

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19710

研究課題名(和文)FTY720の乾癬に対する治療有効性の検討及び機序の解明

研究課題名(英文)Study to evaluate treatment effect of FTY720 on psoriasis in a mouse model

研究代表者

鎌田 昌洋(Kamata, Masahiro)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：70431856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：イミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて、FTY720の乾癬治療薬としての可能性とその作用機序について検討した。FTY720群では臨床スコアは低く組織学的にも表皮の厚さが有意に薄かった。炎症細胞の数も少なく、制御性T細胞の数が多くみられた。また、皮膚でのIL17-A、IL-17FのmRNA発現は有意にFTY720投与群の方が低下していたが、鼠径リンパ節では、IL-17A、IL-17Fのは発現が高かった。以上より、FTY720は乾癬の皮疹を形成するIL-17産生細胞のリンパ節から皮膚の遊走を阻害すると同時に、皮膚にて制御性T細胞を誘導することでイミキモドによる乾癬皮疹形成を軽減したと考察できる。

研究成果の概要(英文)：We examined whether FTY720 is effective for psoriasis using imiquimod-induced psoriasiform dermatitis mouse model. FTY720 ameliorated imiquimod-induced psoriasiform dermatitis clinically and pathological compared to control. The number of inflammatory cells was lower, and the number of regulatory T cells was higher in mice treated with FTY720 than in vehicle-treated mice. In mice treated with FTY720, expression of IL-17A and IL-17F mRNA in the affected skin was decreased, in contrast, that in inguinal lymph nodes was elevated, which suggests that FTY720 should be effective for psoriasis by hindering cells producing IL-17 from migrating from lymph nodes to the skin.

研究分野：乾癬

キーワード：乾癬 FTY720 フィンゴリモド 制御性T細胞 イミキモド IL-17 IL-10 Foxp3

1. 研究開始当初の背景

1) 乾癬の病態の理解および新規治療法開発の必要性

乾癬は有病率が日本では 0.025%~0.11%で、欧米では 2~3%の疾患であり、世界中に多くの罹患患者がいる。全身に厚い鱗屑を伴う紅斑が散在するため、鱗屑が移動のたびにがれおち、美容上の問題も伴うため、患者の QOL が著しく障害される。病因として多因子遺伝や薬剤による誘発、細菌感染との関連性、T 細胞、樹状細胞、単球などを含む免疫学的異常、ケラチノサイトの分化、増殖の異常などが指摘されてきているが、未だ明らかではない。最近では乾癬の病態形成に TNF- α 、IL-17 や IL-23/IL-12p40 などの特定のサイトカインが深く関与することがわかっており、それらを阻害する抗体である生物学的製剤が乾癬に著効することが明らかとなっている。このように、乾癬の病態を正しく理解することは乾癬の治療につながり、世界中の多くの乾癬患者の治療に役立てることにつながると考えられる。

また、生物学的製剤は非常の効果の高い薬剤であるが、生物学的製剤を投与しても効果が十分に得られない症例や、生物学的製剤に対する抗体産生などによりその効果が減弱、無効化する症例も報告されており、全く機序の異なる新規薬剤の開発はより多くの乾癬患者の QOL の向上に貢献できると考えられる。

2) 乾癬の病態形成における炎症細胞浸潤の重要性

乾癬の病変部皮膚には IFN- γ を主に産生する Th1 細胞が多く見られること、ケラチノサイトから IL-8/CXCL8, GRO- α /CXCL1, S100A7/A8/A9 などのケモカインが分泌され、好中球が病変部に遊走してくることは古くから知られている。さらに病変部の樹状細胞は TNF- α 、IL-23, IL-20 を産生し、T 細胞、ケラチノサイトを活性化する。このうち、抗 TNF- α 抗体は難治な乾癬を含めて、非常に優れた効果を発揮することがわかっている。さらに、IL-23 は IL-23p19 と IL-12p40 のサブユニットからなるが、このうち、IL-12p40 を阻害する抗体の投与も乾癬に著効することから、IL-23 は TNF- α とともに、乾癬の病態形成に非常に重要なサイトカインであることが治療効果から逆に明らかとなった。その IL-23 は Th17 細胞の維持に重要であることから、Th17 細胞の重要性が注目されている。Th17 細胞は IL-17、IL-22 を分泌し、さらに表皮の過形成を促進する。このように、乾癬患者におけるサイトカイン、ケモカインの研究はそのまま乾癬の治療につながる可能性もあることから、世界中で精力的に行われている。

3) FTY720

FTY720 は、生体内でリン酸化体に変換され、T 細胞上のスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体に結合し、S1P 受容体の発現低下を引き起こす。S1P 受容体の発現が低下した T 細胞は、リンパ節から移出できなくなる。その結果、T 細胞はリンパ節にトラップされ、炎症を起こさず末梢の部位まで到達できず、免疫抑制作用を発揮する。すでに経口服用が可能な多発性硬化症の治療薬として発売されており、上記のように乾癬の病態にはリンパ節から皮膚に遊走する T 細胞が非常に重要な役割を果たしていることから、FTY720 が乾癬に対して一定の治療効果を上げることが期待できる。さらに、ターゲットとなる FTY720 の T 細胞の系統は Th1 もしくは Th17 であり、これらの細胞はすでに多発性硬化症の病態の中心を担うこともわかっており、その共通性からさらに乾癬への治療効果が期待される。

4) 乾癬の動物モデル：イミキモド誘発乾癬モデルマウス

イミキモドを皮膚に外用して作成するイミキモド誘発乾癬モデルマウスは、著明な鱗屑と浸潤を伴う紅斑を特徴とし、組織学的には表皮肥厚、真皮上層の炎症細胞浸潤を有し、乾癬患者の病態をよく反映するモデルマウスであると考えられている。また、病変部皮膚では IL-17A, IL-17F, IL-23 といった乾癬に関連する各種サイトカインの産生が亢進している。イミキモドは TLR7/8 のリガンドであり、外用により形質様樹状細胞を活性化し、乾癬の病態を形成すると考えられている。イミキモド外用によって引き起こされる一連の炎症細胞活性化および表皮肥厚は、ヒト乾癬患者においても認められる現象であり、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける皮膚は乾癬と類似した免疫学的異常によることが推察される。

2. 研究の目的

このように乾癬の病態には T 細胞をはじめとする様々な炎症細胞の関与がこれまでに指摘されており、それらの皮膚への浸潤を阻害することができれば、実際の治療に結びつく可能性がある。本研究の目的はイミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて、FTY720 の乾癬治療薬としての可能性とその作用機序を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

1) マウスの維持と繁殖

本研究では BALB/c マウスを使用する予定であり、日本 SLC より購入し、動物実験施設にて繁殖・維持した。実験には 7-12 週齢のマウスを用いた。

2) イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作成、FTY720 投与、および臨床的・組織学的評価方

法

2-a) イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作成

剃毛したマウスの背部皮膚にイミキモド（商品名：ベセルナクリーム、持田製薬株式会社）を125mg/日で、6日間連日外用し、乾癬皮疹が誘導されることを確認した。

2-b) FTY720 投与方法

野生型マウスにイミキモドを連日（6日間）外用し乾癬皮疹を誘導するが、同時に PBS 0.1ml または FTY720 0.1ml (3.0mg/kg) も連日腹腔内投与した。

2-c) 皮疹の肉眼的評価

6日間のイミキモド連日外用終了後に FTY720 投与群および PBS 投与群各マウスの背部皮膚における紅斑、浸潤、鱗屑の程度を乾癬重症度のスコア法である PASI (Psoriasis Area and Severity Index) スコアに準じて、1-5 のスコアリング（1なし、2軽度、3中等度、4高度、5極めて高度）で評価し、FTY720 が乾癬皮疹を抑制できるかどうかを検討した（Van der Fits Let al. J Immunol. 182:5836, 2009）。

2-d) 皮疹の組織学的評価

6日間のイミキモド連日外用が終了した FTY720 および PBS 投与群の各マウスの背部皮膚を 6mm トレパンを用いて採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋し、6 μm の厚さで切片を作製し、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。1 検体中 5 箇所をランダムに選び、表皮の厚さを測定し、平均化した。また、炎症細胞浸潤に関しては 400 倍の拡大率で 1 検体中 5 箇所をランダムに選び炎症細胞をカウントした。解析については最低 5 匹のマウスを用いた。

2-e) 皮疹の免疫学的評価

乾癬の皮疹に浸潤する細胞（T 細胞、樹状細胞、単球、好中球）の数を FTY720 投与群および PBS 投与群で免疫組織学的に検討し、FTY720 がどの炎症細胞浸潤を抑制しているかを検討した。

3) FTY720 および PBS 投与イミキモド誘発乾癬マウスにおけるサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現の定量的解析 (real-time PCR 法)

FTY720 および PBS 投与下のイミキモド誘発乾癬マウス皮膚におけるサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、Th1 サイトカインである IFN- γ 、CXCL9、CXCL10、CXCL11、Th17 サイトカインおよびケモカインである IL-17A、IL-17F、IL-12p40、IL-23、CCL20、乾癬の病態形成に関与している各種サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-22などを測定する。イミキモド外用開始前、2日後、4日後、6日後において、これらのサイトカイン、

ケモカインの mRNA の発現を real-time PCR 法によって経時的に評価した。同様に FTY720 および PBS 投与下のイミキモド誘発乾癬マウスのイミキモド外用開始前、2日後、4日後、6日後において、鼠径リンパ節からも全 RNA を単離、mRNA を cDNA に逆転写し、上記サイトカインの mRNA 発現を定量的に解析した。各サイトカインについて、皮膚病変の mRNA 発現量と比較し、T 細胞の分化やリンパ節から皮膚への遊走について解析、考察した。解析については最低 5 匹のマウスを用いた。

4. 研究成果

FTY720 投与群の方が day 5, day 6 において臨床スコアが優位に低く、FTY720 が乾癬皮疹形成を抑制した。また、day 6 の皮疹を組織学的に評価したところ、FTY720 投与後群の方が有意に表皮の厚さが有意に薄かった。炎症細胞の数においても FTY720 投与群の方が、有意に低下していた。更に、乾癬の皮疹に浸潤する制御性 T 細胞の数を、抗 Foxp3 抗体を用いた免疫染色により評価したところ、FTY720 投与群の方が PBS 投与群よりも Foxp3 陽性細胞が多くみられた。次に FTY720 および PBS 投与下のイミキモド誘発乾癬マウス皮膚におけるサイトカイン、ケモカインの mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定したところ、IL17-A, IL-17F, IL-22 の発現は day 6 で有意に FTY720 投与群の方が PBS 投与群より発現が低下していた。IL-23 の発現は FTY720 投与群で低い傾向にあったが有意差はみられなかった。TGF β の発現は FTY720 投与群において day 6 で有意に上昇していた。IL-10 については発現量に有意差はみられなかった。鼠径リンパ節の mRNA 発現は、FTY 投与群の方が IL-17A, IL-17F で高い傾向にあったが、有意差はみられなかった。以上より、FTY720 は、乾癬の皮疹を形成する IL-17 産生細胞のリンパ節から皮膚の遊走を阻害すると同時に、皮膚にて制御性 T 細胞を誘導することで、イミキモドによる乾癬皮疹形成を軽減したと考察できる。本研究より FTY720 が乾癬の治療薬として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

鎌田 昌洋（KAMATA, Masahiro）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：70431856