

氏名 (生年月日) ^{うえ やま} 上山 あずみ (1979年1月9日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第208号

学位授与の日付 2017年9月29日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 乾癬などの炎症性皮膚疾患モデル動物の病因・病態に寄与する T 細胞および樹状細胞の解析

論文審査委員 (主査) 教授 西口 工司

(副査) 教授 中田 徹男

(副査) 教授 加藤 伸一

論文内容の要旨

序論

皮膚は、体の中で最も広い面積をもつ臓器であり、特に免疫機能が高く、体温調整や水分調整を行うとともに、外部からの様々な刺激から体を保護する重要な役割を担っている。皮膚に異常をきたす皮膚疾患は非常に種類が多く、専門医が詳細に分類すると 400 種類にもなると言われている。その中でもアトピー性皮膚炎は最もよくみられる慢性の炎症性皮膚疾患であり、全世界における小児の推定有病率は7~8%、日本でも 45.6 万人が罹患しているとされ、症状が悪化すると強い痒痒感により夜も眠れず、生活の質 (QOL) の低下や社会生活の障害をきたしている。また、アトピー性皮膚炎と並ぶ二大慢性炎症性皮膚疾患として乾癬がある。特に欧米において発症者が多く、有病率は2~3%と言われている。日本でも生活習慣の変化とともに患者数が増加し続けており、国内の患者数はおよそ 12.5 万人と推定されている。表皮の細胞増殖亢進と分化不全を特徴とする炎症性皮膚疾患であり、一度発症すると長期にわたって寛解と増悪を繰り返す完治が難しい疾患であるため、日常生活の中で精神的な苦痛や悩みを抱えている患者が多い。

近年、抗サイトカイン抗体等の生物学的製剤の登場によって病態解明が進展し、両疾患ともに T 細胞の機能異常が原因で、アトピー性皮膚炎は 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞応答、乾癬は 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞応答の過剰な活性化が病態発症に大きく関与していることが明らかとなり、生物学的製剤の開発とともに高い効果が期待できる治療が可能となってきた。そして現在も、より利便性に優れ、安全かつ強い効果を発揮する新薬の開発に向けた創薬研究が活発に進められている。

創薬研究においては、薬効評価や疾患機序の解明を目的として、適切な疾患モデル動物の開発が不可欠である。しかしながら、複雑多岐にわたるヒトの病態を全ての面で正確に反映した疾患モデル動物を実現することは困難である。現在までに、皮膚疾患の有用な非臨床評価モデルとして多くのモデル動物が作出されてきた。それぞれに特徴的な表現型、様々な特性や利点、ヒト病態との相違点が存在し、個々の創薬標的に応じて適した疾患モデル動物を選択することで、創薬の成功確率をあげることもつながると考えられる。しかしながら、皮膚疾患のモデル動物における病因や病態に関して、特に免疫学的観点から詳細に検討された報告は十分ではなく、不明な部分が多い。このことは、皮膚

疾患を対象として免疫細胞を標的とした創薬研究を行ううえで、評価のための疾患モデル動物の選択を困難にしている。

そこで、本研究では、3種類の皮膚疾患モデル動物について、それぞれの病因および病態に関連する免疫学的特性を明らかにする目的で解析し、以下の知見を得た。

第1章 オキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

アレルギー性接触性皮膚炎モデルとしてオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルを構築し、病変部に浸潤するT細胞について詳細に解析した。その結果、電位依存性カリウムチャネルKv1.3の機能をもつエフェクターメモリーT細胞(T_{EM}細胞)が本モデルの病態形成に寄与していることを示した。オキサゾロンなどのハプテンで誘発する皮膚炎モデルは、炎症性皮膚疾患を対象とした創薬研究において簡便に作製可能なモデルとして汎用されているが、急性モデルであることから慢性皮膚疾患とは表現型が異なり、特にインターフェロン- γ が関与するTh1型病態である点が、アトピー性皮膚炎や乾癬の病態とは異なる。しかし、T_{EM}細胞は、疾患によらず炎症組織中において重要な役割を果たすT細胞であることから、本モデルは、Kv1.3をはじめとしてT_{EM}細胞を標的とした創薬研究において、有用であることを示した。

第2章 イミキモド誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

乾癬モデルとして汎用されているイミキモド(IMQ)誘発皮膚炎モデルについて、その病態発症メカニズムを解明するために、IMQの受容体であるToll様受容体7(TLR7)を発現する樹状細胞(DC)に着目してIMQの作用を解析した。その結果、IMQによって、形質細胞様DCおよびTip-DC(tumor necrosis factor α and inducible nitric oxide synthetase-producing DC)が活性化され、Th17経路の誘導と乾癬様病態が惹起され得るメカニズムのひとつを明らかとした。ヒト乾癬患者においても、TLR7アゴニストとして働く抗菌ペプチドLL37と自己RNA複合体がトリガーとなって、同様のメカニズムで病態が引き起こされている可能性が考えられ、特にDCを標的とした乾癬の治療薬開発研究において、本モデルは有用であると考えられた。

第3章 K14.Stat3CマウスTPA誘発乾癬モデルにおける病態発症メカニズムの免疫学的解析

活性化型Stat3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)を恒常的に表皮に発現させたトランスジェニックマウスを用いてK14.Stat3CマウスTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)誘発乾癬モデルを構築し、病変部皮膚に浸潤するIL-17産生細胞ポピュレーションを詳細に解析した。その結果、本モデルの病態に寄与するIL-17産生細胞サブセットは単一ではなく、ヒト乾癬病態と同様に、CD4陽性のTh17細胞や、CD8陽性の17型細胞障害性T細胞、真皮 $\gamma\delta$ T細胞、3型自然リンパ球の全てがIL-17を産生し、病態形成に関与していることを明らかにした。さらに、乾癬病態に寄与するIL-17産生サブセットとして、新たにCD4陰性CD8陰性の $\alpha\beta$ -TCR⁺ double negative T細胞の存在を見出した。乾癬モデルとして広く活用されているIMQ誘発皮膚炎モデルは、真皮 $\gamma\delta$ T細胞のみがIL-17を産生しており、他の細胞サブセットの寄与が少ない点がヒト乾癬病態と異なっている懸念がある。これに対し、TPA誘発K14.Stat3C-Tgマウス乾癬モデルは、病態に寄与するIL-17産生細胞ポピュレーションがヒトと類似しており、T細胞を標的とした乾癬の治療薬開発研究への有用性が示された。

総括

本研究では3種類の皮膚疾患モデル動物における病態発症メカニズムについて検討し、免疫学的特性を明らかにするとともに、ヒト病態との類似点を明確に示した。また、それぞれのモデル動物の病態解析を通して、Kv1.3阻害剤の創薬標的としてのコンセプトの実証、未だ不明な部分の多い乾癬の病態発症メカニズムの解明につながる知見、乾癬病態に寄与する新たなIL-17産生細胞サブセットの同定など、新たな研究成果も得ることができた。これらの知見は、研究の目的や個々の創薬標的に応じて最適なモデルを選択するうえで有用であり、また、皮膚疾患の病態解明や新薬開発の一助となり、今後の創薬研究にとって有用な情報になり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、炎症性皮膚疾患が、T細胞の機能異常に起因することが明らかにされ、抗サイトカイン抗体等の生物学的製剤の開発に続いて、さらなる創薬研究が進められている。創薬研究においては、適切な疾患モデル動物が不可欠であるものの、複雑多岐にわたるヒトの病態を全ての面で正確に反映した疾患モデル動物の実現は困難である。多くの炎症性皮膚疾患の有用な非臨床評価モデルが作出されているものの、その病因や病態に関して、特に免疫学的観点から詳細に検討された報告は十分ではなく、不明な部分が多い。そこで申請者は、炎症性皮膚疾患モデル動物の病因および病態に関連する免疫学的特性について検討し、以下の結果を得た。

第1章では、アレルギー性接触性皮膚炎モデルであるオキサゾロン誘発ラット耳介炎症モデルについて、病変部に浸潤するT細胞が詳細に解析された。その結果、電位依存性カリウムチャンネルKv1.3の機能を有するエフェクターメモリーT細胞(T_{EM}細胞)が、病態形成に寄与していることを明らかにした。T_{EM}細胞は、疾患によらず炎症組織中において重要な役割を果たすことから、Kv1.3をはじめとしたT_{EM}細胞を標的とする創薬研究に対する本モデルの有用性が示された。

第2章では、乾癬モデルとして汎用されているイミキモド(IMQ)誘発皮膚炎モデルについて、IMQの受容体であるToll様受容体7(TLR7)を発現する樹状細胞(DC)に着目した解析が行われた。その結果、IMQにより形質細胞様DCおよびTip-DC(tumor necrosis factor α and inducible nitric oxide synthetase-producing DC)が活性化され、Th17経路の誘導と乾癬様病態が惹起され得るメカニズムの一つが明らかにされた。

第3章では、活性型Stat3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)を恒常的に表皮に発現させたトランスジェニックマウスを用いてK14.Stat3CマウスTPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)誘発乾癬モデルが構築され、病変部皮膚に浸潤するIL-17産生細胞ポピュレーションが詳細に解析された。その結果、本病態に寄与するIL-17産生細胞サブセットは単一ではなく、ヒト乾癬病態と同様、CD4陽性Th17細胞、CD8陽性17型細胞障害性T細胞、真皮 $\gamma\delta$ T細胞および3型自然リンパ球の全てがIL-17を産生し、病態形成に関与することが明らかにされた。さらに、乾癬病態に寄与するIL-17産生サブセットとして、新たにCD4陰性CD8陰性の $\alpha\beta$ -TCR⁺ double negative T細胞の存在が見出された。本モデルは、病態に寄与するIL-17産生細胞ポピュレーションがヒトと類似しており、T細胞を標的とした乾癬の治療薬開発研究への有用性が示された。

これらの研究成果は、皮膚疾患モデル動物における免疫学的特性を明らかにするとともに、ヒトの病態との類似点を明確にした点で重要であり、今後の炎症性皮膚疾患の病態解明や新薬開発にとって有益な情報になり得ると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。