

# 博士學位論文

ケモカイン受容体 CCR4 を介した  
炎症制御がもたらす疾患形成機構に関する研究

近畿大学大学院  
薬学研究科 薬学専攻  
本澤 龍 茉

# 博士學位論文

ケモカイン受容体 CCR4 を介した  
炎症制御がもたらす疾患形成機構に関する研究

令和6年1月11日

近畿大学大学院  
薬学研究科 薬学専攻  
本澤 龍 菜

## 目次

<b>略語一覧</b>	2
<b>序論</b>	4
<b>本論</b>	6
第一章 関節リウマチにおける CCR4 を介した炎症制御機構の解明	6
実験方法	8
第一節 関節リウマチマウスモデルにおける CCR4 の役割	12
第二節 関節炎症部および所属リンパ節へのヘルパーT 細胞集積に対する CCR4 の役割	14
第三節 DC-Th17 クラスター形成における CCR4-CCL22 系の役割	16
考察および小括	19
第二章 炎症性うつ様病態における CCR4 の機能解析	21
実験方法	23
第一節 LPS 誘発性うつ様病態における CCR4 の機能解析	26
第二節 LPS 誘発性うつ病マウスの脳へと浸潤する免疫細胞の解析	28
第三節 LPS 誘発性うつ様病態に対する CCR4 阻害薬の働き	30
考察および小括	32
総括	34
<b>参考文献</b>	36
<b>謝辞</b>	

## 略語一覽

BBB	blood-brain barrier
BSA	bovine serum albumin
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CFA	complete Freund's adjuvant
CIA	collagen-induced arthritis
CXCL	CXC chemokine ligand
DC	dendritic cell
DSS	dextran sodium sulfate
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immune-sorbent assay
Foxp3	forehead box p3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glia fibrillary acidic protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H&E	hematoxylin & eosin
IDO-1	indoleamine 2,3-deoxygenase-1
IFA	incomplete Freund's adjuvant
IFN	interferon
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
Iba-1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
LPS	lipopolysaccharide
MAP2	microtubule-associated protein 2
mRNA	messenger ribonucleic acid
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RA	rheumatoid arthritis
TGF	transforming growth factor

TNF	tumor necrosis factor
Th	T-helper
Treg	regulatory T cell
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 序論

炎症とは様々な免疫細胞が多角的に作用することで生じる免疫反応であり、主に生体における防御機構の一種であると考えられている。免疫系はその反応の様式に応じて、自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫は感染症などにおいて抗原となる細菌の侵入に対して最初に生じる免疫反応であり、好中球やマクロファージといった自然免疫細胞による細菌の貪食やサイトカインの産生が行われる。一方で、獲得免疫はT細胞やB細胞などの抗原特異性を持つ免疫細胞が中心となって生じる免疫反応であり、細菌などの感染症に対して高い防御機能を有する。また、獲得免疫は遺伝的要因、外的要因、環境要因が絡み合い、自己に対する炎症反応も引き起こすことも明らかとされている。中でも獲得免疫系に属するヘルパーT細胞系はT-helper (Th)1、Th2、Th17、制御性T細胞 (regulatory T cell; Treg) など多様なサブセットが存在し、それぞれに固有の免疫反応を引き起こす機能を持ち、それらを介して生体防御や免疫疾患の発症などに幅広く関与している。特にTh17は好中球やマクロファージの活性化を伴う免疫系を亢進する働きをもち、上皮バリア機能や腸粘膜免疫の維持に必須の役割を持つことが知られている。一方で、その免疫反応が過剰になった場合には関節リウマチや乾癬、多発性硬化症などの自己免疫疾患の発症に寄与することも報告された。Th17の主な産生サイトカインであるIL-17Aは自然免疫を担うマクロファージからの炎症性サイトカインの分泌を促進することで炎症反応を増悪させる。また、TregはヘルパーT細胞に対する抗原提示を担う樹状細胞 (dendritic cell; DC) の活性化抑制や、抑制性サイトカインの産生などを介して免疫反応を幅広く抑制する細胞として知られており、Tregを除去したマウスでは自己免疫疾患を発症しやすくなることが報告されている。このように獲得免疫系を担うTh17/Tregのバランスは炎症性疾患の発症や病態形成に大きく影響すると考えられている。

ケモカインは主に免疫細胞の遊走および局在を制御するサイトカインの一群であり、50種類以上のケモカインと23種類のケモカイン受容体が同定されている。前述したヘルパーT細胞サブセットはいずれも固有の組み合わせのケモカイン受容体を発現しており、それぞれに対応したケモカインによって特定の組織への局在が制御されている。ケモカイン系を介した免疫細胞の局在制御は、生理的環境下における免疫機構の維持など、恒常性の維持に重要な働きを担っている一方で、疾患形成時には病変組織で産生されるケモカイン発現プロファイルが変化し、特定の免疫細胞が過剰に集積する原因と

なっている。このように、ケモカイン系によって制御される免疫反応は、過剰な免疫細胞の集積に伴う炎症反応および、それに続く組織の破壊や機能不全にも影響を及ぼしている。実際に、アトピー性皮膚炎では、病変皮膚において Th2 遊走を引き起こすケモカインの発現が増加していることも報告されていることから、ケモカイン系と過剰な免疫反応は密接な関係にあることが示唆されている。そのため、免疫系に関連する医薬品開発や疾患治療の実現には、ケモカイン系を介した炎症制御機構について理解を深めることが重要である。

CC chemokine receptor (CCR)4 は CC chemokine ligand (CCL)17、CCL22 の二つのケモカインをリガンドにもつ受容体であり、Th2、Th17、Treg などのヘルパーT 細胞に特異的に発現している。これまで CCR4 は、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー疾患において Th2 の遊走を担うことや、腫瘍組織への Treg 遊走を担うことでアレルギー疾患の発症あるいは抗腫瘍免疫の抑制に寄与することが報告されてきた。また、著者らの研究グループは、過去に乾癬モデルマウスを用いた研究において CCR4 が所属リンパ節における Th17 の増殖を促進し、疾患の増悪に寄与する因子であることを明らかとしている。このように、CCR4 は疾患や組織ごとに多様な役割を示す因子であり、その詳細な病態制御機構について理解を深めることが過剰な免疫制御を標的とした新たな治療方法の創出のため必須であると考えられる。

本稿では、Th17 依存的な炎症が関わる関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) および、近年注目を集めている神経免疫系の関与が疑われる炎症誘発性うつ病のモデルマウスを使用し、CCR4 を介した炎症制御が疾患形成機構において、どのような寄与を示すか明らかとするため研究を行った。

## 本論

### 第一章 関節リウマチにおける CCR4 を介した炎症制御機構の解明

関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA) は自己免疫疾患に分類される疾患であり、その疾患形成には Th17/Treg バランスの崩壊が関与することが明らかとされている。Th17 は interleukin (IL)-17A や IL-22、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) などの炎症誘導性サイトカインを産生する[1, 2]。特に IL-17A は、関節に存在する線維芽細胞や内皮細胞に作用し、さらに多くの炎症性サイトカインや、好中球やマクロファージの遊走に関わる CXC chemokine ligand (CXCL)1 や CXCL8 などのケモカインの産生を促すことで疾患の発症を強く誘導している。実際に、RA 患者の循環血液中に存在する IL-17A 量は疾患の活動性との相関を有していることも報告されている[3, 4]。また、近年注目されている GM-CSF は好中球やマクロファージの活性化を強力に誘導し、滑膜組織の傷害を引き起こす代表的なサイトカインであり、新たな治療標的としての期待が高まっている[2, 5, 6]。Treg は IL-10 の産生や DC の活性化抑制などを介した免疫抑制作用を持ち、自己に対する免疫寛容やアレルギー反応の抑制を担う免疫細胞である。また Treg は、RA において生じる Th17 炎症を抑制的に制御することも報告されており、これら細胞のバランスが疾患形成において特に重要であると考えられる。

Th17 には CCR4 および CCR6 が発現することが報告されている[7, 8]。中でも CCR6 は、そのリガンドである CCL20 が炎症滑膜において産生されることで Th17 を関節炎症部へと遊走させる働きを持つことが報告されている[9-11]。しかし CCR4 については、そのリガンドである CCL22 が RA 患者の循環血液中および滑液中で増加することが報告されているのみに留まっており、詳細な働きについては明らかとなっていない[12, 13]。

ケモカイン受容体 CCR4 は CCL17 および、CCL22 をリガンドとする受容体であり、RA の発症を制御している Th17、Treg などのヘルパーT 細胞に選択的に発現することが知られている[14, 15]。また、これまでに著者らの研究グループが行った研究において、同じ Th17 依存的な炎症によって発症することが知られる乾癬では、所属リンパ節で CCL22 を発現する DC が CCR4 を発現するメモリーTh17 を誘引し、効率的な抗原提示を行うことで抗原特異的な Th17 のクラスターを形成することを明らかとしている[16]。このことから RA における Th17 炎症において CCR4 は Th17 の炎症組織への遊走だけでなく、

所属リンパ節での Th17 増殖にも関与する可能性が考えられた。また、Treg についても同様に CCR4 を発現するため、CCR4 は Th17 および Treg 両方の側面から炎症を制御し、RA の疾患発症機構に寄与することが考えられる。

そこで本章では、RA の疾患形成に関わる Th17/Treg バランスと、その崩壊によって生じる Th17 炎症に対する CCR4 の役割を明らかとするため、RA マウスモデルおよび CCR4 欠損マウス、CCR4 阻害薬を用いて研究を行った。

## I. 実験方法

### 1. 実験動物

C57BL/6J マウス (8 週齢、雄) および、DBA/1J マウス (8 週齢、雄) は清水実験材料より購入した。また、CCR4 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) は Jackson Laboratory より購入した。実験動物には固形資料および水道水を摂取させ、約 24°C で 12 時間の明暗サイクルに保持された specific photogenic free 環境下の部屋で飼育した。なお、動物実験に関しては研究計画を近畿大学動物実験委員会に申請し、承認を得たうえで近畿大学実験動物規定に基づいて行った。

### 2. Collagen-induced arthritis (CIA) マウスモデルの作製と病態評価

初回免疫として Type II Chicken Collagen (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) を使用し、4 mg/mL の濃度になるように 0.1 M 酢酸で溶解した Collagen 溶液と CFA (complete Freund's adjuvant; SIGMA-ALDRICH) を 50  $\mu$ L ずつ混合して作製したエマルジョンを背部と尾根部へ計 100  $\mu$ L 皮内投与した。C57BL/6 マウスは 2 週間経過後、DBA/1 マウスは 3 週間経過後に追加免疫として Collagen 溶液と IFA (incomplete Freund's adjuvant; SIGMA-ALDRICH) を 50  $\mu$ L ずつ混合して作製したエマルジョンを同様に背部と尾根部へ計 100  $\mu$ L 皮内投与した。また、作製したマウスモデルの病態は後足および関節部の紅斑と腫脹に基づいた評価を行い、0~3 の 4 段階 (0 紅斑および腫脹を認めない, 1 紅斑および腫脹をわずかに認める, 2 紅斑および腫脹を認める, 3 強い紅斑および腫脹を認める) で Score 化した。

### 3. 組織学的解析

採取した関節組織は 4% PFA (paraformaldehyde) 含有 PBS で一晩固定処理を行ったのち、10% EDTA 含有 PBS で脱灰処理を行った。その後、関節組織はパラフィンを用いて包埋した。作製したパラフィンブロックは 6  $\mu$ m の厚さで薄切し、ヘマトキシリンおよびエオジンを用いて染色した。作製した組織標本は光学顕微鏡で観察した。

#### 4. Compound 22 の投与スケジュール

DBA/1 マウスに対して、CIA マウスモデル作成のための初回免疫日から 2 日に 1 度の頻度で 0.5 mg/kg および 2.5 mg/kg 腹腔内投与した。Compound22 は A.V. Purandare らの報告をもとに作製し、CCR4 発現細胞を特異的に阻害することを確認している [17]。

#### 5. 細胞の単離

膝下リンパ節は PBS 中ですりつぶし、70  $\mu$ m のセルストレーナーを通し単細胞懸濁液を得た。また、関節組織は Collagenase D および DNase を含む RPMI-1640 {0.3 mg/mL Collagenase D (Roche; Basel, Switzerland) および 0.01 mg/mL DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)} 内で切り刻み、37°C で 1 時間混和しながらインキュベートした。その後 70  $\mu$ m のセルストレーナーを通し単細胞懸濁液を得た。

#### 6. Compound 22 の毒性解析

膝下リンパ節から単離した CD4<sup>+</sup>細胞を 10<sup>6</sup> 個/mL で培養し、そこへ Compound 22 を 100 nM あるいは 1000 nM の濃度で添加し 3 日間培養した。その後フローサイトメトリーを用いて Th17 量を解析し培養開始時点からの生存率を算出した。

#### 7. フローサイトメトリー

単離した細胞をそれぞれ蛍光標識した抗体 {anti-CD45 (clone; 30-F11), anti-CD4 (clone; GK1.5), anti-CD11b (clone; ICRF44), anti-Gr-1 (clone; RB6-8C5), anti-F4/80 (clone; BM8)} の混合液で 30 分間染色した。IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A の染色に際して、細胞を PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) と Ionomycin で 4 時間刺激したのち Cato-Fast Fix/Perm Solution (BioLegend, San Diego, CA) で固定、透過処理を行い anti-IFN- $\gamma$  (clone; XMG-12), anti-IL-4 (clone; 11B11), anti-IL-17A (clone; TC11-18H10.1) の混合液を用いて 30 分間染色した。また、Foxp3 の染色は Foxp3 Fix/Perm buffer (BioLegend) で固定、透過処理を行い anti-Foxp3 (clone; 150D) を用いて染色した。全ての抗体は BioLegend から購入した。染色した細胞は洗浄したのち、LSR Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) あるいは FACSAria (BD Biosciences) で測定し、FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) で解析した。

## 8. Real-time PCR

膝下リンパ節および関節組織からの mRNA 抽出には RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用した。全量 1  $\mu$ g の RNA template を ReverTraAce qPCR RT Master Mix (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) で転写し cDNA を得た。Real-time PCR は KAPA SYBR Fast qPCR kit (Kappa Biosystems, Woburn, MA) を使用し、製造元のプロトコルに従って行った。PCR は 95°C5 分 (Initial desaturation) の後、95°C30 秒 (denaturation)、60°C30 秒 (annealing)、72°C60 秒 (extension) の反応条件で行った。使用したプライマーは Table 1 に示す。

**Table 1. Primers used in this study.**

Target mRNA	Forward primer	Reverse primer
CCL17	TGAGGTCACCTTCAGATGCTGC	ACCAATCTGATGGCCTTCTTC
CCL22	TCTGATGCAGGTCCCTATGGT	TTATGGAGTAGCTTCTTCAC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
IL-17A	CAGCAGCGATCATCCCTCAAAG	CAGGACCAGGATCTCTTGCTG
IL-4	CAGCTAGTTGTCATCCTGGTCTTC	GCCGATGATGTCTCTCAAGTGC
Foxp3	CTACAGTGCCCCTAGTCATGGTG	AGAAACTCTTCTGGCTCCTCGAA
GM-CSF	TTTACTTTTCCTGGGCATTG	TAGCTGGCTGTCATGTTCAA

それぞれの mRNA 発現は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて GAPDH mRNA で標準化し定量した。

## 9. Hematoxylin & Eosin 染色

関節組織を採取し、4%PFA 含有 PBS で一晩固定したのち 10%EDTA 含有 PBS で 2 日間脱灰処理を行う。その後、Paraffin を用いて包埋し、8  $\mu$ m で薄切した切片を Hematoxylin (Fujifilm, Osaka, Japan) と Eosin (Fujifilm, Osaka, Japan) を使用して染色したのち Pathomount (Fujifilm, Osaka, Japan) でマウントし、Biozero BZ-X800 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

## 10. 免疫染色

膝下リンパ節を採取し、4% PFA 含有 PBS で一晩固定し、OCT compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) を用いて凍結包埋した。その後、切片を 6  $\mu$ m の厚さで薄切し、2% BSA (bovine serum

albumin) & 1% donkey serum を含む PBS でブロッキングした。次に、切片を goat anti-CCL22 (R&D system, Minneapolis, MN) と biotinylated hamster anti-CD11c (clone; N418, BioLegend) もしくは rat anti-IL-17A (clone; TC11-8H4, BioLegend) とともに 4 °C で一晩インキュベートした。洗浄後、切片を Alexa Fluor 488 標識 donkey anti-goat IgG (Thermo Fisher Scientific) と DAPI (Dojindo, Kumamoto, Japan) および Alexa Fluor 555 標識 streptavidin (Thermo Fischer Scientific) あるいは Alexa Fluor 555 標識 goat anti-rat IgG を添加し 2 時間インキュベートした。最後に、切片を Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Denmark) でマウントし、共焦点レーザー走査顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。

## 11. ELISA

採取した関節組織を Tissue Extraction Regent I (Invitrogen, Camarillo, CA) で処理し、関節組織抽出液を得た。得られた関節組織抽出液を用いて IIL-6, IL-17A, IL-4, IL-10, GM-CSF, CCL17, CCL22 の ELISA を行った。IIL-6, IL-17A, IL-4, IL-10, GM-CSF の ELISA キットは BioLegend から購入し、CCL17, CCL22 の ELISA キットは R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。

## 12. 統計処理

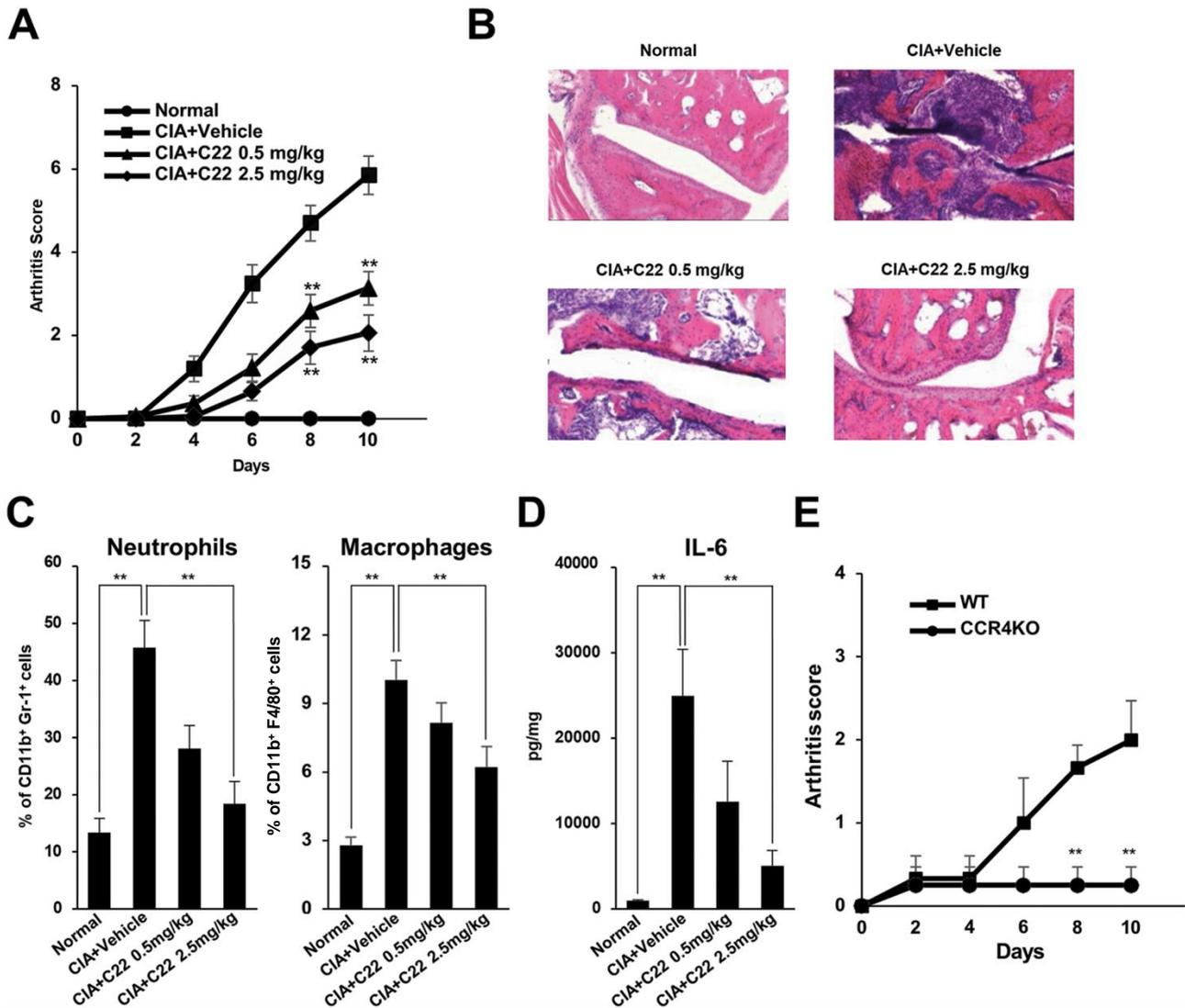
得られた実験値は、平均値±標準誤差で示した。統計的有意性の判定には、2 群間の場合は Student-t 検定を用い、多群間の場合は分散分析を行った後、Tukey-Kramer 法により検定した。P < 0.05、P < 0.01 で有意差ありとした。

## II. 実験結果

### 1. 関節リウマチマウスモデルにおける CCR4 の役割

関節リウマチは、関節部における炎症を主徴とする疾患である。そのマウスモデルには、マウス膝関節部に存在するコラーゲンを抗原とした強力な免疫を誘導することで発症するコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) が汎用されている。関節リウマチにおける CCR4 の機能解析を行うため、CIA に対する感受性が高いことで知られる DBA/1 マウスおよび CCR4 特異的阻害薬である Compound 22 を使用し、CIA 病態および炎症関連細胞、炎症性サイトカインについて解析を行った[18]。CIA 発症時に確認される関節部を中心とした腫脹や発赤は、Compound 22 の投与により軽減されており、その推移は用量依存的である可能性が示された (Fig. 1A)。また、H&E (hematoxylin & eosin) 染色を用いた関節部の組織学的評価では CIA の発症に伴って滑膜組織の破壊と炎症性細胞の浸潤が確認された。一方で、Compound 22 による処置を行ったマウスでは滑膜組織の破壊と炎症性細胞の浸潤の軽減が確認された (Fig. 1B)。また、代表的な炎症性免疫細胞の関節への浸潤を解析したところ、CIA の発症に伴って好中球とマクロファージの浸潤量は著しく増加し、Compound 22 の投与によって用量依存的に減少することが明らかとなった (Fig. 1C)。加えて、関節部で産生される IL-6 量についても同様に、CIA の発症によって増加し Compound 22 の投与によって減少した (Fig. 1D)。

また、CIA における CCR4 の役割を裏付けるため、遺伝的背景の異なる C57BL/6 マウスおよび、その CCR4 欠損マウスを使用して病態評価を行った。その結果、DBA/1 マウスと比較して軽微な病態ではあるが CIA の発症が確認されたことに加え、CCR4 欠損マウスでは関節炎症状が僅かに軽減した (Fig. 1E)。



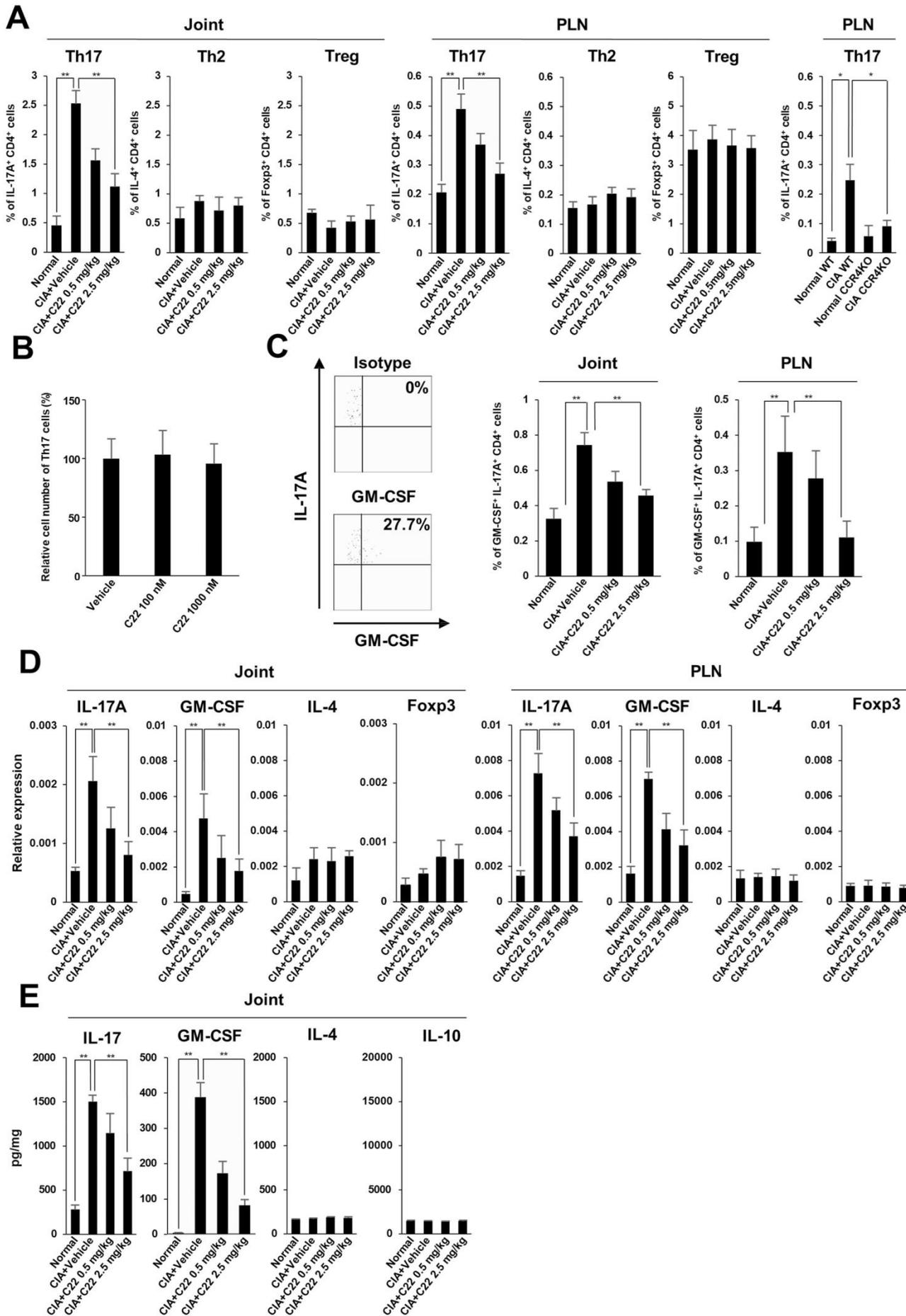
**Fig. 1 Role of CCR4 in the development of CIA.**

(A–D) CIA was induced by intra-dermal immunization of DBA/1J mice with type II collagen. (A) Arthritis score. The severity score of CIA was calculated based on erythema, paw swelling and joint rigidity, and monitored every other day. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of eight independent experiments. (B) HE staining of ankle joints. Representative results from at least three independent experiments are shown. (C) Flow cytometry. Cells were isolated from joint tissues and analyzed for CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> neutrophils and F4/80<sup>+</sup> macrophages using the CD45 gate. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three to four independent experiments. (D) IL-6 levels in joint tissue extracts were measured by ELISA. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. (E) Arthritis score. CIA was induced by intradermal immunization with type II collagen in WT and CCR4-deficient C57BL/6J mice. The severity score of CIA was calculated based on erythema, paw swelling and joint rigidity, and monitored every other day. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of five independent experiments. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . C22; compound 22.

## 2. 関節炎症部および所属リンパ節へのヘルパーT細胞集積に対するCCR4の役割

CIAにおけるCCR4の働きについて、より詳細な解析を行うためCCR4の発現が知られているTh17、Th2、Tregの関節炎症部および所属リンパ節における定量的解析を行った。その結果、IL-17Aを産生するTh17は関節炎症部および所属リンパ節のいずれにおいてもCIAの発症に伴って増加した一方で、Compound 22の投与によって用量依存的な減少が確認された (Fig. 2A)。しかし、Th2とTregは関節炎症部および所属リンパ節ともにCIAの発症に伴う変化は認められず、Compound 22の投与による影響も確認されなかった (Fig. 2A)。また、C57BL/6マウスを用いた場合でも、CIA発症時の所属リンパ節におけるTh17増加量は、野生型マウスと比較しCCR4欠損マウスで減少していることが明らかとなった (Fig. 2A)。また、Compound 22の投与がTh17の生存機能に直接影響を及ぼす可能性を検討するため、*in vitro*を用いてCompound 22を培地に添加した場合のTh17生存率を解析した。その結果、Compound 22を100 nMで添加した場合と1000 nMで添加した場合のいずれにおいても、Th17の生存率に対する影響は認められなかった (Fig. 2B)。

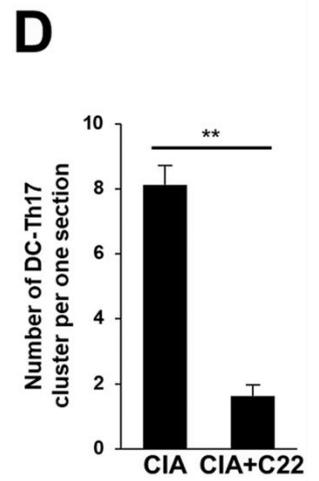
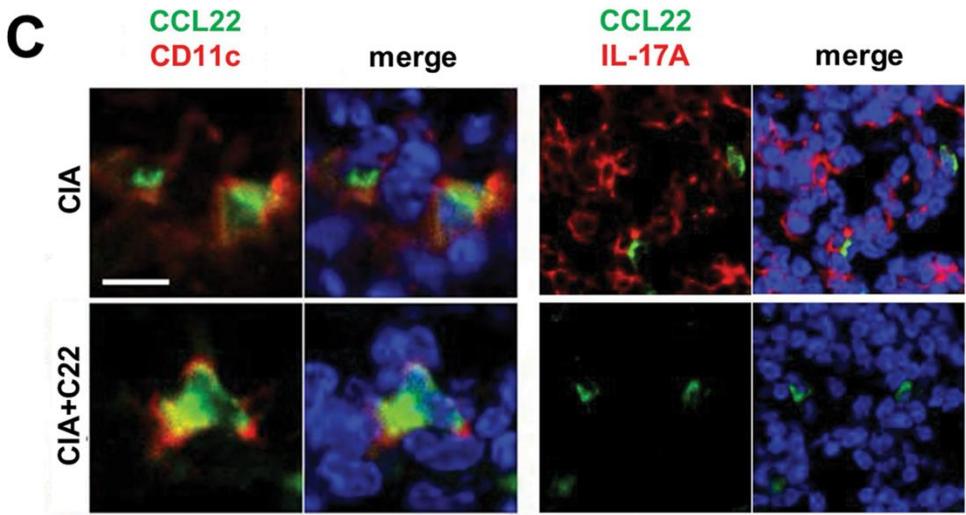
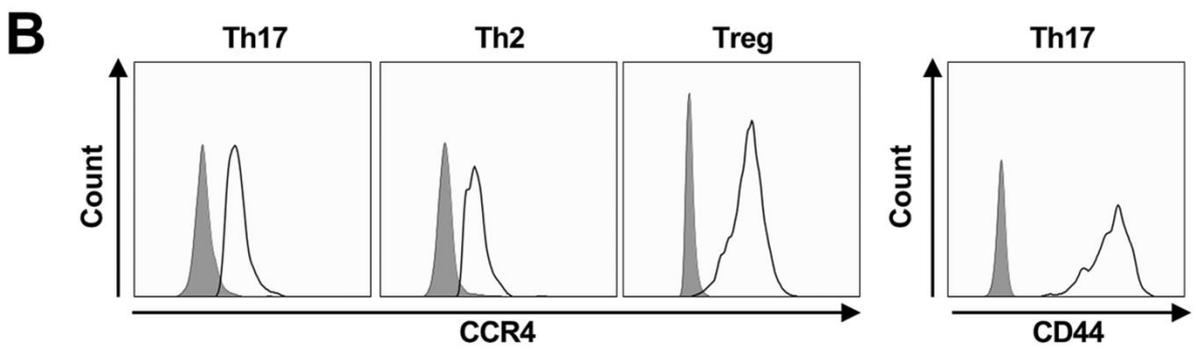
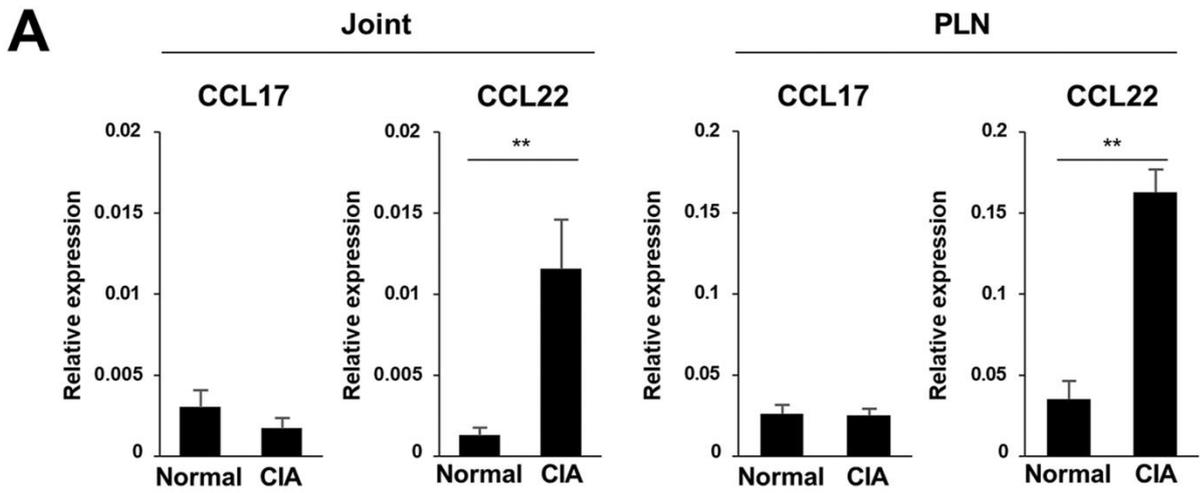
近年の研究において、Th17は炎症環境下でGM-CSF産性能を獲得し、より強い炎症誘導細胞へと変化することが報告されている。そこで、CIAを誘導したDBA/1マウスの関節炎症部および所属リンパ節におけるGM-CSF産生Th17量を解析した。その結果、GM-CSF産生Th17は、いずれにおいてもCIAの発症に伴って増加し、Compound 22の投与によって用量依存的に減少した。また、関節炎症部と所属リンパ節において各種ヘルパーT細胞サブセットが産生するサイトカインを、定量的reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法で解析した。その結果、いずれの組織中でもCIAの発症に伴ってIL-17AとGM-CSFのmRNAは増加した一方でIL-4およびforehead box p3 (Foxp3)のmRNAは変化しなかった。また、Compound 22の投与によってIL-17AおよびGM-CSFの messenger ribonucleic acid (mRNA) は用量依存的に減少した。さらに、関節炎症部におけるIL-17A、GM-CSF、IL-4、IL-10の産生量をELISA法を用いて定量した。その結果、CIAの発症に伴いIL-17A、GM-CSFは増加した一方で、IL-4、IL-10は増加しなかった。また、Compound 22の投与によってIL-17AおよびGM-CSFの産生量は大きく減少した。



**Fig. 2 Effect of compound 22 on accumulation of various T cell subsets in the inflamed joints and regional LNs.** (A) Flow cytometry. Cells were isolated from joint tissues and popliteal LNs of DBA/1J mice and analyzed for IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 cells, IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 cells, and Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg cells using the CD45 gate. Cells were also isolated from popliteal LNs of control and CIA-induced wild-type and CCR4-deficient C57BL/6J mice and analyzed for IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 cells using the CD45 gate. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three to five independent experiments. (B) Effect of compound 22 on Th17 cells in vitro. CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from the regional LNs of CIA mice on day 10 after the last immunization and cultured for 24 h with or without compound 22 at 100 or 1000 nM. The relative cell numbers of Th17 cells in the total viable CD4<sup>+</sup> T cells were determined by flow cytometry. (C) GM-CSF expression in CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> Th17 cells. This was analyzed by flow cytometry. Representative results from at least three independent experiments are shown. (D) The mRNA expression. Real-time RT-PCR assays were performed to determine the mRNA levels of IL-4, IL-17A, GM-CSF, and Foxp3 in the joint tissues and popliteal LNs of DBA/1J mice. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three to five independent experiments. (E) ELISA. ELISA assays were performed to determine the protein levels of IL-4, IL-17A, GM-CSF, and IL-10 in joint tissue extracts of DBA/1J mice. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . C22; compound 22.

### 3. DC-Th17 クラスタ形成における CCR4-CCL22 系の役割

これまでに著者らの研究グループは、乾癬およびメラノーマモデルマウスを使用した研究において、所属リンパ節の DC が多量の CCL22 を産生し、CCR4 を発現するメモリーTh17 を呼び寄せることで DC-Th17 間の相互作用を誘導し、Th17 を増殖させることを明らかとした[19]。そのため、CIA を誘導した DBA/1 マウスの所属リンパ節においても、DC による CCL22 の産生と DC-Th17 クラスタの形成が生じているか検討した。はじめに、関節炎症部および所属リンパ節における CCR4 リガンドの発現を解析したところ、いずれの組織においても CIA の発症に伴って CCL22 の発現が増加する一方で、CCL17 の発現に変化は見られなかった。また、所属リンパ節から単離した Th17 についてフローサイトメトリー法を用いて解析したところ、CCR4 およびメモリーマーカーである CD44 の発現が確認された。加えて、Th2、Treg についても同様に CCR4 の発現を確認した。蛍光免疫染色を用いた解析によってリンパ節における CCL22 の主要な産生細胞は CD11c<sup>+</sup>DC であること、その周囲に IL-17A 産生細胞がクラスタを形成していることを明らかとした。また、形成されたクラスタ数を計数した結果、Compound 22 の投与によって減少することが明らかとなった。



**Fig. 3 Role of the CCR4-CCL22 axis on the formation of DCs-Th17 clusters.**

(A) The mRNA expression. Real-time RT-PCR was performed to determine the levels of mRNA expression of CCL17 and CCL22 in joint tissues and popliteal LNs of DBA/1J mice. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of four independent experiments. (B) Flow cytometry. Cells were isolated from popliteal LNs of CIA-induced DBA/1J mice. IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th17 cells, IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Th2 cells, and Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg cells were analyzed for the surface expression of CCR4 and CD44 by flow cytometry. Representative results from at least three independent experiments are shown. (C) Fluorescent immunohistochemistry. CIA was induced in DBA/1J mice by intra-dermal immunization of type II chicken collagen. DBA/1J mice were also treated with vehicle only or with compound 22. Popliteal LNs were isolated from 10 days after the last immunization. The frozen sections were double stained for CCL22 (green) and CD11c or IL-17A (red). Representative results from at least three independent experiments are shown. (D) The effect of compound 22 on DC-Th17 cell clusters. CIA-induced DBA/1J mice were treated without or with compound 22. DC-Th17 cell clusters per one LN section were counted. The data are expressed as mean  $\pm$  SE of three independent experiments. \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . C22; compound 22.

### Ⅲ. 考察および小括

本章では、関節リウマチモデルである CIA と C57BL/6 マウスおよび、DBA/1 マウスの異なる系統のマウスにおいて、CCR4 は所属リンパ節における Th17 の増殖と関節炎症部への遊走を介して関節リウマチ病態の増悪に寄与する因子であることを明らかとした。また、関節リウマチモデルマウスの所属リンパ節で確認された CCL22<sup>+</sup>DC とメモリーTh17 が CCR4 を介してクラスターを形成する現象は、これまでにメラノーマ担がんモデルマウスおよび乾癬モデルマウスの所属リンパ節でも確認されている [16, 20]。その一方で、Th17 に発現するもう一つの代表的なケモカイン受容体である CCR6 は、関節リウマチモデルマウスにおいて滑膜組織へと Th17 を遊走することで疾患の形成に寄与することが報告されている [11, 21]。しかし、著者らの研究グループが行った研究においてメラノーマ担がんモデルマウスの所属リンパ節では CCR6 を介した Th17 の増殖は確認されなかった。これらの結果から、関節炎症部などの炎症組織への Th17 遊走に関しては CCR4 と CCR6 が協力的に機能する一方で、所属リンパ節における DC-Th17 クラスター形成のような Th17 の増殖には CCR4 のみが選択的に関わっていることが示唆された。

CCR4 の欠損によって所属リンパ節および、関節炎症部の Th17 は野生型マウスと比較し顕著に減少した一方で、CCR4 を発現する他のヘルパーT 細胞サブセットである Th2、Treg は、いずれも所属リンパ節、関節炎症部ともに CIA の発症に伴う増減は確認されなかった。また、CCR4 の欠損による影響も認められなかった。このように CCR4 が Th17 の増殖にのみ寄与することは、前述したメラノーマ担がんモデルマウスと乾癬モデルマウスにおいても確認されていた [16, 20]。加えて、近年膀胱がん細胞を皮下投与した担がんモデルマウスや、ovalbumin (OVA)+アジュバントによるワクチン接種を行ったマウス、dextran sodium sulfate (DSS) を使用した大腸炎モデルマウスのリンパ節において、CCL22<sup>+</sup>DC が Treg の増殖を担うことも新たに報告されている [22]。これらの知見を総括すると、CCR4-CCL22 系を介した特定の CCR4 発現ヘルパーT 細胞サブセットの増殖は、マウスや疾患モデル毎に異なる反応性を示す可能性が考えられる。

現在までに数多くの非臨床試験において、IL-17A の機能を遺伝的欠損や抗体を用いて阻害した場合には、関節リウマチモデルマウスの関節炎症状が著しく低減することが報告されてきた [23, 24]。さらに IL-17A を標的とした、いくつかの臨床試験も行われている [25, 26]。しかし、secukinumab や

brodalumab、CNTO6785などの human anti-IL-17A monoclonal antibody を用いた第II相、第III相試験において、これらの医薬品は関節リウマチ患者に対して十分な治療効果をもたらす事ができなかった[25, 26]。Th17はIL-17Aに加えてGM-CSFを産生することが知られており、SKGマウスと呼ばれる自己免疫性関節炎を自然発症する系統のマウスを用いた研究では、GM-CSFを産生するTh17が所属リンパ節と関節炎症部で増加することが報告されている [27]。GM-CSFは主に好中球やマクロファージなどの自然免疫系に属する炎症性細胞の分化と活性化を促すサイトカインであり、自己免疫性関節炎の発症と増悪に中心的な役割を持つことが報告されている[27, 28]。さらに近年の非臨床研究において、GM-CSFはTh17依存的な炎症性疾患であるCIAやexperimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)の効果的な治療標的として注目を集めている[27, 29, 30]。加えてmavrilimumabやotilimab、namilumabなどのGM-CSFを標的とした抗体医薬品が関節リウマチ患者に対して顕著な治療効果を示したことを報告する臨床研究も存在している[31-33]。本研究ではCCR4選択的阻害薬であるCompound 22の投与によって、所属リンパ節および関節炎症部に存在するGM-CSF産生能を持つものも含めたTh17全体の顕著な減少と、関節リウマチ病態の大幅な改善が認められた。また、IL-17AおよびGM-CSFのmRNAおよびタンパクレベルでの減少も確認された。これらの結果は、CCR4が関節リウマチをなどのTh17依存的な炎症性疾患において有用な新規治療標的となる可能性を示している。しかし、CCR4はTh2やTregなど他のヘルパーT細胞サブセットにも発現していることから、CCR4を阻害することは、これらのヘルパーT細胞に対しても何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。特にTregは免疫寛容を担う重要な細胞であるため、深刻な副作用につながる可能性を十分に考慮しながら用量設定を行う必要があると考えられる。

以上より、CCR4はTh17依存的な炎症性疾患の一種である関節リウマチにおいて、病変部所属リンパ節におけるDC-Th17クラスターの形成を促進しTh17の増殖に寄与すること。また、Th17の関節炎症部への遊走にも寄与することで、Th17を関節組織へと過剰に供給することで関節炎症状を増悪させる因子であることを明らかとした。

## 第二章 炎症性うつ様病態における CCR4 の機能解析

うつ病は代表的な精神疾患の一種であり、その成因として様々な仮説が存在している。特に代表的なモノアミン仮説は、セロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミン神経伝達物質の減少によって抑うつ症状が引き起こされるという仮説であり、現在流通しているうつ病治療薬の多くがこの仮説に基づいて開発されたものとなっている。しかし、うつ病患者のおよそ 30% に対しては、これらの治療薬が十分な治療効果をもたらさないことも報告されている[34]。また、既存の医薬品が効果を示さないノンレスポonderに対して行われた臨床研究において、炎症性サイトカインに対する抗体医薬品が治療効果を示すことも報告されていることから、既存の治療薬とは異なる新たな作用機序をもつ医薬品の開発が求められている[35]。

脳や脊髄といった中枢神経系は、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) によって末梢組織と区切られており、多くの物質や細胞の行き来が妨げられている。そのため、これらの組織は長らく全身の免疫系からは隔絶された組織であると解釈され、免疫系との関連に着目した研究が十分に行われていなかった。しかし、近年の研究によって全身性に誘導された炎症環境下において、BBB を構築しているタイトジャンクションの発現が低下し、BBB の透過性が亢進することで、通常確認されないタンパクの漏出が生じることが明らかとなった[36]。また、脳を包む髄膜内に、脳実質内で生じた高分子や抗原の排出を担うリンパ管の存在も報告されたことから、炎症などの特定の条件下では中枢神経系と末梢組織との間で物質や細胞の行き来が行われる可能性が示された[37]。さらに、炎症時に全身で誘導された炎症性サイトカインは、脳内の indoleamine 2,3-deoxygenase-1 (IDO-1) の発現を誘導することが知られている。IDO-1 はセロトニン合成の素材となる L-トリプトファンから神経障害作用を持つキヌレニン合成することで、セロトニンの合成阻害および神経障害を介してうつ病症状を引き起こす病原因子である[38]。これらの先行研究において、全身性の免疫応答が中枢神経系に影響を与えることを示す知見が数多く報告されたことで、両者の隔たりは消え、中枢神経系の関与する免疫反応は神経免疫と呼ばれる新たな研究領域として確立された。

現在、うつ病患者の循環血液中および脳脊髄液中では、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や IL-6、IL-17A などの炎症性サイトカインが増加していることが報告されている[39]。加えて、これらのパラメーターはうつ病症状との相関を示すことも知られており、炎症性サイトカインの発現制御機構は新規治療標

的として注目を集めている。ヘルパーT細胞サブセットである Th17 細胞は主に IL-17A や GM-CSF を産生することで多くの炎症性疾患の発症に関与する。また、Th17 細胞が産生するサイトカインは自然免疫系細胞の活性化や分化にも関与することが報告されている。一方、Treg は抑制性サイトカインである IL-10 や transforming growth factor (TGF)- $\beta$  を産生することで炎症反応を抑制する[40]。実際に、近年行われた研究によって、うつ病モデルマウスおよびうつ病患者の循環血液中と脳組織内では Th17 が増加することが明らかとされた[41]。また、Treg を除去したうつ病モデルマウスでは、うつ様症状が増悪することも報告されている[41]。これらの知見から、Th17 と Treg によって制御される炎症は全身性であるか脳局所性うつ病の疾患形成に寄与する可能性が示されている。

Th17 や Treg の共通の細胞遊走因子受容体 CCR4 のリガンドである CCL17 ならびに CCL22 はうつ病患者の末梢血中で増加することが報告されている[42]。そこで本章では、神経免疫系における炎症反応である炎症誘発性うつ病の疾患形成において、CCR4 を有する Th17 および Treg が関わる炎症制御機構において CCR4 がどのような役割を果たしているか明らかとするため研究を行った。

## I. 実験方法

### 1. 実験動物

C57BL/6J マウス (8 週齢、雄) は清水実験材料より購入した。また、CCR4 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) は Jackson Laboratory より購入した。実験動物には固形資料および水道水を摂取させ、約 24°C で 12 時間の明暗サイクルに保持された SPF 環境下の部屋で飼育した。なお、動物実験に関しては研究計画を近畿大学動物実験委員会に申請し、承認を得たうえで近畿大学実験動物規定に基づいて行った。

### 2. LPS 誘発性うつ病モデルマウスの作製

LPS (lipopolysaccharide; Sigma-Aldrich) を 1 mg/kg の投与量でマウスに腹腔内投与することでうつ病モデルマウスを作製した。

### 3. 行動試験

LPS の投与から 24 時間経過した時点でのうつ様行動を評価するため、強制水泳試験を行った。強制水泳試験では、マウスを 6 分間足のつかない水上に浮かべ、最後の 4 分間の無動時間を計測した。また、平常時の自発運動量を測定するためオープンフィールドテストを行った。オープンフィールドテストでは直径 60 cm の円形フィールド上に 5 分間マウスを入れ、13 cm 間隔で照射されているレーザーが遮られた回数を計測した。

### 4. Compound 22 の投与スケジュール

Compound 22 は LPS 投与直前に 2.5 mg/kg の投与量で腹腔内投与した。

### 5. 細胞の単離

脳組織は PBS を用いて灌流処置をしたのち嗅球および小脳を取り除いてから Accutase (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) 内で細かく刻み、37°C で 1 時間混和しながらインキュベートした。その後 70  $\mu\text{m}$  のセルストレーナーを通し、25% Percoll (Cytiva, Marlborough, MA, USA) を用いて免疫細胞分画を分取し単細胞懸濁液を得た。

## 6. フローサイトメトリー

単離した細胞をそれぞれ蛍光標識した抗体 {anti-CD45 (clone; 30-F11), anti-CD4 (clone; GK1.5), anti-CD11b (clone; ICRF44), anti-CD86 (clone; GL-1), anti-CD206 (clone; C068C2)} の混合液で 30 分間染色した。IL-17A の染色に際して、細胞を PMA と Ionomycin で 4 時間刺激したのち Cato-Fast Fix/Perm Solution (BioLegend) で固定、透過処理を行い anti-IL-17A (clone; TC11-18H10.1) の混合液を用いて 30 分間染色した。また、Foxp3 の染色は Foxp3 Fix/Perm buffer (BioLegend) で固定、透過処理を行い anti-Foxp3 (clone; 150D) を用いて染色した。全ての抗体は BioLegend から購入した。染色した細胞は洗浄したのち、LSR Fortessa あるいは FACSAria で測定し、FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) で解析した。

## 7. Real-time PCR

膝下リンパ節および関節組織からの mRNA 抽出には RNAiso Plus を使用した。全量 1  $\mu$ g の RNA template を ReverTraAce qPCR RT Master Mix で転写し cDNA を得た。Real-time PCR は KAPA SYBR Fast qPCR kit を使用し、製造元のプロトコルに従って行った。PCR は 95°C5 分 (Initial desaturation) の後、95°C 30 秒 (denaturation)、60°C30 秒 (annealing)、72°C60 秒 (extension) の反応条件で行った。使用したプライマーは Table 2 に示す。

**Table 2. Primers used in this study.**

Target mRNA	Forward primer	Reverse primer
CCL17	TACCATGAGGTCACCTTCAGATGC	GCACTCTCGGCCTACATTGG
CCL22	CTCTGCCATCACGTTTAGTGAA	GACGGTTATCAAAACAACGCC
GAPDH	TGACCTCAACTACATGGTCTACA	CTTCCCATTCTCGGCCTTG
IFN- $\gamma$	CTCAAGTGGCATAGATGT	GAGATAATCTGGCTCTGCAGGATT
IL-4	CAGCTAGTTGTCATCCTGGTCTTC	GCCGATGATGTCTCTCAAGTGA
TNF- $\alpha$	CAGCTAGTTGTCATCCTGGTCTTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
iNOS	AACCCCTTGCTGTTCTCAGCC	GTGGGACGGGTCGATGTCACATGC
Arg1	ACATCACAGAAGAAATTTACAAGACAG	TGCCGTGTTACAGTACTCTTC

それぞれの mRNA 発現は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて GAPDH mRNA で標準化し定量した。

## 8. 免疫染色

脳組織を採取し、4% PFA 含有 PBS で一晩固定し、20%スクロース水溶液で脱水したのち OCT compound を用いて凍結包埋した。その後、切片を 6  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切し、2% BSA & 1% donkey serum を含む PBS でブロッキングした。次に、切片を rabbit anti-CCL17 (Abcam, Cambridge, UK) と goat anti-CD31 (R&D systems, Inc.) または mouse anti-GFAP (BioLegend)、mouse anti-Iba1 (GenTex, Inc., Irvine, CA)、chicken anti-MAP2 (BioLegend) とともに 4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。洗浄後、切片を Alexa Fluor 568 標識 goat anti-mouse IgG (Abcam)、Alexa Fluor 647 標識 donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、Alexa Fluor 647 標識 goat anti-chickenIgY (Abcam)、DAPI (Nacalai Tesque) を適宜添加し 2 時間インキュベートした。最後に、切片を Fluorescence Mounting Medium でマウントし、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

## 9. 統計処理

得られた実験値は、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計的有意性の判定には、2 群間の場合は Student-t 検定を用い、多群間の場合は分散分析を行った後、Tukey-Kramer 法により検定した。P < 0.05、P < 0.01 で有意差ありとした。

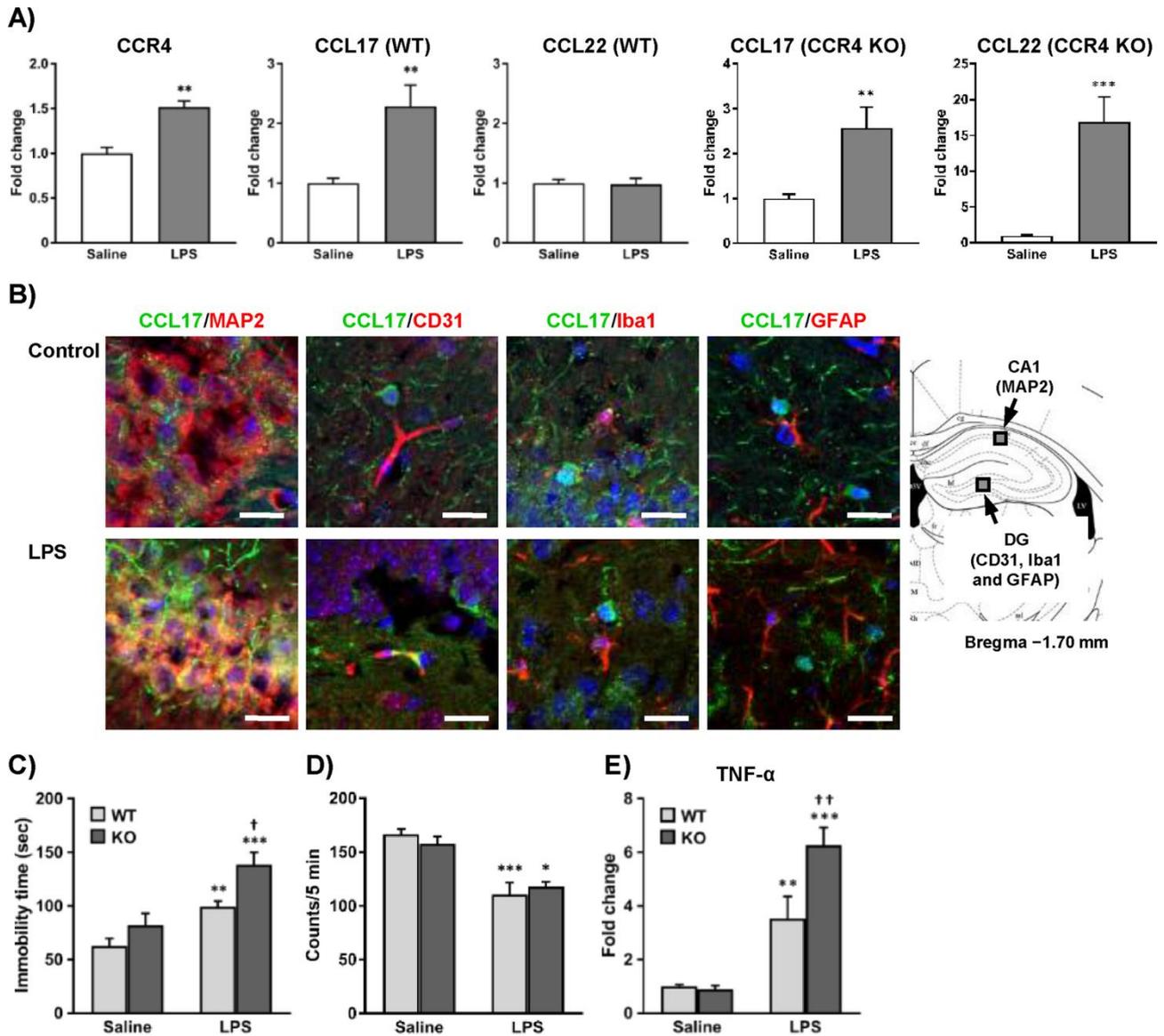
## II. 実験結果

### 1. LPS 誘発性うつ様病態における CCR4 の機能解析

うつ病はセロトニンの供給が滞ることなどで生じる気分障害を中心とした疾患である。その発症にはストレスなどの環境要因以外に、炎症病態形成時の炎症性サイトカインや、それによって発現誘導されるIDO-1によるセロトニン供給量の減少が特に重要な役割を担っている。そこで、炎症誘発性うつ病モデルとして汎用されており、全身性炎症の誘導と、それに続く脳内IDO-1発現の増加やセロトニン産生の減少が引き起こされるLPS誘発性うつ病モデルマウスを使用し研究を行った。

はじめに、LPS投与時に生じる脳内での免疫反応にCCR4が関連しているか検討するため、脳の領域の中でも、脳常在性の免疫細胞であるミクログリアの活性化や組織構造の萎縮などの変化が特に顕著である海馬組織を用いて、CCR4関連遺伝子の発現変化をRT-PCR法を使用し解析した。その結果、CCR4とそのリガンドであるCCL17のmRNAが増加していた一方で、もう一つのリガンドであるCCL22のmRNA量は変化が見られなかった。しかし、CCR4欠損マウスに対して同様に、LPSを投与した場合には野生型マウスで確認されなかった海馬におけるCCL22 mRNAの発現増加が確認された。CCL17は炎症組織において血管内皮から産生され、CCR4発現細胞の血管外への浸潤に寄与することが報告されている。そこで、蛍光免疫染色を用いてCCL17産生細胞の同定を試みた。LPS投与時の海馬領域を中心とした切片において、CCL17はニューロンマーカーであるmicrotubule-associated protein 2 (MAP2) および内皮細胞マーカーであるCD31との共染色が確認された一方で、ミクログリアやマクロファージマーカーであるionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) とアストロサイトマーカーのglia fibrillary acidic protein (GFAP) との共染色は確認されなかった。

うつ症状におけるCCR4の役割を明らかとするため、CCR4の欠損によるうつ様行動に対する影響を解析した。その結果、抑うつ症状の指標である強制水泳試験における無動時間はCCR4欠損マウスにおいて野生型マウスと比較し、延長していることが明らかとなった。その一方で、自発運動量に対する影響は認められなかった。また、炎症マーカーであるTNF- $\alpha$ のmRNA量は、LPSを投与したCCR4欠損マウスの海馬で特に顕著に増加していることが明らかとなった。



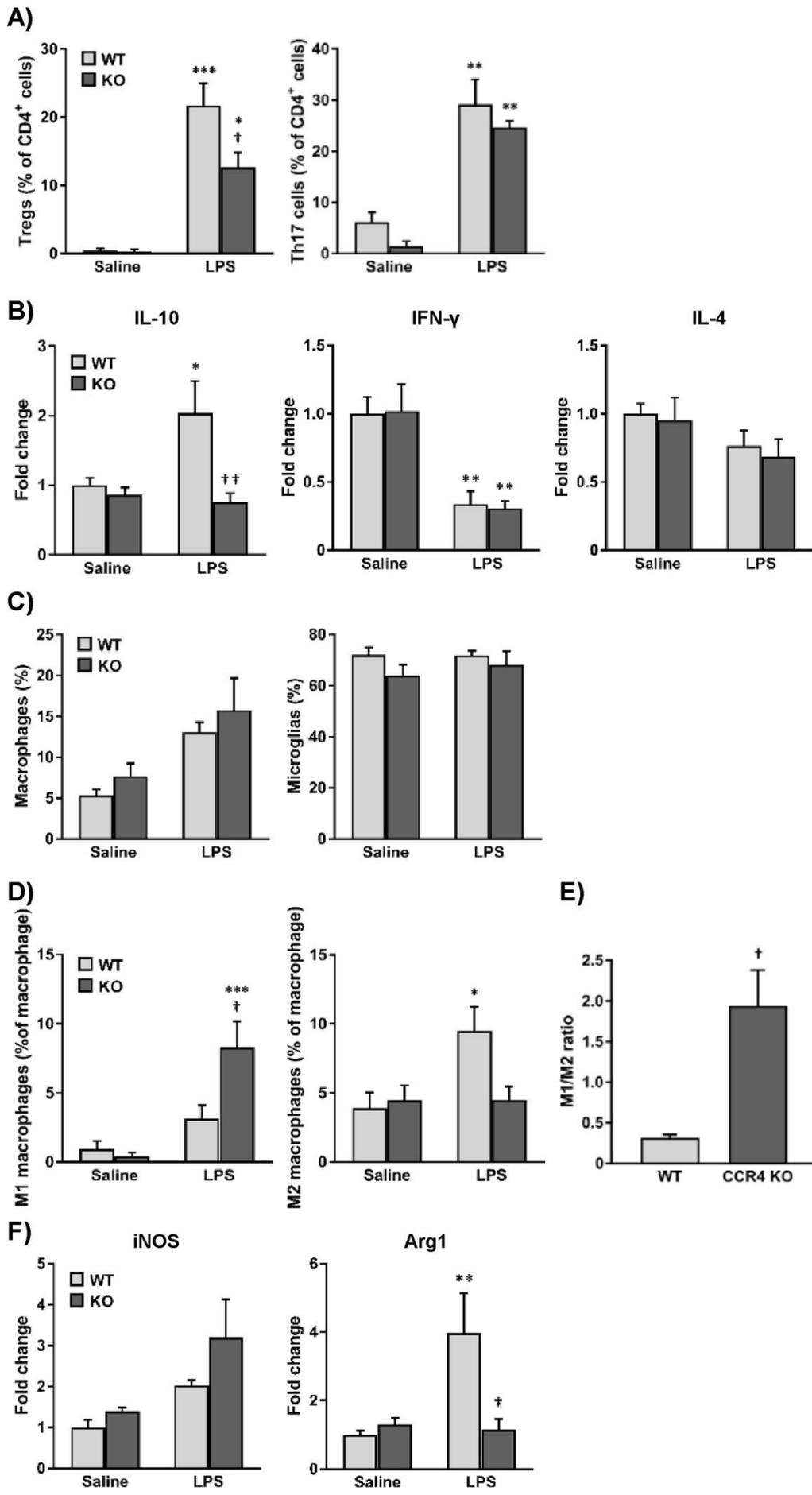
**Fig. 4 Involvement of CCR4 in the pathogenesis of LPS-induced depressive-like behavior.**

(A) Gene expression of CCR4, CCL17, and CCL22 in the hippocampus of LPS-injected wild-type (WT) and CCR4-deficient (KO) mice 12 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS. (B) Double immunostaining of CCL17 with the neuron marker MAP2, the endothelial cell marker CD31, the microglia/macrophage marker Iba1, or the astrocyte marker GFAP in the hippocampus of control and LPS-injected WT mice (*left*). Schematic diagram taken from the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin.<sup>16</sup> Images were obtained from gray areas (*right*). Data are representative experiments. Scale bar, 20  $\mu$ m. (C,D) Immobility time in the forced swim test (C) and spontaneous locomotor activity (D) of WT and CCR4 KO mice 24 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS. (E) Gene expression of TNF- $\alpha$  in the hippocampus of LPS-injected WT and CCR4 KO mice. Values indicate the means  $\pm$  SEM (A: n = 3, C: n = 7–11, D: n = 5–6, E: n = 6–7). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. Saline. † $P$  < 0.05, †† $P$  < 0.01 vs. WT.

## 2. LPS 誘発性うつ病マウスの脳へ浸潤する免疫細胞の解析

炎症制御に関与することが知られる免疫細胞のうち、Treg と Th17 の脳内への浸潤に対する CCR4 の寄与を検討するため、フローサイトメトリーを用いた解析を行った。脳内へと浸潤した Treg と Th17 はいずれも、LPS を投与した野生型マウスで増加した。Th17 の浸潤量は CCR4 欠損マウスでも減少していなかった一方で、Treg の浸潤量は減少していた。

また、海馬組織中の IL-10 mRNA を RT-PCR を用いて定量的に解析したところ、Treg と同様に野生型マウスでは LPS の投与によって増加した一方で、CCR4 欠損マウスでは増加が認められなかった。加えて Th1 マーカーの IFN- $\gamma$ 、Th2 マーカーの IL-4 についても RT-PCR を用いて解析したところ、IFN- $\gamma$  mRNA は野生型マウスおよび CCR4 欠損マウスのいずれにおいても LPS の投与によって減少した一方で、IL-4 mRNA は発現量に変化が認められなかった。ミクログリアとマクロファージは炎症性サイトカインの産生を介してうつ病の発症に寄与する代表的な細胞として知られている。そこで、LPS の投与による脳内ミクログリア、マクロファージ量の変化をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、LPS の投与によって脳内へと浸潤するマクロファージ量が増加傾向にあることが確認された。しかし、ミクログリア量に変化は認められなかった。マクロファージはその機能によって炎症誘導性の M1 マクロファージと炎症抑制性の M2 マクロファージに分類される。そこで、それぞれのサブセットについてフローサイトメトリーを用いて詳細に解析した。その結果、M1 マクロファージは LPS を投与した際に CCR4 欠損マウスで著しく増加した一方で、M2 マクロファージは CCR4 欠損マウスで減少した。また、M1/M2 比を算出した結果 CCR4 欠損マウスで顕著に増加した。さらに、M1 マクロファージと M2 マクロファージそれぞれのマーカーである inducible nitric oxide synthase (iNOS) および Arginase1 の mRNA 量を海馬組織中で解析したところ、iNOS mRNA 量は CCR4 欠損マウスで増加した一方で Arginase1 は減少した。

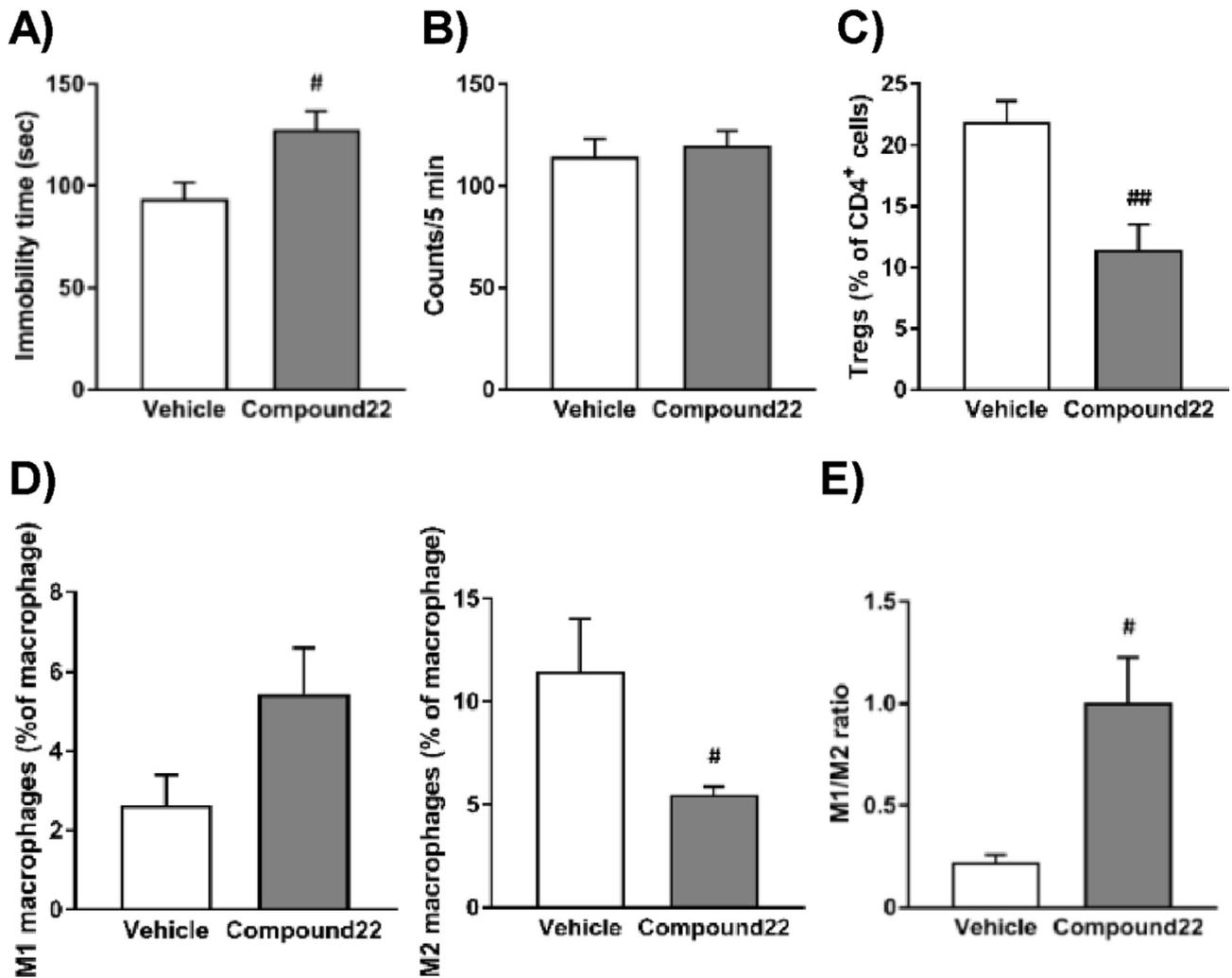


**Fig. 5 Infiltration of Tregs, Th17 cells, and macrophages into the brain of LPS-induced depressive mice.**

(A) Tregs (CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) and Th17 cells (CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>) were analyzed in the brain of wild-type (WT) and CCR4 deficient (KO) mice 24 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS by flow cytometry. (B) Gene expression of IL-10, IFN-γ, and IL-4 in the hippocampus of LPS-injected WT and CCR4 KO mice. (C) Macrophages (CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>) and microglia (CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup>) were analyzed in the brain of WT and CCR4 KO mice by flow cytometry. (D) M1 (CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>) and M2 (CD45<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>) macrophages were analyzed in the brain of WT and CCR4 KO mice 24 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS by flow cytometry. (E) Ratio of M1/M2 macrophage polarization. (F) Gene expression of the M1 macrophage marker iNOS and the M2 macrophage marker Arg1 in the hippocampus of LPS-injected WT and CCR4 KO mice. Values indicate the means ± SEM (A: n = 6–11, B–E: 3–6, F: 4–9). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs. Saline. †*P* < 0.05, ††*P* < 0.01 vs. WT.

### 3. LPS 誘発性うつ様病態に対する CCR4 阻害薬の働き

LPS 誘発性うつ様症状に対する Compound 22 の作用を確かめるため、強制水泳試験および自発運動量試験を行った。その結果、強制水泳試験では CCR4 欠損マウスと同様に Compound 22 の投与によって無動時間の延長が見られた。また、自発運動量も CCR4 欠損マウスと同様に Compound 22 の投与による変化は認められなかった。LPS 投与時の脳への Treg 浸潤に対する Compound 22 の働きを検討したところ、Compound 22 を投与したマウスでは CCR4 欠損マウスと同様に、Treg の浸潤量の減少が確認された。また、脳内浸潤マクロファージの分極に対する Compound 22 の影響を検討した。その結果、CCR4 欠損マウスで確認された結果と同様に、Compound 22 投与群では M1 マクロファージの増加および M2 マクロファージの減少が認められた。



**Fig. 6 Effect of Compound 22, a CCR4 inhibitor, on LPS-induced depressive-like behavior.**

(A, B) Immobility time in the forced swim test (A) and spontaneous locomotor activity (B) of control and Compound 22-treated WT mice 24 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS. (C, D) Tregs and M1 and M2 macrophages were analyzed in the brain of control and Compound 22-treated WT mice 24 h after the intraperitoneal injection of saline or LPS by flow cytometry. (E) Ratio of M1/M2 macrophage polarization. Values indicate the means  $\pm$  SEM (A: n = 11–12, B: n = 5–6, C–E: n = 4–5). # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 vs. Vehicle.

### Ⅲ. 考察および小括

本章では、LPS 誘発性うつ病モデルマウスの脳内への Treg 浸潤に CCR4 が寄与していることを明らかとした。Treg は IL-10 などの抗炎症性サイトカインや DC の活性化抑制などを介して炎症反応を抑制的に制御する細胞であることから、CCR4 は Treg による脳組織での炎症反応の抑制に必須の役割を果たしている可能性が考えられる。しかし、脳組織への Treg 浸潤は、CCR4 欠損マウスおよび、CCR4 阻害薬を投与したマウスの場合でも完全には消失しなかった。近年行われた研究により、傷害を受けた脳においてケモカイン CCL20 が産生されること、さらに対応した受容体である CCR6 を持つ Treg が同部位へと浸潤することが報告された[43]。これらのことから、Treg の脳組織への浸潤には CCR4 および CCR6 が相補的に機能している可能性が示唆された。一方で、同じく CCR4 を発現し、幅広い炎症反応に関与する Th17 の脳組織への遊走は、CCR4 を欠損させた場合においても影響が認められなかった。Th17 は CCR4 だけでなく、CCR6、CCR9、CXCR6 など多様なケモカイン受容体を発現することが報告されている[44]。加えて、近年の研究により、LPS を投与したマウスの脳内では CXCR6 のリガンドとして機能する CXCL16 の発現が増加することが報告された[45]。このことから、Th17 は CCR4 を欠損した場合でも CXCR6 などの他のケモカイン受容体が代替的に機能することで、遊走に対して影響を及ぼしていない可能性が考えられる。

近年の研究において、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインがヒトおよびマウスのうつ病の発症と増悪に重要な役割を示すことが報告された[46]。そのため、これらのサイトカインを産生する主要な免疫細胞であるマクロファージが脳組織へと過剰に浸潤することは、うつ病に対して促進的に寄与すると考えられる[47]。また、マクロファージは周囲のサイトカイン環境に依存して、前記の炎症性サイトカインや CCL5、CXCL10 のような Th1 ケモカインを産生し炎症反応や組織損傷を引き起こす M1 マクロファージ、あるいは IL-10、TGF- $\beta$ 、vascular endothelial growth factor (VEGF) のような抗炎症性サイトカインや成長因子を産生し抗炎症反応や組織修復を担う M2 マクロファージへと分極することが知られている[46]。本研究では、LPS 誘発性うつ病モデルマウスでは脳組織へのマクロファージ浸潤が生じることに加え、CCR4 欠損マウスおよび CCR4 阻害薬を投与したマウスにおいても、それらの浸潤したマクロファージ量には変化が見られないことを示した。その一方で、CCR4 を欠損したマウスあ

るいは CCR4 阻害薬を投与したマウスの脳組織中マクロファージは M1/M2 バランスが M1 マクロファージへと大きく傾いていることを明らかとした。また、Treg によって産生される代表的なサイトカインである IL-10 は、M2 マクロファージへの分極を促進することが知られている[46]。これらのことから、CCR4 の欠損あるいは阻害によって、Treg の脳組織への遊走を抑制され、脳内で IL-10 を産生する免疫細胞が著しく減少することで M2 マクロファージへの分極が大きく減少していることが示唆された。M2 マクロファージは IL-10 などの抑制性サイトカインをさらに産生することによって脳内の炎症反応の抑制に関与すると考えられる。また、CCR4 欠損マウスにおける Treg の脳内浸潤量は、野生型マウスと比較しておよそ半数程度であるにも関わらず、M2 マクロファージは LPS を投与していないマウスと同程度まで減少していた。そして脳組織内の IL-10 産生量も正常マウスと同程度まで減少した。このことから、CCR4 によって強く遊走を制御されている Treg は特に強力な IL-10 産生能を有しており、CCR4 を欠損した場合にはこれらの Treg 選択的に遊走が阻害されていると考えられる。

また、本研究では LPS を投与した際に、海馬における IFN- $\gamma$  の発現量は減少した一方で IL-4 は増減せず、CCR4 の欠損はそれらの発現変化に影響及ぼさないこと、および、CCR4 の欠損に伴う海馬組織内での IL-10 濃度の減少は IFN- $\gamma$  や IL-4 の発現に影響を及ぼさないことを示した。LPS の投与によって誘導されたうつ病症状発症時に、海馬内 IFN- $\gamma$  の発現量が減少したメカニズムについては不明であるが、それにより生じた Th1/Th2 サイトカインバランスの変化がうつ病病態に関与している可能性も考えられる。また、IL-10 濃度の減少によって各種ヘルパーT細胞サイトカインの産生に影響を及ぼさなかった原因として、脳内へと浸潤した免疫細胞の多くがマクロファージであり、ヘルパーT細胞系の浸潤は少ないため、IL-10 による作用がマクロファージに対して特に顕著に現れている可能性が考えられる。

## 総括

CCR4 は Th2、Th17、Treg などのヘルパーT 細胞サブセットに特異的に発現するケモカイン受容体であり、現在までにアトピー性皮膚炎における Th2 の皮膚炎症部への遊走や、メラノーマにおける Treg の腫瘍組織への遊走を介して炎症反応や抗腫瘍免疫に対して寄与を示すことが報告されてきた。しかし、現在明らかとされている CCR4 の働きは、Th2 を中心に形成されるアレルギー疾患や、皮膚組織への皮膚指向性 T 細胞の遊走などに着目したものが多く、同じく CCR4 を発現する Th17 に起因する炎症性自己免疫疾患や皮膚以外の組織への指向性を持つ T 細胞遊走に関する研究は十分に行われていなかった。そこで、Th17 や Treg が中心となって制御している炎症性疾患において、CCR4 がこれらの免疫細胞動態に対してどのような役割を持ち、疾患形成に寄与するか明らかとするため研究を行った。

RA は、関節へと集積した Th17 によって好中球やマクロファージなどの誘導、活性化が引き起こされることで生じる疾患である。今回の研究では、こうした関節へと集積する Th17 の供給源となる所属リンパ節における DC-Th17 クラスターの形成に CCR4 が必須の働きを示すことに加え、関節への Th17 の遊走にも関与している可能性を示した。また我々は、これらの知見が同じ Th17 依存的な炎症によって発症する乾癬モデルマウスにおいても確認されることを報告している。このことから、CCR4 を介した Th17 炎症の制御系は、他の Th17 依存的な炎症を伴う全身性エリテマトーデスや多発性硬化症、一部の炎症性腸疾患などにおいても応用できる可能性が考えられる。

中枢神経系は古くから、全身の免疫系からは隔絶された組織であると考えられており、炎症などの免疫応答に関連する事象と関連付けられた研究は行われていなかった。しかし、近年には中枢神経系と抹消とを隔てている BBB の透過性に関する研究や、中枢神経系に存在するリンパ系組織の存在を示す研究が行われており、しだいに中枢神経系に対する免疫系の関わりが注目されている。そこで本研究では、Th17 サイトカインを中心とする炎症性サイトカインが疾患の形成に関与することが示唆されているうつ病モデルマウスを使用し、CCR4 を介した炎症制御機構が神経炎症に及ぼす影響について検討した。その結果、脳内炎症において CCR4 は、Treg の脳組織への浸潤を介して脳内マクロファージの M2 マクロファージへの分極を誘導し炎症病態を改善する役割を示すことを明らかとした。また脳組織における炎症反応によって引き起こされる疾患はうつ病だけでなく、統合失調症などの一部の精神疾患との関連も示唆されている[19]。このことから、CCR4 を介した炎症制御系は、脳組織における炎症反応に関わる

様々な神経疾患において広く関与する可能性が考えられる。

以上、本研究を通じて、ケモカイン受容体 CCR4 は Th17 依存的な炎症疾患である RA において、所属リンパ節での DC-Th17 クラスターの形成を介した Th17 の増殖および、それら Th17 の関節炎症部への遊走を担うことで関節リウマチ病態を促進的に制御する因子であること。また、炎症誘発性うつ病症状においては、脳組織への Treg 浸潤を担い、脳内浸潤マクロファージの M1/M2 バランスを制御することで、うつ病病態を抑制的に制御する因子であることを明らかとした。

このように CCR4 は、様々な疾患における炎症反応を制御することで疾患の形成に関わる一方で、その働きは疾患の特性や組織に応じて多様に変化することが示された。多くの免疫細胞において、発現するケモカイン受容体は単一ではなく、複数のケモカイン受容体が発現することが知られている。またそのリガンドであるケモカインは病的状況下において異所性に発現し、その発現パターンは疾患によって様々である。そのため、CCR4 系以外のケモカインによって相補的に遊走が制御されることが予想される。こうした、CCR4 系以外のケモカインによる遊走が行われるか否かが、疾患ごとにおいて異なる炎症制御機構をもたらす要因であると考えられる。これらのことから、CCR4 を介した炎症制御が疾患形成に与える影響は疾患ごとに大きく異なるため、新規治療標的としての応用を目指すためには疾患ごとの詳細な機能解析研究が必須であると考えられる。

## 参考文献

1. Bedoya, S.K., et al., *Th17 cells in immunity and autoimmunity*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 986789.
2. Yasuda, K., Y. Takeuchi, and K. Hirota, *The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases*. Semin Immunopathol, 2019. **41**(3): p. 283-297.
3. Rosu, A., et al., *IL-17 patterns in synovium, serum and synovial fluid from treatment-naive, early rheumatoid arthritis patients*. Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(1): p. 73-80.
4. Chen, D.Y., et al., *Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(4): p. R126.
5. Avci, A.B., E. Feist, and G.R. Burmester, *Targeting GM-CSF in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2016. **34**(4 Suppl 98): p. 39-44.
6. Hamilton, J.A., *GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2055.
7. Yoshie, O. and K. Matsushima, *CCR4 and its ligands: from bench to bedside*. Int Immunol, 2015. **27**(1): p. 11-20.
8. Yoshie, O., *CCR4 as a Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy*. Cancers (Basel), 2021. **13**(21).
9. Lochenie, C., et al., *Spin-Crossover Iron(II) Coordination Polymer with Fluorescent Properties: Correlation between Emission Properties and Spin State*. J Am Chem Soc, 2018. **140**(2): p. 700-709.
10. Lee, A.Y. and H. Korner, *CCR6 and CCL20: emerging players in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(4): p. 354-8.
11. Hirota, K., et al., *Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2803-12.
12. Rump, L., et al., *An initial investigation into endothelial CC chemokine expression in the human rheumatoid synovium*. Cytokine, 2017. **97**: p. 133-140.
13. Flytlie, H.A., et al., *Expression of MDC/CCL22 and its receptor CCR4 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis*. Cytokine, 2010. **49**(1): p. 24-9.
14. Imai, T., et al., *The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 15036-42.
15. Imai, T., et al., *Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1764-8.
16. Matsuo, K., et al., *CCR4 Involvement in the Expansion of T Helper Type 17 Cells in a Mouse Model of Psoriasis*. J Invest Dermatol, 2021. **141**(8): p. 1985-1994.
17. Purandare, A.V., et al., *Core exploration in optimization of chemokine receptor CCR4 antagonists*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(3): p. 679-82.
18. Brand, D.D., K.A. Latham, and E.F. Rosloniec, *Collagen-induced arthritis*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1269-75.
19. Ouabbou, S., et al., *Inflammation in Mental Disorders: Is the Microbiota the Missing Link?* Neurosci Bull, 2020. **36**(9): p. 1071-1084.
20. Matsuo, K., et al., *CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma*. Cancer Lett, 2016. **378**(1): p. 16-22.

21. Bonelli, M., et al., *CCR6 controls autoimmune but not innate immunity-driven experimental arthritis*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(11): p. 5278-5285.
22. Rapp, M., et al., *CCL22 controls immunity by promoting regulatory T cell communication with dendritic cells in lymph nodes*. J Exp Med, 2019. **216**(5): p. 1170-1181.
23. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
24. Matsuo, K., et al., *CCR4 Is Critically Involved in Skin Allergic Inflammation of BALB/c Mice*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(8): p. 1764-1773.
25. Blanco, F.J., et al., *Secukinumab in Active Rheumatoid Arthritis: A Phase III Randomized, Double-Blind, Active Comparator- and Placebo-Controlled Study*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(6): p. 1144-1153.
26. Mease, P.J., et al., *CNTO6785, a Fully Human Antiinterleukin 17 Monoclonal Antibody, in Patients with Rheumatoid Arthritis with Inadequate Response to Methotrexate: A Randomized, Placebo-controlled, Phase II, Dose-ranging Study*. J Rheumatol, 2018. **45**(1): p. 22-31.
27. Hirota, K., et al., *Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis*. Immunity, 2018. **48**(6): p. 1220-1232 e5.
28. Sakaguchi, N., et al., *Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 454-60.
29. Rostami, A. and B. Ciric, *Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination*. J Neurol Sci, 2013. **333**(1-2): p. 76-87.
30. van Nieuwenhuijze, A.E., et al., *Complementary action of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-17A induces interleukin-23, receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, and matrix metalloproteinases and drives bone and cartilage pathology in experimental arthritis: rationale for combination therapy in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 163.
31. Weinblatt, M.E., et al., *A Randomized Phase IIb Study of Mavrilimumab and Golimumab in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2018. **70**(1): p. 49-59.
32. Behrens, F., et al., *MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1058-64.
33. Huizinga, T.W., et al., *Phase 1b randomized, double-blind study of namilumab, an anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor monoclonal antibody, in mild-to-moderate rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 53.
34. Zhdanova, M., et al., *The Prevalence and National Burden of Treatment-Resistant Depression and Major Depressive Disorder in the United States*. J Clin Psychiatry, 2021. **82**(2).
35. Drevets, W.C., et al., *Immune targets for therapeutic development in depression: towards precision medicine*. Nat Rev Drug Discov, 2022. **21**(3): p. 224-244.
36. Imakita, N., et al., *Abrogated Caveolin-1 expression via histone modification enzyme Setdb2 regulates brain edema in a mouse model of influenza-associated encephalopathy*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 284.
37. Louveau, A., et al., *Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels*.

- Nature, 2015. **523**(7560): p. 337-41.
38. Wu, X., et al., *Involvement of kynurenine pathway between inflammation and glutamate in the underlying etiopathology of CUMS-induced depression mouse model*. BMC Neurosci, 2022. **23**(1): p. 62.
  39. Beurel, E., M. Toups, and C.B. Nemeroff, *The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble*. Neuron, 2020. **107**(2): p. 234-256.
  40. Matsuo, K., O. Yoshie, and T. Nakayama, *Multifaceted Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Tumor Immunity*. Cancers (Basel), 2021. **13**(23).
  41. Ghosh, R., et al., *T helper cells in depression: central role of Th17 cells*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2022. **59**(1): p. 19-39.
  42. Freff, J., et al., *Chemokine receptor 4 expression on blood T lymphocytes predicts severity of major depressive disorder*. J Affect Disord, 2022. **310**: p. 343-353.
  43. Ito, M., et al., *Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery*. Nature, 2019. **565**(7738): p. 246-250.
  44. Bachelier, F., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(1): p. 1-79.
  45. Thomson, C.A., et al., *Sustained exposure to systemic endotoxin triggers chemokine induction in the brain followed by a rapid influx of leukocytes*. J Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 94.
  46. Shapouri-Moghaddam, A., et al., *Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6425-6440.
  47. Konsman, J.P., P. Parnet, and R. Dantzer, *Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications*. Trends Neurosci, 2002. **25**(3): p. 154-9.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜り、研究の魅力と厳しさを御教授頂きました近畿大学薬学部医療薬学科教授中山隆志先生に甚大なる謝意を表します。

また本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、研究に対する姿勢と情熱を御教授頂きました近畿大学薬学部医療薬学科講師松尾一彦先生ならびに近畿大学薬学部医療薬学科講師原雄大先生に心より御礼申し上げます。

また、免疫染色に際して技術協力頂きました姫路獨協大学薬学部教授長久保大輔先生ならびに助教海堀雄一郎先生に深く御礼申し上げます。

また、Compound 22 を作成頂きました近畿大学薬学部創薬科学科講師西脇敬二先生に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり御協力頂きました近畿大学大学院薬学部化学療法学研究室の皆様にご感謝いたします。

最後に研究に没頭できるように常に暖かく見守ってくれた家族にご感謝いたします。