies Impaired response to Epo, thrombopoietin, IL-3, GM-CSF and IFN γ	No report
Jak3	Impaired development of mature B cell, T cell and NK cell Small thymus Impaired response to γ cytokines	X-linked SCID

* Tyk2 mutant mouse (B10.Q/J)

TYK2 研究は、2006 年に Minegishi Y.等が高 IgE 血症の患者の中からヒト TYK2 欠損症例を発見したことで大きな転機を迎えた²⁰⁾。ヒトでの TYK2 欠損の表現型が、マウスの研究から明らかになっていた IL-12 シグナル抑制に基づいた Th1 細胞抑制の表現型を示しただけでなく、IL-6 や IFN- α/β シグナルに対しても TYK2 欠損の影響が認められたことで、TYK2 はヒトにおいては他の JAK に代替されない重要な役割を持つと考えられるようになった。また同時期には、SLE の多発家系において TYK2 の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) が見出されていたが^{21,22)}、数年後に発表された全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) から TYK2 に関して注目すべき結果が相次いだことも、TYK2 の重要性を認識させるに十分だった。世界各国において様々な疾患に対して精力的に行われた結果、主要な自己免疫疾患であるクローン病 (Crohn's disease: CD)^{23,24)}、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE)^{25,26)}、多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS)^{27,28,29)}、乾癬 (Psoriasis)³⁰⁾ の GWAS において、度々 TYK2 あるいは TYK2 関連分子である IL-12 や IL-23 やその受容体、あるいは STAT3、STAT4 が疾患感受性遺伝子として同定されたのである。代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の GWAS では TYK2 の名は挙がっていないが、IL-23 受容体や STAT4 の関連が指摘されていることから^{31,32)}、代表的な自己免疫疾患と TYK2 の間には関連性が強く示唆されている。

自己免疫疾患研究においては、2004 年に Th17 細胞の発見によるパラダイムシフトが起きた。それまでは IFN- γ を産生する Th1 細胞と IL-4 や IL-5 を産生する Th2 細胞の 2 者がサイトカインを介して互いの機能を抑制するようバランスがとられ、その繊細なバランス制御の破綻により免疫疾患あるいはアレルギー疾患を発症するという Th1/Th2 細胞バランス説が主流だった^{33,34)}。しかし、IFN- γ ^{-/-}マウス由来の T 細胞や抗 IFN- γ 中和抗体では MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を悪化させることや^{35,36)}、Th1 細胞を誘導する IL-12 の投与により EAE が抑制されることから³⁷⁾、Th1/Th2 だけでは必ずしも自己免疫疾患発症メカニズムが説明できるわけではなかった。しかし、活性化あるいは IL-23 に応答して IL-17 を産生するヘルパー T 細胞として Th17 細胞が新たに発見され^{38,39,40)}、IL-17^{-/-}マウスや抗 IL-17 中和抗体により EAE が抑制されることが明らかになった^{41,42)}。こうして Th17 細胞が自己免疫疾患において病態誘導性に働くことが強く示唆され、Th1 細胞と並んで自己免疫疾患発症に重要な役割を持つヘルパー T 細胞と認識されるに至った。さらに、Sakaguchi S.等により発見されていた抑制性 T 細胞 (regulatory T: Treg) 細胞が⁴³⁾、Th1 細胞および Th2 細胞だけでなく Th17 細胞機能をも抑制することが明らかになり⁴⁴⁾、現在では Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞および Treg 細胞の主に 4 つのヘルパー T 細胞サブセットが免疫系の恒常性維持あるいは病態形成に重要な役割を担っていると考えられている。ここで私が注目したのは、その細胞分化や機能発現に必要なサイトカインの構成である。

各ヘルパーT細胞サブセットは Figure 2 に示すように活性化刺激を受けたことのないナイーブ T 細胞から分化し、サブセット毎に様々な環境下で主に樹状細胞 (Dendritic cell: DC) から分泌されるサイトカインが関わっている⁴⁵⁾。ナイーブ T 細胞への IL-12 刺激により STAT4 活性化を介して T-bet 発現が誘導され、高い IFN- γ 産生能を持った Th1 細胞への分化を遂げる。この Th1 細胞は主に細胞性免疫を担い、感染防御に重要である。IL-4 刺激では STAT6 活性化を介した GATA binding protein 3 (GATA3) 発現誘導により、IL-4 や IL-5、IL-13 を産生・分泌して寄生虫感染防御やアレルギーの液性免疫を担う Th2 細胞への分化を遂げる。Th17 細胞の誘導は IL-6 と TGF- β (ヒトでは IL-16) の 2 つのサイトカイン刺激により retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t (ROR γ t) 発現が誘導されて未成熟な Th17 細胞へと分化する。この未成熟な Th17 細胞には ROR γ t により誘導された IL-23 受容体が発現し、成熟した Th17 細胞へと分化する⁴⁶⁾。最近では ex-Th17 細胞と呼ばれる IFN- γ と IL-17 を産生する細胞が見出されており、Th17 細胞の最終分化形態とも考えられ、ex-Th17 細胞分化での IL-23 の関与も示唆されている^{47,48)}。また、当初 Th17 細胞は IL-17 産生細胞として見出されたが、IL-17 だけでなく IL-22 の産生能も高いことが明らかになっており⁴⁹⁾、Th17 細胞が産生する IL-17 および IL-22 を Th17 サイトカインと呼ぶ。TGF- β 刺激では forkhead box P3 (FoxP3) 発現誘導により Treg 細胞分化が誘導され、TGF- β や IL-10 を産生すると共に、細胞表面の cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) の発現を介して他のヘルパー T 細胞の機能制御に寄与すると考えられている。また、Treg

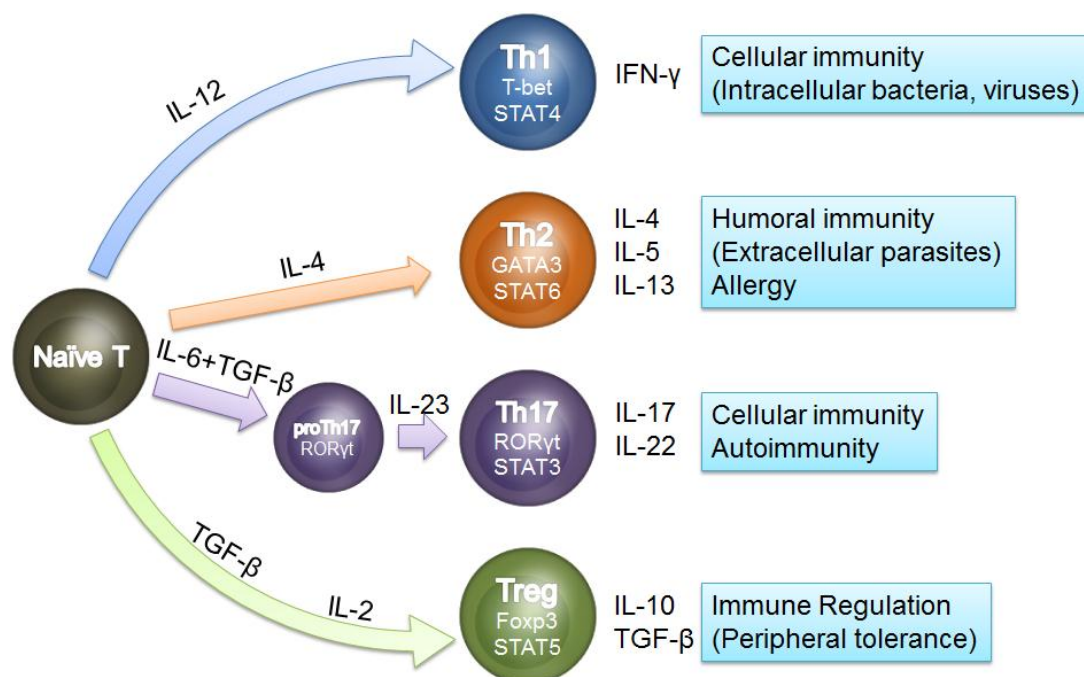


Figure 2. Helper T (Th)-cell differentiation and immune responses

細胞の機能維持・機能発現には cy サイトカインの一つである IL-2 からの刺激が重要であることが知られている⁴³⁾。このようなヘルパーT細胞に関して得られている知見から、私は自己免疫疾患制御を考える場合に、Th1細胞およびTh17細胞への分化・細胞機能を制御することが重要であると同時に、内在性の制御担当細胞であるTreg細胞には影響しないことが最適な方法であると考えた。

JAKs はサイトカイン受容体シグナルにおいて上述のように重要な役割を持つことから、JAKs 制御すなわち JAKs のキナーゼ阻害は創薬標的として注目されている⁵⁰⁾ (Figure 3)。JAKs 制御による自己免疫疾患の治療を目指した創薬を志向したとき、TYK2はこのヘルパーT細胞の分化においてTh1細胞分化に必須のIL-12、Th17細胞の機能維持に必須のIL-23に重要なJAKsであることから優れた創薬標的としてのプロファイルを持つと考えられる。JAK2も同様にIL-12およびIL-23のシグナル伝達に関わるが、JAK2はEPO受容体シグナルにおいても必須でありJAK2変異に基づく慢性骨髄性増殖疾患の治療標的として有望であるが⁵¹⁾、自己免疫疾患治療薬としては造血系の副作用懸念が強いと考える。一方、JAK3は白血球に局限して発現し、T細胞の発生にも関与する cy サイトカインを広く制御することから、自己免疫疾患治療において有望視されているJAKである。しかし、T細胞を広く制御するため、内在性の免疫制御を担うTreg細胞をも抑制することが予測される。JAK1もJAK3と同様に cy サイトカインを制御する他、IFN- γ 受容体シグナルにも関与することから、易感染性リスクが高まることが懸念される。TYK2は免疫細胞で発現が高いものの比較的広範に非免疫細胞にも発現する。しかし、ヒトでのTYK2欠損の表現型は免疫細胞に

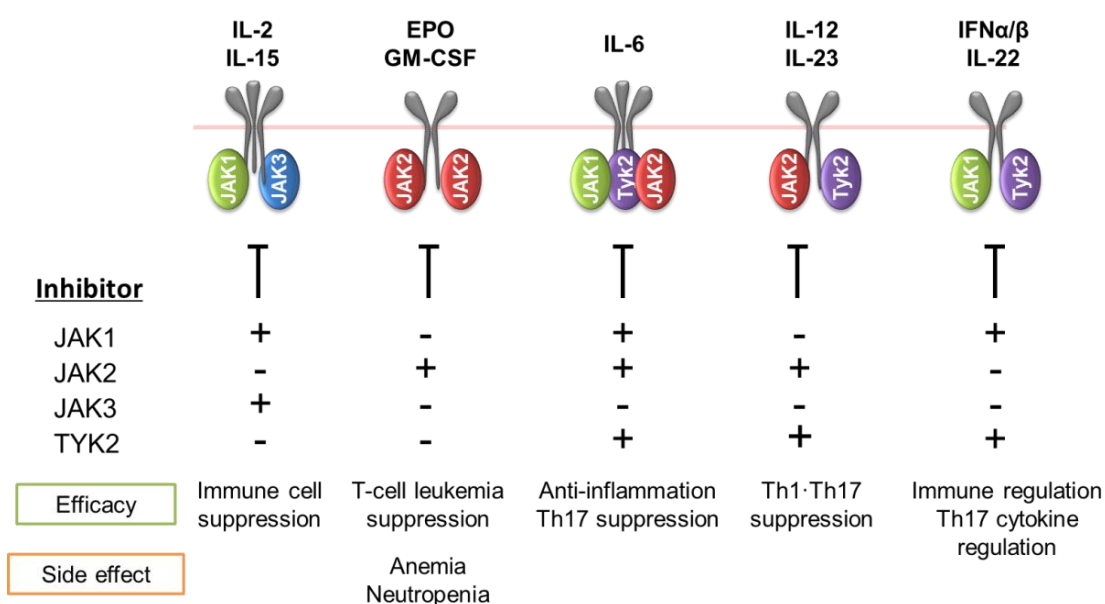


Figure 3. Predictable efficacy and side effect by JAKs inhibition

強く現れていることから、TYK2 の機能を制御する薬剤は免疫疾患治療に有望であると私は考える。

本研究において、私は自己免疫疾患における TYK2 の役割に着目し、Tyk2^{-/-}マウスを用いた検討を行った。第一章では、T 細胞機能発現およびヘルパーT 細胞分化における TYK2 の役割を *in vitro*ならびに *in vivo*で解析して得た知見について述べる。第二章では関節炎、第三章では炎症性腸疾患、そして第四章では乾癬の自己免疫疾患モデルを検討して病態形成における TYK2 の役割、ならびに TYK2 阻害剤を用いて得た新しい知見を述べる。

第一章 T細胞における TYK2 の役割

第一節 諸言

TYK2 が細胞内シグナル伝達に関連するサイトカインである IL-12 および IL-23 は、それぞれ IFN- γ 産生、IL-17 産生を強く誘導する。また、エフェクターT細胞と呼ばれるナイーブ T 細胞から分化したヘルパーT細胞サブセットの誘導にも関与する。エフェクターT細胞には、感染防御などにおいて細胞性免疫に関与する Th1 細胞および Th17 細胞、液性免疫やアレルギーに関与する Th2 細胞、Th1/Th2/Th17 細胞の過剰な免疫応答を制御する Treg 細胞が存在し、それぞれのヘルパーT細胞サブセットが直接的または産生するサイトカインの応答を介して相互に影響し合い、絶妙なバランスをとることで生体の恒常性維持を行っている⁴⁵⁾。しかし、Th1 細胞や Th17 細胞が自己抗原あるいは外来抗原に対して過剰な炎症を誘導することによってそのバランスが崩れたときには自己免疫疾患のような病的な状態を引き起こす原因細胞となる。

炎症部位を支配する所属リンパ節 (draining lymph node: DLN) では IL-12 や IL-23 により Th1 細胞あるいは Th17 細胞等のヘルパーT細胞の分化が誘導され、各ヘルパーT細胞サブセットは障害部位で産生されたケモカインによる遊走作用で炎症部位に集積して炎症反応を亢進させる⁵²⁾。Th1 細胞や Th17 細胞のようなエフェクターT細胞に分化するナイーブ T 細胞は、胸腺において造血幹細胞から分化した細胞である。ナイーブ T 細胞への分化においては多数のサイトカインが関わることで T 細胞レセプター (T cell receptor: TCR) や CD3 などの T 細胞固有の分子を発現して成熟し、成熟過程で CD4 や CD8 などさらにクラスを分ける分子を発現して末梢の二次リンパ器官で生体防御に関わる。このような T 細胞の成熟過程においては、JAK1/JAK3 が関与する IL-7⁵³⁾、JAK2 が関与する c-kit が関与する⁵⁴⁾、TYK2 が関与するサイトカインは関与しない。そのため、TYK2 は成熟した T 細胞にのみ影響を及ぼすと考えられる。

本章では、Tyk2^{-/-}マウスおよび Tyk2 natural mutant マウスから得た細胞を用いて、*in vitro*での基本的な T 細胞応答性、TYK2 依存的なサイトカイン応答とヘルパーT細胞分化への影響を、特に Th17 細胞に注目して検討した。さらに、*in vivo*における関与を明らかにするため、T 細胞依存的な免疫応答である遅延型過敏反応 (delayed-type hyperresponsiveness: DTH) への影響を検討した。

第二節 実験材料と方法

i) Tyk2^{-/-}マウス

TYK2 遺伝子の knockout マウスは ES 細胞において TYK2 (マウス tyrosine kinase 2 : NM 018793.2) 遺伝子座をジーンターゲティング法 (マウス TYK2 遺伝子のエクソン 1 の 4.2 kb XbaI-EcoRV フラグメントをネオマイシン耐性遺伝子に置換) によって破壊した。それをマウス胚に顕微注入してキメラマウスを作製し、交配によって作製されたホモ欠損マウス (Tyk2^{-/-}マウス) またはヘテロ欠損マウス (Tyk2^{+/-}マウス) を用いた (>8 generation onto BALB/c)¹¹⁾。コントロールマウス (Tyk2^{+/+}マウス) としては SPF 化に使用した BALB/cAnNCrIj 系統 (日本チャールス・リバー) を使用した。

ii) Tyk2 mutant マウス

B10.Q バックグラウンドのマウスのうち、Taconic Farms, Inc. (NY, USA) で生産される wild-type の B10.Q/Ai マウスに対し、The Jackson Laboratory (ME, USA) で生産される B10.D1-H2q/SgJ (B10.Q/J) マウスは TYK2 遺伝子の E775K natural mutation により機能的な TYK2 蛋白を発現しない¹⁴⁾。両マウスを各々のブリーダーから購入して試験に使用した。

iii) 動物倫理

本試験は以下の法律およびガイドラインに準拠して実施した。

- ・ 「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号, 平成 11 年 12 月 22 日改正, 平成 17 年 6 月 22 日一部改正)
- ・ 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号, 平成 18 年 4 月 28 日)
- ・ 「動物実験に関する指針」[(社) 日本実験動物学会, 昭和 62 年 5 月 22 日]

iv) T 細胞機能評価

マウス脾臓を、麻酔下で放血致死したマウスから無菌的に採取した。脾臓はナイロンメッシュを用いて血球を含む脾細胞を回収し、ACK buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA-2Na) で溶血処理して、10% FBS および 100 units/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin を含む RPMI1640 培地に脾細胞を懸濁した。細胞培養は、CO₂ インキュベーター内において 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

T リンパ球幼若化反応試験では、96 well plate に 1×10^6 cells/well となるよう脾細胞を播種し、T 細胞マイトジェン concanavalin A (Con A) (Sigma-Aldrich) の終濃度が 0 – 10 $\mu\text{g/mL}$ となるように活性化刺激を加えた。刺激 45 時間後から 48 時間後の間の増殖を WST8 (同仁化学) で評価するとともに、回収した培養上清中 IL-2 濃度を ELISA で測定した。

サイトカイン産生試験では、 5×10^4 cells/well となるよう anti-mouse CD3 antibody-coated T-cell activation plate (BD Biosciences) に脾細胞を播種し、mouse IL-2 または mouse IL-12 で 48 時間刺激したときの培養上清中 IFN- γ 濃度を ELISA で測定した。Mouse IL-23 を用いた時には、72 時間刺激したときの培養上清中 IL-17 濃度を ELISA で測定した。細胞刺激に用いたサイトカインは、mouse IL-2 および mouse IL-12 は PeproTech、mouse IL-23 は R&D systems から購入した。サイトカイン用 ELISA キットは全て R&D systems から購入した。

v) ヘルパーT (helper T: Th) 細胞分化誘導試験

Dynabeads Mouse CD4 (L3T4) (Life Technologies) を使用して脾細胞から CD4⁺細胞をポジティブセクションした。その後、DETACHaBEAD Mouse CD4 (Life Technologies) を用いてビーズフリーの CD4⁺細胞を回収した。さらに CD62L MicroBeads (Miltenyi Biotec) を使用して CD62L⁺細胞をポジティブセクションし、精製度が >95% の CD4⁺CD62L⁺ナイーブ T 細胞を回収した。精製したナイーブ T 細胞は、mouse IL-6 (50 ng/mL)、human TGF- β (5 ng/mL)、mouse IL-23 (10 ng/mL)、mouse IL-12 (1 ng/mL)、anti-IFN- γ antibody (XMG1.2) (10 $\mu\text{g/mL}$)、anti-IL-4 antibody (11B11) (10 $\mu\text{g/mL}$)、anti-mouse IL-12/IL-23p40 antibody (C17.8) (10 $\mu\text{g/mL}$) および anti-CD28 antibody (37.51) (1 $\mu\text{g/mL}$) と共に、anti-CD3e antibody (145-2C11) を 5 $\mu\text{g/mL}$ で一晩固相化したプレートで 72 時間培養し、Th17 細胞、Th1 細胞または Treg 細胞への分化を誘導した。誘導に用いたサイトカインは、mouse IL-6 および mouse IL-12 は PeproTech、human TGF- β および mouse IL-23 は R&D systems から購入した。抗体は、anti-mouse IFN- γ antibody、anti-mouse CD3e antibody、anti-mouse CD28 antibody は BD Pharmingen、anti-mouse IL-12/IL-23p40 antibody は BioLegend から購入した。anti-mouse IL-4 antibody は 11B11 細胞から精製した抗体を用いた。

vi) フローサイトメトリー (Flow cytometry: FCM) 解析

分化誘導の確認は細胞内サイトカイン、転写因子、または細胞表面抗原の染色を行なうことで確認した。すなわち、Th1 細胞および Th17 細胞は FITC-IFN- γ 抗体ならびに PE-IL-17 抗体を用いて二重染色し、Treg は PE-FoxP3 抗体で二重染色して、その発現パターンをフローサイトメーター BD FACSCalibur (BD Biosciences) および解析ソフト CellQuest (BD Biosciences) または FlowJo software (Tree Star) で解析した。細胞表面抗

原ならびに細胞内サイトカインの染色用抗体 Alexa Fluor 647 labeled anti-CD4 antibody (L3T4)、FITC labeled-IFN- γ antibody (XMG1.2)、PE labeled-IL-17 antibody (TC11-18H10)、PE labeled-FoxP3 antibody (MF23)、FoxP3 の細胞内染色試薬 Mouse FoxP3 Buffer Set は BD Pharmingen から購入した。IL-17 および IFN- γ の細胞内サイトカイン染色用試薬 BD Cytofix/Cytoperm Fixation/ Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug は BD Biosciences から購入した。

vii) DTH 反応

Day 0 に 5 mg/mL の methylated bovine serum albumin (mBSA) (Sigma-Aldrich) と 1 mg/mL H37Ra を含む Complete Freund's adjuvant (CFA) (DIFCO) を 1:1 で混合してエマルジョンを調製し、50 μ L のエマルジョンを腹部の 2 箇所皮内注射して免疫した。Day 7 (惹起前) にシックネスゲージ (PEACOCK) を用いて両後肢の厚みの pre 値を測定した後、0.5 mg/mL の mBSA 溶液を右後肢の踵へ 50 μ L 皮内注射した。左後肢の踵へは生理食塩液 50 μ L を皮内注射した。Day 8 (惹起 24 時間後) に後肢の肥厚を測定した。DTH 反応の評価は、各個体について、day 8 における後肢の厚みから、day 7 の pre 値を差し引くことで算出した。

viii) 統計解析

要約統計量の算出ならびに図の作成は Microsoft Excel 2003 または 2010 (Microsoft Corporation) を使用した。統計解析は SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を使用し、有意水準 0.05 (両側) をもって判定した。統計手法は、2 群間の連続した数値の比較は *t* 検定または Welch 検定を用いた。

第三節 結果および考察

第一項 TYK2 遺伝子欠損マウス T 細胞の表現型

エフェクター T 細胞の応答における TYK2 の役割を明らかにするため、Tyk2^{+/+}、Tyk2^{+/-} および Tyk2^{-/-} マウスの脾細胞を用いて T 細胞応答を検討した。T 細胞マイトジェンである Con A を用いて種々の濃度で細胞を刺激したとき、Tyk2^{+/+}、Tyk2^{+/-} および Tyk2^{-/-} マウスの脾細胞は同等の細胞増殖性および IL-2 産生能を示した (Figure 4A, 4B)。また、JAK1 および JAK3 によってシグナルが伝達され TYK2 が関与しないサイトカインである IL-2 刺激においても、各細胞間で誘導される IFN- γ 産生量に違いは認められなかった (Figure 4C)。このことから、TYK2 欠損によって基本的な T 細胞機能は保持されることが明らかになった。

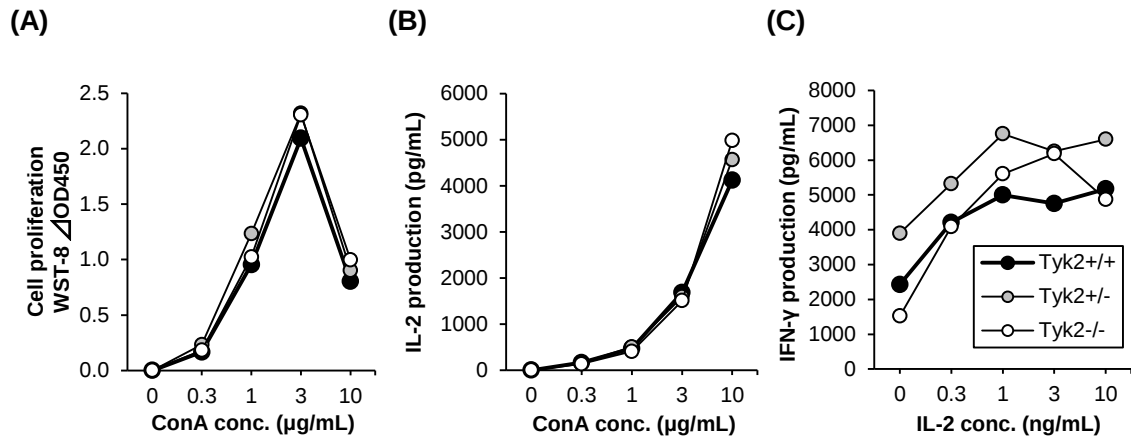


Figure 4. TYK2 is not required for T cell specific mitogen reaction and IL-2-dependent IFN-γ production.

A and B, Isolated splenocytes (1×10^5 cells) from Tyk2^{+/+}, Tyk2^{+/-}, or Tyk2^{-/-} mice were analyzed for proliferative response (**A**) and IL-2 production (**B**) after stimulation with or without Con A (0 – 10 µg/mL) for 48 h. Results are representative of two independent experiments. **C**, Isolated splenocytes (5×10^4 cells) from Tyk2^{+/+}, Tyk2^{+/-}, or Tyk2^{-/-} mice were analyzed for IFN-γ production after stimulation with or without IL-2 (0 – 3 ng/mL) in the presence of anti-CD3 mAb for 48 h.

次に、TYK2 および JAK2 が関与する IL-12 刺激に対する影響を検討した¹⁷⁾。その結果、IL-12 による刺激により、Tyk2^{+/+} および Tyk2^{+/-} では著明な IFN-γ 産生が認められたのに対し、Tyk2^{-/-} の脾細胞では IFN-γ 産生の上昇が認められなかった (Figure 5A)。この IL-12 刺激に対する応答性の欠失は Tyk2 mutant である B10.Q/J マウスにおいても同様に認められた (Figure 5B)。研究に用いた Tyk2^{-/-} マウスは BALB/c 系統であったが、B10.Q/J マウスは C57BL/10SnSg 系統である。また、これまでの研究において 129/SV と C57BL/6 の混雑系統の Tyk2^{-/-} マウスにおいても IL-12 に対する応答性が欠失することを確認していることから¹¹⁾、IL-12 依存的な IFN-γ 産生における TYK2 の関与が普遍的であり、遺伝的な背景の違いの影響を受けないことが示唆された。

IL-12 は p40/p35 で構成されるヘテロダイマーのサイトカインであり、p40/p19 で構成される IL-23 とは p40 を共有している¹⁸⁾。TYK2 および JAK2 は IL-12 受容体のみならず IL-23 受容体にも会合しシグナル伝達に関わる¹⁹⁾。IL-23 は IL-17 産生の誘導因子でもあることから、Tyk2^{+/+}、Tyk2^{+/-} および Tyk2^{-/-} マウスの脾細胞を IL-23 で刺激したときの IL-17 産生について検討した。Figure 6A に示すように、Tyk2^{+/+} では IL-23 刺激濃度に依存して IL-17 産生量の増加が認められた。一方、Tyk2^{-/-} では IL-17 産生はほぼ欠失し、Tyk2^{+/-} では中程

度の IL-17 産生を示すに過ぎなかった (Figure 6B)。Tyk2 mutant である B10.Q/J においても IL-17 産生の欠失が認められた。このことは、IL-23 依存的な IL-17 産生が TYK2 に強く依存していることが明らかになり、その依存の程度は IL-12 依存的な IFN- γ 産生とは異なる可能性が示唆された。

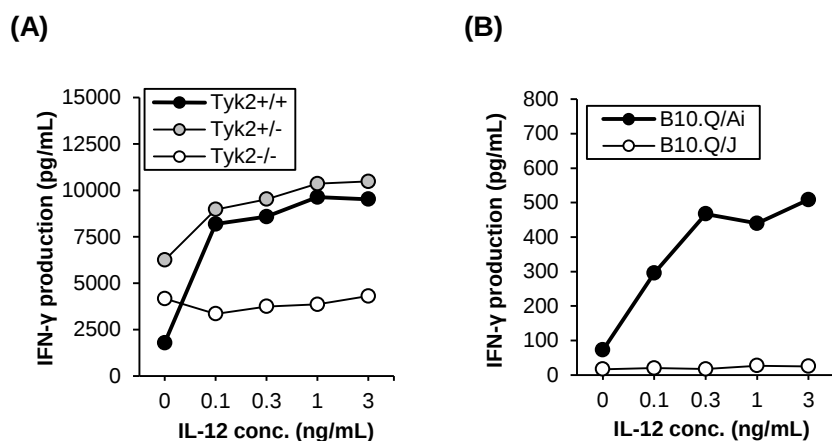


Figure 5. TYK2 is required for IL-12-dependent IFN- γ production.

A, Isolated splenocytes (5×10^4 cells) from Tyk2^{+/+}, Tyk2^{+/-}, or Tyk2^{-/-} mice were analyzed for IFN- γ production after stimulation with or without IL-12 (0 – 3 ng/mL) in the presence of anti-CD3 mAb for 48 h. **B**, Isolated splenocytes (5×10^4 cells) from B10.Q/Ai or B10.Q/J mice were analyzed for IFN- γ production after stimulation with or without IL-12 (0 – 3 ng/mL) in the presence of anti-CD3 mAb for 48 h.

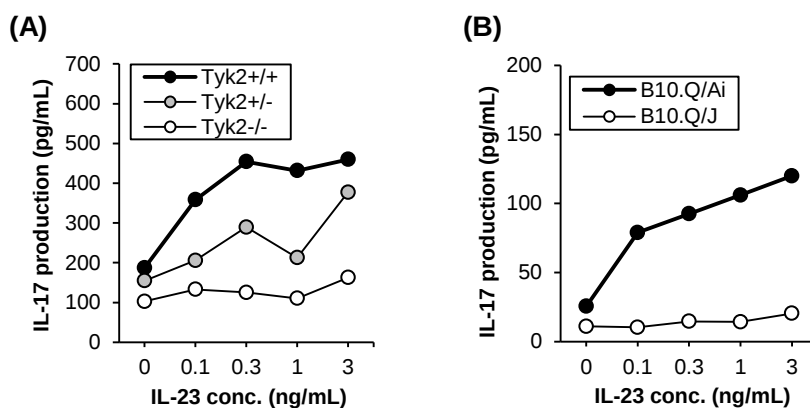


Figure 6. TYK2 is required for IL-23-dependent IL-17 production.

A, Isolated splenocytes (2×10^5) from Tyk2^{+/+}, Tyk2^{+/-}, or Tyk2^{-/-} mice were analyzed for IL-17 production after stimulation with or without IL-23 (0 – 3 ng/mL) in the presence of anti-CD3 mAb for 72 h. **B**, Isolated splenocytes (5×10^4 cells) from B10.Q/Ai or B10.Q/J mice were analyzed for IL-17 production after stimulation with or without IL-23 (0 – 3 ng/mL) in the presence of anti-CD3 mAb for 72 h.

以上の成績から、TYK2 を欠損した細胞では T 細胞の基本的な表現型ならびに TYK2 非依存的なサイトカイン応答には影響を及ぼさず、TYK2 が関与する IL-12 および IL-23 により誘導されるサイトカイン産生に対してのみ重要な役割を持つことが明らかになった。

第二項 TYK2 遺伝子欠損のヘルパーT 細胞分化への影響

TYK2 遺伝子欠損の Th17 細胞分化への影響を明らかにする目的で、Tyk2^{+/+}マウスおよびTyk2^{-/-}マウスから単離した CD4⁺CD62L⁺ナイーブ T 細胞を IL-6 および TGF- β 存在下で培養したときの IL-17 および IFN- γ 産生能について、細胞内サイトカイン染色を用いた FCM で解析した。Tyk2^{+/+}細胞および Tyk2^{-/-}細胞に CD3/CD28 刺激のみを加えた場合では IL-17 産生能を持った細胞 (Th17 細胞) はほとんど認められないが、IL-6 + TGF- β の Th17 細胞誘導刺激を加えた場合には著明かつ同等に Th17 細胞の割合が増加した (Figure 7)。

一方、IL-6 + TGF- β に加えて IL-23 を添加した細胞においては、Tyk2^{+/+}細胞に比し Tyk2^{-/-}細胞では Th17 細胞への分化が有意に低下し、TYK2 が IL-23 シグナルに影響することで Th17 細胞の増殖または機能維持に寄与することが明らかになった。

IL-12 により誘導される IFN- γ 産生能を持った細胞 (Th1 細胞) の割合もまた Tyk2^{-/-}細胞では低下し、TYK2 が IL-12 シグナルに影響することで Th1 細胞の分化、増殖または機能維持に寄与することが明らかになった。

TYK2 がヘルパーT 細胞の分化において Th1 細胞分化および Th17 細胞分化に選択的に影響するのかを明らかにするため、Treg 細胞分化に対する影響を検討した。Figure 8 に示すように、TGF- β により誘導された Treg 細胞のマスターレギュレーターである FoxP3 発現は Tyk2^{+/+}細胞と Tyk2^{-/-}細胞で同等に誘導され、TYK2 欠損の影響は各ヘルパーT 細胞サブセットで異なることが明らかになった。

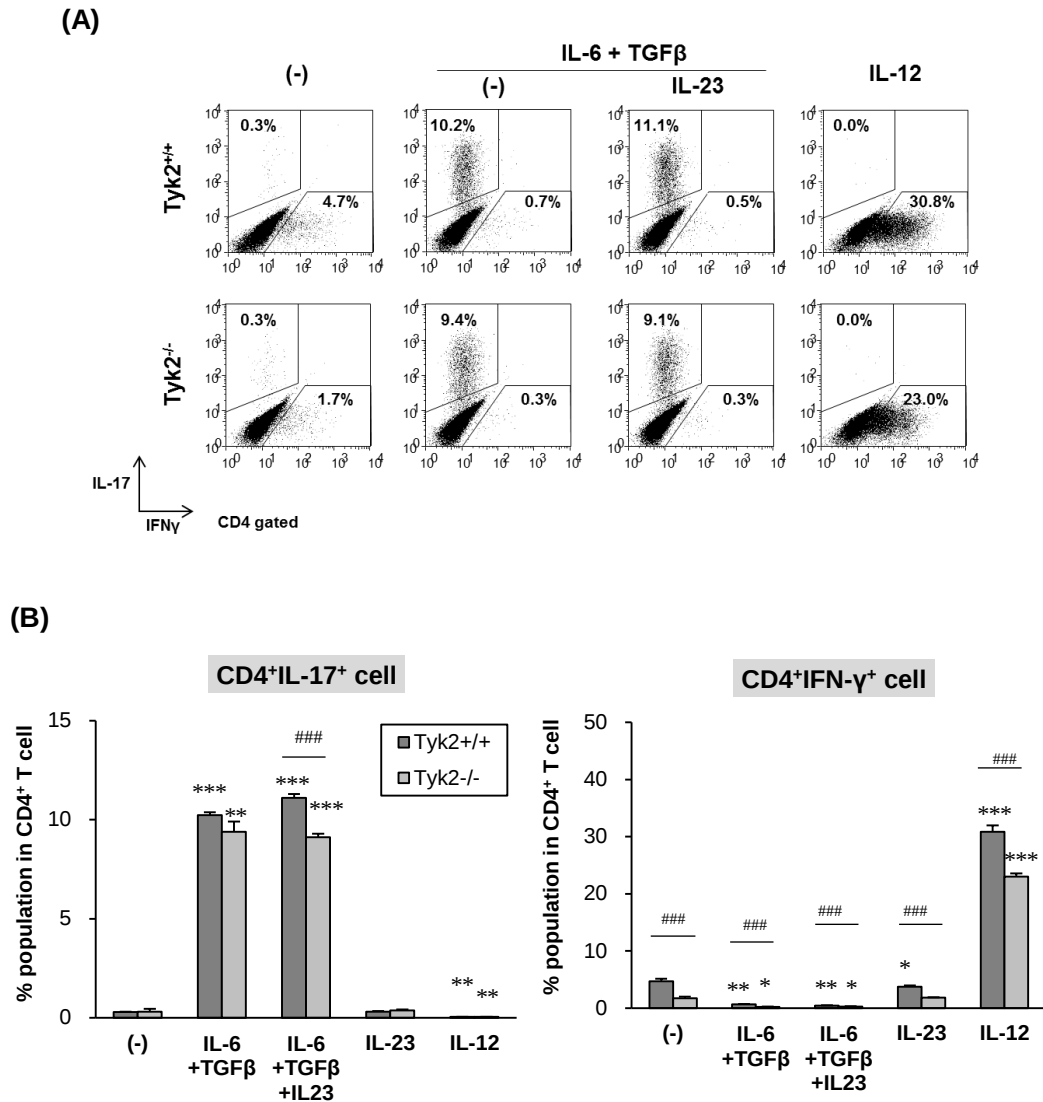


Figure 7. TYK2 is required for Th17&Th1 cell induction.

A and **B**, Isolated CD4⁺CD62L⁺ naive T cells (2.5×10^6 cells) from Tyk2^{+/+} or Tyk2^{-/-} mice were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb (5 mg/mL) and soluble anti-CD28 mAb (1 mg/mL) in Th1/Th17 cell-inducing conditions. Seventy-two hours poststimulation, cells were harvested and immediately subjected to intracellular cytokine staining for IL-17 and IFN-γ. IL-17⁺ and IFN-γ⁺ cell populations were gated, and their ratios were compared. Representative dot plot of CD4 gated cells and averaged values (**A**) and averaged results (**B**) are shown. The results represents mean + SD (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control; ### $p < 0.001$ compared with Tyk2^{+/+}.

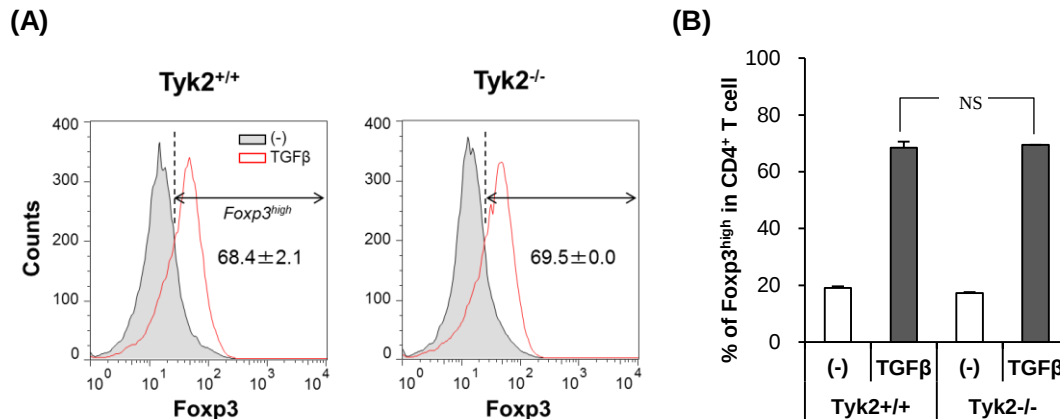


Figure 8. TYK2 is not required for immune regulatory T cell.

A and **B**, Isolated $CD4^+CD62L^+$ naive T cells (2.5×10^6 cells) from $Tyk2^{+/+}$ or $Tyk2^{-/-}$ mice were stimulated in the Treg-inducing conditions. Seventy-two hours poststimulation, cells were analyzed by FoxP3 staining. Representative graphs of three independent experiments are shown (**A**). Dashed line indicates the staining of naive T cells without TGF- β stimulation, and solid line indicates staining with TGF- β stimulation. Results were analyzed based on the percentage of $FoxP3^{high}$ population in $Tyk2^{+/+}$ or $Tyk2^{-/-}$ cells. Histogram shows representative result of % $FoxP3^{high}$ population (**B**). The result represents mean + SD ($n=3$). NS, not statistic.

以上の成績から、TYK2 は病態誘導性の Th1 細胞および Th17 細胞の分化誘導、増殖、機能維持において重要な役割を持ち、免疫制御性の Treg 細胞の分化誘導に対しては影響しないという選択的な免疫制御機能を持つことが明らかになった。

第三項 DTH 反応

In vitro 実験で認められた上述の IL-12 および IL-23 に対する影響を、*in vivo* の反応で確認しようと考えた。DTH 反応は IV 型アレルギー反応とも呼ばれ、エフェクター T 細胞が抗原に対して応答し、24~48 時間後をピークとした炎症が認められる。細胞性免疫反応依存的、特に T 細胞の関与が強く示唆されており、IL-12p40 遺伝子欠損マウスおよび IL-23p19 遺伝子欠損マウスで応答が欠失することから IL-12 および IL-23 の関与が強く示唆されている^{55,56}。そこで、*in vivo* での TYK2 欠損の影響を評価する目的で、 $Tyk2^{+/+}$ 、 $Tyk2^{+/-}$ および $Tyk2^{-/-}$ マウスを用いた検討を行った。

$Tyk2^{+/+}$ マウスでは抗原である mBSA 溶液投与から 24 時間後に足首部分からつま先にかけて強い腫脹が認められ、反対足への saline 投与では腫脹は認められなかった (Figure 9)。

一方、Tyk2^{+/-}マウスおよび Tyk2^{-/-}マウスでは TYK2 の欠損の程度に従い DTH 反応による腫脹が有意に減弱し、TYK2 が *in vivo* においても IL-12 および IL-23 依存的な T 細胞応答に重要な役割を有することが示唆された。

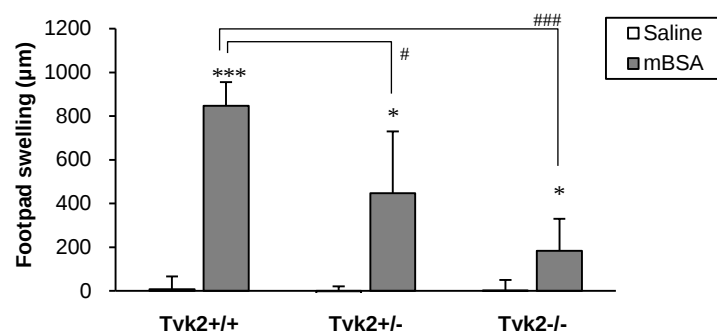


Figure 9. TYK2 plays a role in T cell-dependent immune reaction *in vivo*.

Mice immunized with mBSA were induced DTH reaction by the antigen injection into left heel. Antigen-specific swelling 24 h after challenge was calculated as footpad thickness over the value measured just before the challenge. The results represents mean + SD (n=5). **p* < 0.05, ****p* < 0.001 compared with saline; # *p* < 0.05, ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

第四節 考察

Tyk2^{-/-}マウスは他の JAKs 遺伝子のノックアウトマウスと比較して、目立った表現型を示さず外観的にも異常は認められない (8,9,10,11)。血液学的ならびに血液生化学的側面からの解析も検討したが、他の JAKs 遺伝子欠損マウスのような特徴的な表現型を認めないことを確認した (データ非提示)。さらに、ヒトの TYK2 欠損症例では高 IgE 血症の症状を示すことから血清中の総 IgE 量を測定したが²⁰⁾、Tyk2^{+/+}マウスと Tyk2^{-/-}マウス間に差は認められなかった (データ非提示)。Tyk2^{-/-}マウスでは Th2 型の好酸球性炎症が亢進することから⁵⁷⁾、TYK2 を欠損した場合には抗原刺激が無いあるいは少ない環境下では T 細胞でバランスが維持され、過剰な抗原刺激によりバランスが破綻した場合には Th2 型に傾き易い表現型を持つと考えられた。そのため、ヒト TYK2 欠損でも清浄な環境下であれば高 IgE 血症のような Th2 型の反応を示すことなく、Tyk2^{-/-}マウスと同様に T 細胞間のバランスを維持することが可能だったかもしれない。しかし、我々の生活環境には Th1 型あるいは Th17 型の免疫反応を誘導するウイルスや微生物等の抗原や Th2 型の免疫反応を誘導するダニや花粉等の抗原 (アレルゲン) が存在し、恒常的な刺激により免疫系のバランスを形成・維持しているため、ヒト TYK2 欠損では通常的生活環境下に存在するアレルゲンによって生体

免疫システムが Th2 優位な状態に変化したと考えることができる。

Tyk2^{-/-}マウスは特に目立った表現型を示さなかったが、脾細胞のサイトカイン応答性は Tyk2^{+/+}マウスとは大きく異なり、IL-12 シグナルおよび IL-23 シグナルにおいて TYK2 が重要な役割を持つことが明らかとなった。また、ヘルパーT 細胞分化においても Tyk2^{-/-}マウス由来 CD4⁺細胞では Th1 細胞への分化ならびに Th17 細胞の増殖が低下することが確認された。一方で、予見されたとおりに Treg 細胞への分化には影響を及ぼさないことが明らかとなり、TYK2 が自己免疫疾患の病態誘導に関わる Th1 細胞ならびに Th17 細胞の分化・増殖を選択的にコントロールする分子で、免疫制御性の Treg 細胞には影響しないという理論が実際に成り立つことを明らかにした。創薬を考えた場合には、TYK2 阻害薬が Th1 細胞ならびに Th17 細胞に対して選択的な抑制作用を示すこと、さらには Treg 細胞に影響しないことから Treg 細胞による免疫抑制作用の補助も期待ができ、TYK2 阻害薬は効率よく免疫抑制作用を発揮することが期待される。JAK3 阻害薬もまた有望な免疫抑制薬であるが、T 細胞の発達に必要な IL-7 や Treg 細胞の機能維持に必須の IL-2 シグナルを抑制することから T 細胞全般を強く抑制すると考えられ、TYK2 阻害薬と JAK3 阻害薬、あるいはその他の JAK 阻害薬とは関与するサイトカイン構成の違いから、全く異なる薬効発現プロファイルを持った薬剤になる可能性がある。

このように、TYK2 は Th1 細胞および Th17 細胞を選択的に制御する興味深いプロファイルを持つことが明らかになったことから、炎症性疾患あるいは自己免疫疾患の病態モデルでの TYK2 の役割を研究する意義は大きいと考えた。次章以降では、自己免疫疾患の病態発症における TYK2 の役割ならびにそのときの Th1 および Th17 の関与について Tyk2^{-/-}マウスを用いた検討を進めて得た知見について述べる。

第五節 まとめ

本章では、T 細胞機能における TYK2 の役割について以下のことを明らかにした。

- ・ TYK2 は基本的な T 細胞機能には影響せず、シグナル伝達に関与する IL-12 および IL-23 による細胞の応答に選択的に関与する。
- ・ TYK2 は病態誘導性の Th1 細胞ならびに Th17 細胞の誘導を制御するが、免疫制御性の Treg 細胞の誘導に対しては影響しない。
- ・ *In vivo*においても、TYK2 は IL-12 ならびに IL-23 が関わる T 細胞性免疫応答に役割を有する。

第二章 関節炎における TYK2 の役割

第一節 諸言

RA は自己免疫疾患の中でも最も多い患者数を占め、自己の免疫が主に手足の関節や筋肉等の運動器官を炎症を伴って侵し、これにより関節痛、関節の変形が生じる代表的な炎症性自己免疫疾患である^{58,59}。関節リウマチの症状は対称性に発症し、左右両側の手足に関節炎を生じることが多い。RA の病因は十分には明らかになっていないが、単一の疾患というよりはむしろ複合的な発症原因を含んでいると考えられている⁶⁰。RA 患者の炎症滑膜では CD4⁺細胞の浸潤が認められ Th1 優位な炎症を示すが、これは Th1 優位な関節炎を示すマウスの CIA モデルと似ていることから、CIA モデルはヒト RA の動物モデルであると考えられている。また、近年の Th17 細胞の研究から、Th17 細胞もまた RA ならびに CIA モデルの病態形成に関与することが示唆されている⁶¹。

II 型コラーゲンで免疫されたマウスはコラーゲンに対する抗体を産生し、自己の関節の II 型コラーゲンに反応することで関節炎を発症する。しかし、この関節炎の発症はマウスの major histocompatibility complex (MHC) ハプロタイプに強く依存する。コラーゲンに対する応答は DBA/1 (H-2^a) マウスや B10.RIII (H-2^r) マウスで強く、C57BL/6 (H-2^b) マウスや BALB/c (H-2^d) マウスでは弱い⁶¹。RA 様の関節炎症状を誘発する他の手法として、抗コラーゲン抗体誘導性関節炎 (collagen antibody-induced arthritis: CAIA) が知られている⁶²。これは、コラーゲン上のエピトープに対する複数のモノクローナル抗体のカクテルを投与して受動免疫することにより、MHC ハプロタイプに依存せずに動物に関節炎を誘導する方法で、CIA 感受性の高い DBA/1 マウスのみならず、C57BL/6 マウスや BALB/c マウスに対しても短期間で関節炎症状を誘導することが可能である。通常、CAIA モデルは LPS を同時に処置することで TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を付加して反応を亢進させ、少量の抗コラーゲン抗体で強い関節炎を誘導するが⁶³、LPS を付加無しに大量の抗体を投与することによっても関節炎を誘導することが可能である⁶⁴。Tyk2^{-/-}マウスにおいては、LPS ショックに対して抵抗性を示すことから^{15,16}、LPS を使用した場合の影響については炎症性サイトカインの誘導能の違いが影響する可能性があり注意を要する。また、この CAIA モデルの優れた点は、CIA がコラーゲンとアジュバントによる免疫に始まり、自然免疫系の活性化、B 細胞からの抗コラーゲン抗体の産生誘導、関節炎発症のような複雑な免疫反応を介して関節炎の発症に至るメカニズムを持つのは異なり、抗コラーゲン抗体依存的な関節炎発症過程のみに評価対象を絞り込むことが出来る点である。特に、B10.Q/J マウスの検討では抗体価の低下が関節炎発症抵抗性の一因として示唆されているが¹²、これまで関節炎発症フェーズのみに注目した検討は試みが無く、TYK2 の関節炎発症における役割を解析する上で重要と考えられた。

本章では、CIA 感受性 B10.Q (H-2^q) 系統マウスを用いて CIA の発症への Tyk2 mutation の影響を確認した。さらに、CIA 非感受性 BALB/c 系統の Tyk2^{-/-}マウスを用いて CAIA 発症への影響を検討し、病態の解析に加えて Th1/Th17 の関与について検討した。

第二節 実験方法

i) コラーゲン関節炎 (CIA) モデル

B10.Q/Ai マウスまたは B10.Q/J マウスへ、ウシ II 型コラーゲン (コラーゲン技術研修会) と 1 mg/mL *Mycobacterium Tuberculosis* 死菌 H37Ra を含む CFA を 1:1 混和して作製したエマルジョン 100 μ L を day 0 には尾部、day 14 には尾根部に皮内投与して免疫し、四肢に関節炎を誘導した。関節炎の評価は各肢について 3 点評価を行い、総計 12 点として経日的に関節炎の重篤度をクリニカルスコアとして評価した。クリニカルスコアの判定は Table 2 の基準に従った。

Table 2. Criteria of clinical scoring of CIA.

Graded clinical score/paw	Clinical Observations
Score 0	Normal paw
Score 0.5	At least one toe inflamed and swollen
Score 1	Mild swelling of entire paw
Score 2	Entire paw inflamed and swollen
Score 3	Very inflamed and swollen paw or ankylosed paw

Maximal total score: 12 (0 to 3 for each paw, adding the scores for all 4 paws)

ii) コラーゲン抗体誘導関節炎 (CAIA) モデル

関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル (5 クローン, 10 mg/mL) (Chondrex) を 0.6 mL/mice で静脈内投与して関節炎を惹起した。関節炎の評価は四肢について各 3 点評価を行い、総計 12 点で経日的に関節炎の重篤度をクリニカルスコアとして評価した。関節炎クリニカルスコア判定は各肢を指、甲および手首・足首・踵に分け、部位別スコアの総和としてクリニカルスコアを求めた。クリニカルスコアの判定は Table 3 の基準に従った。観察の最終日 (day 7) には足容積測定装置 MK-101P (室町機械) を用いて後肢の腫脹を測定した。

Table 3. Criteria of clinical scoring of CAIA.

Clinical score/paw		Clinical Observations
Toe(s)	Score 0	Normal toes
	Score 0.1-0.5	One toe inflamed and swollen = 0.1 Total score of 5 toes = 0.5
Instep	Score 0	Normal instep
	Score 0.5	Partial swelling of entire instep
	Score 1	Mild swelling of entire instep
	Score 1.5	Severe swelling of entire instep
Heel and tarsus	Score 0	Normal heel and tarsus
	Score 0.5	Partial or Mild swelling of entire heel and tarsus
	Score 1	Severe swelling of entire heel and tarsus

One paw score = Toe(s) (0-0.5) + Instep (0-1.5) + Heel and tarsus (0-1)

Maximal total score: 12 (0 to 3 for each paw, adding the scores for all 4 paws)

iii) 病理組織学的解析

病理組織学的解析は対象組織から作成した病理標本を顕微鏡下で観察評価した。病理標本は10%中性緩衝ホルマリンに浸し、後日 EDTA 脱灰した組織をパラフィン包埋した。6 μ m の厚さに薄切した切片は Hematoxylin&Eosin (H&E) 染色を行い、踵関節部分の病理変化を評価した。

iv) 肢組織の遺伝子発現変動解析

組織における遺伝子発現変動解析は TaqMan プローブ法による定量的 RT-PCR (quantitative RT-PCR: qPCR) にて解析した。CAIA 誘導マウス後肢の組織中 mRNA 発現変動解析は、液体窒素で凍結して破砕した組織 (後肢) を ISOGEN (日本ジーン) 中でホモジナイズし、RNeasy kit (QIAGEN) を用いて mRNA を抽出した。5 μ g の mRNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA に逆転写した後、市販の TaqMan gene expression assay の各 primer/probe セット (Applied Biosystems) と TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) を用い、Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で解析した。

v) 細胞内シグナル伝達の Western Blot analysis

膝下リンパ節細胞におけるシグナル伝達は Western Blot 法にて解析した。解析用サンプルは、day 3 の膝下リンパ節を回収して細胞をナイロンメッシュを用いて分散した後、 1×10^6 個の DLN 細胞を 20 μ L の radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Santa Cruz

Biotechnology) で溶解して作製した。その後 SDS-PAGE でサンプル中の蛋白質を分離し、蛋白質をゲルから Polyvinylidene fluoride transfer (PVDF) メンブレン (Perkin Elmer) に転写した。このメンブレンに抗体を反応させ、Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer) を用いて目的蛋白のバンドを検出した。

検出用には以下の抗体を用いた。抗 STAT3 抗体 (sc-7179)、抗 STAT4 抗体 (sc-486) および抗 I κ B α 抗体 (sc-371) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 pSTAT3(Tyr705)抗体 (9131) (Cell Signaling Technologies)、抗 pSTAT4(Tyr693)抗体 (Y011047) (Applied Biochemical Materials)、抗 Actin 抗体(A1978) (Sigma-Aldrich)。

vi) 統計解析

統計解析は SAS System Release 8.2 を使用し、有意水準 0.05 (両側) をもって判定した。統計手法は、2 群間の連続した数値の比較では *t* 検定または Welch 検定、2 群間のスコアの比較では Wilcoxon 順位和検定で解析した。

第三節 実験結果

第一項 CIA モデル

CIA に感受性のある B10.Q 系統マウスを用い、Tyk2 wild-type の B10.Q/Ai と Tyk2 mutant の B10.Q/J マウスで CIA を検討した。B10.Q/Ai マウスはコラーゲン免疫によって 8 例中 7 例が CIA を発症した (Figure 10A)。一方、B10.Q/J マウスは同処置によって誘導された関節炎は 7 例中 1 例であり、その関節炎のクリニカルスコアは B10.Q/Ai で誘導された関節炎と比較して軽微で、有意な減弱が認められた (Figure 10B)。

以上の結果から、TYK2 遺伝子に変異を持った B10.Q/J マウスが CIA モデルに対して発症抵抗性を示すという既報の再現性が確認された¹²⁾。

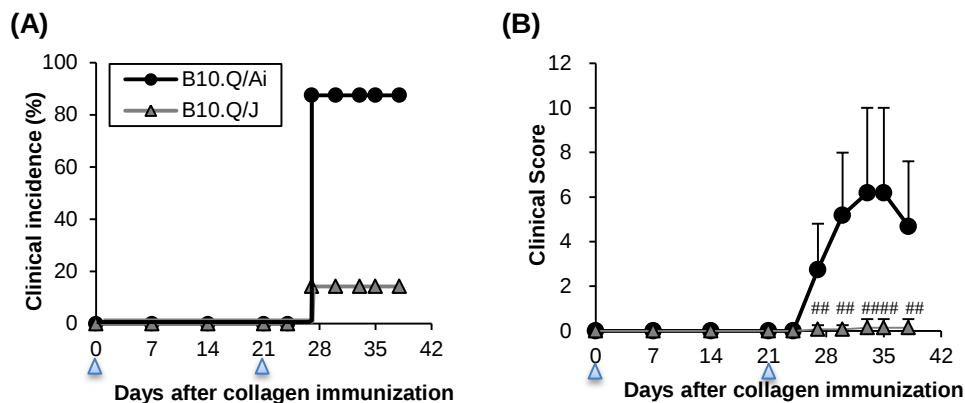


Figure 10. Loss of TYK2 function leads a resistance to CIA model.

A and **B**, Tyk2 wild-type B10.Q/Ai mice and Tyk2 mutant B10.Q/J mice were immunized with bovine CII on days 0 and 21, and arthritis was induced after the second immunization. Incidence of arthritis (**A**) and clinical arthritis score (**B**) during the course of the experiment were strongly reduced in B10.Q/J mice. Each value represents mean + SD (n=7–8). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with the B10.Q/Ai.

第二項 CAIA モデル

前項にて B10.Q/J マウスが CIA モデルに対して発症抵抗性を示すことを明らかにしたが、既報の論文では血清中抗コラーゲン抗体価の低下が認められることが報告されている¹²⁾。すなわち、TYK2 が抗コラーゲン抗体の産生過程に影響することで、T 細胞が関わる関節炎の病態形成過程全体が抑圧され、関節炎発症における TYK2 の役割を解明する上で CIA モデルだけでは解析が不十分と考えた。そこで、関節炎特異的な免疫反応における TYK2 の役割を明らかにするため、抗コラーゲン抗体依存的な関節炎である CAIA モデルを検討した。

Tyk2^{+/+}マウスでは抗コラーゲン抗体カクテルの投与により、3 日後には 8 例全例が関節炎を発症した (Figure 11A)。一方、Tyk2^{-/-}マウスでは day 3 では全く関節炎の発症は認められず、day 6 に 8 例中 1 例が前肢の 1 指に弱い関節炎を示した (Figure 11B, 11C)。客観的な指標として、day 7 に後肢足容積を測定し、Tyk2^{-/-}マウスでは CAIA 誘導による足容積の増加が有意に抑制されることを確認した (Figure 11D)。このことから、TYK2 が抗体依存的な関節炎の発症過程において重要な役割を持つことが明らかになった。

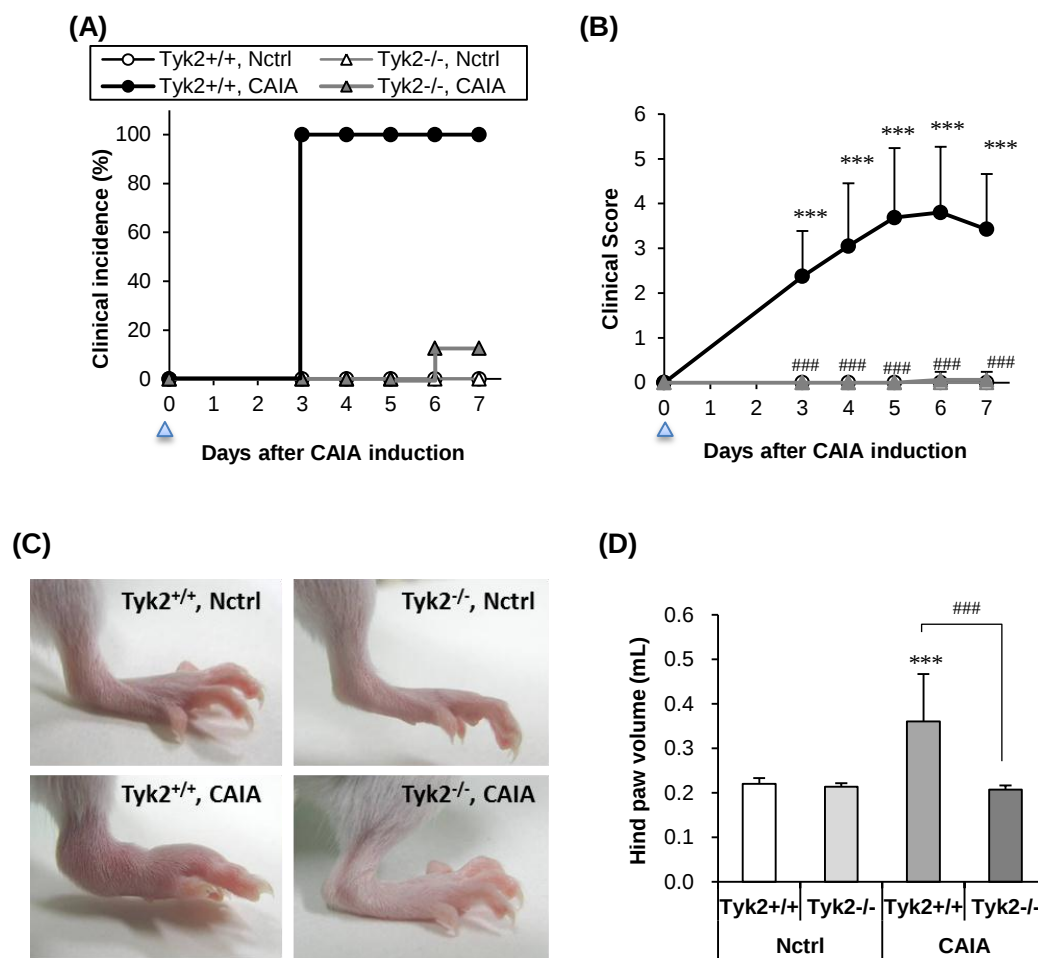


Figure 11. TYK2 plays a role in effector phase of arthritis.

A and **B**, Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice were intravenously injected with an anti-collagen antibody cocktail on day 0. Incidence of arthritis (**A**) and clinical arthritis score change (**B**) during the experiment. **C**, Representative appearance of the hind limb on day 7 after CAIA induction. Tyk2^{+/+} mice limbs showed obvious swelling. **D**, Hind paw volume on day 7. Tyk2^{+/+} mice showed a significant increase in volume, but Tyk2^{-/-} mice did not. Each value represents mean + SD (n=8). ****p* < 0.001 compared with Nctrl; ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

Day 7の後肢足根関節の病理組織解析では、Tyk2^{+/+}マウスではCAIA誘導により滑膜細胞の増殖、滑膜下組織への強い好中球浸潤が認められ、関節軟骨表層は糜爛性的変化が見られた (Figure 12)。また、骨組織ではパンス形成および破骨細胞による破壊と、一部の例では骨破壊に反応して起きたと考えられる骨芽細胞による新骨形成が認められた。一方、Tyk2^{-/-}マウスでは正常な関節構造ならびに軟骨表層を保持しており、病理学的にも関節炎の発症は認められなかった。

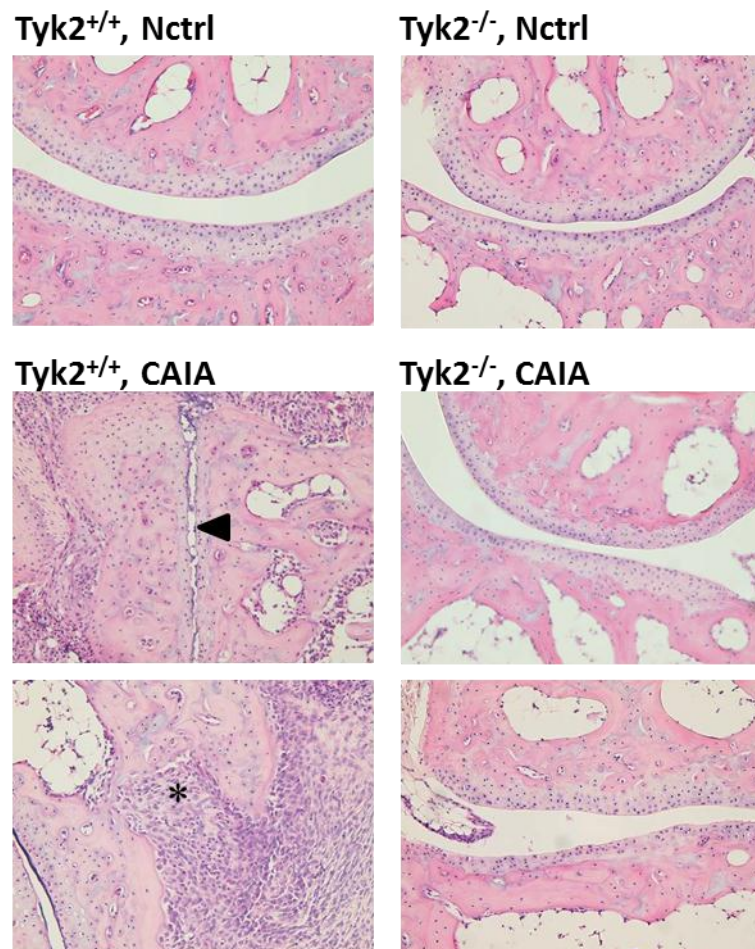


Figure 12. Pathological appearance in the CAIA-induced paws.

Representative H&E-stained tarsal joint sections from CAIA-induced $Tyk2^{+/+}$ and $Tyk2^{-/-}$ mice on day 7 as described in Methods. $Tyk2^{+/+}$ mice joints showed inflammatory cells infiltration, erosion synovium (arrowhead) and bone destruction (asterisk), but $Tyk2^{-/-}$ mice had no critical change ($\times 200$ magnification).

関節炎発症初期の day 3 の肢組織中 mRNA 発現変動解析により、 $Tyk2^{+/+}$ マウスでは CAIA 誘導により IL-17A および IFN- γ に加え、p40 のような Th1/Th17 に関連する分子が発現亢進を示し、 $Tyk2^{-/-}$ マウスでは有意な低下が認められた (Figure 13A)。炎症後期の day 7 においても、持続的に発現が亢進した p40 が $Tyk2^{-/-}$ マウスで有意に低く、IL-17A および IFN- γ についても低い傾向を示した。さらに、CAIA により誘導される炎症性サイトカイン IL-6、IL-18、TNF- α および IFN- β の mRNA 発現亢進が $Tyk2^{-/-}$ マウスでは有意に低下しており、 $Tyk2^{-/-}$ マウスでは炎症反応が強力に抑えられていることが明らかになった (Figure 13B)。

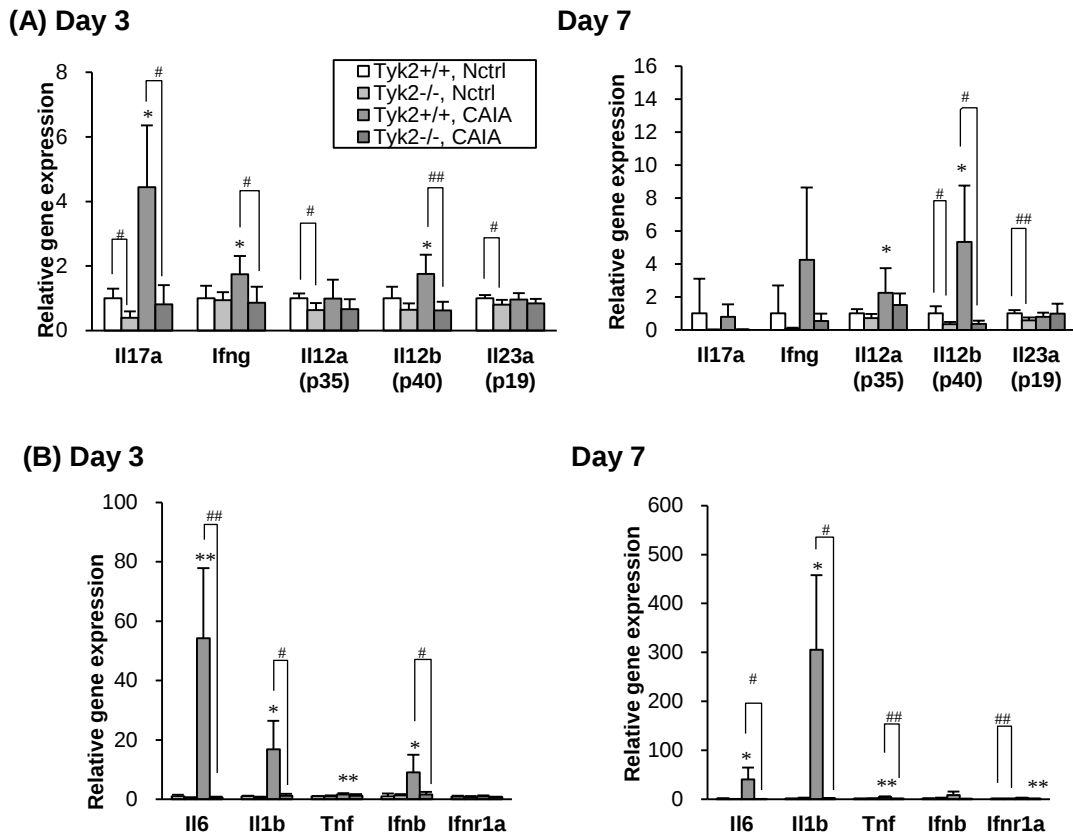
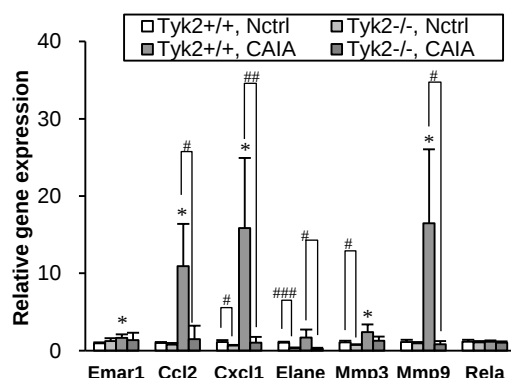


Figure 13. TYK2 is required for Th1/Th17-related and other pro-inflammatory gene expression in CAIA-induced paws.

A and **B**, Three or seven days after CAIA induction, gene expressions of Th1/Th17-related (**A**) and other pro-inflammatory cytokines (**B**) were evaluated in the hind paw of Tyk2^{+/+} mice and Tyk2^{-/-} mice as described in Methods. IL-17A and IFN- γ was significantly increased in Tyk2^{+/+} mice at day 3, but not at day 7. Results are given as fold expression, compared with reference GAPDH expression, and then normalized with averaged Tyk2^{+/+} control expression. Each value represents mean + SD (n=5). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the Nctrl; # p < 0.05, ## p < 0.01 compared with the Tyk2^{+/+}.

さらに、関節炎発症初期の肢組織中 mRNA 発現変動解析から、Tyk2^{+/+}マウスでは CAIA 誘導により day 3 に monocyte chemoattractant である CCL2、および neutrophil chemoattractant である CXCL1 の遺伝子発現が上昇し、day 7 にはマクロファージおよび好中球性炎症のマーカーとなる F4/80 (Emar1) および Neutrophil elastase (Elane) の発現が亢進すること、そして Tyk2^{-/-}マウスではそれらの遺伝子の発現が有意に低下あるいは低下傾向を示すことが明らかになった (Figure 14)。さらに細胞外マトリックス分解酵素である MMP3 および MMP9 の発現も Tyk2^{-/-}マウスでは低下しており、Tyk2^{-/-}マウスでは関節および組織の破壊が遺伝子レベルで抑制されていることが明らかになった (Figure 14)。

Day 3



Day 7

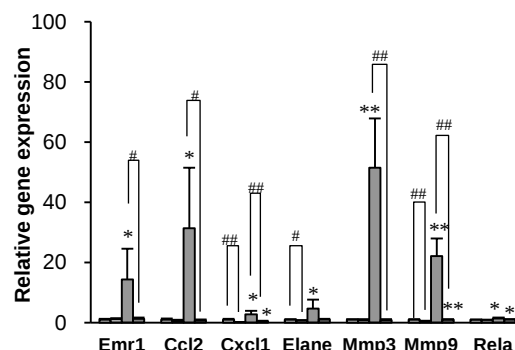


Figure 14. TYK2 is required for inflammatory gene expression in CAIA-induced paws.

Inflammation-related gene expression in the CAIA model. Gene expressions of inflammation were evaluated in the hind paw. Chemokines gene expression, Ccl2 and Cxcl1, were highly elevated at day 3, and Emr1 (F4/80, macrophage marker), was elevated at day 7. Elane (elastase, neutrophil marker) did not significantly changed in this experiment. Mmp expression was significantly elevated during the experiments. Each value represents mean + SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the Nctrl; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with the Tyk2^{+/+}.

Tyk2^{-/-}マウスで認められた肢組織における Th1 および Th17 サイトカイン産生の低下が Th1 細胞および Th17 細胞の数的あるいは質的な抑制に基づくのかを明らかにするため、肢 DLN での STAT リン酸化を Western blotting 法で確認した。CAIA を誘導した Tyk2^{+/+}マウスの DLN 細胞では IL-23 シグナルあるいは Th17 細胞活性化を反映すると考えられる STAT3 リン酸化の亢進が認められたが、Tyk2^{-/-}マウスの DLN 細胞ではリン酸化は減弱した (Figure 15)。また、IL-12 シグナルあるいは Th1 細胞活性化を反映すると考えられる STAT4 リン酸化も同様に Tyk2^{-/-}マウスでは減弱が認められ、TYK2 が DLN 中の Th1 細胞および Th17 細胞の活性化あるいは増加に必要なことが示唆された。

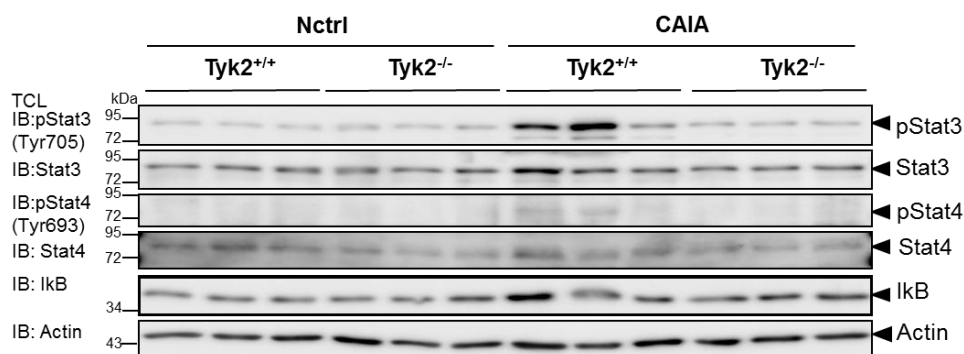


Figure 15. TYK2 plays an important role in STAT3 and STAT4 phosphorylation of lymph node cell lysate from CAIA model mice.

Phosphorylation of STAT proteins in the lymph node cells from the CAIA model. Popliteal lymph node cells were collected at day 3 and phosphorylation of STATs and IκB expression were analyzed as described in Methods. In cells from CAIA-induced Tyk2^{+/+} group, STAT3 and STAT4 phosphorylation were observed, but completely diminished in Tyk2^{-/-} mice. Data represent independent cell lysate from three mice of each group.

以上のことから、TYK2 が関節炎の発症過程、特に抗コラーゲン抗体により誘導される関節炎の炎症過程において重要な役割を担うこと、そして Tyk2^{-/-}マウスで認められる関節炎発症抵抗性に Th1/Th17 細胞の抑制が寄与している可能性が示唆された。

第四節 考察

TYK2 の自己免疫疾患モデルでの検討はほとんど検討されていなかったが、唯一、CIA 抵抗性を示す B10.Q マウスの研究から、TYK2 遺伝子への突然変異がその抵抗性に関与している可能性が示唆され、TYK2 が関節炎発症に重要な役割を持つことが示唆されていた。しかし、それ以外の解析はほとんど行われることなく、自己免疫疾患研究から取り残された形になっていた。しかし、ヒト TYK2 欠損症例の発見から、私を含めて TYK2 と自己免疫疾患との関係に注目した研究が行われるようになった。2009 年には Tyk2 mutant の B10.Q/J マウスならびに Tyk2^{-/-}マウスが EAE に対して発症抵抗性を示すことが相次いで報告された^{65,66}。EAE は Th17 依存性が高いモデルと考えられており、Oyamada A.等は抗原である myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 刺激に対する DLN 細胞の IL-17 産生が Tyk2^{-/-}マウスでは低下し、脊髄への Th17 細胞の浸潤も減少することを報告している⁶⁶。EAE は MHC 拘束性があることが知られており、主に本研究に用いた BALB/c 系統は MHC が EAE を発症しない H-2^dであったため、EAE モデルを用いた検討は行えていない。

CIA モデルも MHC 拘束性があることが知られており、BALB/c 系統は CIA に対しても感受性が無い。そこで、既報の B10.Q/J マウスにおける関節炎発症抵抗性について検討し、関節炎発症抵抗性が再現されることを確認した。しかし、B10.Q/J マウスでは CIA 免疫後の抗コラーゲン抗体価が低いことが報告されている¹²⁾。また、B10.Q/J マウスでの CIA 発症抵抗性は確かな現象ではあるが、B10.Q/J マウスのような自然発生による突然変異マウスは未確認の遺伝子変異を持っている可能性が否定できないため、gene targeting により Tyk2 遺伝子を knockout した Tyk2^{-/-}マウスで関節炎発症への影響を確認することが必要と考えた。しかし、これまでに Tyk2^{-/-}マウスで関節炎発症への影響を検討した報告は無い。関節炎モデルとして汎用される CIA モデルは DBA/1 マウスや B10 マウスでは重篤な関節炎を発症するものの、他の系統では安定して病態を誘導することが難しいことがその一因として挙げられる。C57BL/6 系統であれば弱い関節炎を誘導することが可能であるが、BALB/c 系統ではほとんど関節炎を発症することは無い。また、CIA 感受性の有無だけでなく、B10.Q/J マウスが示す発症抵抗性に抗コラーゲン抗体産生の減少が関わっている可能性があり、抗コラーゲン抗体産生以後の関節の炎症・破壊の過程での TYK2 の役割についても解析する必要があると考えた。

そこで、多様な系統のマウスで関節炎誘導が可能な抗コラーゲン抗体により直接誘導される CAIA モデルの検討を行った。Tyk2^{-/-}マウスが LPS shock 抵抗性を示すことから^{15,16)}、LPS 負荷無しに関節炎を誘導できる Chondrex 社の 5 clone の抗コラーゲン抗体カクテルを用いて検討し、Tyk2^{-/-}マウスが CAIA 発症に対して強い抵抗性を示すことを確認した。足組織の病理組織解析でも炎症像は認められず、炎症に関連した IL-6 や IL-18 の mRNA 発現上昇も認められなかった。一方で、TYK2 が関わる IL-12/IL-23 関連のサイトカインの発現は関節炎発症初期の day 3 に抑制が認められたものの、必ずしも Tyk2^{-/-}マウスが示す強い関節炎発症抵抗性を説明しうるものではなかった。IL-12p40^{-/-}マウスに比べ IL-23p19^{-/-}マウスでは CIA 発症抵抗性が強く認められることから^{67,68)}、CIA においては IL-23 がより重要な役割を持つ可能性がある。また、IL-23 には強い破骨細胞形成作用があることが最近報告された⁶⁹⁾。そのため、Tyk2^{-/-}マウスにおいても IL-23 依存的な破骨細胞による関節破壊が直接的に制御されている可能性がある。Tyk2^{-/-}マウスが示す強い関節炎発症抑制作用から、関節破壊において TYK2 は代替できない重要な役割を持つと考えられ、直接的に骨破壊に関わる過程での TYK2 の役割についての研究が今後必要と考える。

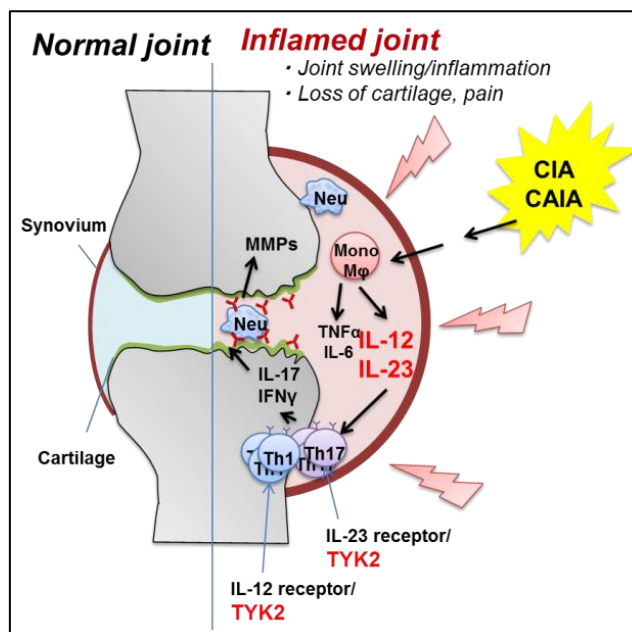
本研究においては異なる 2 つの関節炎モデルを検討し、マウスも B10.Q 系統の Tyk2 mutant B10.Q/J マウス (H-2^q) ならびに BALB/c 系統の Tyk2^{-/-}マウス (H-2^d) という異なるモデル、異なる MHC ハプロタイプで TYK2 が関節炎発症に関わることを明らかにした。すなわち、TYK2 の関節炎発症における重要性はモデルおよび MHC ハプロタイプに拘束されない、普遍的な形質であると考えられる。

以上のように、TYK2 が関節炎発症に重要なことを *Tyk2 mutant* マウスで確認し、さらに抗コラーゲン抗体依存的な関節破壊に対しても TYK2 が重要な役割を持つことを明らかにした。

第五節 まとめ

本章では、関節炎における TYK2 の役割について以下のことを明らかにした (Scheme 1)。

- TYK2 はマウス関節炎モデルでの病態進展/悪化に重要な役割を持つ。
- 関節炎における TYK2 の重要性は遺伝的背景が異なるマウス間においても強く保存されている。
- TYK2 は抗コラーゲン抗体による炎症誘導ならびに関節破壊を直接的に制御する。



Scheme 1. TYK2 role in arthritis.

第三章 炎症性腸疾患における TYK2 の役割

第一節 諸言

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は消化管での炎症を主徴とする原因不明の慢性炎症性疾患で、主に潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) から成る⁷⁰⁾。IBD は欧米に患者が多く日本では稀な疾患であったが、近年の食生活の欧米化により患者数は増加の一途を辿っている。しかし、その発症原因は特定されておらず、免疫系異常や遺伝的背景の影響、腸内細菌叢バランスなどが考えられるものの、単一の原因というよりはむしろ複数の要因が病態の形成に影響していると考えられている⁷¹⁾。UC と CD は消化管の潰瘍病変という点で類似しているが、UC は主に大腸粘膜の正常組織と罹患組織の間にはっきりとした境界がある潰瘍や糜爛を特徴とした大腸に局限したびまん性非特異性炎症で、比較的表層に炎症を生じ、粘血便、下痢、発熱等を症状とする⁷²⁾。一方、CD は消化管のアфта様潰瘍や敷石状外観、線維化を伴い、口から胃、小腸、大腸、直腸、肛門まですべての消化管に病変が起こる肉芽腫性炎症で、腸組織深部に炎症を生じ、腹痛、下痢、肛門病変等を主症状として再発寛解を繰り返す⁷³⁾。

炎症性腸疾患において、その病態にサイトカインの関与が強く示唆されている⁷⁴⁾。TNF- α や IL-12 が病変局所で増加しており、そうしたサイトカインを標的とした生物製剤が有効性を示していることから、病態への関与は確かである⁷⁵⁾。ヒト IBD の解析からも、病態には Th1 細胞あるいは Th17 細胞が指摘されており⁷⁶⁾、GWAS においても TYK2 ならびに IL23R が本疾患と有意に関連することが報告されている^{23,24)}。しかし、IBD における TYK2 の役割については不明なままである。

原因不明の IBD ではあるが、動物モデルとしては多くのモデルが考案され研究に用いられている⁷⁷⁾。その中でも、デキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium: DSS) を含有する水を飲水することで大腸炎が誘導される DSS 誘導性大腸炎が UC モデル⁷⁸⁾、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid: TNBS) を直腸内投与することで誘導される TNBS 誘導性大腸炎が CD モデルとして繁用されている⁷⁹⁾。DSS 誘導性大腸炎は体重増加の抑制、血便および貧血などの症状、大腸粘膜組織における糜爛の形成などがヒト UC の特徴に似ていることから UC の病態モデルと考えられている。DSS はムコ多糖の一種で、腸粘膜上皮障害を引き起こし、DSS が粘膜の免疫細胞に貪食されることで免疫系を活性化することが発症のメカニズムと考えられている⁸⁰⁾。また最近では、IBD 発症における腸内細菌叢の重要性と同じく、DSS 大腸炎の発症においても腸内細菌が産生する toll like receptor (TLR) リガンド等が障害粘膜から免疫系を活性化して IBD の発症に関わると考えられている⁸¹⁾。一方で、TNBS 誘導性大腸炎モデルはハプテンである

TNBS が誘導する T 細胞応答によりヒト CD に類似した炎症所見と病理変化を見せることから CD のモデルとして用いられている⁸²⁾。

本章では、TYK2 の IBD の病態進展における意義について DSS 誘導性大腸炎モデルおよび TNBS 誘導性大腸炎モデルを用いて検討した。

第二節 実験方法

i) DSS 誘導性大腸炎モデル

Day 0 から day 7 まで 3% DSS (m.w. 36,000-50,000, MP Biomedicals) または milliQ 水を自由飲水させ、大腸炎を誘発した。経時的な大腸炎の疾患活動性を非侵襲的に評価する手法として、下に示した Cooper HS.等の disease activity index (DAI) によるスコアリングを用いた^{83,84)}。7 日間の DSS 飲水処置後にマウスは麻酔下にて採血して放血致死し、大腸の長さを測定した。

Table 4. Disease activity index.

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5		
2	5-10	Loose stools	Guiaac +
3	10-15		
4	>15	Diarrhea	Gross bleeding

The disease activity index (DAI) = Weight loss score (0-4) + Stool consistency (0-4) + Bleeding (0-4); Max score: 12. *Normal stools, well formed pellets; loose stools, pasty stools that do not stick to the anus; diarrhea, liquid stools that stick to the anus.

ii) TNBS 誘導性大腸炎モデル

麻酔下、マウス経口ゾンデおよび 1 mL ディスポーザブルシリンジに 0.15 mL の 3.5 mg TNBS (Fluka) と 40% ethanol 含む投与液 (以下 TNBS 液) を充填し、肛門から約 0.5 cm の所に TNBS 液 0.05 mL を注入した後、さらにゾンデを挿入して、肛門から約 4 cm の所に残りの TNBS 液 0.1 mL を注入した。Day 0 以降は毎日生死を確認し、生存を確認したマウスについては体重を測定した。

iii) 大腸組織の遺伝子発現変動解析

大腸組織中 mRNA 発現変動解析は、PBS でよく洗浄した大腸組織を RNAlater (Applied Biosystems) で保存し、後日 ISOGEN 中でホモジナイズし、RNeasy kit を用いて mRNA を抽出した。以降の操作は第二章 第二節 (iv) の手法に従った。

iv) 統計解析

統計解析は SAS System Release 8.2 を使用し、有意水準 0.05 (両側) をもって判定した。統計手法は、2 群間の連続した数値の比較では *t* 検定または Welch 検定を用いた。2 群間の生存期間の検定では Kaplan-Meier 法・Log-rank 検定・Cox 回帰で解析した。

第三節 実験結果

第一項 DSS 誘導性大腸炎モデル

IL-12 および IL-23 は腸管の炎症においても中心的な役割を演じることが知られていることから^{85, 86, 87}、炎症性大腸炎における TYK2 の役割を、ヒト UC のモデルである DSS 誘導性大腸炎モデルを用いて検討した。

Tyk2^{+/+}マウスおよび Tyk2^{-/-}マウスは day 0 から採材する day 7 まで milliQ 水または 3% DSS を自由飲水させた。milliQ 水を与えた Tyk2^{+/+}マウスおよび Tyk2^{-/-}マウスでは体重変化ならびに大腸炎症をスコア化した DAI スコアの評価で評価期間中の変化は認められなかった (Figure 16)。一方、3% DSS を与えられた Tyk2^{+/+}マウスでは day 2 から DAI スコアの上昇が認められ、day 5 以降には Tyk2^{+/+}マウスの DAI スコアならびに体重推移において milliQ 水を与えたマウスと比し有意な体重減少ならびに DAI スコアの有意な増加が観察され、大腸炎の誘導が確認された。一方、Tyk2^{-/-}マウスでは体重の変化は認められなかったものの、便潜血ならびに軟便は Tyk2^{+/+}マウスと同様に観察された (Figure 16)。そのため 3% DSS を飲水した Tyk2^{-/-}マウスの DAI スコアは経日的に増加したが、Tyk2^{+/+}マウスと比較して有意に低かった。

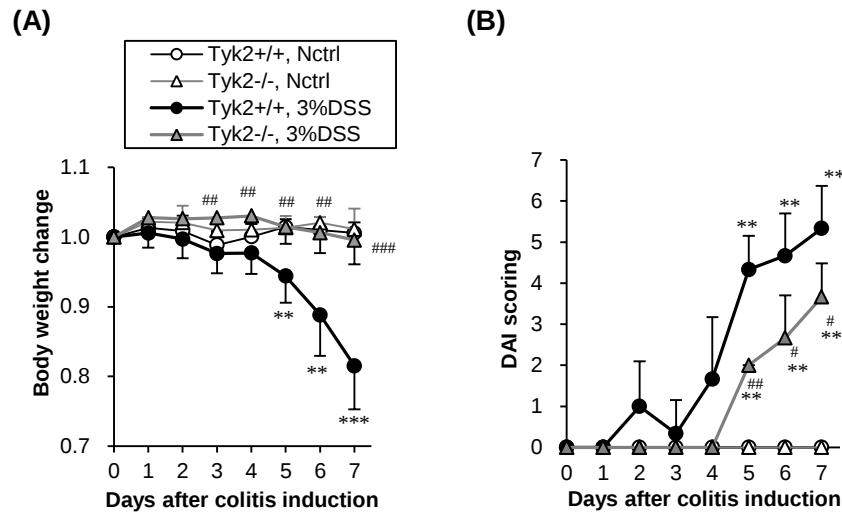


Figure 16. TYK2 plays an important role in DSS-induced experimental colitis.

A and **B**, Body weight change (**A**) and disease activity index (DAI) (**B**) during the course of DSS treatment in Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice were monitored every day. Each value represents mean + SD (n=6). ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with Nctrl; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

DSS 誘導性大腸炎では、DSS の処置によって生じた炎症刺激によって病態の進展と共に大腸組織の短縮、肥厚が認められる⁸⁸⁾。Day 7 に採取した組織では、Tyk2^{+/+}マウスおよびTyk2^{-/-}マウスで 3% DSS 飲水により有意な大腸長の短縮が観察されたが、その程度はTyk2^{-/-}マウスで有意な軽減が認められた (Figure 17)。

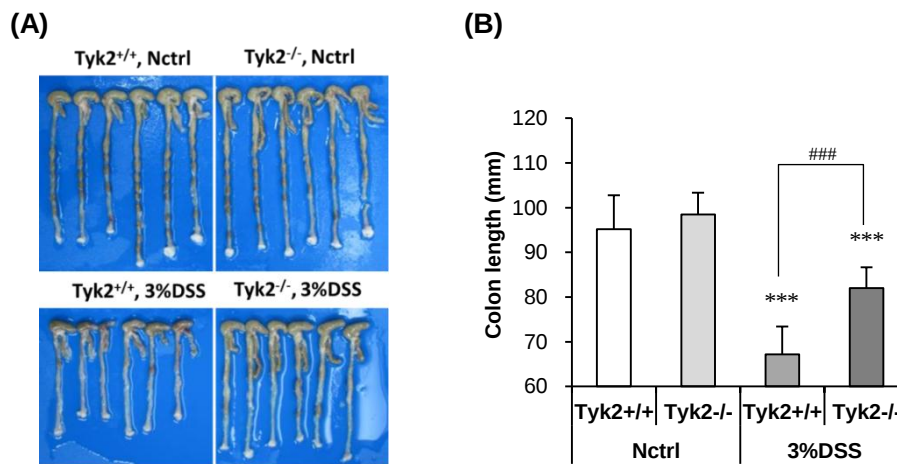


Figure 17. TYK2 deficiency attenuates colon shortening.

A and **B**, Colon feature (**A**) and lengths (**B**) in control and DSS-treated Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice were evaluated on day 7. Each value represents mean + SD (n=6). ****p* < 0.001 compared with Nctrl; ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

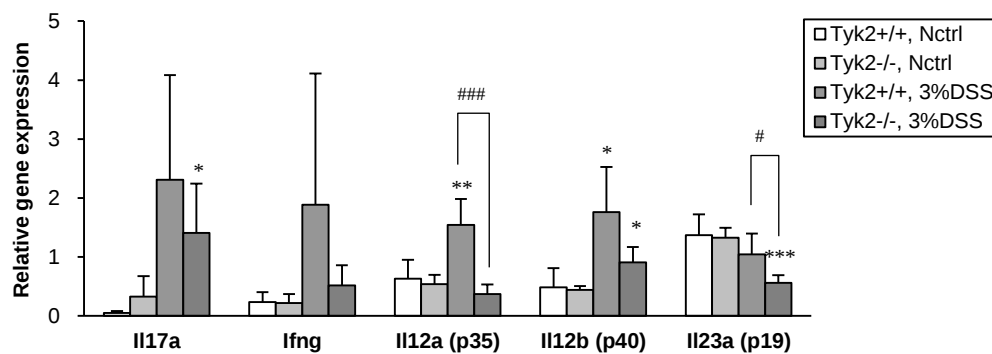


Figure 18. TYK2 regulates Th1/Th17 cytokine production in colon.

Effect of TYK2 deficiency on expression level of cytokines in colon tissue at day 7 after DSS treatment. Each value represents mean + SD (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with Nctrl; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared with Tyk2^{+/+}.

Tyk2^{-/-}マウスのモデル抵抗性のメカニズムについて検討するため、day 7 での大腸組織の mRNA 発現変動を検討した。その結果、DSS を処置した Tyk2^{+/+}マウスでは p35、p40 の炎症性サイトカインの有意な発現亢進と IFN- γ および IL-17A の発現が亢進する傾向が認められた (Figure 18)。一方、Tyk2^{-/-}マウスにおいても p35 および p19 の有意な発現低下と他のサイトカインの低下傾向が認められ、TYK2 が大腸組織での Th1/Th17 サイトカインの発現亢進に必要なことが示唆された。

第二項 TNBS 誘導性大腸炎モデル

UC とは異なる大腸炎における TYK2 欠損の影響を評価するため、ヒト CD のモデルである TNBS 誘導性大腸炎モデルを検討した。

大腸への TNBS の投与により、Tyk2^{+/+}マウスでは TNBS 投与翌日から急激な体重の減少と死亡例が認められ、day 3 までに全例が死亡した (Figure 19A)。一方、Tyk2^{-/-}マウスでは 50%の死亡にとどまり、致死的に誘導された TNBS 大腸炎に対して Tyk2^{-/-}マウスは生存期間を有意に延長した。また、生存した Tyk2^{-/-}マウスについては著しい体重減少からの回復が認められた (Figure 19B, 19C)。

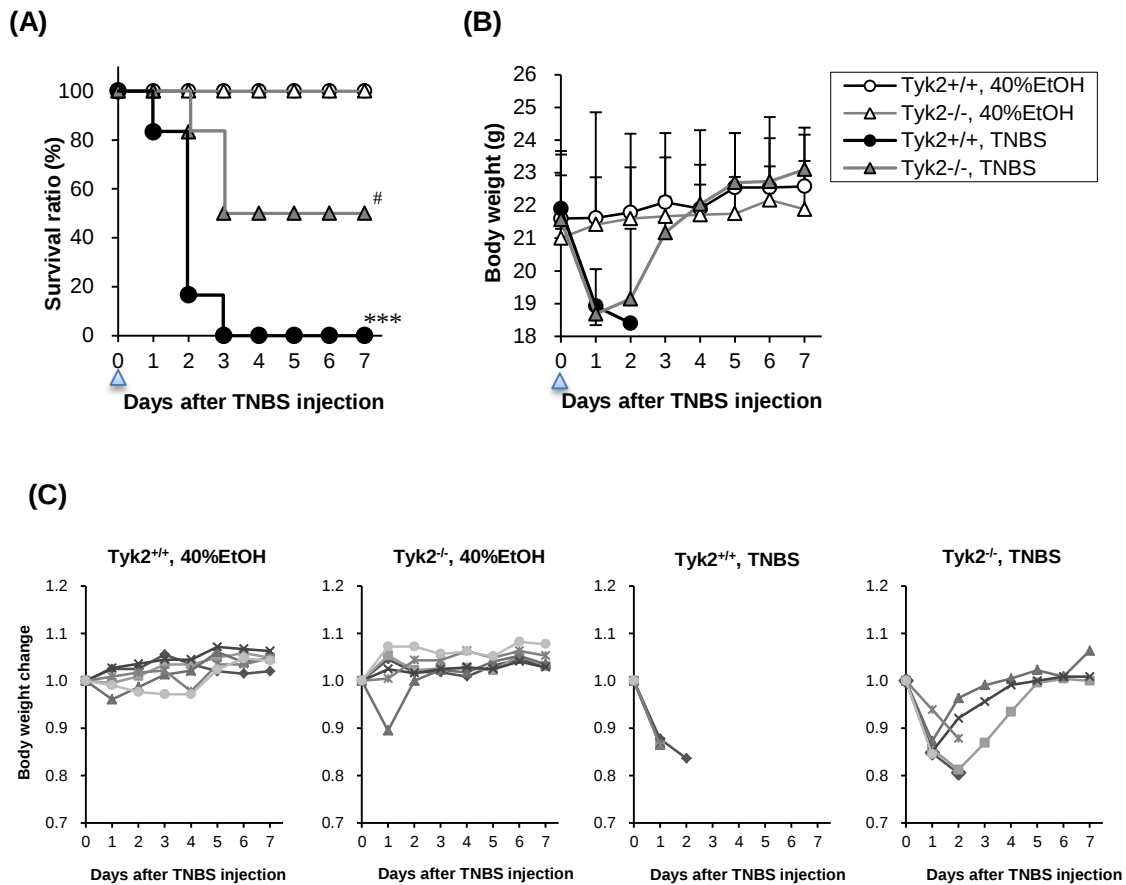


Figure 19. TNBS-induced experimental colitis in TYK2-deficient mice.

A, Mice were treated with 3.5 mg of TNBS in 40% EtOH by rectal instillation to induce colitis or with 40% EtOH alone to serve as colitis controls. TNBS-induced colitis-associated mortality in Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice was monitored every day. Data represent the survival ratio of mice. *** $p < 0.001$ compared with 40% EtOH, # $p < 0.05$ compared with Tyk2^{+/+}. **B and C**, Body weight changes during the course of TNBS treatment. Data represents mean body weight + SD ($n=6$) (**B**) or body weight change of each mouse (**C**).

第四節 考察

UC および CD に代表される IBD は欧米で多い疾患だったが、近年の食生活の変化と共に日本でも患者数が著しく増加して最近特に注目されている自己免疫疾患である^{70,71})。TYK2、IL12RB1、IL-23R 等が複数の GWAS で疾患感受性遺伝子として候補に挙がっており、TYK2 関連遺伝子と IBD との関連性が強く示唆されている^{23,24,89})。動物モデルにおいては IL-12 欠損マウスおよび IL-23 欠損マウスそれぞれで IBD モデルに対して抵抗あるいは増悪との相反した報告があり、IL-12 と IL-23 の重要性については十分明らかにはされていない^{85,90})。

本研究においてヒト UC モデルの DSS 誘導性大腸炎とヒト CD モデルの TNBS 誘導性大腸炎を用いた検討を行い、Tyk2^{-/-}マウスが両モデルに対して抵抗性を示すことを明らかにした。IBD では IL-12・IL-23 の共通サブユニットである p40 の中和抗体の ustekinumab がヒト CD を対象とした臨床試験において奏効している⁹¹⁾。こうしたことから、p40 の関わる IL-12 および IL-23 の両者が IBD の病態の進展に関わると考えることができ、両サイトカインのシグナル伝達に関わる TYK2 は最適な治療標的になる可能性がある。しかしながら、TYK2 欠損はいずれのモデルに対しても完全な抵抗性ではなかったことも事実である。すなわち、DSS 大腸炎モデルでは腸管の出血が認められ、また TNBS 大腸炎モデルでは約半数が死に至った。大腸炎では IL-23 の重要性が指摘されている一方で、Th17 サイトカインの一つである IL-22 が防御的な役割を担っている可能性が指摘されている⁹²⁾。すなわち、IL-22 は粘膜上皮細胞の恒常性維持に必須のサイトカインであり、IL-22 を抑制することは腸管上皮の感染防御ならびに上皮構造の維持・修復に関わる機能が抑えられることになる。そのため、Tyk2^{-/-}マウスが DSS 大腸炎モデルで出血や下痢などを示したのは、Th17 細胞を抑制することで病態誘導性の IL-17 を抑えたと同時に、防御的に機能する IL-22 もまた抑えたことが理由と考えられる。一方、IL-22 は腸管において単純な防御性サイトカインとしての役割を持つわけではなく、炎症初期と後期で役割が異なることも示唆されており⁹³⁾、IBD における IL-22 の役割については更なる解析が必要と考えられる。

腸管の免疫システムは非常に複雑である。IBD の発症原因も十分には理解されていないが、近年の急激な患者数の変化から、食事あるいは抗生剤の影響により容易に変化する腸内細菌叢が IBD 発症に関係している可能性が示唆されている⁹⁴⁾。免疫システムはヒトでは数千種類、数百兆個にもなる腸内細菌とバランスをとりながら腸管の恒常性維持を行っており、腸管免疫は単に腸管という一部の臓器の免疫システムだけではなく、全身の免疫機能の維持にも重要な役割を持つと考えられる。腸管免疫では Th1 細胞や Th17 細胞が役割を持つと考えられていたが、最近、自然リンパ球 (innate lymphoid cell: ILC) と呼ばれる新しいリンパ球集団が見出されている⁹⁵⁾。ILCs はヘルパーT 細胞のような分化誘導を必要とせず速やかなサイトカイン産生が可能で、初期の生体防御に寄与していると考えられている。ILCs には IFN- γ を産生する ILC1、IL-17 を産生する ILC17、IL-22 を産生する ILC22 等が定義され、基本的にはヘルパーT 細胞と同様に IL-12 あるいは IL-23 により IFN- γ 、IL-17 あるいは IL-22 を産生する⁹⁶⁾。ILCs はヘルパーT 細胞とは全く異なる分化経路を辿るものの、Th1 には ILC1、Th2 には ILC2 のように、ヘルパーT 細胞サブセットに相当する ILC が存在する。IBD においては IL-23 が ILCs により産生される IFN- γ 、IL-17 あるいは IL-22 が病態形成に関わることが示唆されている^{97,98)}。本研究においても DSS 大腸炎モデルで IFN- γ 、IL-17 の産生を認めている。CD4⁺IFN- γ ⁺細胞および CD4⁺IL-17⁺細胞の増加は FCM で確認しているが (データ非開示)、ILCs については情報が十分ではなかったことから検討できていない。そのため、qPCR での IFN- γ ならびに IL-17 の発現変動には

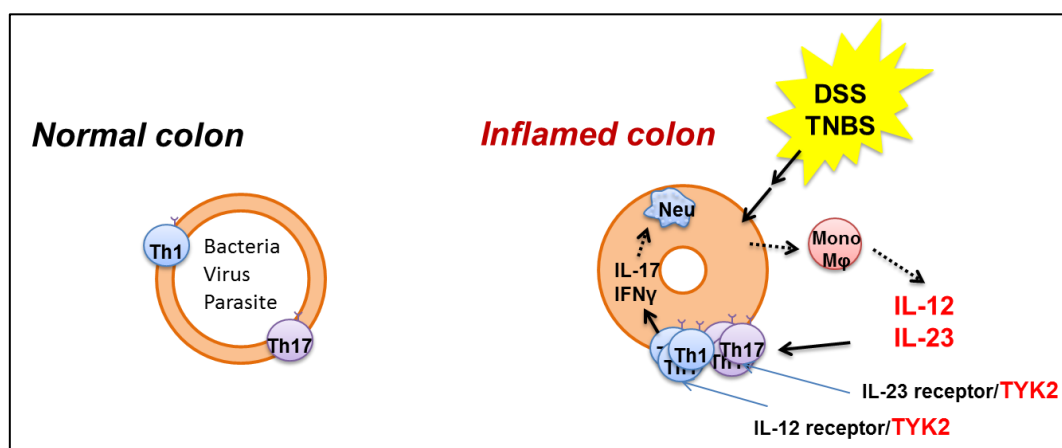
ヘルパーT細胞のみならず ILCs の影響が含まれている可能性がある。しかしながら、ヘルパーT細胞と同様に ILCs も機能発現には IL-12 や IL-23 が必要であることに変わり無く^{97,98)}、TYK2 が重要な役割を持つことに違いはないと考える。今後、ILCs 研究においても機能発現における TYK2 の重要性が明らかになるものと考ええる。

以上のように、TYK2 が DSS 誘導性大腸炎モデルならびに TNBS 誘導性大腸炎で認められる IBD 発症において重要な役割を持つことを明らかにした。

第五節 まとめ

本章では、IBD における TYK2 の役割について以下のことを明らかにした (Scheme 2)。

- ・ TYK2 はマウス IBD モデルでの病態進展/悪化に重要な役割を持ち、TYK2 欠損によって疾患活動性、大腸短縮あるいは致死的な炎症の誘導を制御する。
- ・ DSS 大腸炎では、TYK2 欠損により IL-12 および IL-23 産生が抑制され、Th1 および Th17 サイトカイン産生を抑制する。



Scheme 2. TYK2 role in IBD.

第四章 乾癬における TYK2 の役割

第一節 諸言

乾癬は世界で 2～3%が罹患しているといわれる自己免疫疾患の一つで⁹⁹⁾、皮膚の慢性的な炎症性疾患であり、境界の不明瞭な紅斑、角質の肥厚、鱗屑を特徴とする¹⁰⁰⁾。罹患した皮膚では好中球、マクロファージならびに活性化 T 細胞の浸潤・増加が認められ、中でも Th17 細胞が産生する IL-17 および IL-22 が好中球浸潤やケラチノサイトからの抗菌ペプチド (Defensin や S100 ファミリー蛋白など) の産生を誘導することで乾癬を誘導・悪化させると考えられている^{101,102)}。近年、IL-23 を構成するサブユニットである p40 に対する抗体 ustekinumab が上市され、乾癬治療で効果を示している^{103,104)}。また、抗 IL-17 抗体も現在臨床試験が進められ良好な成績を収めつつあり、IL-23 ならびに IL-17 が乾癬治療において治療ターゲットとすべき重要なサイトカインであると言える¹⁰⁵⁾。ヒト乾癬の臨床サンプルの解析においても Th17 細胞を中心とした関与が強く示唆されており^{99,106,107,108)}、乾癬は Th17 細胞が関与する代表的な疾患と考えられる。

乾癬の動物モデルとしては、CD18^{-/-} PL/J マウスのように乾癬様の皮膚炎症状を自然発症するモデル、TPA 誘導性 K5.Stat3 マウス乾癬モデルのように乾癬を発症しやすい資質を持った動物へ刺激を加えることで皮膚炎症状を誘発するモデル、CD45RB^{high} T 細胞を SCID マウスなどに移入することにより誘発するモデル、ヒト乾癬患者の皮膚片を移植する xenotransplantation モデル、そして皮膚炎症状を誘発する物質を処置することで誘発するモデル等が作製され研究に用いられている^{109,110)}。

遺伝子改変やヒト組織のような特殊な材料を必要とせず、様々な系統の動物で誘発できるモデルは創薬を考えた場合に非常に有用と考える。代表的な乾癬様皮膚炎の誘発モデルとして、イミキモド (imiquimod: IMQ) 誘導性モデルと IL-23 誘導性モデルがある。IMQ 誘導性モデルは 2009 年に van der Fits 等により報告された¹¹¹⁾。IMQ は自然免疫に重要な役割を持つ TLR の内、ウイルス由来の一本鎖 RNA (single strand RNA: ssRNA) を認識する TLR7/8 のアゴニストであり、ヒトパピローマウイルス感染によって発症する性感染症の一つである尖圭コンジローマの治療薬として 5% IMQ 含有の塗布剤として用いられる¹¹²⁾。IMQ クリームは副作用として塗布部位に皮膚炎症状を示すことが添付文書にも書かれていたが、特に乾癬患者に適用したときに乾癬症状を悪化させることがあった^{113,114)}。乾癬は Th17 細胞が強く関与すると考えられており¹¹⁵⁾、IMQ により DC が活性化されて IL-23 および IL-17 が強く関与する皮膚炎が引き起こされるという、乾癬に類似した発症メカニズムを持つこと、誘導された皮膚炎が乾癬特有の過角化や異常角化のような病理変化を示すことから¹¹¹⁾、乾癬のモデルとして汎用されてきている。

もう一つのモデルである IL-23 誘導性モデルは乾癬の発症に重要なサイトカインを直接皮膚に投与する方法であり、マウス耳介へ皮内注することで耳介に耳介肥厚を伴う炎症を誘導する^{116,117}。IL-23 誘発によりナイーブ CD4⁺T 細胞からの Th17 細胞分化や分化した Th17 細胞の過増殖、または皮膚 $\gamma\delta$ T 細胞のような IL-23 受容体を発現し IL-17 産生能を持った細胞からの IL-17 産生を誘導し¹¹⁸、T 細胞応答が発端となった皮膚炎を示す。

皮膚疾患においては Th17 から産生される IL-17 のみが重要なわけではなく、Th17 サイトカインの一つである IL-22 の関与も大きいと考える。IL-22 は IL-10 ファミリーに属するサイトカインで、IL-22 受容体には TYK2 および JAK1 が会合し、シグナル伝達に関与すると考えられている¹¹⁹。IL-22 はケラチノサイトの増殖や抗菌ペプチドの産生を引き起こし、皮膚の恒常性維持やリモデリング、感染防御に重要なサイトカインであることが知られている^{120,121}。IL-22 は免疫機能の発現において防御にも病態誘導にも関与する二面性を持ったサイトカインであるが、ヒト乾癬においては皮膚および血中の IL-22 の増加が認められることから¹²²、乾癬において病態誘導性に寄与していると考えられている。過剰な IL-22 産生が乾癬を誘導することは、IL-22 Tg マウスが皮膚の乾癬様の皮膚過増殖を引き起こすことから確かと考えられる¹²³。このように IL-22 は皮膚疾患である乾癬において無視できないサイトカインであると考えられる。しかしながら、IL-22 の生理活性における TYK2 の役割についてはほとんど検討されていなかった。

本章では、これまでの Tyk2^{-/-}マウスを用いた解析から、TYK2 が乾癬の病態進展に重要な IL-23 および IL-17 に関与することから、IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎モデルを検討した。その結果を踏まえ、IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデルを用いて、IL-23 を介した皮膚炎に対する影響について検討した。さらに、IL-22 シグナルにおける TYK2 の役割についても検討した。

第二節 実験方法

i) IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

Day 0 から day 6 までの間、麻酔下でマウス右耳表にベセルナクリーム 5% (IMQ 5%含有) (持田製薬) 5 mg を連日塗布して皮膚炎を誘発した。皮膚炎の評価として、IMQ 塗布前にシクネスゲージを用いて耳介の肥厚を測定した。最終日 (day 7) は IMQ 塗布約 24 時間後に耳介の肥厚を測定し、直径 9 mm の耳介組織を採取して耳介腫脹を組織重量でも評価した。

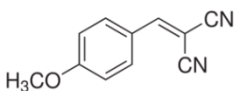
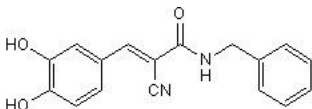
ii) IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

Day 0 から day 3 までの間、mouse IL-23 (R&D Systems) 1 μ g をマウス耳介へ 20 μ L の液量で連日皮内投与した。対照群には同量の蛋白量となるように 50 μ g/mL BSA 溶液を 20 μ L 皮内注した。皮膚炎の評価として、IL-23 投与前にシクネスゲージを用いて耳介の肥厚を測定した。IL-23 最終投与 24 時間後にも耳介厚を測定し、一部の検討では直径 6 mm の耳介組織を採取し、耳介腫脹を組織重量でも評価した。

TYK2 阻害剤実験では、TYK2 キナーゼ阻害剤の Tyrphostin A1 (Santa Cruz Biotechnology, CAS number: 2826-26-8) を用いた (Table 5)。Tyrphostin A1 は 100 mg/mL dimethylsulfoxide (DMSO) ストック溶液を作製し、終濃度が 5% DMSO となるよう PBS で希釈して用いた。IL-23 投与 30 分前および 7 時間後に 1 日 2 回腹腔内投与した (計 8 回投与)。

耳介肥厚の評価は、各個体について、測定日における耳介厚から、IL-23 投与前 (day 0) に測定した耳介厚 (pre 値) を差し引くことで算出した。

Table 5. Structure of Tyrphostin A1 and B42

	Tyrphostin A1	Tyrphostin B42
		
CAS#	2826-26-8	133550-30-8
Formula	C11H8N2O	C17H14N2O3
M.W.	184.2	294.3
Category	TYK2 inhibitor	JAK2 inhibitor

iii) IL-22 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

Day 0 から day 3 までの間、mouse IL-22 (R&D Systems) 1 μ g をマウス耳介へ 20 μ L の液量で連日皮内投与した。皮膚炎の評価は IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデルでの方法に準じた。

iv) 病理組織学的解析

病理組織学的解析は試験最終日に耳介を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固

定した。固定標本はパラフィン包埋した後に薄切し、H&E 染色した。病理写真は HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス) で撮影した。

耳介表皮の解析では、BIOREVO BZ-9000 専用計測モジュール、または、倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 およびイメージングソフトウェア cellSens (オリンパス) を用い、各標本を $\times 20$ で観察したときの一視野にある表皮の厚みを間隔を空けて 6 箇所測定し、平均値をその標本の表皮の厚みとして解析した。

v) 耳組織中のサイトカイン量測定

組織中サイトカイン量の測定は、試験最終日に直径 8 mm の耳介組織を採取し、10% Tween-20/1 mM PMSF/PBS 0.5 mL 中でホモジナイズして遠心上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定した。測定値は Protein Quantification Kit-Rapid (同仁堂) で測定したタンパク量で補正した。

vi) 耳組織中浸潤細胞および DLN 細胞の FCM 解析

皮膚組織中浸潤細胞の解析での細胞回収は次のように実施した。試験最終日に直径 8 mm の耳介組織を採取し、中間層でピンセットで 2 枚に剥離し、2.4 U/mL の dispase II (Roche Applied Science) で 37°C、2 時間インキュベートして表皮と真皮を剥離した。さらに真皮を 0.28 U/mL Liberase TM (Roche) で 37°C、1 時間インキュベートして細胞を回収した。耳介 DLN 中細胞の解析では、試験最終日に DLN をメッシュにて細胞を分離させ、細胞を回収した。

皮膚組織ならびに DLN から採取した細胞の FCM 解析は、第一章 第二節 (vi) の手法に従った。

vii) 耳組織および DLN の遺伝子発現解析

組織中 mRNA 発現変動解析は、RNAlater 中に保存した組織 (耳介組織、DLN) を ISOGEN 中でホモジナイズし、RNeasy kit を用いて mRNA を抽出した。以降の操作は第二章 第二節 (iv) の手法に従った。

viii) HaCaT 細胞の TYK2 ノックダウン実験

ヒトケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞は 10% FBS-DMEM 培地で維持した。HaCaT 細胞を 48-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、TYK2 siRNA または Control siRNA は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。48 時間後に細胞を IL-22 (10 ng/mL) を添加し、各時点で細胞可溶化液を作製し、Western blotting 法で検出

した。

ターゲット分子のノックダウンには以下の配列の siRNA を用いた。TYK2 siRNA: 5'-GGAGAAACCUCCAAUCUCATT-3' (sense)、5'-UGAGAUUGGAGGUUUCUCCTG-3' (antisense)。Non-targeting control siRNA は QIAGEN から購入した (Cat. 1022076)。

検出用には以下の抗体を用いた。抗 STAT3 抗体 (sc-7179) (Santa Cruz Biotechnology)、抗 pSTAT3(Tyr705) 抗体 (9131) (Cell Signaling Technologies)、抗 TYK2 抗体 (610174)、抗 JAK1 抗体 (610231) (BD Biosciences)、抗 ACTIN 抗体 (Sigma-Aldrich)。

ix) Tyrphostin A1 の JAK リン酸化阻害確認

JAKs 自己リン酸化に対する Tyrphostin A1 および JAK2 キナーゼ阻害剤 Tyrphostin B42 の影響は次のように検討した (Table 5)。ヒト子宮頸癌由来細胞株である HeLa 細胞を 24 well plate に播種し、TYK2、JAK1 または JAK2 をコードするベクターを Metafectene (Biontex) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの 36 時間後に、細胞を Tyrphostin A1、Tyrphostin B42 または溶媒である DMSO を添加した。1 時間インキュベートした後に細胞を可溶化し、Western blotting 法にて各 JAK の自己リン酸化を検出した。

検出用には以下の抗体を用いた。抗 pTYK2 抗体 (9321)、抗 pJAK1 抗体 (3331)、抗 pJAK2 抗体 (3771)、抗 JAK2 抗体 (3230) (Cell Signaling Technology)、抗 TYK2 抗体 (610174)、抗 JAK1 抗体 (610231) (BD Biosciences)。

x) 統計解析

統計解析は SAS System Release 8.2 を使用し、有意水準 0.05 (両側) をもって判定した。統計手法は、2 群間の連続した数値の比較では *t* 検定または Welch 検定、多群間の連続した数値の比較は non-parametric Dunnett 型多重比較で解析した。

第三節 実験結果

第一項 IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

乾癬における TYK2 欠損の影響を評価するため、ヒト乾癬に類似した IL-17 および IL-23 依存的な皮膚炎と病理変化を認める IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎モデルを検討した¹¹⁾。

Tyk2^{+/+}マウスへ IMQ を連日塗布により 2 日後から有意な耳介の肥厚が認められ、6 日後

をピークとする皮膚炎を発症した (Figure 20A)。一方、 $Tyk2^{-/-}$ マウスへ塗布した場合には3日後から耳介の肥厚が認められたが、その程度は $Tyk2^{+/+}$ マウスと比べて有意に弱かった。Day 7に採取した耳介重量においても耳介肥厚と一致した変化が認められ (Figure 20B)、TYK2がIMQにより誘導される乾癬様皮膚炎の発症に重要な役割を持つことが明らかになった。

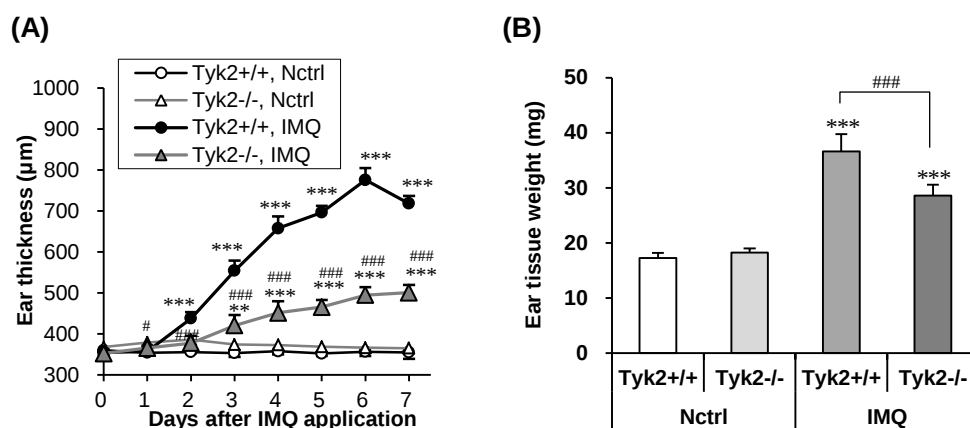


Figure 20. TYK2 plays an important role in IMQ-induced skin inflammation.

A, Ear skin of $Tyk2^{+/+}$ and $Tyk2^{-/-}$ mice was treated or not with IMQ for 6 consecutive days. Ear thickness was measured on the days indicated. **B**, The ear tissue weight on day 7 was measured. Data represent mean + SD (n=7). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with Nctrl; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared with $Tyk2^{+/+}$.

組織学的解析では、IMQ処置した $Tyk2^{+/+}$ マウスの皮膚組織で単核球ならびに弱い好中球の浸潤が認められ、表皮の肥厚が観察された (Figure 21A)。表皮厚の測定により、無処置と比較してIMQ塗布した $Tyk2^{+/+}$ マウスならびに $Tyk2^{-/-}$ マウス組織で表皮の有意な肥厚が観察されたが、その程度は $Tyk2^{-/-}$ マウスで有意に低下した (Figure 21B)。

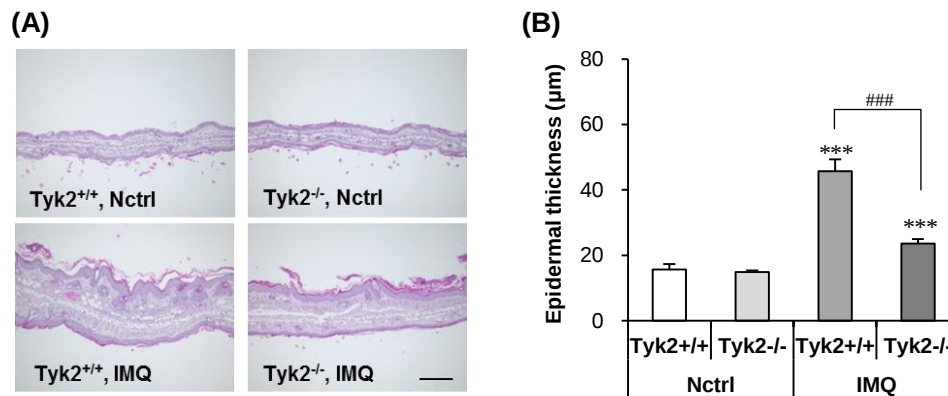


Figure 21. TYK2 plays an important role in IMQ-induced epidermal hyperplasia.

A, Representative histological features of IMQ treated ear skin of Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice. H&E staining. Scale bar, 200 μm. **B**, Epidermal hyperplasia, as quantified by imaging software from H&E stained ear sections. Data represent mean epidermal thickness + SD (n=5). ****p* < 0.001 compared with Nctrl; ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

表皮の肥厚の主要因はケラチノサイトの増殖であると考えられる^{99,100}。そこで、ケラチノサイトの増殖について皮膚組織中 mRNA 発現を検討したところ、IMQ 処置した Tyk2^{+/+}マウスではケラチノサイトの増殖マーカーである Keratin 16 (Krt16) の著しい発現亢進が認められた。一方で、Tyk2^{-/-}マウスでは Tyk2^{+/+}マウスに比して Krt16 発現の有意な低下が認められ、TYK2 が乾癬に特徴的なケラチノサイトの増殖を制御することが明らかになった。

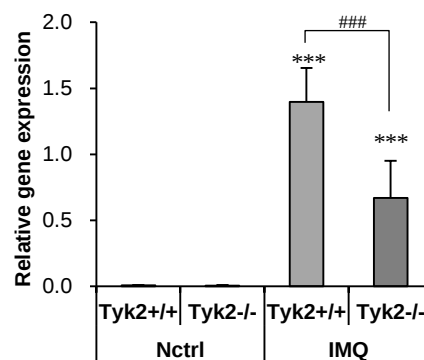


Figure 22. TYK2 regulates keratinocyte proliferation in IMQ-treated skin.

Gene expression level of keratinocyte proliferation marker, keratin-16 (Krt16), in ear skin at 24 h after IMQ application for 4 consecutive days. Data represent mean gene expression + SD relative to GAPDH (n=5). ****p* < 0.001 compared with Nctrl; ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

Tyk2^{-/-}マウスにおいて IMQ 誘導性皮膚炎の発症が抑制されることが確認されたことから、Tyk2^{-/-}マウスの発症抵抗性のメカニズムを検討するため、Tyk2^{+/+}マウスと Tyk2^{-/-}マウスで耳介肥厚の程度に差が認められ始める day 4 の耳介組織 mRNA 発現変動ならびに耳介 DLN 細胞の分化の違いを検討した。

皮膚組織中 mRNA 発現では、IMQ 塗布した Tyk2^{+/+}マウスで Th17 サイトカインである IL-17A および IL-22 の mRNA 発現が亢進し、IL12A(p35)、IL12B(p40)、IL23A(p19) の IL-12 および IL-23 に関わるサイトカインの有意な mRNA 発現の亢進が認められた。一方、Tyk2^{-/-}マウスでは IMQ 塗布により誘導される皮膚炎において炎症性サイトカイン発現の有意な発現低下が認められた。また、この、IMQ 誘導性癬様皮膚炎モデルにおいては代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ がいずれの群の耳介組織から検出できなかったことから、このモデルでは Th1 より Th17 への依存性が高く、Th17 依存性が高いといわれるヒト乾癬に類似したモデルであることが示唆された。

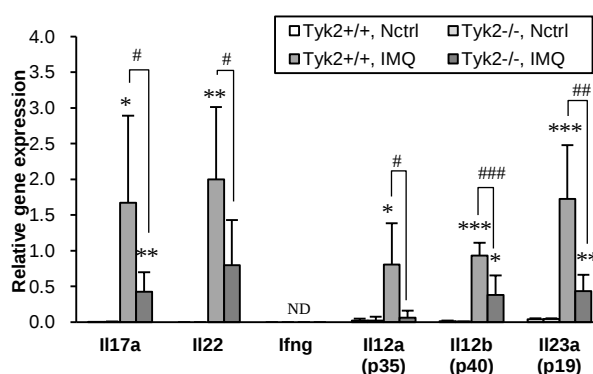


Figure 23. TYK2 is required for Th17 cytokine induction in IMQ-treated skin.

Gene expression level of cytokines in ear skin at 24 h after application of IMQ for 4 consecutive days. Data represent mean gene expression + SD relative to GAPDH (n=5). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with Nctrl; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

耳介 DLN 細胞の FCM 解析から、IMQ 塗布した Tyk2^{+/+}マウスで CD4⁺IL-17⁺ T 細胞数が 3.7 倍に増加したのに対し、Tyk2^{-/-}マウスでは 1.9 倍の増加に過ぎず有意に低値を示した。また、CD4⁺IFN- γ ⁺ T 細胞も同様に IMQ 塗布した Tyk2^{+/+}マウスでは 3.7 倍に増加しているのに対し、Tyk2^{-/-}マウスでは 2.1 倍の増加に過ぎず有意に低値を示した。しかし、CD4⁺IL-17⁺ T 細胞と CD4⁺IFN- γ ⁺ T 細胞の細胞数は 10 倍以上異なっていること、また、耳介組織の mRNA 発現プロファイルが示すとおり、本モデルにおいては Th17 依存性が高いことが示唆されていることから、主に CD4⁺IL-17⁺ T 細胞の数の違いが病態形成の違いに反映されているものと推察された。

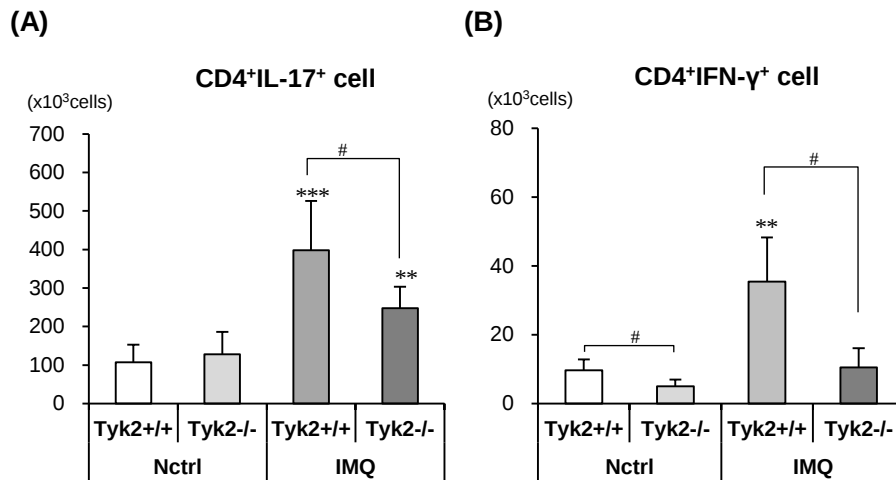


Figure 24. TYK2 regulates Th17 and Th1 cell induction in ear draining lymph node from IMQ-treated mice.

A and B, The number of CD4⁺IL-17⁺ (**A**) and CD4⁺IFN-γ⁺ (**B**) T cells from draining lymph nodes of Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice that were treated or not with IMQ on the ear. After four consecutive days IMQ application, total draining lymph node cells were counted and stained CD4, IL-17, and IFN-γ after PMA/ionomycin stimulation. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with Nctrl; #*p* < 0.05 compared with Tyk2^{+/+}.

第二項 IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

IMQ で誘導される乾癬様の皮膚炎は TLR7 のアゴニストである IMQ が皮膚の樹状細胞を刺激することで IL-23 産生が誘導され乾癬様の病態が形成され、IL-23 および IL-17 が関与するヒト乾癬を反映したモデルであると考えられている¹¹¹⁾。乾癬の病態形成における TYK2 の役割の解析をさらに進めるため、recombinant IL-23 を耳介皮内へ投与して皮膚炎を誘導する IL-23 誘導性皮膚炎モデルを作製し^{116,117)}、耳介肥厚ならびにサイトカイン発現のタイムコースを確認した。IL-23 の連日投与により耳介厚は day 4 まで経日的に増加し、耳介組織中では IL-17A および IL-22 の遺伝子および蛋白発現が day 2 までに上昇して高値を維持し、Th17 サイトカインに依存性が高いモデルであることを確認した (データ非提示)。

IL-23 誘導性皮膚炎モデルにおける TYK2 の役割を検討するため、Tyk2^{+/+}マウスと Tyk2^{-/-}マウスを用いて IL-23 誘導性皮膚炎発症について比較検討した。Tyk2^{+/+}マウスでは IL-23 投与日数の増加とともに耳介の腫脹が認められ、BSA 投与した対照マウスと比較して有意な耳介腫脹の亢進が認められた (Figure 25A)。一方、Tyk2^{-/-}マウスではその腫脹の程度は Tyk2^{+/+}マウスに比べて有意に低く、それは day 4 に一定サイズで採取した耳介皮膚重量においても同様であった (Figure 25A, 25B)。組織学的には Tyk2^{+/+}マウス耳介組織では好中球を主体とした細胞浸潤と表皮の肥厚が確認されたのに対し、Tyk2^{-/-}マウスでは認

められた細胞浸潤ならびに表皮肥厚の変化は小さかった (Figure 26)。このことから、TYK2 が IL-23 誘導性皮膚炎において重要な役割を持つことが明らかになった。

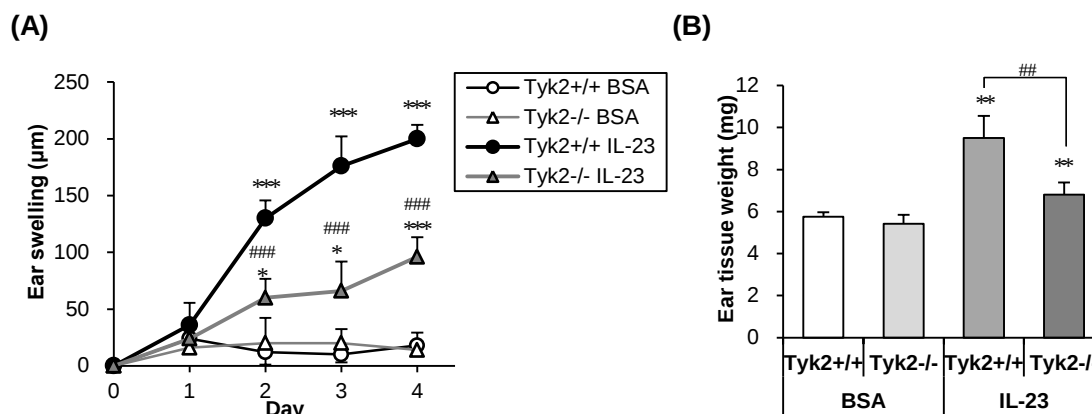


Figure 25. Involvement of TYK2 in IL-23-induced skin inflammation.

A, The ear pinna of Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice was intradermally injected 1 μg/ear of IL-23 or same amount of BSA for 4 consecutive days. Ear swelling was evaluated on the days as indicated. **B**, Ear tissue weight on day 4 was measured. The ear tissue sample was uniformly collected by biopsy punch. Data represents mean + SD (n=5). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with BSA; ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

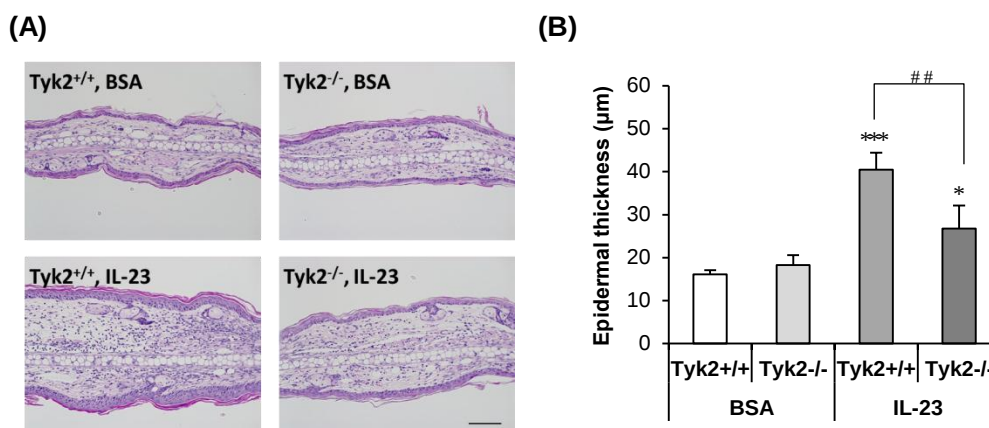


Figure 26. TYK2 plays an important role in IL-23-induced skin inflammation and epidermal hyperplasia.

A, Representative H&E stained histological features of IL-23-treated ear pinna from Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice. Scale bar, 100 μm. **B**, Epidermal hyperplasia was evaluated by measuring the epidermal thickness by imaging analysis. Data represents mean + SD (n=5). **p* < 0.05, ****p* < 0.001 compared with BSA; ##*p* < 0.01 compared with Tyk2^{+/+}.

皮膚組織に浸潤した細胞を回収し、FCM 解析を行った。IL-23 を処置した $Tyk2^{+/+}$ マウス耳介組織では $Tyk2^{-/-}$ マウス耳介組織に比して $CD4^{+}$ ヘルパーT 細胞、 $\gamma\delta TCR^{+}$ $\gamma\delta T$ 細胞、 $Gr-1^{+}$ 好中球および $F4/80^{+}$ マクロファージの増加が認められた (Figure 27A)。

さらに皮膚浸潤細胞ならびに DLN 細胞の細胞内サイトカイン染色から、IL-23 処置した $Tyk2^{+/+}$ マウスでは IL-23 投与により、 $CD4^{+}IL-22^{+}$ の浸潤細胞の増加が観察された (Figure 27B)。また、 $\gamma\delta TCR^{+}$ 細胞では IL-17⁺細胞および IL-22⁺細胞が $Tyk2^{+/+}$ マウスおよび $Tyk2^{-/-}$ マウスで同等に存在し、TYK2 欠損の影響をほとんど受けていないことが示唆された。LN 細胞においても、IL-23 処置した $Tyk2^{+/+}$ マウスでは $CD4^{+}IL-17^{+}$ 細胞ならびに $CD4^{+}IL-22^{+}$ 細胞が増加し、 $Tyk2^{-/-}$ マウスで減少が認められた (Figure 27B)。なお、 $\gamma\delta TCR^{+}$ 細胞は LN で僅かにしか存在しないため、細胞内染色による FCM 解析は検討できていない。また、細胞内サイトカイン染色は産生能を持つ細胞を評価しているため、TYK2 のように受容体シグナルにも影響する分子の場合には、産生能を持った細胞が実際に IL-23 に対して応答する細胞を反映せず、 $Tyk2^{-/-}$ マウスの組織で認められたヘルパーT 細胞ならびに $\gamma\delta T$ 細胞は実際には IL-17 および IL-22 産生が強く抑制されていると考える。

さらに皮膚への細胞浸潤を促すケモカインの mRNA 発現について検討した。マクロファージ、Th17/ $\gamma\delta T$ 細胞、好中球の遊走に関わるケモカインとして知られる CCL2、CCL20 および CXCL1 の発現が IL-23 を投与した $Tyk2^{+/+}$ マウス皮膚組織では亢進した (Figure 28)。一方、 $Tyk2^{-/-}$ マウスでは有意な低下あるいは低下傾向が認められ、炎症生細胞の浸潤が $Tyk2^{-/-}$ マウスで減少していたことの理由の一つと考えられた。

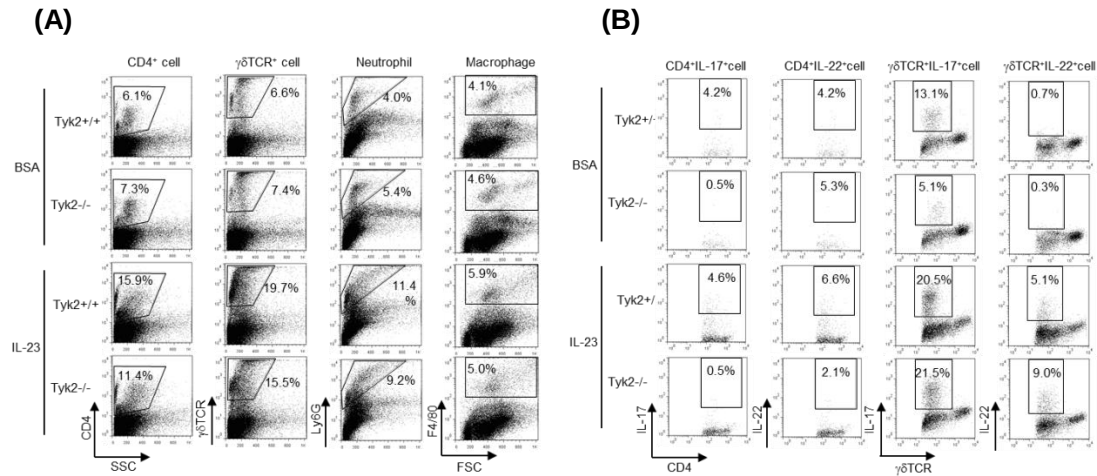


Figure 27. Acute inflammatory cell infiltration into the ear pinna.

A and **B**, Flow cytometry analysis of the dermal cells isolated from pooled Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} ear skin after 4 consecutive days of IL-23 injection. Surface markers of major inflammatory cells (**A**) and intracellular IL-17 and IL-22 in CD4⁺ cells and γδTCR⁺ cells (**B**) were analyzed with fluorescent-labeled specific antibodies after the cells were stimulated with PMA (30 ng/mL) and ionomycin (1 mg/mL). Percentage on each figure means identified cells from pooled dermal cell suspension.

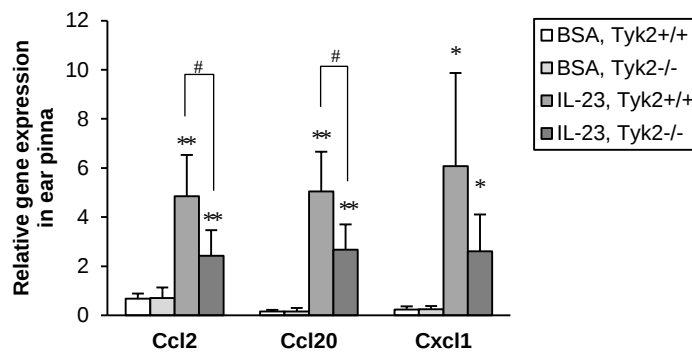


Figure 28. TYK2 regulates chemoattractant expressions in IL-23-treated skin.

mRNA expressions of proinflammatory chemokines, CCL2, CCL20 and CXCL1, in the ear pinna after 2 consecutive days of IL-23 injection were evaluated by qPCR. Gene expression level was normalized by GAPDH expression. Data represents mean gene expression + SD (n=5). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with BSA; #*p* < 0.05 compared with the Tyk2^{+/+}.

TYK2欠損でのTh17サイトカイン産生ならびに皮膚炎のマーカーについて耳介組織および耳介DLNのmRNA発現変動を検討した。Day 2において、IL-23を処置したTyk2^{+/+}マウス耳介組織ではIL-17、IL-22、IFN- γ 、IL-18、TNF- α などの炎症性サイトカインの有意な増加が認められた。IL-23を処置したTyk2^{-/-}マウス耳介組織においても増加は認められたが、Tyk2^{+/+}マウス耳介組織に比して低い傾向を示した (Figure 29A)。耳介DLNにおいてはIL-22発現がIL-23処置したTyk2^{+/+}マウスで著明に高く、それに比してTyk2^{-/-}マウスでは低い傾向が認められた (Figure 29B)。このような炎症性サイトカインのmRNA発現はday 4においても同様に認められた (データ非提示)。

さらに、乾癬に特徴的なケラチノサイトの増殖ならびに抗菌ペプチドの発現を皮膚組織で検討した。Day 4の皮膚組織において、Tyk2^{+/+}マウスで認められるKrt16の発現亢進がTyk2^{-/-}マウスでは有意に低下し、抗菌ペプチドの β 2-defensinおよびS100A8の発現においても同様に発現の低下が認められ、TYK2が乾癬の病態形成をmRNAレベルで抑制していることが明らかになった (Figure 29C)。

耳介組織におけるサイトカイン産生をホモジネート中のサイトカイン蛋白量としてELISAで検討したところ、Tyk2^{-/-}マウス皮膚ではIL-17ならびにIL-22産生亢進の有意な低下が認められ、TYK2欠損により主要なTh17サイトカインが蛋白レベルで低下していることを確認した (Figure 30A, 30B)。さらに、TYK2がTh17サイトカイン産生に直接関わることを確認するため、耳介DLN細胞を*in vitro*でIL-23刺激したときのTh17サイトカイン産生に対する影響を検討した。Tyk2^{+/+}DLN細胞ではIL-23濃度依存的にIL-17およびIL-22産生の増加が認められたが、Tyk2^{-/-}DLN細胞では有意な減少が認められ、TYK2がIL-23により誘導されるIL-17およびIL-22の産生に直接関わることを明らかになった (Figure 30C, 30D)。

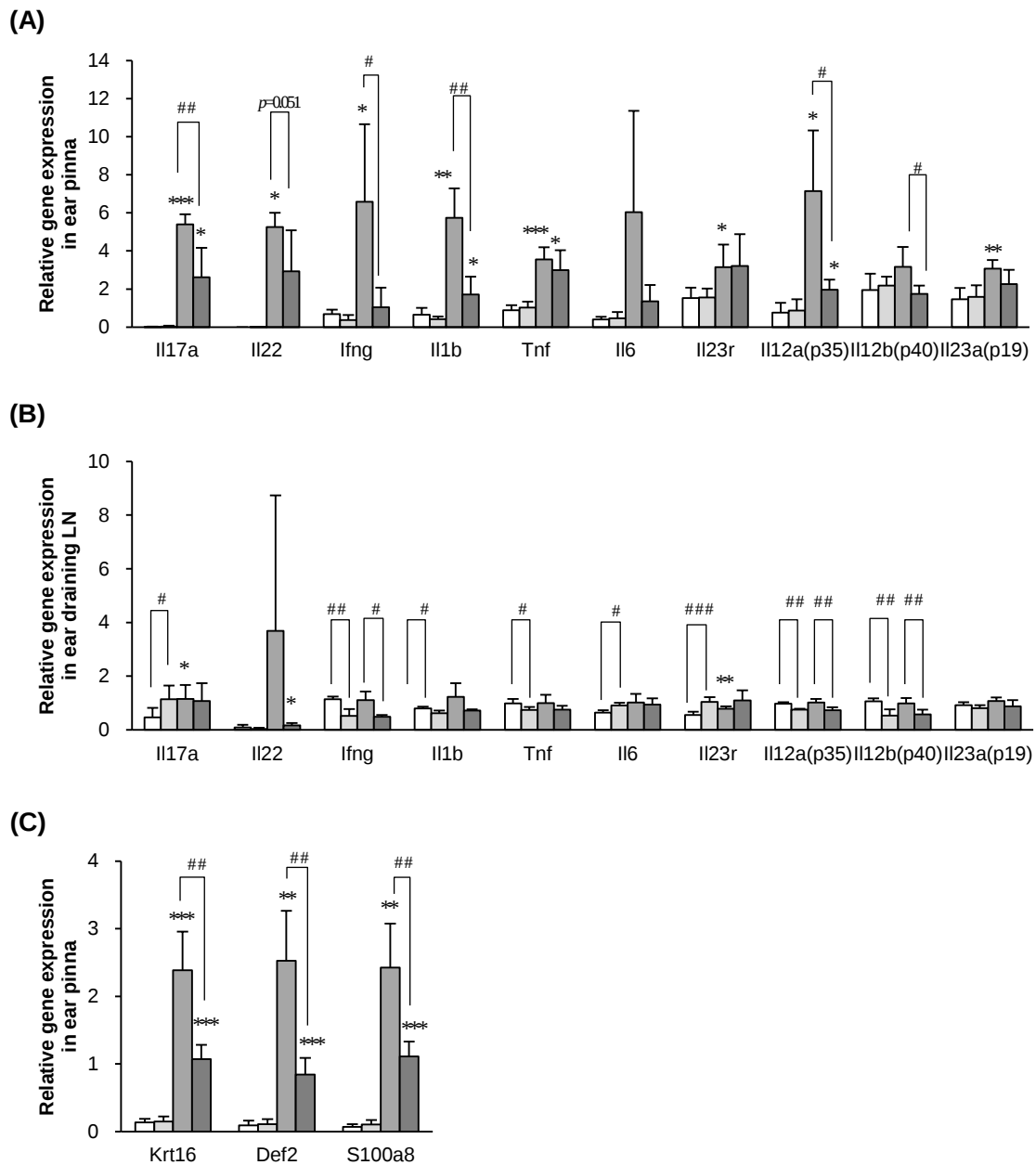


Figure 29. TYK2 is required for proinflammatory cytokine and psoriasis-related molecule expressions in IL-23-treated skin.

A and **B**, mRNA expressions of cytokines in the ear pinna (**A**) and the ear draining LN (**B**) from each mouse after 2 consecutive days of IL-23 injection were evaluated by qPCR. (**C**) mRNA expressions of psoriasis-related molecules in the ear pinna on day 4. Expressions of Krt16, keratinocyte proliferation marker, and defensin and S100a8, antimicrobial peptides, were measured. Data represents mean gene expression + SD (n=5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with BSA; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with Tyk2^{+/+}.

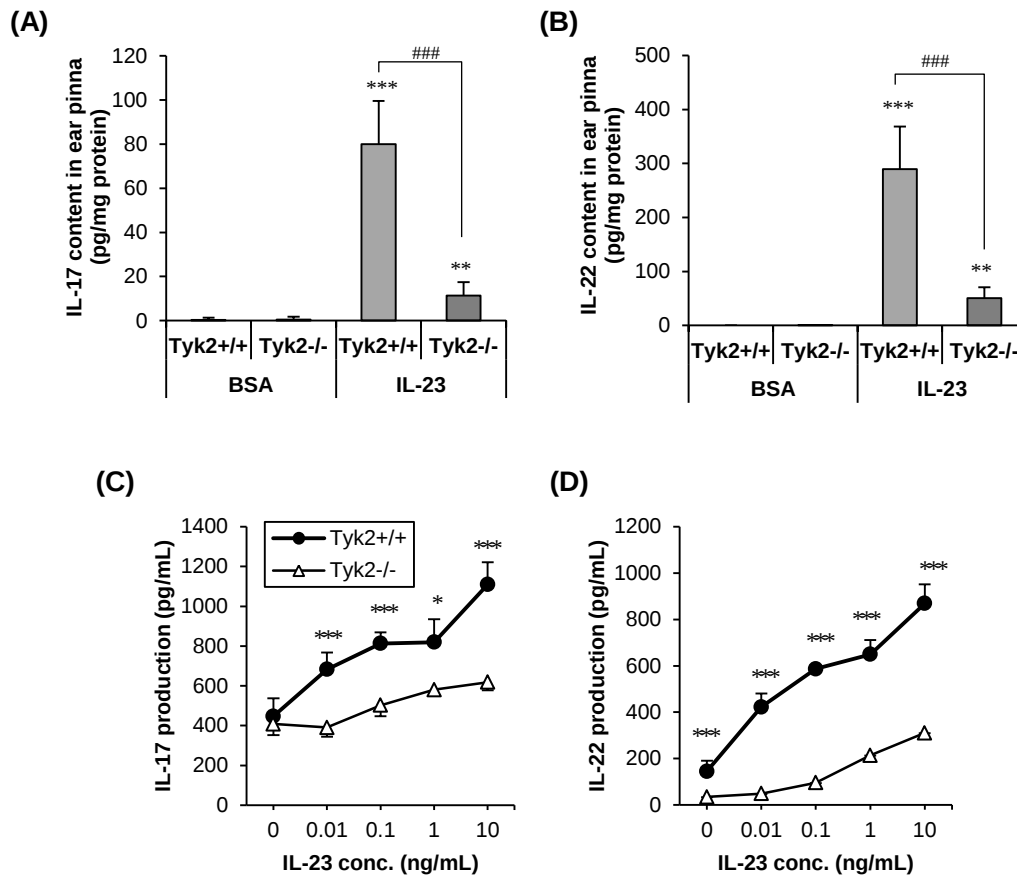


Figure 30. TYK2 is required for IL-23 dependent Th17 cytokine induction.

A, IL-17 and IL-22 contents in the ear pinna. After 4 consecutive days of IL-23 injection, the ear pinna was homogenated and cytokine contents were measured by ELISA as indicated. Data represents mean production + SD (n=6). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with BSA; #### $p < 0.001$ compared with Tyk2^{-/-}. **B**, Ear draining LN cells isolated from un-treated Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice were stimulated with various concentration of recombinant mouse IL-23 (0 – 10 ng/mL) under CD3 stimulation for 72 h and measured the secreted cytokines by ELISA. Data represents mean concentration + SD (n=3). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with Tyk2^{-/-} DLN cells.

さらに、IL-23 誘導性皮膚炎モデルでのサイトカインの役割について検討するため、抗 IL-22 抗体、抗 IL-17A 抗体、抗 IFN- γ 抗体および抗 p40 抗体を用いたサイトカイン中和実験を行った。抗 IL-17A 抗体は day 3 以降の後期に強く耳介腫脹を抑制し、抗 IL-22 抗体は特に day 1、2 および 3 の初期の耳介腫脹ならびに day 4 での表皮の肥厚を強く抑制した (Figure 31A, 31B)。このことから、IL-17A は特に後期の炎症相、IL-22 は炎症初期から皮膚炎に重要な役割を持つことが示唆された。一方、抗 IFN- γ 抗体は本モデルの耳介腫脹に対して抑制作用は示さなかった (Figure 31C)。投与している IL-23 を直接中和する抗 p40 抗体は 4 つの抗体の中で最も強く耳介腫脹を抑制した (Figure 31D)。抗 IL-22 抗体を処置

した耳介についてさらに評価を進めたところ、耳介組織の病理解析では悪化した炎症の軽減が認められ、IL-23 処置により認められた耳介表皮の肥厚が抗 IL-22 抗体処置によって有意に軽減することを明らかにした (Figure 32)。

IL-17A および IL-22 に対する中和抗体で皮膚炎の抑制が認められたことから、IL-23 誘導性皮膚炎は IL-17A および IL-22 の産生あるいは作用を制御する薬剤が有効なモデルであることが示唆された。

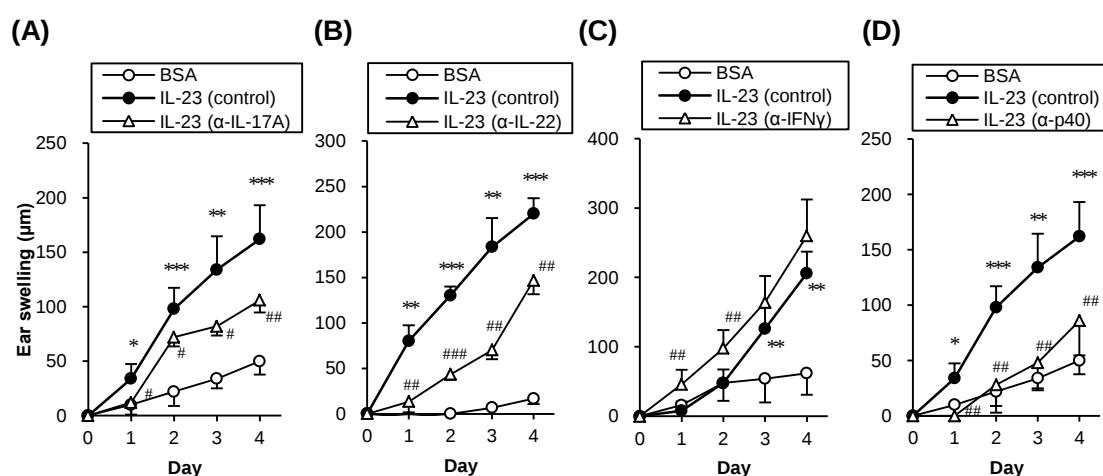


Figure 31. Both IL-17 and IL-22 play critical roles in IL-23-induced skin inflammation.

A - D, Recombinant mouse IL-23 was intradermally injected into ear pinna for 4 consecutive days, and the ear thickness was measured using dial thickness gauge as indicated. Neutralizing antibody and isotype control antibody, 0.1 mg each, were intraperitoneally administered at day 0 and the ear swelling was evaluated. Anti-IL-17A antibody (**A**), anti-IL-22 antibody (**B**), anti-IFN- γ antibody (**C**) and anti-p40 antibody (**D**) were evaluated. Each value represents mean $\pm$ SD (n=3-5). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with BSA; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 compared with control antibody.

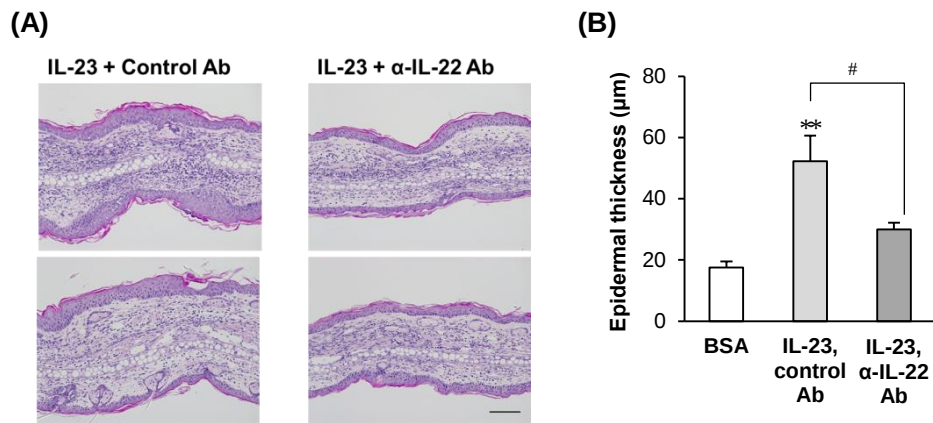


Figure 32. Blocking of IL-22 ameliorates IL-23-induced inflammation and epidermal hyperplasia.

A, Representative histological features in IL-22 neutralizing experiment. H&E staining. Scale Bar, 100 μm. **B**, Epidermal hyperplasia, as quantified by imaging software from H&E stained sections. Each value represents mean + SD (n=3) ** $p < 0.01$ compared with BSA ; # $p < 0.05$ compared with control antibody.

第三項 IL-22 誘導性乾癬様皮膚炎モデル

IL-23 誘導性皮膚炎モデルにおいて TYK2 が重要な役割を持つことが明らかになったが、IL-22 受容体にも会合する TYK2 がどのように IL-22 に依存した作用に寄与するかは不明である。そこで、IL-22 を耳介に直接投与するモデルを作製して検討した。なお、IL-22 受容体の発現は、少なくとも mRNA 発現レベルで $Tyk2^{+/+}$ マウスと $Tyk2^{-/-}$ マウスに差はなかった (データ非提示)。

IL-22 投与により、IL-23 に比べ弱いものの $Tyk2^{+/+}$ マウスで耳介腫脹が認められ、 $Tyk2^{-/-}$ マウスでは有意な抑制が認められた (Figure 33A)。また、組織学的な解析によっても、IL-22 投与では $Tyk2^{+/+}$ マウス耳介組織で表皮の肥厚と弱い炎症性細胞浸潤が認められたが、 $Tyk2^{-/-}$ マウス耳介組織ではその程度は軽微であった (Figure 33B)。表皮肥厚に対しても IL-22 処置した $Tyk2^{+/+}$ マウスでは表皮の厚みの増加が認められたが、 $Tyk2^{-/-}$ マウスでは減少した (Figure 33C)。このように IL-22 投与による耳介腫脹ならびに表皮肥厚に $Tyk2^{-/-}$ マウスが抵抗性を示したことから、TYK2 が IL-22 の作用に直接的に関与することが明らかになった。

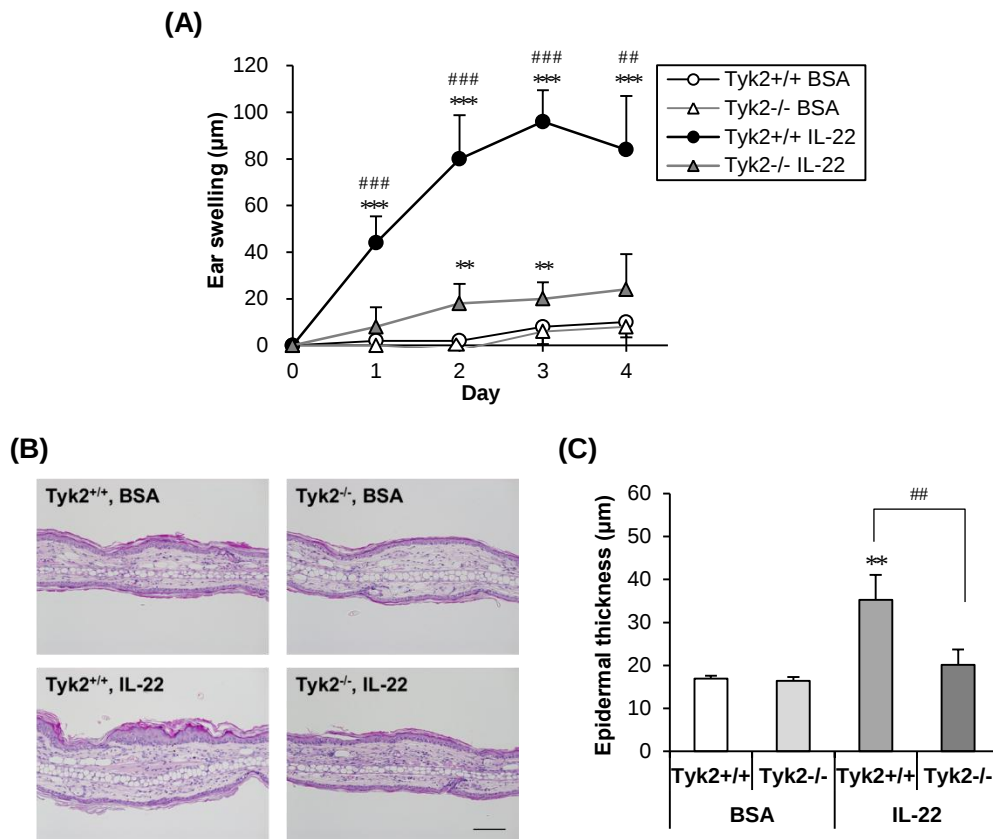


Figure 33. Involvement of TYK2 in IL-22-induced skin inflammation.

A, The ear pinna of Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice was intradermally injected 1 $\mu\text{g}/\text{ear}$ of IL-22 or BSA for 4 consecutive days. Ear swelling was evaluated on the days indicated. **B** and **C**, Representative H&E stained histological features (**B**) and epidermal thickness (**C**) of IL-22-treated ear pinna from Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice. Scale bar, 100 μm . Data represents mean + SD for five mice per group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with BSA; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared with Tyk2^{+/+}.

表皮の肥厚に関わるケラチノサイトは皮膚における主要な IL-22 受容体発現細胞であることから¹²⁰⁾、IL-22 がケラチノサイトの増殖を直接的に誘導している可能性が考えられた。そこで、IL-22 により直接的に誘導される変化に及ぼす TYK2 欠損の影響を、耳介への IL-22 単回投与 3 時間および 6 時間後に誘導される mRNA 発現で検討した。Tyk2^{+/+}マウスに比し Tyk2^{-/-}マウスでは IL-22 刺激による Krt16、 β 2-Defensin、S100A8 および S100A9 の発現上昇が有意に低下あるいは低下傾向を示し、IL-22 が TYK2 を介してこれらの因子の産生に直接的に関与していることが示唆された (Figure 34)。

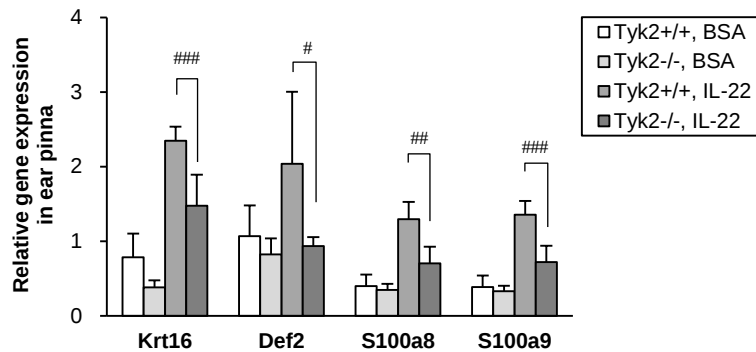


Figure 34. TYK2 controls IL-22-induced keratinocyte proliferation and activation.

The ear pinna of Tyk2^{+/+} and Tyk2^{-/-} mice was intradermally injected 1 µg/ear of IL-22 or BSA. mRNA expressions in the ear pinna from each mouse after several hours of IL-22 injection were evaluated by qPCR. Expression of Krt16, S100a8 and S100a9 were measured after 6 h, and Def2 was after 3 h. Data represents mean gene expression + SD (n=6). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared with Tyk2^{+/+}.

第四項 ケラチノサイトの IL-22 応答における TYK2 の役割

IL-22 を皮膚へ投与した場合に、主に応答するのはケラチノサイトであると考えられるが、*in vivo* では他の細胞の関与も否定は出来ず、TYK2 と IL-22 の関係を明らかにするには不十分である。そこで、ヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT 細胞を用いて、TYK2 を siRNA を用いてノックダウンしたときの IL-22 刺激依存的な STAT3 リン酸化に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。

Control siRNA で処理した HaCaT 細胞では 10 ng/mL の IL-22 刺激により、5 分、30 分と STAT3 リン酸化レベルの上昇が確認された (Figure 35)。一方で、TYK2 を siRNA でノックダウンした HaCaT 細胞では IL-22 依存的な STAT3 リン酸化レベルの上昇は認められず、TYK2 が IL-22 シグナル伝達に必須の因子であることが明らかになった。

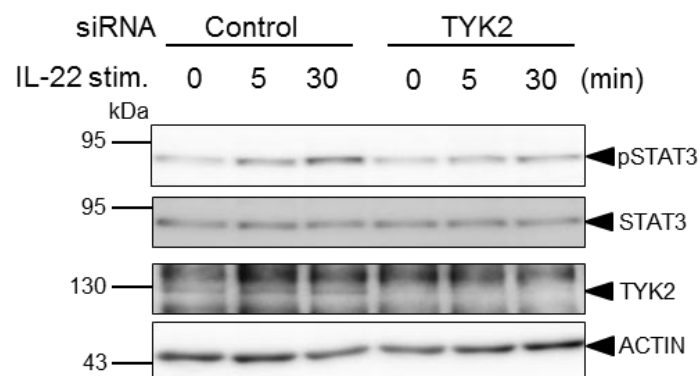


Figure 35. TYK2 directly regulates IL-22 signaling in keratinocyte.

The phosphorylation of STAT3 in human keratinocyte cell line HaCaT by IL-22 stimulation was evaluated *in vitro*. Two days before the stimulation, TYK2 knockdown in HaCaT cell was done by TYK2 siRNA. Cells were harvested 5 min and 30 min after IL-22 stimulation and STAT3 phosphorylation was analyzed by Western blotting. To confirm the TYK2 knockdown, TYK2 and ACTIN were also blotted.

第五項 IL-23 誘導性乾癬様皮膚炎モデルにおける Tyrphostin A1 投与の影響

IL-23 誘導性皮膚炎に対し TYK2 の機能阻害が有効な制御方法になるかを評価するため、TYK2 キナーゼ阻害剤として知られている Tyrphostin A1 をツール化合物として薬効評価を行った。

Tyrphostin A1 は Tyrphostin と呼ばれるキナーゼ阻害剤ライブラリ化合物の一つで、元々はキナーゼ阻害活性が無く、EGFR シグナル阻害剤などのネガティブコントロール化合物として用いられていた¹²⁴⁾。しかし、TYK2 阻害活性があることが判明した^{125,126)}。JAK2 等に対しても選択性を有していたことから、TYK2 選択性が比較的高い化合物であると考えられ研究に用いられている。TYK2 阻害剤としての資質を明らかにするため、TYK2 あるいは他の JAK の自己リン酸化の抑制作用について JAKs の自己リン酸化に対する阻害作用を Western blotting 法で確認した。JAKs は過剰発現させるとリガンド刺激無しに自己リン酸化を引き起こす。そのため、過剰発現させた JAKs のリン酸化に対する化合物の影響を評価することで、通常はヘテロな組み合わせの JAKs のシグナルを単一の JAK キナーゼに対する影響として検出することが可能になる。Tyrphostin A1 は TYK2 を過剰発現させときには 30 μ M で TYK2 リン酸化を抑制し、JAK1 ならびに JAK2 のリン酸化に対しては影響しなかった (Figure 36)。一方、JAK2 阻害剤として知られる Tyrphostin B42 は 30 μ M および 100 μ M で TYK2 リン酸化には影響せず、JAK1 リン酸化に対しては 30 μ M、JAK2 リン酸化に対しては 100 μ M で、Tyrphostin A1 とは明らかに異なる阻害プロファイルを示し、Tyrphostin A1 を TYK2 阻害剤として用いることが出来ることを確認した。

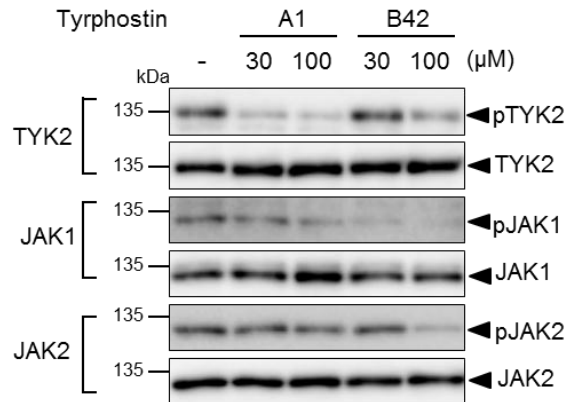


Figure 36. Tyrphostin A1 selectively suppresses TYK2 autophosphorylation.

HeLa cells were plated on 24-well plates and transfected with a vector coding for TYK2, JAK1 or JAK2 as indicated using Metafectene. At 36 h after transfection, the cells were treated with vehicle (DMSO), Tyrphostin A1 or Tyrphostin B42 at indicated concentration for an additional 1 h. The cells were lysed, and lysate was immunoblotted with the indicated antibodies and assessed the autophosphorylation levels of JAKs.

次に、Tyrphostin A1 の乾癬モデルに対する薬効評価を IL-23 誘導性皮膚炎モデルを用いて行った。Tyrphostin A1 は *in vivo* での使用実績が無く溶解性も悪いことから、1 日 2 回の腹腔内投与で検討した。IL-23 投与による耳介腫脹は 2 および 10 mg/kg の Tyrphostin A1 投与では全く認められなかったが、50 mg/kg 投与では耳介腫脹ならびに耳介組織重量の有意な抑制が観察された (Figure 37、耳介組織重量データ非提示)。

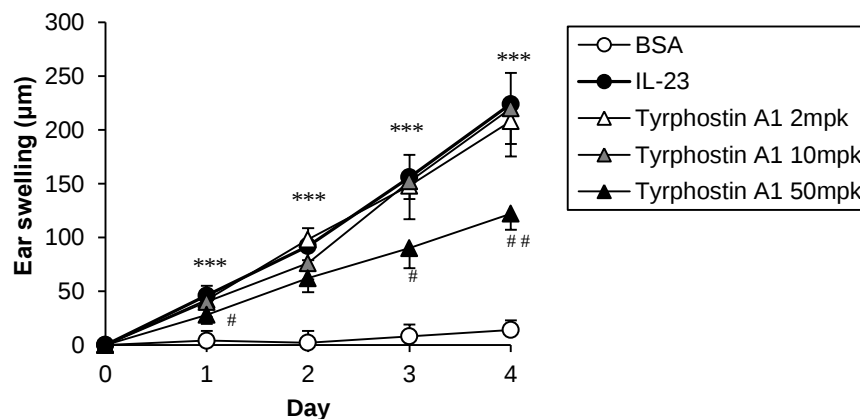


Figure 37. Tyrphostin A1 suppresses IL-23-induced psoriatic skin inflammation.

Tyrphostin A1 was intraperitoneally administrated twice a day into IL-23-treated Tyk2^{+/+} mice. Ear swelling was measured as indicated. Data represents mean $\pm$ SD (n=5). *** p < 0.001 compared with BSA; # p < 0.05, ## p < 0.01 compared with IL-23.

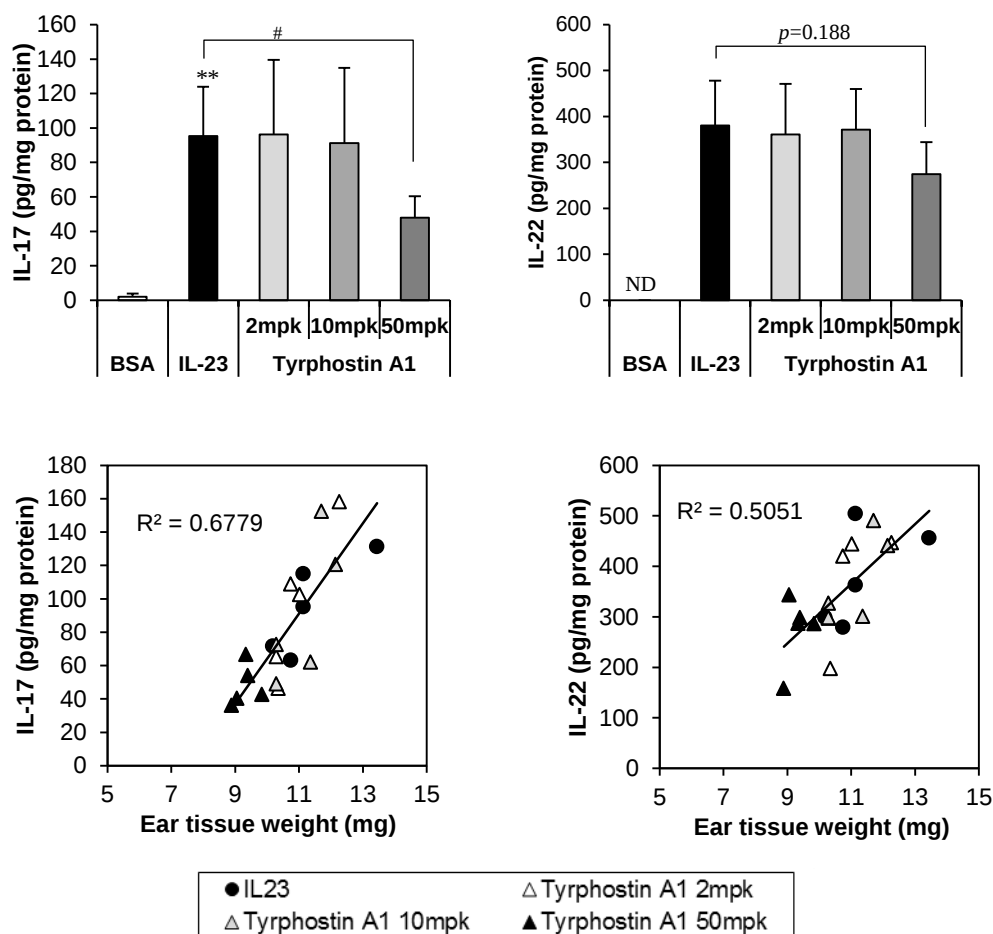


Figure 38. Tyrphostin A1 suppresses pathogenic IL-17 and IL-22 production.

A, IL-17 and IL-22 contents in the ear pinna. After 4 consecutive days of IL-23 injection and Tyrphostin A1 administration, cytokine contents in the ear pinna were measured by ELISA as indicated. Data represents mean + SD (n=5). ND, not detected. ** $p < 0.01$ compared with BSA; # $p < 0.05$ compared with IL-23. **B**, IL-17 and IL-22 production and ear tissue weight that were shown in Fig. 35 in each treated mice were plotted.

Day 4 での耳介組織中サイトカイン量を測定したところ、耳介腫脹と同様に 50 mg/kg 投与で IL-17 産生の有意な低下ならびに IL-22 産生の低下傾向が認められ、耳介腫脹抑制とサイトカイン産生抑制が同様の变化を示した (Figure 38A)。このとき、耳組織中の STAT3 リン酸化も抑制された (データ非提示)。個体ごとの耳介重量と耳介組織中各サイトカイン量の相関関係を確認したところ、IL-17 に対しては $r^2=0.678$ 、IL-22 に対しては $r^2=0.505$ を示し、耳介重量と各サイトカイン量に正の相関が認められた (Figure 38B)。この相関関係は図からも明らかなように、2 および 10 mg/kg の Tyrphostin A1 投与のマウスにおいて

も、Th17 サイトカイン量と耳介腫脹の抑制に関係性があることを示唆しているものと考え
る。

IL-17 および IL-22 が耳介腫脹の増加にかかわることは中和抗体実験からも明らかである
(Figure 31)。従って、Tyrphostin A1 投与で認められた耳介腫脹抑制が耳介組織中 Th17 サ
イトカインの産生抑制に基づく可能性が示唆された。

第四節 考察

TYK2 は乾癬の病態形成に重要な役割を持つ IL-23 のシグナル伝達に関わる分子であり、
IL-23 誘導による IL-17 産生ならびに IL-22 産生を強く抑制し、表皮の肥厚ならびに抗菌ペ
プチドの産生抑制を介して乾癬様皮膚炎に重要な役割を持つことが示唆された。さらに
IL-22 のシグナル伝達に対する直接的な関与も示唆され、TYK2 が IL-17 および IL-22 の産
生抑制ならびに IL-22 依存的な乾癬関連分子の産生の直接抑制により、乾癬病態の発症お
よび悪化に関与することが示唆された。

IL-23 に対する TYK2 の関与はすでに明らかとなっており、IL-23 誘導性皮膚炎モデルに
対して抵抗性を示すことは予測できることである。しかしながら、IL-23 による IL-17 産生
細胞の皮膚および DLN での増加や、IL-22 産生に対する影響は明らかではなかった。本研
究から、TYK2 欠損により皮膚に浸潤する Th17 細胞が減少し、DLN においては IL-22 を
産生する CD4⁺細胞、すなわち Th17 細胞あるいは Th22 細胞が減少することが確認された。
一方で IL-23 受容体を発現し、IL-17 および IL-22 の産生能を持つことが知られている $\gamma\delta$ T
細胞の数的変化に対しては明らかな影響は認められなかったが、評価方法が
PMA/ionomycin 刺激下での産生能であり、IL-23 を投与したときにその IL-23 刺激に応答
する細胞とは異なる。そのため、病態形成においては検出された Th17/Th22 細胞ならびに
 $\gamma\delta$ T 細胞は Tyk2^{-/-}マウスでは IL-23 応答性低下すると考えられる。実際、Tyk2^{-/-}マウス由
来 $\gamma\delta$ T 細胞では IL-23 依存的な IL-17 産生が低下することが報告されている¹²⁷⁾。そのため、
Tyk2^{-/-}マウスでは病態形成に関与する各細胞からのサイトカイン産生は低くなっており、
それが耳介組織ホモジネート中の IL-17 および IL-22 産生量の低さに反映されていると推
察される。

IL-22 は二面性のあるサイトカインと考えられており、作用する組織、臓器によって病態
誘導的にも防御的にも働くと考えられている¹²⁰⁾。皮膚においては前者での役割が大きいと
考えられており、乾癬治療においては IL-22 を抑制することは望ましい作用と考えられる。
IL-22 受容体は血球系細胞には発現せず、非血球系細胞に発現し、特に皮膚においてはケラ
チノサイトが IL-22 に応答する細胞である¹²⁰⁾。乾癬の病態形成に重要な IL-22 だが、シグ

ナル伝達に関わる TYK2 の役割についてはほとんど研究はされていなかった。私も IL-22 は正常な皮膚の形成に重要であり、特に Tyk2^{-/-}マウスで皮膚形成に異常は認められないことから、IL-22 のシグナルに対する影響は非常に限定的なものだろうと考えていた。しかし、IL-22 誘導性皮膚炎や表皮肥厚、抗菌ペプチド類の産生などの抑制から TYK2 は IL-22 受容体シグナル伝達において代替されない重要な役割を持つことが明らかになった。同じく IL-22 受容体に会合する JAK1 もまた重要な役割を持つことが明らかにされている¹¹⁹⁾。そのため、IL-22 の作用に対して TYK2 と JAK1 がそれぞれに役割を持つことが明らかであるが、TYK2 と JAK1 の関与の質的違いについては今後の研究が望まれる部分と考える。

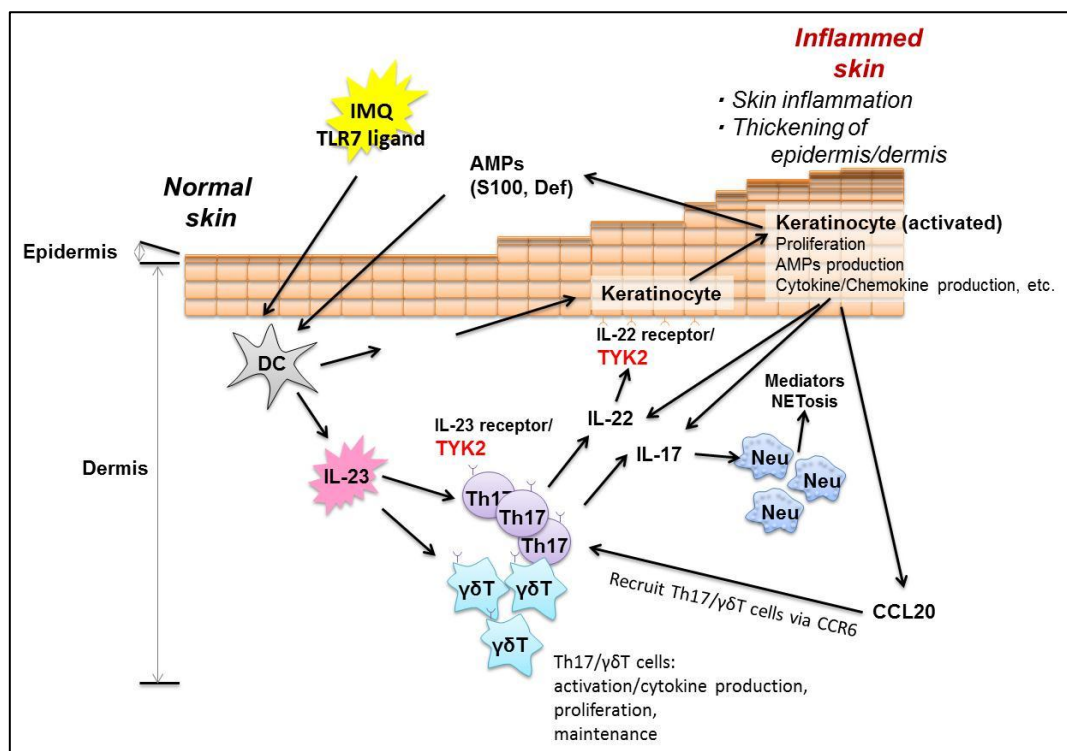
Tyk2^{-/-}マウスで得られた関節炎、IBD そして乾癬のモデルで認められた知見から、創薬に結び付けるため、化合物による TYK2 阻害実験を試みた。古典的なキナーゼ化合物ライブラリの Tyrphostin 類の中に TYK2 選択性が高い Tyrphostin A1 があり^{113,114)}、実際に TYK2 選択性を確認できたことから、Tyrphostin A1 での阻害実験を試みた。Tyrphostin A1 は耳介腫脹抑制ならびに組織中 Th17 サイトカイン産生を抑制し、両者には正の相関が認められた。このことは、Tyrphostin A1 の薬効が Th17 サイトカイン産生抑制に基づくことを示唆していることに加え、強い *in vivo* 活性を持つ TYK2 阻害薬はより強い薬効を示すことが期待される。

以上のように、本研究では IMQ、IL-23 および IL-22 による乾癬の炎症ならびに乾癬関連分子産生に関わる TYK2 の役割を検討し、TYK2 が IL-17 および IL-22 産生を抑制することにより炎症反応ならびに乾癬様皮膚病変の形成に関与すること、またそれが TYK2 阻害薬により制御可能であることを示唆した。IMQ 誘導性モデルと IL-23 誘導性モデルという代表的な 2 つの乾癬モデルの病態形成に関わる TYK2 は、血球系細胞からの IL-17 および IL-22 産生による炎症反応ならびに非血球系細胞による IL-22 に依存した乾癬関連分子の発現を制御し、乾癬治療の標的分子として有望と考える。

第五節 まとめ

本章では、乾癬における TYK2 の役割について以下のことを明らかにした (Scheme 3)。

- ・ TYK2 はマウス乾癬モデルでの病態進展/悪化に重要な役割を持ち、ヒト乾癬で認められる Th17 サイトカインならびに抗菌ペプチドの誘導が TYK2 欠損により減少する。
- ・ TYK2 は IL-22 シグナル抑制により、ケラチノサイトによる表皮肥厚ならびに抗菌ペプチドの産生を制御する。
- ・ TYK2 の機能阻害によって乾癬の病態を制御できる可能性がある。



Scheme 3 TYK2 role in psoriasis.

第五章 総括

本研究では、Tyk2^{-/-}マウスを用いた解析により、自己免疫疾患における TYK2 の役割について新知見を得た。

第一章では、TYK2 が IL-12 受容体および IL-23 受容体からのシグナル伝達に重要な役割を持ち、特に自己免疫疾患病態を誘導するヘルパーT 細胞として注目されている Th1 細胞ならびに Th17 細胞の分化・増殖に関わること、そして免疫制御性の Treg 細胞に対しては影響しないことを *in vitro* および *in vivo* 解析から明らかにした。

第二章では、Tyk2^{-/-}マウスが関節炎モデルである CIA および CAIA に対して強い発症抵抗性を示すこと、抗コラーゲン抗体依存的な関節炎ならびに関節破壊に直接的な役割を有することを明らかにした。さらに CAIA においては Th1 ならびに Th17 サイトカインの産生抑制が病態制御に寄与している可能性を示唆した。

第三章では、Tyk2^{-/-}マウスが UC モデルの DSS 誘導性大腸炎および CD モデルの TNBS 誘導性大腸炎の異なるタイプの IBD モデルに対して抵抗性を示すことを明らかにした。また、DSS 誘導性大腸炎においては Th1 ならびに Th17 サイトカインの産生抑制が病態制御に寄与している可能性を示唆した。

第四章では、Tyk2^{-/-}マウスが乾癬モデルである IMQ 誘導性皮膚炎および IL-23 誘導性皮膚炎に対して発症抵抗性を示すことを明らかにした。TYK2 は炎症の悪化だけではなく、乾癬に特有の表皮肥厚の制御への寄与の大きさから、ケラチノサイトでの IL-22 の活性制御における TYK2 の直接的な役割を明らかにし、さらには低分子化合物による TYK2 機能阻害が乾癬病態を制御する可能性があることを示唆した。

本研究においては特に TYK2 が関わる IL-12、IL-23 および IL-22 に注目した研究を行った。しかし、TYK2 が他にも IFN- α/β のシグナル伝達に関わり、これらのサイトカインは SLE の病態の形成に重要なことが知られている^{128,129)}。また、GWAS においても TYK2 は SLE の疾患感受性遺伝子としても同定されていることから^{25,26)}、TYK2 は複雑かつ未解明な発症メカニズムを持ち、多種多様な臓器で起こる自己免疫疾患において共通して病態形成に関わる重要な分子であると考えられる。

本研究において、TYK2 遺伝子を欠失した場合だけでなく、TYK2 キナーゼ活性阻害による病態コントロールの可能性を示した。得られた知見から、TYK2 阻害薬は IL-12/IL-23 の選択的な抑制作用や病態誘導性の Th1 細胞/Th17 細胞の分化・増殖の選択的な抑制作用を持ち、さらには直接的な IL-22 抑制作用により既存の薬剤や抗 p40 抗体など異なる薬効プロファイルを持つ可能性があることから、新しいクラスの自己免疫疾患治療薬となること

が期待される。本研究によって得られた知見が、自己免疫疾患の病態解明ならびに新しいクラスの薬剤の創生に繋がり、自己免疫疾患に苦しむ患者の方々の一助になることを願う。

参考文献

- ¹ Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:293-322.
- ² Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev.* 2009;228(1):273-87.
- ³ Krolewski JJ, Lee R, Eddy R, Shows TB, Dalla-Favera R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene.* 1990;5(3):277-82.
- ⁴ Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell.* 1992;70(2):313-22.
- ⁵ Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature.* 1993;366(6455):580-3.
- ⁶ Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zürcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1991;11(4):2057-65.
- ⁷ Takahashi T, Shirasawa T. Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 1994;342(2):124-8.
- ⁸ Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell.* 1998;93(3):373-83.
- ⁹ Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell.* 1998;93(3):397-409.
- ¹⁰ Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ. Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science.* 1995;270(5237):794-7.
- ¹¹ Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, Yamashita M, Numata A, Takase K, Kobayashi S, Shibata S, Asano Y, Gondo H, Sekiguchi K, Nakayama K, Nakayama T, Okamura T, Okamura S, Niho Y, Nakayama K. Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity.* 2000;13(4):561-71.
- ¹² Ortmann R, Smeltz R, Yap G, Sher A, Shevach EM. A heritable defect in IL-12 signaling in B10.Q/J mice. I. In vitro analysis. *J Immunol.* 2001;166(9):5712-9.
- ¹³ Yap GS, Ortmann R, Shevach E, Sher A. A heritable defect in IL-12 signaling in B10.Q/J mice. II. Effect on acute resistance to *Toxoplasma gondii* and rescue by IL-18 treatment. *J Immunol.* 2001;166(9):5720-5.
- ¹⁴ Shaw MH, Boyartchuk V, Wong S, Karaghiosoff M, Ragimbeau J, Pellegrini S,

Muller M, Dietrich WF, Yap GS. A natural mutation in the Tyk2 pseudokinase domain underlies altered susceptibility of B10.Q/J mice to infection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11594-9.

¹⁵ Karaghiosoff M, Steinborn R, Kovarik P, Kriegshäuser G, Baccarini M, Donabauer B, Reichart U, Kolbe T, Bogdan C, Leanderson T, Levy D, Decker T, Müller M. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol*. 2003;4(5):471-7.

¹⁶ Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Matsuda T, Nakayama K, Harada M. The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int Immunol*. 2004;16(8):1173-9.

¹⁷ Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med*. 1995;181(1):399-404.

¹⁸ Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-25.

¹⁹ Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol*. 2002;168(11):5699-708.

²⁰ Minegishi Y, Saito M, Morio T, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity*. 2006;25(5):745-755.

²¹ Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, Jönsen A, Rantapää-Dahlqvist S, Möller B, Kere J, Koskenmies S, Widén E, Eloranta ML, Julkunen H, Kristjansdottir H, Steinsson K, Alm G, Rönnblom L, Syvänen AC. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet*. 2005;76:528-537.

²² Cunninghame Graham DS, Akil M, Vyse TJ. Association of polymorphisms across the tyrosine kinase gene, TYK2 in UK SLE families. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(6):927-30.

²³ Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, Russell RK, Sleiman PM, Imielinski M, Glessner J, Hou C, Wilson DC, Walters T, Kim C, Frackelton EC, Lionetti P, Barabino A, Van Limbergen J, Guthery S, Denson L, Piccoli D, Li M, Dubinsky M, Silverberg M, Griffiths A, Grant SF, Satsangi J, Baldassano R, Hakonarson H. Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am J Hum Genet*. 2009;84(3):399-405.

²⁴ Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees

CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossum A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(12):1118-25.

²⁵ Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, Pullmann R, Ordi-Ros J, Sebastiani GD, Ruzickova S, Jose Santos M, Papasteriades C, Marchini M, Skopouli FN, Suarez A, Blanco FJ, D'Alfonso S, Bijl M, Carreira P, Witte T, Migliaresi S, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A; European Consortium of SLE DNA Collections. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):R69.

²⁶ Cunninghame Graham DS, Morris DL, Bhangale TR, Criswell LA, Syvänen AC, Rönnblom L, Behrens TW, Graham RR, Vyse TJ. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2011;7(10):e1002341.

²⁷ Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, Booth DR, Heard RN, Stewart GJ, Bogaert E, Dubois B, Harbo HF, Celius EG, Spurkland A, Strange R, Hawkins C, Robertson NP, Dudbridge F, Wason J, De Jager PL, Hafler D, Rioux JD, Ivinson AJ, McCauley JL, Pericak-Vance M, Oksenberg JR, Hauser SL, Sexton D, Haines J, Sawcer S; Wellcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC), Compston A. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(10):1309-13.

²⁸ Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet.* 2009;41(7):824-8.

²⁹ Mero IL, Lorentzen AR, Ban M, Smestad C, Celius EG, Aarseth JH, Myhr KM, Link J, Hillert J, Olsson T, Kockum I, Masterman T, Oturai AB, Søndergaard HB, Sellebjerg F, Saarela J, Kemppinen A, Elovaara I, Spurkland A, Dudbridge F, Lie BA, Harbo HF. A rare variant of the TYK2 gene is confirmed to be associated with multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(4):502-4.

³⁰ Genetic Analysis of Psoriasis Consortium & the Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, Weale ME, Allen MH, Barton A, Band G, Bellenguez C, Bergboer JG, Blackwell JM, Bramon E, Bumpstead SJ, Casas JP, Cork MJ, Corvin A, Deloukas P, Dilthey A, Duncanson A, Edkins S, Estivill X, Fitzgerald O, Freeman C, Giardina E, Gray E, Hofer A, Hüffmeier U, Hunt SE, Irvine

AD, Jankowski J, Kirby B, Langford C, Lascorz J, Leman J, Leslie S, Mallbris L, Markus HS, Mathew CG, McLean WH, McManus R, Mössner R, Moutsianas L, Naluai AT, Nestle FO, Novelli G, Onoufriadis A, Palmer CN, Perricone C, Pirinen M, Plomin R, Potter SC, Pujol RM, Rautanen A, Riveira-Munoz E, Ryan AW, Salmhofer W, Samuelsson L, Sawcer SJ, Schalkwijk J, Smith CH, Ståhle M, Su Z, Tazi-Ahnini R, Traupe H, Viswanathan AC, Warren RB, Weger W, Wolk K, Wood N, Worthington J, Young HS, Zeeuwen PL, Hayday A, Burden AD, Griffiths CE, Kere J, Reis A, McVean G, Evans DM, Brown MA, Barker JN, Peltonen L, Donnelly P, Trembath RC. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet.* 2010;42(11):985-90.

³¹ Orozco G, Rueda B, Robledo G, García A, Martín J. Investigation of the IL23R gene in a Spanish rheumatoid arthritis cohort. *Hum Immunol.* 2007;68(8):681-4.

³² Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Gibbons L, Plant D; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P; YEAR consortium, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Worthington J. Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2008;17(15):2274-9.

³³ Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.

³⁴ Charlton B, Lafferty KJ. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(6):793-8.

³⁵ Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996;156(1):5-7.

³⁶ Begolka WS, Miller SD. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol.* 1998;149(9):771-81.

³⁷ Gran B, Chu N, Zhang GX, Yu S, Li Y, Chen XH, Kamoun M, Rostami A. Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *J Neuroimmunol.* 2004;156(1-2):123-31.

³⁸ Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1910-4.

³⁹ Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(3):349-56.

⁴⁰ Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1849-61.

⁴¹ Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K,

Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;177(1):566-73.

⁴² Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, Gold R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005;237(2):123-30.

⁴³ Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.

⁴⁴ Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2007;66 Suppl 3:iii87-90.

⁴⁵ Takatori H, Kanno Y, Chen Z, O'Shea JJ. New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. *Mod Rheumatol.* 2008;18(6):533-41.

⁴⁶ Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.

⁴⁷ Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;66(3):390-402.

⁴⁸ Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2011;12(3):255-63.

⁴⁹ Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-9.

⁵⁰ O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y, Laurence A. Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* 2013;72 Suppl 2:ii111-5.

⁵¹ Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1779-90.

⁵² Proost P, Wuyts A, van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(4):211-23.

⁵³ Zeng YX, Takahashi H, Shibata M, Hirokawa K. JAK3 Janus kinase is involved in interleukin 7 signal pathway. *FEBS Lett.* 1994;353(3):289-93.

⁵⁴ Linnekin D, Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, Keller JR, Ruscetti FW, Ferris DK, Longo DL. JAK2 is constitutively associated with c-Kit and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol.* 1996;95(3-4):224-8.

⁵⁵ Ghilardi N, Kljavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, De Sauvage FJ. Compromised

humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. *J Immunol.* 2004;172(5):2827-33.

⁵⁶ Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 1996;4(5):471-81.

⁵⁷ Seto Y, Nakajima H, Suto A, Shimoda K, Saito Y, Nakayama KI, Iwamoto I. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J Immunol.* 2003;170(2):1077-83.

⁵⁸ Boers M. Rheumatoid arthritis. Treatment of early disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001;27(2):405-14.

⁵⁹ Gay S. Rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13(3):191-2.

⁶⁰ Schett G, Tohidast-Akrad M, Steiner G, Smolen J. The stressed synovium. *Arthritis Res.* 2001;3(2):80-6.

⁶¹ Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007;7(1):65-70.

⁶² Khachigian LM. Collagen antibody-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2512-6.

⁶³ Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol.* 1992;148(7):2103-8.

⁶⁴ Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, Mizutani N, Brand DD, Waritani T, Terato K, Yoshino S. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. *J Immunol Methods.* 2009;343(1):49-55.

⁶⁵ Spach KM, Noubade R, McElvany B, Hickey WF, Blankenhorn EP, Teuscher C. A single nucleotide polymorphism in Tyk2 controls susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009;182(12):7776-83.

⁶⁶ Oyamada A, Ikebe H, Itsumi M, Saiwai H, Okada S, Shimoda K, Iwakura Y, Nakayama KI, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009;183(11):7539-46.

⁶⁷ McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Warriar RR, Connaughton SE, Hall LB, Arp LH, Gately MK, Magram J. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur J Immunol.* 1996;26(12):2933-8.

⁶⁸ Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003;198(12):1951-7.

⁶⁹ Adamopoulos IE, Tessmer M, Chao CC, Adda S, Gorman D, Petro M, Chou CC, Pierce RH, Yao W, Lane NE, Laface D, Bowman EP. IL-23 is critical for induction of arthritis, osteoclast formation, and maintenance of bone mass. *J Immunol.* 2011;187(2):951-9.

-
- ⁷⁰ Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007;369(9573):1641-57.
- ⁷¹ Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
- ⁷² Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012;380(9853):1606-19.
- ⁷³ Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
- ⁷⁴ Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4280-8.
- ⁷⁵ Lim WC, Hanauer SB. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*. 2004;4(2):66-85.
- ⁷⁶ Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58(8):1152-67.
- ⁷⁷ Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109(4):1344-67.
- ⁷⁸ Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702.
- ⁷⁹ Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol*. 2000;19(1):51-62.
- ⁸⁰ Okayasu I. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702.
- ⁸¹ Fukata M, Michelsen KS, Eri R, Thomas LS, Hu B, Lukasek K, Nast CC, Lechago J, Xu R, Naiki Y, Soliman A, Arditi M, Abreu MT. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G1055-65.
- ⁸² Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96(3):795-803.
- ⁸³ Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 1993;69:238-49.
- ⁸⁴ Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci*. 1993;38:1722-34.
- ⁸⁵ Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995;182(5):1281-90.
- ⁸⁶ Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A,

Lehr HA, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Galle PR, Karow M, Neurath MF. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol.* 2006;177(5):2760-4.

⁸⁷ Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ, Powrie F. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity.* 2006;25(2):309-18.

⁸⁸ Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98(3):694-702.

⁸⁹ Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med.* 2007;13(1):26-8.

⁹⁰ Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1310-6.

⁹¹ Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanss J, Guzzo C, Sands BE, Hanauer SB, Targan S, Rutgeerts P, Ghosh S, de Villiers WJ, Panaccione R, Greenberg G, Schreiber S, Lichtiger S, Feagan BG; CERTIFI Study Group. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2012;367(16):1519-28.

⁹² Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, Flavell RA. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity.* 2008;29(6):947-57.

⁹³ Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, Hedl M, Zhang W, O'Connor W Jr, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Booth CJ, Cho JH, Ouyang W, Abraham C, Flavell RA. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature.* 2012;491(7423):259-63.

⁹⁴ Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(10):599-608.

⁹⁵ Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* 2011;12(1):21-7.

⁹⁶ Cherrier M, Ohnmacht C, Cording S, Eberl G. Development and function of intestinal innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(3):277-83.

⁹⁷ Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature.* 2010;464(7293):1371-5.

⁹⁸ Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, Travis SP, Powrie F. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med.* 2011;208(6):1127-33.

-
- ⁹⁹ Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2005;352:1899-1912.
- ¹⁰⁰ Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445:866-873.
- ¹⁰¹ Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2009;160(2):319-24.
- ¹⁰² Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, Nau F, Guillet G, Dagregorio G, Yssel H, Lecron JC, Morel F. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(3):407-15.
- ¹⁰³ Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, Li S, Dooley LT, Gordon KB; PHOENIX 1 study investigators. 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(9625):1665-74.
- ¹⁰⁴ Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary P, Yeilding N, Guzzo C, Hsu MC, Wang Y, Li S, Dooley LT, Reich K; PHOENIX 2 study investigators. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet*. 2008;371(9625):1675-84.
- ¹⁰⁵ Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH; Psoriasis Study Group, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ; Rheumatoid Arthritis Study Group, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD; Uveitis Study Group, Rose K, Haider A, Di Padova F. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med*. 2010;2(52):52ra72.
- ¹⁰⁶ Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, Krueger JG. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1207-11.
- ¹⁰⁷ Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(6):1339-50.
- ¹⁰⁸ Blauvelt A. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1064-7.
- ¹⁰⁹ Danilenko DM. Review paper: preclinical models of psoriasis. *Vet Pathol*. 2008;45(4):563-75.
- ¹¹⁰ Wagner EF, Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):704-14.
- ¹¹¹ van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009;182(9):5836-45.

-
- ¹¹² Bell DM. Occupational risk of human immunodeficiency virus infection in healthcare workers: an overview. *Am J Med.* 1997;102(5B):9-15.
- ¹¹³ Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol.* 2004;140(12):1490-5.
- ¹¹⁴ Wu JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australas J Dermatol.* 2004;45(1):47-50.
- ¹¹⁵ Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2007;9(6):461-7.
- ¹¹⁶ Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB, Gorman DM, Smith K, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, McClanahan TK, Bowman EP. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med.* 2006;203(12):2577-87.
- ¹¹⁷ Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature.* 2007;445(7128):648-51.
- ¹¹⁸ Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331-41.
- ¹¹⁹ Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem.* 2002;277(37):33676-82.
- ¹²⁰ Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):17-31.
- ¹²¹ Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol.* 2011;23(3):159-63.
- ¹²² Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. 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(5):1309-23.
- ¹²³ Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(5):523-36.
- ¹²⁴ Tchorzewski MT, Qureshi FG, Duncan MD, Duncan KL, Saini N, Harmon JW. Role of insulin-like growth factor-I in esophageal mucosal healing processes. *J Lab Clin Med.* 1998;132(2):134-41.

¹²⁵ Bright JJ, Du C, Sriram S. Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1999;162(10):6255-62.

¹²⁶ Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Micallef M, Hamaoka T, Kurimoto M, Fujiwara H. Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18. *Eur J Immunol.* 2003;33(1):243-51.

¹²⁷ Nakamura R, Shibata K, Yamada H, Shimoda K, Nakayama K, Yoshikai Y. Tyk2-signaling plays an important role in host defense against *Escherichia coli* through IL-23-induced IL-17 production by gammadelta T cells. *J Immunol.* 2008;181(3):2071-5.

¹²⁸ Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus.* 2008;17(5):394-9.

¹²⁹ Schmidt KN, Ouyang W. Targeting interferon-alpha: a promising approach for systemic lupus erythematosus therapy. *Lupus.* 2004;13(5):348-52.

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 衛生化学研究室内の松田 正 教授に深く感謝いたします。

本研究で用いた **TYK2** 遺伝子改変マウスを提供してくださった宮崎大学医学部 内科学講座 消化器血液学分野の下田和哉教授、数多くのご助言をいただきました大阪大学 大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学の織谷健司准教授には心から御礼申し上げます。また、お二人には本論文の審査をしていただきましたこと、重ねて御礼申し上げます。

研究面での貴重なご助言ならびにご協力を頂きました北海道大学 大学院薬学研究院 衛生化学研究室内の室本竜太助教ならびに同研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

本論文を審査していただきました北海道大学 大学院薬学研究院 薬物動態学研究室 菅原 満 教授に御礼申し上げます。

岐阜薬科大学 薬理学研究室在籍時に免疫薬理研究の基本についてご教授いただきました現 岐阜保健医療短期大学 永井博弼学長、現 岐阜薬科大学 機能分子学大講座 稲垣直樹教授、同 田中宏幸准教授ならびに同研究室でお世話になった皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださった第一三共株式会社 蔵方慎一博士、磯野藤男博士、森下 馨 博士、秋本俊彦博士、前田博昭博士、下里隆一博士、**Manish Diwan** 博士、田中伸治研究員、青沼見里研究員、横山美香研究員、**TYK2** 遺伝子改変マウスの繁殖・生産にご協力を頂きました石橋光太郎博士に深く感謝すると共に、本研究を進めるにあたりご助言を頂きました皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、日頃研究を行うにあたり、心身を支えて頂きました家族に感謝致します。