

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791056

研究課題名（和文）創傷治癒におけるケモカイン CCL17 の役割の解析

研究課題名（英文） Analysis of the role of CCL17 in wound healing

研究代表者

常深 祐一郎 (TSUNEMI YUICHIRO)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00361478

研究成果の概要（和文）：

表皮で産生されたケモカイン CCL17 が皮膚での免疫・炎症・再生に及ぼす影響を検討した。創傷治癒においては CCL17 は線維芽細胞の遊走を促進し、CCR4 を発現した NGF 産生リンパ球や肥満細胞を集めることにより創傷治癒を促進していることが示唆された。腫瘍免疫においては CCL17 が皮膚での腫瘍免疫を抑制している可能性が見いだされた。また抗アレルギー薬は表皮細胞ならびに真皮線維芽細胞からの CCL17 産生を抑制した。CCL17 は創傷の治療薬の候補となること、抗アレルギー薬を含め CCL17 やその受容体である CCR4 の阻害薬は皮膚のリモデリングや皮膚腫瘍の治療薬となりうることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

The effects of CCL17 produced by epidermal keratinocytes on immunity, inflammation and regeneration in the skin were investigated. CCL17 accelerates wound healing by promotion of fibroblast migration and recruitment of CCR4⁺NGF-producing lymphocytes and mastocytes. CCL17 may suppress tumor immunity in the skin. Cetirizine, an antihistamine drug, has inhibitory effects on CCL17 production by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. These suggest that CCL17 is a candidate drug for skin wound and inhibitors of CCL17 and its receptor, CCR4, may be available for prevention of remodeling after cutaneous inflammation and treatment for skin tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ケモカイン、CCL17、CCR4、創傷治癒、腫瘍免疫、表皮、線維芽細胞、制御性 T 細胞

- 研究開始当初の背景
 - ケモカイン CCL17/TARC

ケモカインは、免疫や炎症反応において、様々な白血球の遊走や活性化を司っている

ペプチドの一群である。免疫や炎症反応の起きている場所への各種の白血球の選択的動員は、それぞれの白血球に選択的に受容体が発現していることによる。ケモカインは、2つのシステイン残基（システイン-システインモチーフ）間に存在するアミノ酸の数によってサブグループに分けられる。C、CC、CXC、CX3Cの4つのグループがある。ケモカイン受容体の方も、XCR1、CCR1-10、CXCR1-6、CX3CR1に分けられる。Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CC chemokine ligand (CCL)17は、CCケモカインの1つで、CC chemokine receptor (CCR) 4のリガンドである。CCR4は、おもにTh2細胞、好塩基球に発現しており、これらの細胞の遊走に参与している。

(2) CCL17と皮膚疾患

皮膚科領域でCCL17がまず注目されたのはアトピー性皮膚炎(AD)である。以下のことからCCL17は病変部にCCR4陽性Th2細胞を遊走させることによりTh2タイプの反応を引き起こし、ADの病態に重要な役割を果たしている。病変部では表皮、血管内皮、浸潤T細胞、真皮樹状細胞でCCL17の産生が増加し、CCR4陽性細胞の数も増加している。また末梢血でのCCR4陽性CD4陽性T細胞数も増加しており、CCR4は主にCLA陽性皮膚向性T細胞に発現している。末梢血中でのCD4陽性T細胞でのCCR4陽性率は病勢を反映している。血清中CCL17濃度は、AD患者で健常人より有意に増加しており、ADの重症度と相関する(3)CCL17の皮膚炎での役割の研究とその過程で得られた創傷治癒への関与を示唆する所見

上記の(2)で述べたようにCCL17はADの病態において重要な役割を果たしているが、中でも表皮角化細胞によって産生されるCCL17の意義を明らかにするため、われわれは表皮基底層に発現するkeratin 14のプロモーター支配下に、表皮でCCL17を恒常的に強発現するトランスジェニックマウス(CCL17-Tgマウス)を作成した。このマウスでは、contact hypersensitivity (CHS)においてTh1型反応は抑制され、Th2型反応が促進されること、慢性にCHSで著明に血清IgEが増加すること、さらに一次刺激によっても皮膚炎が発症し、血清IgEの上昇がおこること、皮膚で肥満細胞が増加することなどを見いだした。表皮で産生されたCCL17がADの病態に参与していることの裏付けとなった(Eur J Immunol; 36: 2116-2127, 2006)。その中でCCL17-Tgマウスでは、皮膚炎を惹起すると苔癬化が強くおこることが判明した。苔癬化はいわゆる組織のリモデリングの1種で、さらにリモデリングは、創傷治癒過程と深く関連している。このため、CCL17が創傷治癒にも関与している

可能性が推測された。

(4) 難治性皮膚潰瘍の臨床的問題点

難治性皮膚潰瘍の治療は様々な治療法が登場した現在においても、依然として大きな問題となっている。増加の一途をたどる糖尿病患者の足趾の潰瘍を例にとっても、糖尿病による創傷治癒能力の低下に、血行不全、免疫低下などが併存し、極めて難治となり、切断を余儀なくされることが多い。それにより患者のQOL、生命予後は著しく低下する。また、高齢化社会において、褥瘡も看護上、医療上の緊急課題である。皮膚潰瘍の治療薬として、種々の薬剤が存在するが、臨床の現場ではまだまだ満足いく治療ができないのが現実であり、新規の治療薬の開発が急務である。そのなかで、ケモカインは創傷治癒薬としての開発がなされておらず、有望な候補である。

(5) CCL17の創傷治癒への関与

そこで創傷治癒について検討したところこれまでの研究により以下のようなことが明らかになった。

① CCL17-Tgマウスでは、野生型マウス(non-Tgマウス)と比較して、有意に創傷治癒が促進していた。

② 組織学的にはCCL17-Tgマウスでは早期に肉芽形成みられ、(創傷治癒に重要な)肥満細胞数が増加していた。

③ (NGFは創傷治癒に重要であるが、)血清中NGF濃度はCCL17-Tgマウスでは上昇していた。

④ CCL17の作用する細胞を検討したところケラチノサイトはCCL17の受容体であるCCR4を発現していなかったが、線維芽細胞では発現がみられた。

⑤ CCL17刺激によって線維芽細胞はNGFを産生した。一方ケラチノサイトでは産生はみられなかった。

⑥ CCL17-Tgマウスより単離した線維芽細胞はCCL17添加により増殖能が亢進したが、non-Tgマウスより単離した線維芽細胞では変化がみられなかった。

(6) CCL17と皮膚炎の関連の研究において得られたCCL17の腫瘍免疫への関与を示唆する所見

上記(3)の実験の過程で、表皮で産生されたCCL17がリンパ球を遊走させるか、リンパ球が表皮向性示すか、をみるためにリンパ球のcell lineを皮下注射する実験を行ったところ、腫瘍を形成した。その腫瘍はCCL17-Tgマウスでは、野生型マウス(non-Tgマウス)と比較して、有意に大きく、これは再現性が得られた。このことから、CCL17-Tgマウスでは腫瘍免疫が抑制されている可能性が示唆された。その機序としては、CCR4は制御性T細胞にも発現しているため、表皮で産生されたCCL17がCCR4陽性制御性T細胞を遊走させて、腫瘍免疫を抑制している、というこ

とが仮説として考えられた。

2. 研究の目的

(1) CCL17 の創傷治癒促進機序の解明

ここまでに得られたデータを追試しながら、ケモカイン CCL17 が創傷治癒を促進する機序について、さらに詳細に検討する。

(2) ケモカイン CCL17 の腫瘍免疫への関与の検討

ケモカイン CCL17 が腫瘍の増殖に影響を及ぼすかどうかを検討する。その上で、その機序を解明する。

(3) 抗アレルギー薬の CCL17 産生に及ぼす効果の検討

抗アレルギー薬が CCL17 の産生を抑制するかを検討する。

3. 研究の方法

「4. 研究成果」と併せて各検討事項ごとに記載する。

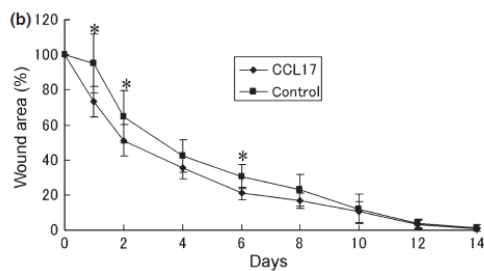
4. 研究成果

CCL17-Tg マウスは過去に報告したものを使用した (Tsunemi Y et al. Eur J Immunol 2006; 36: 2116-2127)。background は C57BL/6 である。

(1) CCL17 の創傷治癒促進の機序の解明

①マウスの背部に 1.5cm の皮膚の全層欠損を作成した。これまでの実験で確認されているように CCL17-Tg マウスでは創の閉鎖が早かった。

②上記のように作成した創に recombinant CCL17 を注射により局所投与したところ、創の閉鎖が PBS を注射したものよりも促進していた。



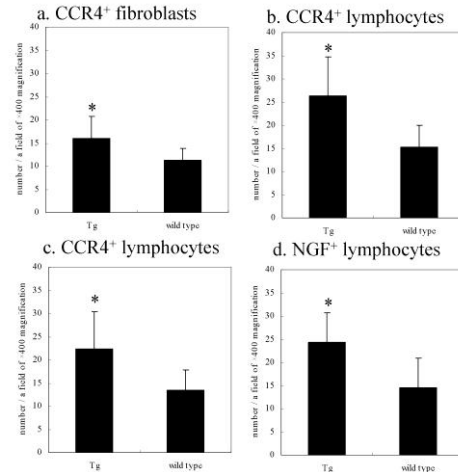
③創傷治癒過程を組織学的に検討したところ、CCL17-Tg マウスにおいては肉芽組織内の CCR4 陽性の線維芽細胞が non-Tg マウスと比較して増加していた。

CCR4 陽性のリンパ球は肉芽組織内、肉芽組織の周囲共に CCL17-Tg マウスでは増加していた。

④NGF は創傷治癒に作用する様々な細胞に作用し創傷治癒を促進する重要な物質である。その NGF の血清中濃度が CCL17-Tg マウスでは増加していたことから、創傷治癒に関与す

る他のサイトカインや成長因子等の血清中濃度を測定したが、stem cell factor, VEGF, TNF- α , TGF- β , IGF-I, EGF, GM-CSF 濃度には差がみられなかった。

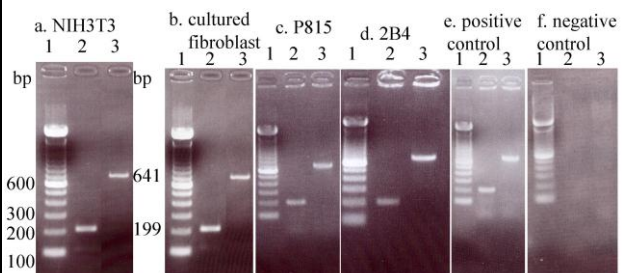
⑤CCL17-Tg マウスにおいて血清中の NGF 濃度が高いことより組織学的にも NGF 陽性細胞の検討を行ったところ、CCL17-Tg マウスでは、肉芽周囲の組織における NGF 陽性リンパ球数



が増加していた。

(a: 肉芽組織内の CCR4 陽性線維芽細胞数、b: 肉芽組織内の CCR4 陽性リンパ球数、c: 肉芽周囲の CCR4 陽性リンパ球数、d: NGF 陽性のリンパ球数)

⑥CCL17 によって遊走する可能性のある細胞を同定するため、各種細胞の CCR4 発現を mRNA レベルで検討した。線維芽細胞の cell line である NIH3T3、non-Tg マウスの皮膚より単離した線維芽細胞 (cultured fibroblast という)、肥満細胞の cell line である P815、T 細胞 hybridoma である 2B4 細胞の CCR4 mRNA 発現を RT-PCR にて解析したところ、これら全ての細胞において発現がみられた。

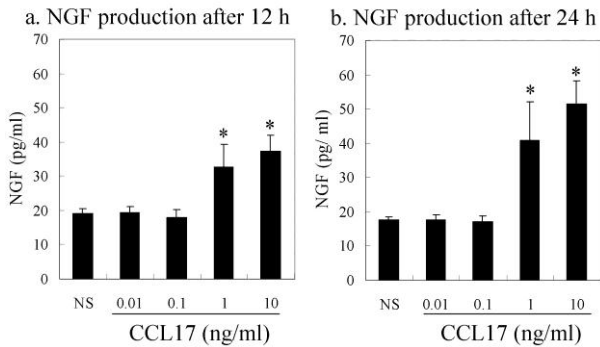


(1: size marker, 2: CCR4, 3: GAPDH)

⑦タンパクレベルでの CCR4 発現を確認するため NIH3T3, cultured fibroblast, 2B4 を culture slide 上に培養したのち固定し、CCR4 の免疫染色を行ったところ、これらの細胞には CCR4 が陽性であった。

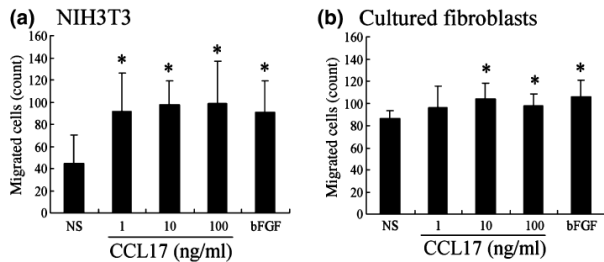
⑧免疫染色にて創傷治癒部位に NGF 陽性リン

パ球がみられたことよりリンパ球の NGF 産生を検討したところ、2B4 細胞からの NGF 産生は CCL17 によって促進された。



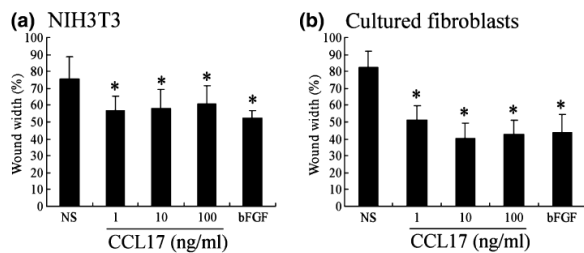
⑨CCL17 が線維芽細胞 (NIH3T3 と cultured fibroblast) の遊走に影響を与えるかを以下の2つの実験で検討した。

Boyden chamber assay では CCL17 は膜を通過する細胞数を有意に増加させた。



培養して confluent になった細胞をピペットの先で一定幅除去し、その幅が小さくなる速度を顕微鏡的に検討する *in vitro* scratch wound assay により、CCL17 はその幅の減少を促進させた。

つまり CCL17 は NIH3T3 と cultured fibroblast の遊走を促進することが判明した。



た。

⑩まとめると、以下ようになる。

CCL17-Tg マウスでは創傷治癒が促進しており、早期に肉芽形成がみられた。また CCL17 を創傷治癒局所に投与することにより創傷治癒が促進した。つまり、CCL17 は肉芽形成を促進することにより創傷治癒速度を上げている。CCL17-Tg マウスでは肉芽組織に CCR4 陽性線維芽細胞数の増加が観察された。

NIH3T3 および cultured fibroblast は mRNA レベルでもタンパクレベルでも CCR4 を発現していた。Boyden chamber assay ならびに *in vitro* scratch wound assay において CCL17 はこれら線維芽細胞の遊走を促進した。

CCL17-Tg マウスでは、血清中 NGF 濃度が増加していた。また、創傷治癒局所の NGF 陽性リンパ球が増加しており、CCR4 陽性リンパ球も増加していた。T 細胞である 2B4 細胞を用いた検討では、CCR4 を発現し、CCL17 刺激により NGF 産生が増加した。このことより、CCL17 は CCR4 陽性リンパ球を創傷治癒局所へ遊走させ、NGF 産生を促進している可能性がある。NGF は線維芽細胞の遊走や線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化させるほか角化細胞、肥満細胞、血管内皮細胞などにも作用し、創傷治癒に大きく関与している。よってリンパ球により創傷治癒局所で産生された NGF もまた創傷治癒に促進的に働いていると考えられる。

CCL17-Tg マウスでは創傷治癒局所の肥満細胞数も増加していたが、肥満細胞もまた、NGF や PDGF, VEGF と行った創傷治癒にきわめて重要な成長因子を分泌することによって創傷治癒を促進することが多数報告されている。

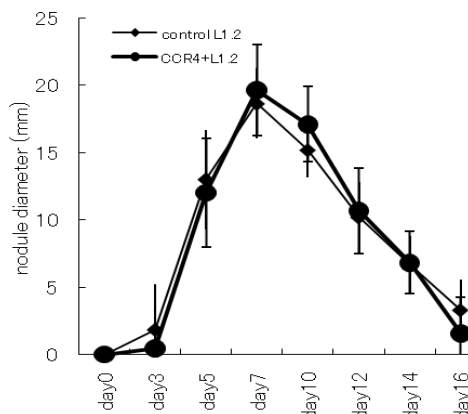
総合すると CCL17 は、線維芽細胞の遊走を促進し、CCR4 を発現した NGF 陽性 (産生) リンパ球や肥満細胞を集めることにより、創傷治癒を促進していると考えられる。

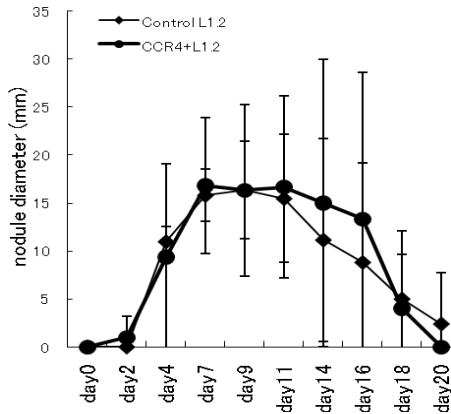
以上の研究結果は CCL17 が創傷治癒の治療薬となる可能性を示唆する。また、リモデリングの観点から見ると CCL17 や CCR4 の阻害薬がアレルギー炎症におけるリモデリングを予防する薬剤となりうることも示唆する。

(2)CCL17 の腫瘍免疫への関与の検討

CCL17 が腫瘍免疫に影響するかを検討するために CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスに腫瘍細胞を皮下注射してその増大速度を検討した。

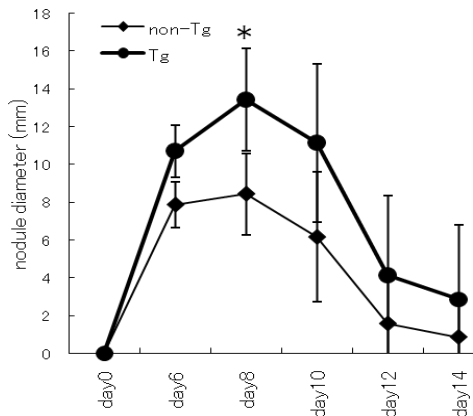
①マウス pre-B 細胞の cell line である L1.2 細胞と同細胞に CCR4 を強発現させた CCR4-L1.2 細胞をマウスの皮下注射したところ、いずれの細胞も結節を形成し、その体積は CCL17-Tg マウスで有意に大きかった。しかし L1.2 細胞と CCR4-L1.2 では差がなかった。



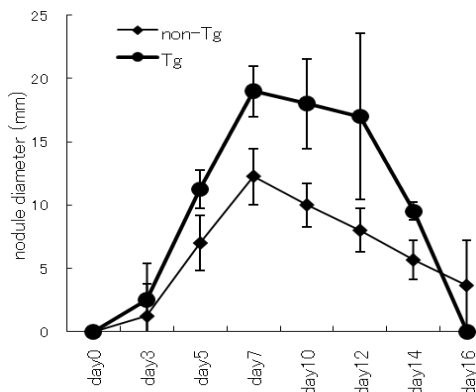


L1.2 細胞と CCR4-L1.2 細胞を non-Tg マウスに注射

L1.2 細胞と CCR4-L1.2 細胞を Tg マウスに注射



L1.2 細胞を CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスに注射



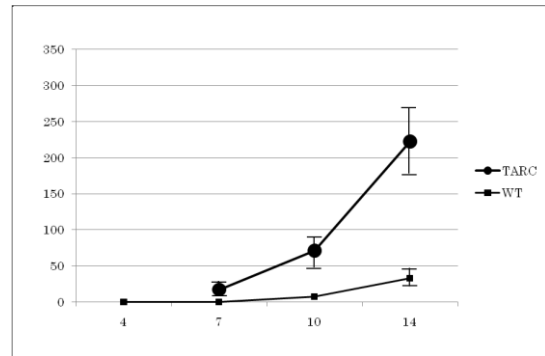
CCR4-L1.2 細胞を CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスに注射

この結果は CCL17-Tg マウスでは、腫瘍の増大速度は大きい、腫瘍の CCR4 の発現には依存しないことが分かる。

②上記①の実験で有意な差がみられたため、次に実際の腫瘍に近い状態を再現するため、メラノーマ細胞を用いた実験を行った。

マウスの腹部に B16F1 メラノーマ細胞を注射して、腫瘍結節の大きさを CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスで比較したところ、CCL17-Tg マウスで腫瘍結節は有意に増大した。

よって表皮よりの CCL17 によって皮膚での腫瘍細胞の増殖や生存が腫瘍細胞の種類によらず増加すること、CCL17 は腫瘍細胞そのものに作用しているのではなく腫瘍免疫を抑制している可能性があることが示唆された。



③腫瘍結節に浸潤している細胞を解析するため腫瘍結節を切除し real time PCR にて FOXP3 発現やサイトカイン発現を検討したところ、FOXP3 発現は CCL17-Tg マウスでやや増加している傾向が見られたが、予備実験段階であり結論づけられない。その他、種々の解析を行うも CCL17-Tg マウスで腫瘍結節が増大する機序につながる結果は現在のところ得られていない。

④現段階ではその機序は不明なものの CCL17 が腫瘍免疫を抑制している可能性を示したことは意義がある。CCL17 やその受容体である CCR4 の阻害薬が日光角化症などの皮膚腫瘍の治療薬に結びつく可能性がある。今後は CCL17 が腫瘍免疫に影響を及ぼす機序を詳細に解明する予定である。

(3) 抗アレルギー薬が CCL17 産生へ及ぼす影響の検討

創傷治癒過程は疾患によっては組織のリモデリングにつながるが、前述のごとく CCL17 は皮膚炎におけるリモデリングにも関与している可能性がある。よって CCL17 の阻

害薬はリモデリングや線維化に対しての治療薬となりうる。

セチリジンは表皮角化細胞や線維芽細胞からのCCL17産生を臨床濃度で抑制した。

抗ヒスタミン薬がCCL17産生を抑制することで、アレルギー炎症やそう痒の抑制のみならず組織のリモデリングも抑制する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Tamaki K, Sato S. Cetirizine hydrochloride suppresses the CCL17 production by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. Int J Dermatol 51(8), 2012, in press, 査読あり

② Kato T, Saeki H, Tsunemi Y, Shibata S, Tamaki K, Sato S. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CC chemokine ligand (CCL) 17 accelerates wound healing by enhancing fibroblast migration. Exp Dermatol 2011; 20: 669-74. 査読あり

doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01286.x.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常深 祐一郎 (TSUNEMI YUICHIRO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：00361478

(2) 研究協力者

加藤 豊章 (KATO TOYOAKI)
東京大学・医学部附属病院

森村 壮志 (MORIMURA SOSHI)
東京大学・医学部附属病院