

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860872

研究課題名(和文) Th17細胞をターゲットとした皮膚疾患の治療

研究課題名(英文) a study of treatment strategy for fibrotic skin disorders, which targets Th17 cells

## 研究代表者

岡本 芳伸 (Okamoto, Yoshinobu)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：90707100

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)：全身性強皮症は原因不明の線維化疾患で、Th17細胞と関連するIL-17Aなどが関与する報告が近年増えている。線維化の機序解明と臨床応用を目指し、皮膚線維化病変におけるIL-17Aの役割を検討した。成長因子投与による皮膚線維化モデルマウスにおいて、野生型と比較してIL-17A欠損マウスで線維化が改善し、炎症細胞の浸潤が軽減した。IL-17Aは、皮膚への直接投与でも持続的な線維化を誘導し、成長因子CTGFの産生増加に関連して慢性の線維化病変の維持にかかわることが示唆された。また、薬剤開発を目指し、IL-17A抑制物質ウルソール酸の投与を試みたが、理想的な濃度や投与方法などの改良を要すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Systemic sclerosis (SSc) is a fibrotic disorder, the etiology of which has not yet been fully elucidated. Recently, growing evidence has demonstrated that Th17 cells and IL-17A plays a crucial role in the pathogenesis of SSc. The aim of this study was to examine the role of IL-17A in the progression of skin fibrosis in experimental murine fibrosis model by exogenous injection of growth factors. The loss of IL-17A significantly attenuated the rapid subcutaneous fibrosis and infiltration of inflammatory cells, to compared with wild-type. The daily injections of IL-17A alone induced fibrosis with time, and increased expression levels of TGF- $\beta$ 1 and CTGF mRNA. This findings suggest that IL-17A contributes to production of CTGF, thereby leading to persistent fibrosis. In addition, with the aim of drug development, we attempt to administer IL-17A-inhibitor agent: ursolic acid. we improve such as the ideal concentration and method of administration.

研究分野：膠原病

キーワード：サイトカイン TGF- $\beta$ 1 CTGF IL-17A

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT細胞(Th)の一種であるTh17細胞が発見されて以来、その役割が様々な疾患で注目されている。Th細胞は白血球の大部分を占めており、様々な病態に関与しているものと考えられている。Th1細胞とTh2細胞の相互のバランスで疾患の病態を説明しようとするTh1/Th2パラダイムが1986年より知られてきた。そこに、近年Th17などの新たなThサブセットが確立し、各サブセットの役割分担は複雑となった。Th17は自己免疫や慢性炎症、感染防御などに関与していると考えられており、中でも皮膚や腸管などの免疫/炎症に重要な働きを有している。炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬の病態には、Th17とInterleukin (IL)-17Aなどの関連サイトカインの関与が大きく、それらを標的とした治療として、Th17の増殖や維持に関連するIL-12/23に対する中和抗体やIL-17A抗体の投与が既に臨床応用され効果を上げている。またIL-17 receptor Aに対する抗体の臨床試験が国内でも行われ、その効果が期待されている。乾癬以外には、接触皮膚炎(Nakae,S.et al.: Immunity, 17: 375-87, 2002)やアトピー性皮膚炎などの動物モデルでTh17やIL-17Aの関与を示唆する報告がみられる。ほか皮膚以外の他臓器の炎症性疾患や自己免疫疾患、また線維化病変においても、Th17やIL-17Aの関与が指摘されてきている。

皮膚や全身諸臓器の線維化を特徴とする自己免疫疾患である全身性強皮症においても、患者やモデルマウスにおいてTh17とIL-17Aなどの関与の報告が増えている。全身性強皮症の病態解明を目指して、申請者らはこれまでの研究で、強皮症の動物モデルとして現在最も使用されているブレオマイシン(BLM)誘導性の強皮症モデルマウスを用いて、Th1、Th2、Th17サブセットのそれぞれ代表的なサイトカインであるIFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17Aの皮膚病変部における役割を検討してきた(Okamoto,Y.et al.:Arthritis Rheum., 64:3726-35,2012)。その結果は、IFN- $\gamma$ やIL-4の単独欠損マウスではBLM誘導性強皮症モデルの皮膚硬化の程度は野生型と変わらなかったが、IL-17A欠損マウスでは皮膚硬化が有意に抑制された。他にも、野生型マウスに比べIL-17A欠損マウスの皮膚では、BLM皮内注射による炎症細胞の線維化病変部位への浸潤が抑制されていた。またBLMの連日投与は、皮膚や脾臓におけるIL-17A発現を誘導し、脾臓におけるTh17細胞も増加させた。他にも、野生型マウスに比べIL-17A欠損マウスの皮膚では、強力な線維化誘導/維持因子であるTransforming growth factor(TGF)- $\beta$ とConnective tissue growth factor(CTGF)のBLM皮内注射による発現誘導が抑制されていた。またBLMの連日投与は、皮膚や脾臓におけるIL-17A発現を誘導し、脾臓におけるTh17細胞も増加させた。また、*in vitro*の検討では、皮膚線維芽細胞培地へ

のIL-17A添加がコラーゲン産生を用量依存的に増加させた。さらに、この培養実験においてIL-17A添加が皮膚線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ とCTGFの発現を亢進させた。IL-17Aが直接的に、あるいはこれらの成長因子の産生誘導を介して間接的に、病変部でのコラーゲン産生を亢進させたものと考えられた。さらに、遺伝的な強皮症モデルであるタイトスキンマウス(TSK/+)とIL-17A欠損マウスを交配して、IL-17Aを欠損したタイトスキンマウスを作成したところ、通常タイトスキンマウスよりも皮膚硬化が有意に抑制されていた。これら2種類の皮膚硬化モデルでの検討から、IL-17AがTGF- $\beta$ やCTGFなどと協調的に働き、強皮症などの皮膚硬化に関与している可能性が示された。つまり、少なくともこの強皮症動物モデルでは、皮膚硬化の形成過程における炎症細胞の誘導に関連して、IFN- $\gamma$ やIL-4と比較して、IL-17Aがより重要な役割を有していることが明らかとなり、IL-17Aが強皮症の皮膚硬化や自己免疫異常に関与している可能性が示された。

最近では、強皮症モデルマウスでToll-like Receptor(TLR)-4を欠損すると皮膚硬化は軽減し、IL-4/IL-17Aの発現が減弱する(Takahashi,T. et al.: Arthritis Rheum., 67: 254-265, 2014)という報告がなされた。Th17やIL-17Aは、他のサイトカインや免疫調節機構と関連して、尋常性乾癬のみならず他の疾患の発症においても、重要な役割を有している可能性が高いと考えられる。いまだ病態の全容が解明されていない全身性強皮症の線維化機序の解明を目指し、IL-17Aの役割の更なる検討が必要と考えられる。

近年、Th17の活性化とそれに伴うIL-17Aの産生を抑制するいくつかの薬剤や化合物が知られるようになってきた(Miossec P,et al. Nat Rev Drug Discov 11(10): 763-776, 2012)。その代表的な化合物として、ウルソール酸、SR1001、SR2211、celastrolなどが知られている。Th17やIL-17Aは、近年様々な疾患で治療ターゲットの有力な候補となってきたが、Th17の活性化を抑制する薬剤を用いた実際の検討は、尋常性乾癬以外では、未だ自己免疫性脳脊髄炎などでの少数の報告にとどまっている。Th17やIL-17Aに関連したこれまでの知見を基に、線維化疾患に対してもこれらの化合物の臨床応用が期待される。

## 2. 研究の目的

皮膚線維化や炎症反応におけるTh17やIL-17Aの詳細な役割の解明を目指して、本研究では、マウス強皮症モデルにおいて、IL-17Aの線維化における直接作用の検討を行う。またTh17の関与が指摘されている強皮症モデルにおいて、Th17の活性化を抑制することが知られている薬剤を投与して改善効果を確認する。強皮症モデルでの炎症や

皮膚硬化が抑制される結果が予想されるが、治療効果の機序についても、免疫学的手法を用いて解析したい。これらにより、全身性強皮症の病態解明、ひいては治療への発展、関連他疾患への応用を目指すものとする。

### 3. 研究の方法

BLMをマウスに連日28日間皮内注射すると真皮の線維化が生じることが知られている。またTGF- $\beta$ を生まれたばかりの新生児マウスに皮下投与することで線維化と血管新生が誘導される。この変化は一時的であるが、TGF- $\beta$ に連続してCTGFを投与すると線維化が持続することが知られる。これらのモデルでIL-17Aを欠損したマウスでの線維化の変化を比較評価することで、線維化におけるIL-17Aの詳細な役割を検討する。

また上記の強皮症モデル(BLM誘導性強皮症モデル、および成長因子注射モデル)において、Th17の活性化を抑制することが知られている化合物ウルソール酸の投与を試み、効果、副作用を明らかにすることを目指す。治療効果を認める場合には、その作用機序についても組織学的、免疫学的手法を用いて詳しく検討する。さらに、IL-17Aやその受容体に対する中和抗体による治療との比較や、IL-17A欠損マウスを用いた検討も行うことで、線維化疾患におけるTh17やIL-17Aの役割を詳細に解析したい。

#### ・効果判定について

線維化部位の皮膚を採取し、HE染色やコラーゲンの染色を行った病理標本で、真皮の厚さを測定する。また、線維化組織におけるコラーゲンの定量も行う。炎症の程度については、浸潤細胞の種類や数を免疫組織染色で解析する。

#### ・作用機序について

局所皮膚におけるIL-17Aやその他のTh17サイトカイン(IL-21、IL-22、IL-6、IL-8)、ケモカイン、接着分子、成長因子などの発現をreal time PCRや細胞抽出液を用いたELISAでの測定を行って解析する。また、局所皮膚より浸潤細胞を採取し、フローサイトメトリーで浸潤細胞とそれらが発現するサイトカイン、ケモカイン、ケモカイン受容体、活性化マーカーなどについて詳しく解析を行う。末梢血液中、皮膚局所、脾臓におけるTh17細胞の数をフローサイトメトリーを使用して確認する。

### 4. 研究成果

TGF- $\beta$ 投与モデルにおいては、野生型と比較してIL-17A欠損マウスで線維化が改善した(図1)。しかし、TGF- $\beta$ 投与CTGF連続投与モデルとTGF- $\beta$ 投与IL-17A連続投与モデルにおいては、IL-17A欠損マウスでも線維化が持続し改善に乏しいことを確認した。TGF- $\beta$ 投与モデルにおいて、IL-17A欠

損マウスでの線維化減弱部にはCD206陽性細胞の浸潤増加を伴っており、炎症制御性マクロファージの線維化改善への寄与が示唆された。

IL-17A欠損マウスでは、TGF- $\beta$ 誘導による早期の線維化が減弱した。

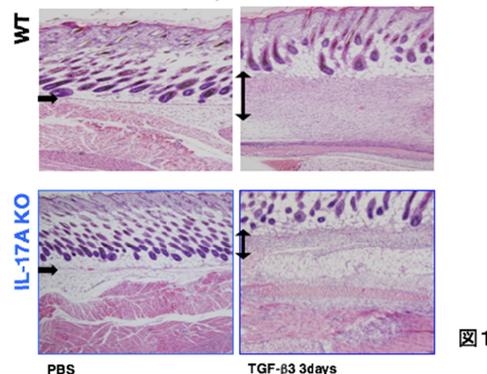


図1

またIL-17Aの皮膚局所への直接投与により持続的な線維化が維持された(図2)。同様のrealtimePCRにおいて、CTGFのmRNA産生を確認した。TGF- $\beta$ 投与CTGF連続投与モデルにおいて、IL-17A欠損マウスでリンパ球浸潤が減少した。またrealtimePCRにおいて、IL-17A欠損マウスにおけるCTGFのmRNA産生の低下を確認した。以上より、IL-17AはCTGF産生と関連して線維化病変の形成や維持にかかわっていると考えられ、IL-17Aを抑制することで慢性持続性の線維化病態の改善に繋がる可能性が示唆された。線維化における作用機序の解明という本研究の目的に合致して今後の発展性に繋がる意義ある新知見が得られたと考えられる。今後も解析を進めていく予定である。

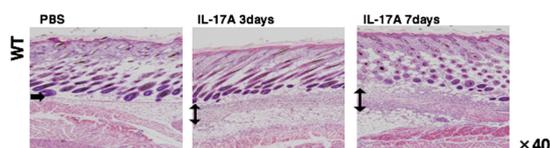


図2

IL-17Aの投与でも、炎症細胞優位の線維化を起こした。  
IL-17Aのみの連続投与で線維化は減弱せず。

また、線維化病変を改善する薬剤開発を目指して、IL-17A抑制による強皮症モデルの線維化の改善効果の検討も行った。IL-17A抑制物質としてウルソール酸の投与を試みたが、難溶性のためにDMSOや溶媒油滴への至適溶解濃度と、モデルマウスへの投与方法の検討に時間を要した。新生児マウス成長因子注射モデルにおいて、皮膚局所への投与や腹腔内への投与を行ったが、技術的ハードルからまだ一定の傾向の結果は得られていない。BLM投与モデルにおいて、腹腔内投与を行ったが、IL-17A抑制系列のマウス死亡率が想定以上に高い結果となった。これはIL-17A欠損マウスへのBLM誘導強皮症モデルと同様の傾向であり、薬剤投与によるIL-17A阻害に由来する感染抵抗性の破綻が考えられた。至適濃度や投与間隔、投与方法

などについて、IL-17A 抑制物質を用いた実験系の検討改良を、引き続き継続中である。

5．主な発表論文等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

岡本 芳伸 (OKAMOTO, Yoshinobu)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：90707100

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし