

博士學位論文

要約

乾癬におけるケモカイン受容体 CCR4 の DC-Th17 細胞
相互作用を介した病態形成機構についての研究

令和3年1月13日

近畿大学大学院
薬学研究科薬学専攻
北 畑 孝 祐

要約

乾癬は慢性の自己免疫性の炎症性皮膚疾患であり、表皮の肥厚と T 細胞の浸潤が特徴的である。WHO は乾癬を慢性、非伝染性で、苦痛、見た目の悪さおよび機能障害を伴い、根治治療がなく、患者の生活の質 (QoL) に重大な悪影響を及ぼす皮膚疾患と定義している。同組織は全世界で少なくとも一億人の患者が存在すると見積もっており、乾癬を重大な世界規模の問題だと表現している。このように乾癬の世界的な注目度は高くアンメットニーズを解消するべくさらなる研究が求められている。

近年では免疫学の発展とともに急速に乾癬病態の理解が進んでいる。乾癬は当初その特徴的な症状である鱗屑と表皮肥厚という組織学的な変化から、表皮の異常角化が原因の疾患とされていた。しかし、1980 年代にシクロスポリンの乾癬に対する有効性が示されると、乾癬病態は表皮の異常角化症から T 細胞による炎症性免疫疾患と考えられるようになる。この頃の免疫学では T 細胞を主とする獲得免疫は Th1 型免疫と Th2 型免疫の二元論で説明されていたため、乾癬を含む炎症性疾患の病変部位で Th1 サイトカインの産生が増加すること、さらに Th1 細胞の浸潤が認められることから、Th1 細胞優位の疾患であるとされていた。しかしながら 2005 年には新たな T 細胞サブセットで IL-17 を産生する Th17 細胞が同定され、乾癬は Th17 型疾患と考えられるようになった。現在では Th17 細胞が産生する IL-17 や IL-22 はケラチノサイトに作用しケラチノサイトからのサイトカイン/ケモカインや抗菌ペプチドの産生を促し、またケラチノサイトの増殖を促進することで乾癬の病態形成に寄与すると考えられている。このように乾癬は免疫学の発展と共に急速に病態の理解が進んだが、未だ乾癬の病態形成機構には不明な点も多くさらなる病態解明が強く求められている。

ケモカインは主に免疫担当細胞の細胞遊走を制御するサイトカインの一群であり、ケモカインが産生される組織または局所へと対応するケモカイン受容体を発現する免疫細胞を遊走させることで炎症反応や免疫応答において重要な役

割を果たす。Th17 細胞を含む成熟した T 細胞は機能的なサブセットからなり、これらのサブセットは特徴的なケモカイン受容体のセットを発現する。このケモカイン受容体の発現パターンの違いは炎症選択的な T 細胞サブセットの免疫応答の場への遊走を可能にする。例えば CCR4 は Th2 細胞、Treg 細胞と Th17 細胞に選択的に発現し、リガンドである CCL17 と CCL22 が産生される場への遊走を媒介する。特に Th17 細胞は CCR4 と CCR6 を発現することが知られている。しかし、これらのケモカイン及びケモカイン受容体の生理的または病理的役割は未だ不明な点が多い。

乾癬において Th17 細胞に発現する CCR6 はリガンドである CCL20 が産生される病変部位への浸潤に関わると考えられているが、一方で CCR4 の役割は全く解析されていない。CCR4 は当初 Th2 細胞選択的なケモカイン受容体として同定されたため、Th1 型疾患とされていた乾癬では全く関与しないと考えられていた。事実、一般的な乾癬患者の病変部位では CCR4 リガンドの CCL17 及び CCL22 の産生は認められないため、Th17 細胞優位な疾患とされている乾癬での CCR4 リガンド-CCR4 系の役割、特にその Th17 細胞が介する炎症反応での役割は全く不明である。

Th17 細胞等のエフェクター T 細胞の誘導は樹状細胞 (DC) とのインタラクションを介して引き起こされる。皮膚などの抹消組織に局在する DC は抗原を取り込み活性化したのち、T 細胞への抗原提示のため所属リンパ節に移動する。その後 DC は所属リンパ節でケモカインを産生し、対応するケモカイン受容体を発現する naïve T 細胞またはメモリー T 細胞を誘引する。この結果、抗原特異的な T 細胞とのクラスターの形成とそれに続くエフェクター T 細胞の増殖を引き起こし、Th17 細胞を含むエフェクター T 細胞を誘導する。これまでに慢性的な皮膚炎が起きている皮膚及び所属リンパ節で CCR4 発現 T 細胞と CCL22 産生 DC からなる多数のクラスターの存在が報告されている。しかしこの CCR4 発現 T 細胞サブセットは現在でも明らかになっていない。また近年、メラノーマ担癌マウスでメモリー Th17 細胞と CCL22 発現 DC とのインタラクションを介して

CCR4 が Th17 細胞の増殖に寄与することが明らかとなった。さらに Th17 細胞が B16 メラノーマに対する CD8⁺T 細胞誘導にも関わるということが報告されている。他の研究グループも Th17 細胞が CD8⁺T 細胞の活性化を介して抗腫瘍免疫と自己免疫疾患に寄与することを報告している。これらの報告は炎症性疾患の乾癬においても CCR4 が Th17 細胞と DC とのインタラクションに寄与し、Th17 細胞の増殖を促進することで乾癬病態に関わることを示唆している。そこで、乾癬における CCR4 の寄与を明らかにするため、CCR4 欠損マウスを用いて乾癬での役割を解析した。

乾癬研究で広く用いられているマウスモデルはイミキモド(IMQ)誘発性乾癬モデルである。一般的に IMQ 誘発性乾癬は IMQ を 6 日間連続で皮膚に塗布する短期間の感作で乾癬様症状を誘導する。しかしながら、このマウスモデルではヒト乾癬とは異なり、Th17 細胞は非常に小さな集団でしかなく、乾癬病態を誘導する IL-17 産生細胞のほとんどは $\gamma\delta$ T 細胞である。実際、標準的な IMQ 誘発性短期感作乾癬モデルを用いた予備実験においても、野生型マウスと CCR4 欠損マウスでその病態に差はなく、炎症部位である皮膚と所属リンパ節で Th17 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞にも有意な差はなかった。そこで、IMQ を 14 日間隔日で塗布した。その結果、IMQ をこれまでより長期間塗布することで、従来の短期感作モデルより乾癬様症状と各種免疫細胞を同程度またはそれ以上に誘導することができた。さらに短期感作モデルより長期感作モデルでは Th17 細胞が病変皮膚及び所属リンパ節でより強く誘導できることが示された。よって、IMQ の塗布期間の延長により従来の短期感作モデルより Th17細胞をより強く誘導できる IMQ 長期感作乾癬モデルを作成できた。

次に CCR4 の乾癬病態への寄与を調べるために、野生型マウスと CCR4 欠損マウスに IMQ 長期感作乾癬モデルを発症させ病態を比較した。その結果 CCR4 欠損マウスでは野生型マウスと比較し乾癬発症 6 日目以降から病態が減少しはじめ 14 日目には有意に皮膚の肥厚、紅斑、鱗屑そして累積スコアが減少していた。さらに発症 14 日目の皮膚を HE 染色したところ表皮の肥厚が CCR4 欠損マ

ウスで優位に減少していることも明らかとなった。また発症 14 日目では CCR4 欠損マウスの病変皮膚及び所属リンパ節で Th17 細胞の割合が野生型に比べて有意に低いことが明らかとなった。この病変皮膚に浸潤した Th17 細胞は CCR4 及び CCR6 を発現することも確認している。さらに皮膚組織の Th17 関連サイトカインの mRNA 発現とタンパク量も CCR4 欠損マウスで減少し、乾癬関連遺伝子の発現も CCR4 欠損マウスで減少していた。これらの結果は、CCR4 乾癬病態の形成に寄与していることを示している。また CCR4 は乾癬病態で Th17 細胞応答に関わることが示唆された。

乾癬では Th17 細胞だけでなく CD8⁺T 細胞もその病態に関わることが知られている。そこで Granzyme B と Perforin の発現を病変皮膚で測定したところ、発症 14 日目の皮膚では野生型マウスで上昇していた Granzyme B と Perforin は、CCR4 欠損マウスで顕著に減少することが明らかとなった。同時に CD8⁺細胞の皮膚浸潤も有意に減少した。これらの結果より CCR4 欠損マウスでは CD8⁺T 細胞を含む炎症反応も減少することが明らかとなった。

Th17 細胞に加えて Th2 細胞と Treg 細胞も CCR4 を発現することが知られている。代表的な Th2 サイトカインである IL-4 及び Treg 細胞のマスター転写因子 Foxp3 の発現を測定したところ、野生型と CCR4 欠損マウスともに病変部位である皮膚でそれらの mRNA 発現に変化はなかった。また flowcytometry 解析により測定した Treg 細胞の皮膚浸潤にも変化は見られなかった。皮膚組織で IL-4 及び Foxp3 mRNA の増加を示さず、Treg 細胞の浸潤もないことは、本乾癬モデルでは Th2 細胞及び Treg 細胞の寄与が小さいことを示唆している。

マウス皮内への mIL-23 投与は、表皮肥厚や不全角化そして炎症細胞の皮膚組織内への浸潤を伴う乾癬様皮膚炎を引き起こす。そこで IMQ 誘発性乾癬に加えて乾癬マウスモデルとして広く使用されている IL-23 誘発性乾癬においても CCR4 の寄与を明らかにするため、野生型マウスと CCR4 欠損マウスに IL-23 誘発性乾癬を発症させその病態を比較した。その結果 IMQ 誘発性乾癬と同様に IL-23 誘発性乾癬でも CCR4 欠損マウスで野生型マウスと比較し 6 日目以降から乾

癬病態が減少し、Th17 細胞の割合が病変皮膚及び所属リンパ節で有意に減少することが明らかとなった。これらの結果から CCR4 欠損による乾癬病態への寄与は特定の乾癬マウスモデル、特に IMQ 誘発性乾癬モデルに依存しないと示唆された。

これまでの結果から CCR4 の欠損によって Th17 細胞が病変皮膚と所属リンパ節のどちらでも減少することが明らかとなった。しかしながら、一般的に乾癬患者の病変部位では CCR6 のリガンドである CCL20 の強い発現認められている一方、CCR4 リガンドである CCL17 と CCL22 の発現は認められない。そこで病変皮膚と所属リンパ節での CCR4 リガンドである CCL17 と CCL22 と CCR6 リガンドである CCL20 の発現を測定した。病変皮膚では CCL20 mRNA の顕著な上昇が見られたが、CCL17 及び CCL22 mRNA 発現の上昇は見られなかった。一方、所属リンパ節では CCL17 と CCL20 の発現は見られなかったが、CCR4 リガンドの一つである CCL22 mRNA の顕著な上昇が確認できた。

これまでに抗腫瘍免疫においては CCR4 が所属リンパ節での DC-Th17 細胞クラスターの形成に関与し Th17 細胞の増殖を促進することが報告されている。まず所属リンパ節中の Th17 細胞のフェノタイプを解析すると、CCR4 陽性でありメモリーマーカーである CD44 を発現していた。次に、乾癬においても同様に DC-Th17 細胞クラスターが存在するか解析したところ野生型マウスの所属リンパ節で CCL22 を産生する DC の周囲に IL-17 を産生するリンパ球様細胞が集積しクラスターを形成していることが明らかとなった。またこのクラスター数を計測すると、野生型マウスに比べて CCR4 欠損マウスでは有意にクラスター数が減少することが明らかとなった。さらに DC と CD4⁺細胞の共培養により誘導される Th17 細胞は CCR4 の選択的阻害剤 Compound 22 の存在下で抑制された。また CCR4 欠損マウス由来の CD4⁺細胞からの Th17 細胞の増殖も減少した。これらの結果より、CCL22-CCR4 系は乾癬病態において Th17 細胞と CCL22 産生 DC との相互作用を介して Th17 細胞の増殖に関与することが示された。

近年乾癬患者の血清 CCL22 量が重症度と相関するだけでなく、一部の重症乾

癬患者の皮膚病変で CCL22 の発現上昇が報告されている。そこで、IMQ を感作させ乾癬を発症させたマウスの耳介皮膚に CCL22 を、抗原を効率よく皮膚へと送達できる新規 DDS デバイスである親水性ゲルパッチを用いて経皮的に投与し、皮膚組織で産生される CCL22 の役割を検討した。その結果、CCL22 の投与により Th17 細胞の皮膚浸潤が増加し、乾癬病態が悪化することが明らかとなった。この結果は一部のヒト乾癬病変部位でみられる CCL22 発現は、CCR4 を介した Th17 細胞の皮膚浸潤を促進し乾癬病態の重症化に関与することを示唆している。

これまでの結果は、CCR4 が乾癬の有効な治療標的であることを示唆している。そこで、CCR4 の選択的阻害剤である Compound 22 を使用して CCR4 の乾癬病態に対する治療効果を評価した。Compound 22 の投与は DC-Th17 細胞のクラスター形成を抑制し、Th17 細胞を減少させ、濃度依存的に乾癬病態を改善することが示された。CCR4 阻害剤は乾癬での Th17 細胞を介した炎症反応を阻害することで乾癬に対して治療効果を示すことを示唆している。

本研究では、乾癬病態における CCR4 の役割を解析するため、乾癬研究で一般的に広く用いられている IMQ 誘発性乾癬モデルを使用した。しかし、乾癬病態の形成に不可欠な IL-17A の産生は、6 日間という短期間で乾癬を誘導できる従来モデルでは CCR4 を発現しない $\gamma\delta$ T 細胞の寄与が大きい。実際に標準的な従来の IMQ 誘発性乾癬モデルでは CCR4 欠損マウスに異常は見られなかった。そこで本研究では従来の IMQ 誘発性乾癬モデルを改変し、Th17 細胞やいくつかの免疫細胞をより誘導した長期感作モデルを作成した。IMQ の感作期間を延長することで、Th17 細胞を強く誘導でき、さらに CCR4 欠損マウスではその病態に 6 日目以降から差が見られた。これは Th17 細胞の誘導に必要な期間と一致しており、IL-23 誘発性乾癬モデルを用いた場合でも同様であった。これら結果は、Th17 細胞をはじめとする T 細胞の誘導にはある程度の期間が必要であることを示唆している。今後の T 細胞に注目した研究においても炎症の期間の違いによる免疫細胞集団の構成細胞の差に注意する必要があると考える。

近年乾癬患者には抗原特異的な CD4⁺ T 細胞または CD8⁺T 細胞が存在するこ

とが報告され自己免疫疾患の側面を有することが明らかとなりつつある。そのため、自己抗原特異的な CD8⁺T 細胞は乾癬病態において重要な役割を果たす可能性が指摘されている。この点に関連して、これまでにがん免疫や自己免疫疾患では Th17 細胞が CD8⁺T 細胞反応を促進することが知られている。本研究においても IMQ 誘発性長期感作モデルで皮膚浸潤 CD8⁺T 細胞が増加することが明らかとなった。これは Th17 細胞の CD8⁺T 細胞反応の促進を介した乾癬病態の形成への寄与を支持するものと考えられる。

以上、CCR4 は乾癬病態において Th17 細胞と DC のクラスター形成に関わることで Th17 細胞の増殖を促進し乾癬病態の形成に寄与することが明らかとなった。また、一部の重症乾癬患者で見られる CCL22 の発現増加は Th17 細胞の皮膚浸潤に関与することが示唆された。さらに CCR4 は乾癬病態の有効な治療標的であることが示唆された。CCR4 は既知の皮膚浸潤としての機能だけでなくリンパ節内での細胞局在を制御することにより Th17 細胞応答が関与する疾患の形成や免疫応答に関与する可能性が示された。