

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10217

研究課題名(和文) ケモカイン ELC/CCL19 の新規受容体同定とその乾癬における役割の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel receptor for ELC/CCL19 and its role 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において研究代表者は、ケモカインELC/CCL19がGPCR#13受容体の新規の機能的リガンドであることを見出した。また、ELC/CCL19はGPCR#13に対して、既知受容体のCCR7と同程度のアゴニスト活性を持ち、CCR7を発現していないGPCR#13陽性のエフェクター細胞の遊走を担う機能的なリガンドであることを明らかにした。また、乾癬モデルマウスへのELC/CCL19の経皮投与により、病変部でのGPCR#13陽性エフェクター細胞の浸潤が増加し、乾癬病態が増悪した。以上の結果より、ELC/CCL19-GPCR#13系が乾癬の病態形成に重要な役割を果たしてい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

ELC/CCL19の既知受容体であるCCR7は主にナイーブリンパ球に発現していることより、ELC/CCL19は恒常的な免疫応答の誘導に関わると考えられてきた。しかしながら、ELC/CCL19がGPCR#13の新たなリガンドであり、GPCR#13を介してエフェクター細胞の炎症巣への遊走を制御しているという知見は、炎症性疾患の病態形成における新たな分子機序の解明に貢献するものであると考えている。さらに、ELC/CCL19が、乾癬を含む炎症性疾患における新たな創薬標的となり得る可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：ELC/CCL19 is a functional ligand for CCR7, which is mainly expressed by naive T and B cells. In the present study, we found that ELC/CCL19 is also a functional ligand for GPCR#13, which is broadly expressed by effector cells such as NK cells and monocytes. We revealed that ELC/CCL19 efficiently induced cell migration in murine L1.2 cells stably expressing GPCR#13 (L1.2-GPCR#13) as well as in L1.2-CCR7. Furthermore, in chemotaxis assays using human PBMCs, ELC/CCL19 attracted not only naive T cells but also CD16(+) NK cells and CD14(+) monocytes. In addition, ELC/CCL19-mediated cell migration was suppressed by treatment with a GPCR#13 antagonist. In mouse psoriasis model, intradermal injection of ELC/CCL19 recruited GPCR#13(+)/CCR7(-) effector cells in psoriasis-like skin lesions and exacerbated psoriasis-like inflammation. These results suggest that ELC/CCL19 another agonist for GPCR#13 and may play an important role in psoriasis by recruiting GPCR#13-expressing effector cells.

研究分野：免疫学

キーワード：ケモカイン ELC/CCL19 乾癬

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、免疫を担当する細胞の遊走を制御するサイトカインの一群である。これまでに、40種類以上のケモカインおよび19種類の受容体が同定されており、免疫細胞の遊走制御について広く理解が進んでいる。しかしながら、既知の受容体-リガンドの組み合わせでは説明できない現象も存在することより、未だ明らかにされていない受容体-リガンドの組み合わせの存在が示唆されている。これまでに研究代表者らは、細胞内カルシウム濃度の上昇反応を指標として、多くの新規ケモカインおよびその受容体を同定してきた。しかしながら、この反応は細胞遊走には必須ではなく、必ずしも細胞遊走の指標とならないことが明らかとなってきた。そこで、研究代表者らは、既知のケモカイン受容体を含む、46種類の細胞遊走関連受容体の安定発現細胞株を作製し、細胞遊走活性を指標として、新規ケモカイン受容体の網羅的な再スクリーニングを実施した。その中で、GPCR#13が、ELC/CCL19に対して、既知の受容体であるCCR7と同程度の強い細胞遊走活性を示すことを見出した。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず ELC/CCL19-GPCR#13 系の結合特性とその生理学的意義を解明する。そこで、GPCR#13 に対する ELC/CCL19 の結合および反応性の解析を行う。また、GPCR#13 の発現細胞についても同定する。

乾癬は、皮膚の紅斑や肥厚、鱗屑を特徴とする炎症性の皮膚疾患であり、その発症原因は未だ特定されておらず、症状の完全な消失も困難である。乾癬患者の皮膚において、これまでに ELC/CCL19 の発現が増加することが報告されている。ELC/CCL19 の既知の受容体である CCR7 は、ナイーブリンパ球に発現しており、これらの細胞のリンパ節への遊走を制御している。しかしながら、CCR7 陽性のナイーブリンパ球は炎症巣へは浸潤できない。そのため、乾癬における炎症反応において、ELC/CCL19 の病理学的な意義等は不明であった。したがって、本研究課題では、ELC/CCL19-CCR7 の病理学的な意義の解明として、乾癬病態に焦点を当て解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト CCR7 もしくは GPCR#13 を安定的に発現させた L1.2 細胞株を用いた。

(2) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の単離

成人ドナーより採取したヘパリン添加静脈血を PBS で 2 倍に希釈し、65% Percoll (GE Healthcare) に重層、2000 rpm で 20 分間遠心分離した。中間層を回収後、PBS を添加し、1300 rpm で 10 分間遠心分離した。細胞ペレットを、フェノールレッドを含まない RPMI1640 (1 mg/mL BSA、10 mM HEPES (pH7.4) 含有) で懸濁した。

(3) ケモタキシスアッセイ

CHEMOTX ケモタキシスチャンパー (Pore size 5 μ m; Neuroprobe) を使い、チャンパーの上部ウェルに各細胞を 25 μ L (2×10^5 個)、下部ウェルに 29 μ L の各ケモカインおよびリガンド (ELC/CCL19、SLC/CCL21、GPCR#13 リガンド; Invitrogen) を加えた。阻害薬を使った実験では、各細胞を PTX (500 ng/mL; Sigma-Aldrich) にて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間処置した後に、上部ウェルに添加した。37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベーター内で 2 時間静置し、細胞遊走を行った。下部ウェルに遊走した細胞を、溶解液 (10 mM Tris (pH8.0)、0.1% triton-X100) で溶解し、PicoGreen2 本鎖 DNA 定量試薬 (Molecular Probes) を添加した。励起光 485 nm/測定光 535 nm で、蛍光強度を測定し、細胞数を定量した。結果は、上部ウェルに添加した細胞の割合 (%) で示した。

(3) フローサイトメトリー

Human BD Fc Block (BD Biosciences) を 4 $^{\circ}$ C、30 分間処置することで、Fc 受容体をブロッキングした。その後、FITC 標識抗 human CD3 抗体 (clone; UCHT1、DAKO)、FITC 標識抗 human CD14 抗体 (clone; M5E2、BD Biosciences)、PE-Cy7 標識抗 human CD16 抗体 (clone; 3G8、BD Biosciences)、PE 標識抗 human CD56 抗体 (clone; B159、BD Biosciences) を 4 $^{\circ}$ C、30 分間反応させた。0.1% BSA/PBS により洗浄後、BD LSRFortessa (BD Biosciences) にて測定した。

(4) 乾癬モデルマウスの作製

動物は、メスの C57BL/6J マウス (6-8 週齢; 清水実験材料) を用いた。ベセルナクリーム 5% (5% イミキモド (IMQ); 持田製薬) をマウス片耳に 15 mg ずつ、6 日間連日塗布した。これらのモデルマウスに、IMQ 最終塗布の 24 時間後に ELC/CCL19 0.5 μ g を染み込ませた親水性ゲルパッチ (コスメディ製薬) を耳介皮膚に貼付、PTX 10 mg/kg を腹腔内投与、42 時間後にヒト PBMC 200 μ L (1×10^7 個) を静脈内投与した。

(5) マウス乾癬病態の評価

IMQ 最終塗布の 2 日後に、耳介皮膚の紅斑、鱗屑、皮膚肥厚を観察し、以下のようにスコアを付けた。0: none、1: slight、2: moderate、3: marked、4: very marked。

(6) ヘマトキシリン・エオシン染色

IMQ 最終塗布の 2 日後に、耳介皮膚をサンプリングした。川本法用凍結包埋剤 (Leica) で凍結包埋し、クリオスタット (Leica) により凍結切片 (6 μm) を作製した。ホルマリン溶液 (Wako) で 1 晩固定し、ヘマトキシリン (Wako)、エオシン (Wako) でそれぞれ染色した後、上昇アルコール系列およびキシレンにて脱水・透徹を行った。ソフトマウント (Wako) により封入し、顕微鏡にて画像を取得後、ImageJ にて組織厚を計測した。

(7) 細胞の単離

IMQ 最終塗布の 2 日後に、耳介皮膚をサンプリングし、Dispase (20 U/sample; Roche) を含有した HBSS で 37 °C、1 時間インキュベートした。その後、20% FBS、Collagenase (1.85 U/sample)、DNase (0.25 μL/sample) を含有した RPMI1640 培地内で、ハサミで細断した。37 °C で 1 時間振とう後、遠心分離 (1500 rpm、10 分、4 °C) し、上清を除去した。細胞ペレットを、0.1% BSA/PBS で懸濁し、フローサイトメリー解析のサンプルとした。

4. 研究成果

(1) 受容体安定発現細胞株を用いた細胞遊走活性の解析

ELC/CCL19 は、100 nM をピークとして、GPCR#13 を発現させた L1.2 細胞の遊走を誘導した。この活性は既知の受容体である CCR7 を発現させた細胞に対してと同程度であった (図 1)。さらに、この ELC/CCL19 による細胞遊走活性は、GPCR#13 阻害薬である PTX の処置により阻害された。一方、CCR7 のもう一つリガンドである SLC/CCL21 は、CCR7 発現 L1.2 細胞の遊走を誘導したが、GPCR#13 発現細胞の遊走は誘導しなかった (図 1)。

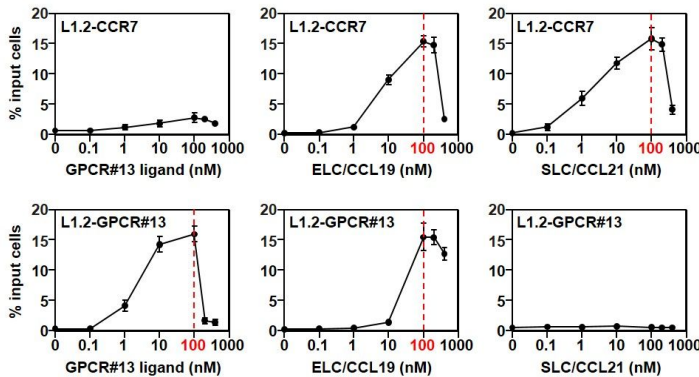


図 1 受容体安定発現細胞株を用いた ELC/CCL19 の細胞遊走活性

(2) ヒト PBMC を用いた細胞遊走活性の解析

フローサイトメーターを用いたヒト PBMC の遊走解析により、ELC/CCL19 の CD3 陽性 T 細胞、CD56 陽性 CD16^{low} NK 細胞、CD56 陽性 CD16^{high} NK 細胞、単球に対する遊走活性を評価した。なお、これら 4 種の細胞はいずれも GPCR#13 を発現していること、一方 CCR7 は CD3 陽性 T 細胞および CD56 陽性 CD16^{low} NK 細胞でしか発現していないことを確認している (data not shown)。

GPCR#13 の既知のリガンドを用いた検討では、4 種の細胞ともに 10 nM をピークとして細胞遊走活性が認められた (図 2)。GPCR#13 阻害薬の前処置により、その細胞遊走は濃度依存的に阻害された (data not shown)。

ELC/CCL19 に関しても、GPCR#13 リガンドと同様に、CCR7 の発現に関わらず、すべての GPCR#13 発現細胞の細胞遊走を誘導した (図 2)。さらに、GPCR#13 阻害薬の前処置により、ELC/CCL19 を介した単球および CD56 陽性 CD16^{high} NK 細胞の遊走は阻害されたが、CCR7 を発現する CD3 陽性 T 細胞および CD56 陽性 CD16^{low} NK 細胞では、それらの遊走は阻害されなかった (data not shown)。

SLC/CCL21 を用いた検討では、CD3 陽性 T 細胞および CD56 陽性 CD16^{low} NK 細胞の遊走は認められたものの、CCR7 を発現していない単球および CD56 陽性 CD16^{high} NK 細胞の遊走は認められなかった (図 2)。

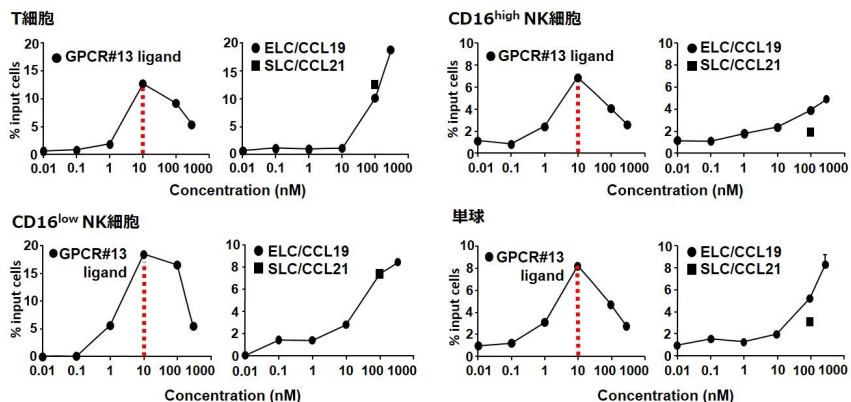


図 2 ヒト PBMC を用いた細胞遊走活性

(1)および(2)以外にも、研究代表者らは、GPCR#13 に対して、ELC/CCL19 が CCR7 と同等の細胞内カルシウム濃度上昇反応および細胞接着反応性を示すこと明らかにした (data not shown)。これらの知見を合わせて考えると、ELC/CCL19 は、GPCR#13 に対する新規の機能的なリガンドであると考えられる。

(3) 乾癬病態における ELC/CCL19-GPCR#13 系の関与

乾癬モデルマウスを用い、乾癬病態への ELC/CCL19 の関与について検討したところ、ELC/CCL19 を経皮投与したマウスにおいて、耳介皮膚の厚さが他の群よりも増大していた (図 3)。この時、病変部への GPCR#13 を発現する CD14 陽性単球および CD56 陽性 CD16^{high} NK 細胞の浸潤が認められた (図 4)。さらに、これらの現象は、GPCR#13 阻害薬の共処置により、抑制された。

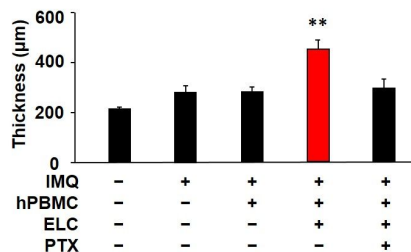
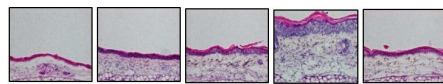


図 3 ELC/CCL19 が乾癬病態へ与える影響

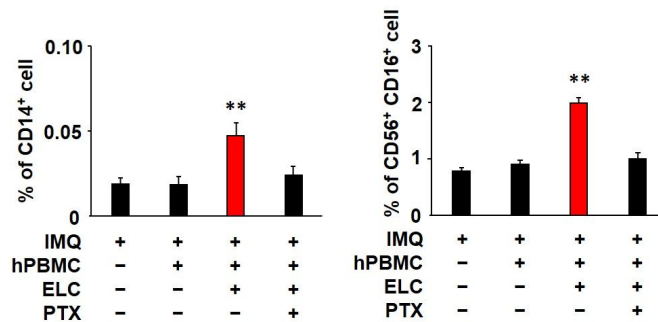


図 4 ELC/CCL19 によるエフェクター細胞の浸潤

以上より、ELC/CCL19-GPCR#13 系は、乾癬病変部への種々のエフェクター細胞の浸潤を介して、その病態増悪に寄与している可能性が示された。また、研究代表者らは、ヒト乾癬患者の病変皮膚において、ELC/CCL19 および GPCR#13 が発現していること、重症度の高い患者では、これらの分子の発現が高値を示したことも見出し (data not shown)、乾癬への ELC/CCL19-GPCR#13 系の関与を裏付けるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本澤龍菜、松尾一彦、北畑孝祐、長沼孝典、有馬優香、岩間有咲、長久保大輔、義江修、中山隆志
2. 発表標題 Th17依存的な乾癬モデルマウスの作製とケモカイン受容体CCR4の役割
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝典、松尾一彦、北畑孝祐、西川莉央、中山隆志
2. 発表標題 新規アスコルビン酸誘導体は抗炎症作用を介して乾癬病態を改善する
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有馬優香、松尾一彦、岩間有咲、長沼孝典、西脇啓二、義江 修、中山隆志
2. 発表標題 ケモカイン受容体CCR4およびCCR6は乾癬発症において異なる役割を担う
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩間有咲、松尾一彦、伊藤茉奈、有馬優香、長沼孝典、西脇啓二、義江 修、中山隆志
2. 発表標題 乾癬発症におけるケモカイン受容体CCR4およびCCR6の役割の解明
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017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)	