

平成 22年 3月 31日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19390277
 研究課題名 (和文) Th2型ケモカイン受容体CCR4の生理作用と病的役割の解明
 研究課題名 (英文) Study on the pathophysiological role of the Th2-type chemokine receptor CCR4
 研究代表者 義江 修
 (YOSHIE OSAMU)
 近畿大学・医学部・教授
 研究者番号： 10166910

研究成果の概要 (和文)：

CCR4はTh2細胞、制御性T細胞、皮膚指向性T細胞などに選択的に発現するケモカイン受容体である。我々はTh2型のマウス気道炎症で低分子CCR4阻害剤の治療効果を示した。またCCR4とそのリガンドMDC/CCL22は腸管膜リンパ節での樹状細胞と制御性T細胞の相互作用を誘導して免疫寛容を誘導することを示した。さらにEBウイルスやHTLV-1といったヒトの腫瘍ウイルスは共通してCCR4のリガンド、特にMDC/CCL22の発現を感染細胞に誘導し、それによって感染細胞の周囲にCCR4陽性のTh2細胞や制御性T細胞を動員して免疫回避やウイルス伝播に役立っていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

CCR4 is a chemokine receptor selectively expressed by Th2 cells, regulatory T cells, and skin-homing T cells. We have shown a potent therapeutic effect of a small molecule CCR4 inhibitor on Th2-induced airway inflammation in mice. We have also shown that CCR4 and its ligand MDC/CCL22 mediate immunosuppressive interactions of dendritic cells and regulatory T cells in mesenteric lymphonodes. Furthermore, human oncogenic viruses such as EBV and HTLV-1 commonly induce expression of MDC/CCL22 in infected host cells to attract Th2 cells and regulatory T cells for immunoevasion and virus propagation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・7210

キーワード： CCR4、CCL17、CCL22、Th2、Treg

1. 研究開始当初の背景

CCR4はT細胞系にきわめて選択的に発現しているケモカイン受容体である。胸腺T細胞ではCCR4はCD4⁺CD8⁺ダブル陽性とCD4⁺シングル陽性の段階で発現している。またそのリガンドであるCCL17とCCL22は胸腺髄質の上皮細胞や樹状細胞での発現が報告されている。そして皮質で正の選択を受けたCD4⁺シングル陽性T細胞は髄質で負の選択（自己抗原反応クローンの除去）を受けるが、CCR4はCD4⁺シングル陽性T細胞の皮質から髄質への移動に関与することによって負の選択に重要な役割をはたすことが示唆されている。しかしながら、CCR4ノックアウトマウスでの解析ではT細胞分化に特に大きな異常は見出されておらず、この仮説はいまだ十分に証明されていない。また末梢の成熟T細胞ではCCR4の発現はアレルギー性疾患に関与するTh2細胞、免疫反応を抑制する制御性T細胞（Treg）、CLA陽性の皮膚指向性メモリーT細胞などで選択的に発現することが報告されている。そのため、CCR4の発現はこれらの特定のT細胞サブセットの機能と密接に関係しており、またこれらのT細胞サブセットの分化とカップルして発現が制御されていると推測される。特にTh2でのCCR4発現から、CCR4はTh2型の免疫応答と密接に関係しており、そのためCCR4はアトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患の治療標的としても注目されている。しかしながら、体内でのCCR4発現細胞の全体像やその役割についてはいまだ不明な点が多く、そのためCCR4の生理機能および各種疾患での病的役割についてはいまだ十分な理解には至っていないというのが実状である。

2. 研究の目的

CCR4の生体での生理作用と病的役割を解明することを目的とする。そのためのおもな項目として以下のものを目指した。

(1) マウスのアレルギー疾患モデルでのCCR4選択的低分子阻害剤を用いた治療実験、(2) CCR4遺伝子欠損マウスを用いた解析、(3) 炎症や癌組織におけるCCR4リガンドの発現とその役割の解析、(4) ウイルス感染細胞におけるCCR4リガンドの発現とその役割の解析。

3. 研究の方法

1) 低分子CCR4阻害剤の合成

アストラゼネカ社の国際公開特許情報に基づき、低分子CCR4阻害N-pyrazinyl-phenylsulphonamide化合物(2,3-dichloro-N-(5-chloro-3-(2-hydroxy methylphenylmethoxy)-2-pyrazinyl)-benzenesulphonamide)を合成した。阻害剤の大量合成は外部(Nard研究所)に委託した。

2) 皮膚炎モデルマウスに対するCCR4系の発現検討

ハプテン塗布による接触性皮膚炎の急性型および慢性型モデルを作製し、CCR4系の発現と役割を検討した。

3) 喘息モデルマウスに対するCCR4阻害剤の治療効果の検討

マウスをオバルブミン(OVA)で感作した後、OVAを気道より繰り返し暴露する実験系を用いてCCR4阻害剤の治療効果を検討した。

4) 養子移入による気道炎症モデルでのCCR4系の役割の検討。

OVA特異的TCRトランスジェニックマウス(DO11.10 TCR- $\alpha\beta$)から調整した

CD4⁺T 細胞をインビトロで Th1 あるいは Th2 に分化誘導した後に養子移入し、OVA を気道より暴露して発症させる気道炎症モデルにおける CCR4 阻害剤の治療効果を検討した。

5) ヒト腫瘍での CCR4 系の役割。

ヒト腫瘍組織での CCR4 リガンドの発現とその役割を検討した。

6) ウイルス感染細胞での CCR4 系の役割。

EBV、HTLV-1 などの感染細胞での CCR4 リガンドの発現とその役割を検討した。

4. 研究成果

1) 低分子 CCR4 阻害剤 Compound 22 の合成
アトラゼネカ社の公開された国際特許に基づき低分子 CCR4 阻害剤 Compound 22 を合成した。そしてこの Compound 22 が CCR4 に極めて選択的に細胞遊走を阻害することをすべてのケモカイン受容体を網羅したトランスフェクタントのパネルを用いて確認した。また Compound 22 はマウスの CCR4 に対しても阻害効果を示すことを確認した。そこで Compound 22 を用いれば CCR4 の生体での機能阻止実験が可能であると考えられた。

2) 皮膚炎モデルでの検討

NC/Nga および BALB/c マウスを用いてハプテン DNFB の耳介への反復塗布による接触性皮膚炎モデルを作製した。DNFB を週 1 回の割合で全 6 回の反復塗布により耳介の肥厚と血中 IgE 値の著明な上昇がみられた。そこで皮膚炎組織を経時的に採取し、RT-PCR を用いてすべてのケモカイン受容体および主要なケモカインの発現を解析した。その結果、CCR1、CCR2、CCR3 の発現上昇がみられたが、予想に反して CCR4 の明らかな発現上昇は認められな

かった。またケモカインに関しても IP-10/CXCL10、MIP-1 α /CCL3、RANTES/CCL5 などの発現上昇がみられたが、CCR4 のリガンドである TARC/CCL17、MDC/CCL22 の発現上昇は見られなかった。そこで次にハプテンを変えて FITC でも同様の検討を行ったが、ほぼ同様の結果であった。これらの結果から、ハプテン塗布によるマウスの接触性皮膚炎はヒトのアトピー性皮膚炎の十分なモデルとは言えないと判断し、これ以上の解析を中止した。

3) 喘息モデルでの検討

BALB/c マウスを卵白アルブミン OVA と Alum で 2 度免疫して感作し、経気道的に OVA を 3 日連続投与して気道炎症を惹起する喘息モデルを作製した。そして Compound 22 を用いて治療効果を検討したが、全身プレチスモグラフによる呼吸機能のモニターでは効果がみられる前に致死量に達してしまった。このことから、Compound 22 はインビボでは高濃度になるとかなりの毒性があることが分かった。そこで CCR4 リガンドに対する抗体での治療効果を検討した。まず抗 TARC 抗体の効果を検討したが、全身プレチスモグラフによる呼吸機能のモニターでは治療効果は全く見られなかった。また BAL 中の各種浸潤細胞の数にもほとんど変化は見られなかった。さらに同様の解析を抗 MDC 抗体でも検討したが、やはりほぼ同じ結果であった。これらの結果から、この喘息モデルでは CCR4 系の関与は低いと推測され、やはり十分なヒトの喘息モデルとは言えないのではないかと判断した。

4) 抗原特異的 T 細胞養子免疫系での検討

OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス (DO11.10 TCR- $\alpha\beta$) を用いて、ナイ

ーブ T 細胞をそれぞれに適した培養条件のもとに Th1、Th2、Th17 に分化させた。その結果、Th1 はおもに CXCR3 を、Th2 はおもに CCR4 を発現することが確認された。また Th17 も CCR6 や CCR4 を発現していた。そこで野生型 BALB/c マウスにこれらの T 細胞サブセットを移入し、経気道的に OVA を投与して気道炎を惹起した。そして Compound 22 による治療効果を検討した。その結果、Th2 を移入したマウスで特異的に BAL 中のリンパ球と好酸球の浸潤やメタコリン誘発気道過敏性の抑制が見られた。同様の結果は抗 TARC 抗体および抗 MDC 抗体でも得られた。これらの結果から、CCR4 を発現する Th2 による気道炎症では確かに CCR4 系の抑制が治療効果を発揮することが確認された(投稿準備中)。

5) その他のマウスモデルでの CCR4 系の役割の解析

腸管免疫では免疫反応とともに免疫寛容も重要である。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) はトリプトファンを分解してキヌレニンを生産する酵素であり、免疫抑制的に作用する。腸管膜リンパ節 (MLN) の樹状細胞 (DC) は IDO を構成的に発現しており、またその近傍には Treg が存在していることが見出された。そして MLN の DC での IDO 発現には Treg の CTLA-4 と DC の B7 の間の相互作用が重要であることが Treg 特異的 CTLA-4 欠損マウスで示された。さらに DC は自己の壊死細胞を貪食したり、CCR7 リガンドの CCL19 で刺激されると CCR4 リガンド MDC を産生し、それによって CCR4 陽性の Treg を周囲に動員すると考えられた。そして、MDC-CCR4 経路が DC と Treg の相互作用に重要であることは CCR4 欠損マウスでは MLN 中の IDO 陽性 DC が著減することからも示唆さ

れた。このように、MLN 中の DC は Treg の作用で IDO を構成的に発現し、それは腸管における免疫寛容に重要と考えられる。

6) ヒト腫瘍における CCR4+Treg の役割の検討。

一般的に腫瘍組織は免疫抑制状態と考えられている。しかしながら、一部の癌では多数の腫瘍浸潤 T 細胞 (TILs) が観察され、そのような癌は一般的に予後がよいことも示されている。我々はリンパ球浸潤に富んだ胃癌 (多くは EBV 陽性である) での TIL 浸潤におけるケモカイン系の役割を検討した。その結果、予想に反して浸潤する TIL の多くは Th1 型の CXCR3 を発現し、Th2 型の CCR4 を発現する細胞はわずかであった。そこで CXCR3 のリガンドの発現を検討したところ、MIG/CXCL9 の発現が樹状細胞も含めたストローマ細胞で強く陽性であった。一方、CCR4 のリガンド MDC の発現は一部の樹状細胞と思われる細胞に見られた。次に Foxp3 陽性の Treg の浸潤を検討した。Treg は約 5% が CXCR3 陽性、約 50% が CCR4 陽性であった。しかしながら、Treg の浸潤は特に目立つほど多いものではなく、そのためリンパ球浸潤に富んだ胃癌では、多数浸潤する Th1 型の T 細胞の機能を抑制するための他のメカニズムが存在することが示唆された。

口腔内扁平上皮癌における TILs の予後との相関を検討した。TILs はストローマ (腫瘍-宿主境界) とネスト (腫瘍実質内) を区別して解析した。その結果、ストローマあるいはネストの CD8+T 細胞の数、および全 Foxp3+Treg でなくそのうちの約 60% の CCR4+Foxp3+Treg の数が予後と最も相関していた。そしてストローマ CD8+T 細胞/CCR4+Treg 比が最も強力な独立の予後因子であった。

7) ウイルス感染細胞での CCR4 系の役割
我々は以前に EBV 感染 B 細胞は EBV のコードする転写活性化因子 LMP-1 による NF- κ B 活性化により CCR4 のリガンド、特に MDC を大量に産生していることを明らかにした (Nakayama et al., J. Virol. 78:1665-1674, 2004)。そこで EBV 陽性加齢関連 B 細胞増多症での TARC と MDC の発現を検討した。その結果、LMP-1 陽性の大型腫瘍細胞に一致して TARC と MDC の発現が見られ、また腫瘍組織には CCR4+ FOXP3+ の Treg が多数浸潤していることを確認した。EBV+腫瘍細胞は LMP-1 の作用により CCR4 リガンドを産生し、それによって CCR4+Treg を動員して宿主の免疫監視機構を抑制していることが示唆された。

EBV と同じヘルペスウイルスの CMV でもウイルス感染細胞は MDC を発現してくる。そして CMV のコードする遺伝子 UL144 が NF- κ B の活性化を介して MDC の発現を誘導する。しかしながら、CMV 感染細胞では NF- κ B の活性化を抑制する IE86 も同時に発現しているが、IE86 は UL144 による MDC の発現誘導を抑制しないこと、それには MDC プロモーターの NF- κ B サイト近傍に存在する CREB サイトが重要であることが明らかとなった。

成人 T 細胞白血病の原因ウイルスである HTLV-1 は強力な転写活性化因子 Tax をコードしている。我々は HTLV-1 感染 T 細胞は大量の MDC を産生することを見出した。そして MDC の発現は Tax による NF- κ B の活性化を介して行われることを確認した。また HTLV-1 はセルフフリーのウイルス粒子では感染効率が極めて低く、おもに細胞依存性に伝播することが知られているが、HTLV-1 感染 T 細胞は MDC を産生するこ

とにより、CCR4 陽性の T 細胞を周囲に呼び集めて接着し、それによって CCR4 陽性 T 細胞に選択的に HTLV-1 を伝播することが示された。

これらの結果から、ヒトの腫瘍ウイルスや潜伏感染ウイルスでは感染細胞は共通して CCR4 リガンドを発現し、それによって Treg や Th2 を選択的に動員して宿主の免疫監視機構を抑制したり、体内での感染拡大に役立っていることが示唆された。

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 7 件)

1. Watanebe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8+ T cells and CCR4+ regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endocrinology 2010 [Epub ahead of print] (査読有)
2. Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, Bai Z, Tsuji NM, Nagakubo D, Yoshie O, Sakaguchi S, Takikawa O, Miyasaka M. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: Functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. J. Immunol. 183:5608-5614, 2009. (査読有)
3. Ohtani H, Jin Z, Takegawa S, Nakayama T, and Yoshie O. Abundant expression of CXCL9 (MIG) by stromal cells that include dendritic cells and accumulation of CXCR3+ T cells in lymphocyte-rich gastric carcinoma. J. Pathol. 217:21-31, 2009. (査読有)
4. Saito K, Torii M, Ma N, Tsuchiya T, Wang L, Hori T, Nagakubo D, Nitta N, Kanegasaki S, Hieshima K, Yoshie O, Gabazza EC, Katayama N, Shiku H, Kuribayashi K, Kato T. Differential regulatory function of resting and preactivated allergen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells in Th2-type airway inflammation. J. Immunol. 181:6889-6897, 2008. (査読有)

5. Poole E, Atkins E, Nakayama T, Yoshie O, Groves I, Alcamì A, Sinclair J. NF- κ B-mediated activation of the chemokine CCL22 by the product of the human cytomegalovirus gene UL144 escapes regulation by viral IE86. *J. Virol.* 82:4250-4256, 2008. (査読有)
6. Takegawa S, Jin Z, Nakayama T, Oyama T, Hieshima K, Nagakubo D, Shirakawa AK, Tsuzuki T, Nakamura S, Yoshie O. Expression of CCL17 and CCL22 by latent membrane protein 1-positive tumor cells in age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder. *Cancer Sci.* 99:296-302, 2008. (査読有)
7. Hieshima K, Nagakubo D, Nakayama T, Shirakawa AK, Jin Z, Yoshie O. Tax-inducible production of CC chemokine ligand 22 by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells promotes preferential transmission of HTLV-1 to CCR4-expressing CD4+ T cells. *J. Immunol.* 180:931-939, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 神沼 修、大友 隆之、森 晶夫、長久保 大輔、稗島 州雄、義江 修、鈴木一矢、廣井 隆親 「T 細胞依存性の好酸球性気道炎症に対する CCR4 拮抗薬の作用」 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会(平成 20 年 10 月 29~31 日、秋田)
2. 義江 修、竹川 澄男、中山 隆志、白川 愛子、樋口 智紀、長久保 大輔、重田 暁子、稗島 州雄、中村 栄男 「加齢関連 EBV+B 細胞リンパ増殖症における多様なケモカインの発現」 第 67 回日本癌学会総会 (平成 20 年 10 月 28~30 日、名古屋)
3. 中山 隆志、樋口 智紀、竹川 澄男、長久保 大輔、重田 暁子、白川 愛子、稗島 州雄、義江 修 「CCR4 を発現する ATL と CTCL における Fra-2 の異常発現」 第 67 回日本癌学会総会 (平成 20 年 10 月 28~30 日、名古屋)
4. 義江 修 「ケモカイン受容体 CCR4 と HTLV-1 感染、ATL 発がん」 第 29 回日本炎症・再生医学会 (平成 20 年 7 月 8 日~10 日、東京)
5. Nakayama, T., Hieshima, K., Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A., and Yoshie, O. Role of Fra-2/JunD heterodimer in CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 19 年 11 月 20~22 日

(東京)

6. 稗島 州雄、中山 隆志、白川 愛子、義江 修 「HTLV-1 の CD4+ T 細胞への感染におけるケモカイン/ケモカイン受容体 CCL22/CCR4 の役割」 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、平成 19 年 10 月 21~23 日 (札幌)
7. 中山 隆志、稗島 州雄、金 哲、長久保 大輔、白川 愛子、山田 恭暉、藤井 雅寛、義江 修 「Fra-2 と JunD のヘテロダイマーは ATL 細胞における CCR4 発現と細胞増殖を促進する」 第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 3~5 日 (横浜)
8. 稗島 州雄、中山 隆志、長久保 大輔、白川 愛子、金 哲、義江 修 「HTLV-1 Tax 誘導性ケモカイン CCL22 の HTLV-1 初期感染における役割」 第 66 回日本癌学会総会、平成 19 年 10 月 3~5 日 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 義江 修

(YOSHIE OSAMU)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10166910

(2) 研究分担者

稗島 州雄

(HIESHIMA KUNIO)

近畿大学医学部・准教授

研究者番号：10322570

中山 隆志

(NAKAYAMA TAKASHI)

近畿大学医学部・講師

研究者番号：60319663

長久保 大輔

(NAGAKUDO DAISUKE)

近畿大学医学部・助教

研究者番号：10368293

白川 愛子

(SHIRAKAWA AIKO)

近畿大学医学部・助教

研究者番号：30260285

(3) 連携研究者

()

研究者番号：