

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08700

研究課題名（和文）乾癬におけるケモカイン受容体CCR4を介したTh17細胞増殖の病理的役割の解明

研究課題名（英文）Role of Th17 cell expansion through CCR4 in psoriasis

研究代表者

中山 隆志（Nakayama, Takashi）

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：60319663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、乾癬におけるケモカイン受容体CCR4の役割の解明を目的とする。CCR4欠損マウスは、皮膚の肥厚や紅斑、鱗屑といった乾癬様病態の軽減および乾癬関連遺伝子の発現減少を示した。この時、病変皮膚および所属リンパ節において、Th17細胞が減少していた。さらに、所属リンパ節において、CCR4陽性のTh17細胞とCCL22産生の樹状細胞がクラスターを形成しており、CCR4欠損マウスでは、それが減少していた。また、選択的CCR4阻害薬でも同様の結果が得られた。以上より、CCR4は、所属リンパ節でのTh17細胞増殖に関与し、乾癬病態の発現に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は、自己免疫性疾患の1つであり、未だ根本的な治療法が無い。Th17細胞が関連すると言われているが、その寄与の詳細は不明である。また、CCR4は、Th2細胞やTh17細胞に発現しており、これまでアレルギーなどのTh2疾患において重要な役割を果たすことが報告されているが、Th17疾患への寄与は不明であった。本研究で明らかにした、CCR4が所属リンパ節でのTh17細胞増殖を介して、乾癬の増悪に寄与するという知見は、乾癬の病態解明に貢献すると考えている。CCR4を標的とした乾癬の新たな治療戦略の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the role of CCR4 in psoriasis. CCR4 deficiency caused the decrease in skin disease and expression levels of psoriasis-related genes. Furthermore, Th17 cells were reduced in the skin lesions and regional lymph nodes of CCR4 deficient mice. In the regional lymph nodes, CCR4-positive Th17 cells were clustered with CCL22-producing dendritic cells, and these clusters were decreased in CCR4 deficient mice. Similar results were observed in selective CCR4 antagonist-treated mice. These findings suggest that CCR4 would be involved in the pathology of psoriasis through the expansion of Th17 cells in the lymph nodes.

研究分野：免疫学

キーワード：乾癬 CCR4 Th17

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケモカインは免疫担当細胞の細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり、炎症反応や免疫応答において重要な役割を担っている。これまでに、研究代表者らは、Th2 細胞に選択的に発現するケモカイン受容体 CCR4 およびそのリガンドである CCL17 がアトピー性皮膚炎の皮膚組織で高発現し、血中 CCL17 値が臨床症状と強く相関することを報告した。また、近年、CCR4 は、Th2 細胞だけでなく、Th17 細胞の主要な遊走制御因子であることが明らかにされた。しかしながら、CCR4 はアレルギー性疾患を含む Th2 関連疾患において重要な役割を果たすことが示されているが、一方で、乾癬を含む Th17 関連疾患における役割についてはほとんど不明である。

乾癬モデルマウスの作製には、現在イミキモド (IMQ) を塗布する方法が汎用されている。これは、IMQ を 6 日間塗布することで乾癬様病態を誘発するが、Th17 細胞はほとんど誘導されない。それどころか、ヒトの皮膚にはほとんど存在しない T 細胞が IL-17 の主要な産生細胞となることが知られている。そこで、よりヒトの乾癬病態類似したモデルマウスの作製を試み、研究代表者らは、IMQ を 14 日間塗布することで、Th17 細胞を効率よく誘導できる乾癬モデルマウス (IMQ 長期塗布モデル) の作製に成功した。本モデルは、従来モデルよりも、ヒトの臨床症状により類似した病態を誘導できる有益なモデルであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上述した IMQ 長期塗布モデルを用い、乾癬における CCR4 を介した Th17 細胞の遊走制御機構の解析を通じて、CCR4 の乾癬発症における役割および新たな乾癬治療標的としての可能性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 動物

メスの C57B/6 系統の野生型および CCR4 欠損マウスを用いた。SPF 環境下にて、12 時間の明暗サイクル、室温 23 °C ± 1 で飼育した。餌・水は自由に摂取できるようにした。動物実験は、「近畿大学実験動物規程」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。

(2) 乾癬モデルマウスの作製

IMQ 5%クリームを耳介皮膚に、1 日おきに 14 日間塗布することで作製した。

(3) フローサイトメトリー

耳介皮膚および所属リンパ節より、免疫細胞を単離した。抗 CD16/32 抗体にて Fc 受容体を阻害後、蛍光色素を標識した抗体で染色した。BD LSR Fortessa もしくは BD FACSAria にて測定を行った。

(4) Real-time PCR

モデルマウスの病変皮膚および所属リンパ節を回収した。Total RNA を抽出し、cDNA を調整した。SYBR Green を用い、目的遺伝子の発現量を測定した。

(5) ELISA

モデルマウスの病変皮膚を回収した。Lysis buffer 中でタンパク質を抽出後、遠心分離し、上清をサンプルとして使用した。BioLegend 社の ELISA kit を用い、各種サイトカイン量を定量した。

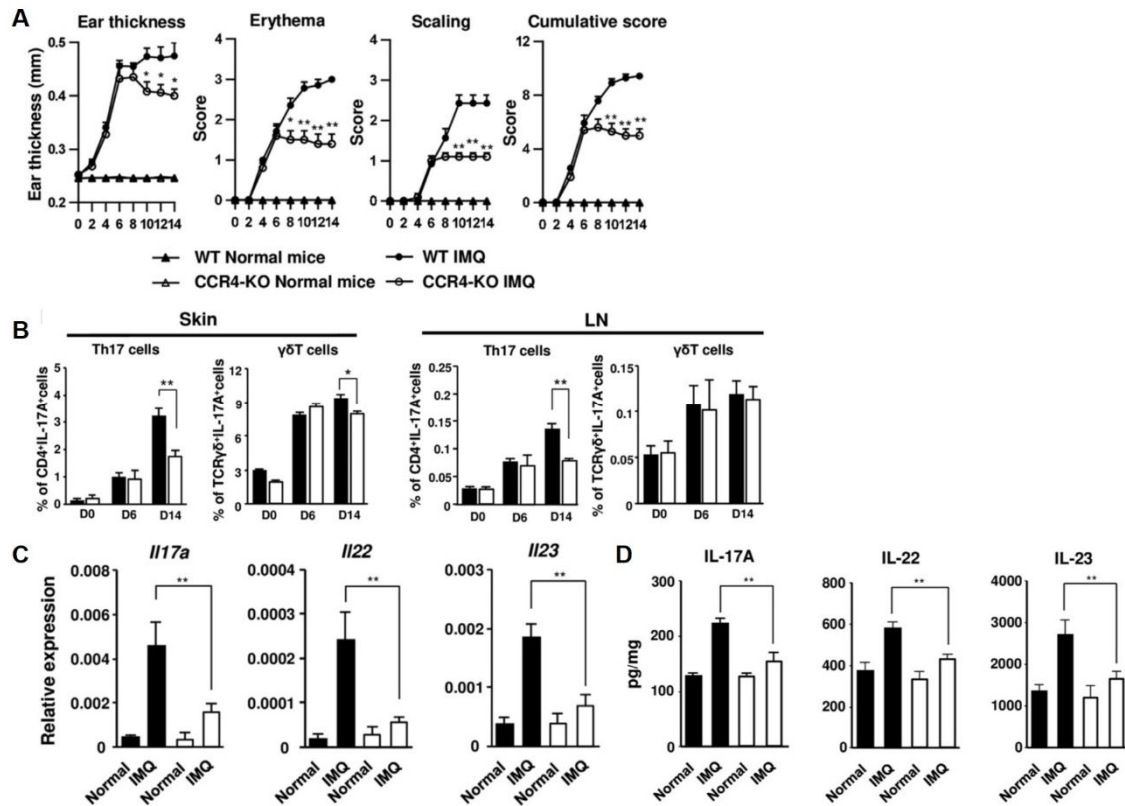
(6) 免疫染色

4% PFA にて固定した所属リンパ節を用い、凍結切片を作製した。2% BSA および 1% ロバ血清にてブロッキングした。1 次抗体を 1 晩反応させ、蛍光色素が標識された 2 次抗体を反応させた。封入し、共焦点顕微鏡にて画像を取得した。

4. 研究成果

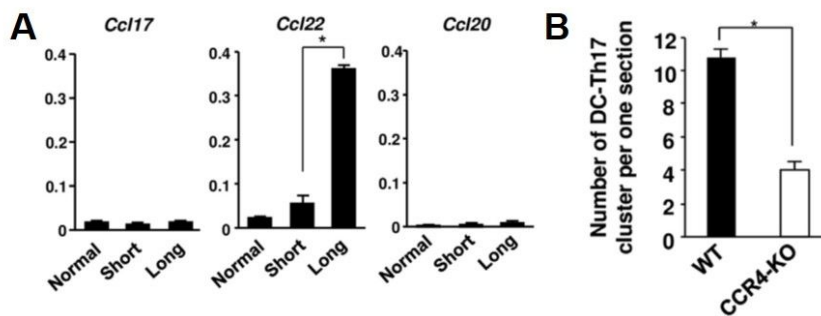
(1) CCR4 欠損が乾癬病態に与える影響

CCR4 欠損マウスでは、耳介皮膚の肥厚、紅斑および鱗屑のスコアが、野生型マウスと比べ、有意に減少した (Fig. 1A)。また、CCR4 欠損マウスの病変皮膚および所属リンパ節において、Th17 細胞の有意な減少がみられた (Fig. 1B)。さらに、病変皮膚において、乾癬に関連するサイトカイン (IL-17A、IL-22、IL-23) の発現が、CCR4 欠損マウスで減少した (Fig. 1C)。



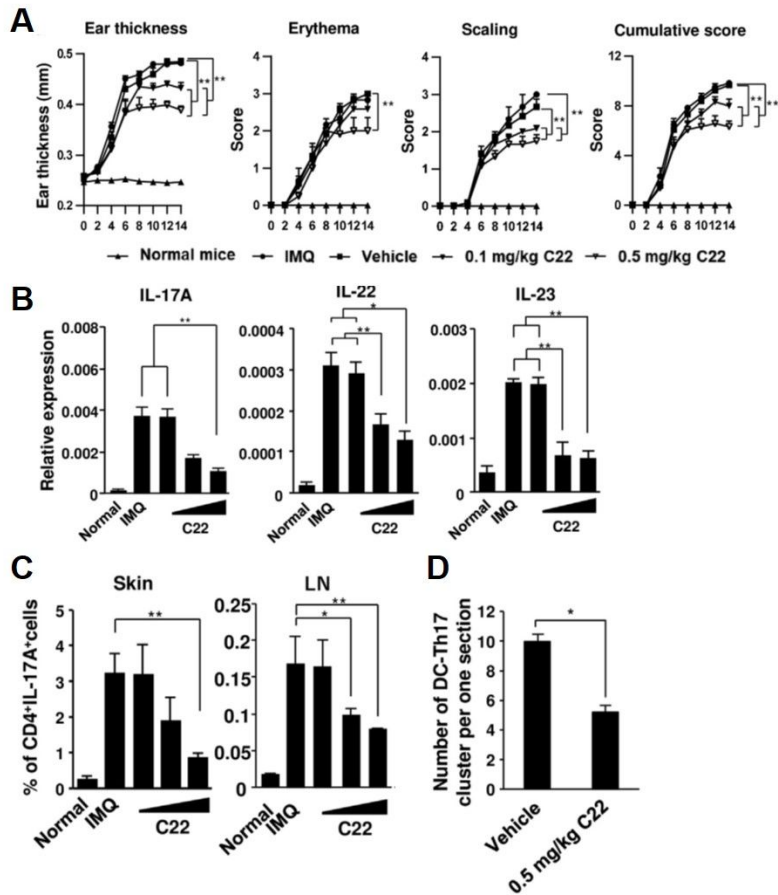
(2) 所属リンパ節における Th17 細胞増殖への CCR4 の寄与

これまでに、研究代表者らは、メラノーマ担癌マウスを用いた研究より、所属リンパ節における Th17 細胞の増殖には、CCR4 リガンド (CCL22) 陽性の樹状細胞と CCR4 陽性の Th17 細胞のクラスター形成が必要であることを明らかにしている (Matsuo et al., *Cancer Lett.*, 2016)。そこで、乾癬モデルマウスにおいても、同様の現象が起こっているのか検討した。乾癬モデルマウスの所属リンパ節において、CCL22 の発現が有意に増加し (Fig.2A)、さらに、CCL22 陽性の樹状細胞と Th17 細胞のクラスター数が、CCR4 欠損マウスで有意に減少した (Fig.2B)。



(3) 選択的 CCR4 阻害薬による乾癬病態の変化

選択的 CCR4 阻害薬である Compound22 を、0.1 もしくは 0.5 mg/kg の用量で 1 日おきに腹腔内投与した際の病態の変化等について解析した。まず、臨床スコアを解析したところ、皮膚の肥厚や紅斑、鱗屑が軽減した (Fig.3A)。また、病変皮膚において、Th17 細胞の割合および乾癬関連分子の発現が有意に低下した (Fig.3B,C)。さらに、所属リンパ節における Th17 細胞の割合および CCL22 陽性樹状細胞と Th17 細胞のクラスター形成が減少した (Fig.3C,D)。



以上より、乾癬において、CCR4 は、Th17 細胞の所属リンパ節における誘導と増殖、皮膚への遊走を介し、病態形成に深く関与している可能性を示した。本研究で得られた知見は、乾癬を始めとする Th17 疾患において、CCR4 が治療標的となることを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuhiko Matsuo, Kosuke Kitahata, Yuichiro Kaibori, Yuka Arima, Arisa Iwama, Mana Ito, Yuta Hara, Daisuke Nagakubo, Ying-Shu Quan, Fumio Kamiyama, Naoki Oiso, Akira Kawada, Osamu Yoshie, Takashi Nakayama	4. 巻 141
2. 論文標題 CCR4 involvement in expansion of Th17 cells in a mouse model of psoriasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1985-1994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.12.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔭山雄太、北畑孝祐、松尾一彦、義江修、中山隆志
2. 発表標題 乾癬におけるCCR4を介したTh17細胞遊走の制御機構の解明
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北畑 孝祐, 松尾 一彦, 海堀 祐一郎, 長久保 大輔, 義江 修, 中山 隆志
2. 発表標題 乾癬モデルマウスにおけるTh17細胞増幅に対するCCR4の寄与
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松尾 一彦 (Matsuo Kazuhiko) (70615921)	近畿大学・薬学部・講師 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関