

公益財団法人
薬理研究会

助 成 研 究 報 告

第 60 集

2022 年度

序

本財団では、平成 11 年度から、「薬物治療に関する基礎的研究並びに実地応用上の研究」をテーマに研究助成者を公募してきました。

2022 年度には 32 件の応募をいただき、本財団の選考委員会において厳正に審査を行った結果、次の 7 名の研究者に研究助成金を支給しました。

筑波大学 医学医療系生命医科学域	佐々木 哲也	助 教
東京大学 保健・健康推進本部	高橋 良太	助 教
岡山大学 学術研究院医歯薬学域	富樫 庸介	教 授
名古屋市立大学 大学院医学研究科	野 村 洋	教 授
岡山大学病院 小児科	平井 健太	研究助教
近畿大学 薬学部	松尾 一彦	講 師
広島大学 大学院医系科学研究科	柳瀬 雄輝	准教授

ここに、上記 2022 年度に研究助成を受けられた方々による研究成果を、助成研究報告第 60 集として刊行するものです。

本財団の研究助成によって、薬理学、薬学に係わる基礎的研究が着実に進められていることは、誠に悦ばしいことであります。

研究助成を受けられた方々におかれては、本財団の設立の趣旨を体し一層のご精進を期待しております。

2023 年 12 月

公益財団法人 薬 理 研 究 会
理事長 遠 藤 實

目 次

1	膵炎症性発癌における発癌機序の解明と免疫療法の検討	高橋 良太	東京大学 保健・健康推進本部	p.1
2	腫瘍浸潤 T 細胞に発現する接着・遊走因子を標的にした新規治療開発	富樫 庸介	岡山大学 学術研究院医歯薬学域 腫瘍微小環境学分野	p.4
3	記憶想起が回復する神経機構の解明	野村 洋	名古屋市立大学 大学院医学研究科 寄附講座	p.7
4	川崎病血管炎における単一細胞解析と mRNA-microRNA 相関解析による創薬基盤研究	平井 健太	岡山大学病院 小児科	p.10
5	アトピー性皮膚炎におけるケモカイン受容体 CCR4 を介した Th2 細胞の増殖機構解明と CCR4 を標的とした治療効果	松尾 一彦	近畿大学 薬学部 医療薬学科	p.14
6	コリン性蕁麻疹発症メカニズムの解明と新規治療標的の探索	柳瀬 雄輝	広島大学 大学院医系科学研究科 治療薬効学	p.18

なお、筑波大学の佐々木哲也助教は研究期間延長のため、次回の助成研究報告第 61 集に掲載予定です。

1. 膵炎症性発癌における発癌機序の解明と免疫療法の検討

高橋 良太

(東京大学保健・健康推進本部)

(現在：東京大学医学部附属病院消化器内科)

【背景・目的】

膵臓癌は最も治療困難な癌の一つとして知られている。日本における癌死では 4 番目に多く、症例数は増加傾向である。炎症は多くの癌の進展を促進することが知られている。慢性膵炎は膵臓癌の危険因子であることが知られており、膵臓癌のマウスモデルにおいても膵炎により発癌が促進されることが示されている。しかし膵炎によって発癌が促進される機序は明らかになっておらず、慢性膵炎患者に対する膵癌発症予防治療も見いだされていない。我々はこれまでの研究で、独自に作製した慢性膵炎のマウスモデル(Elastase-IL1 β マウス)及びこのマウスを膵特異的な変異型 Kras 発現による膵腫瘍マウスモデル(LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre, KC マウス)に交配した慢性膵炎発癌モデル(KCI マウス)を用いて、慢性膵炎により膵発癌が促進され、その機序として免疫抑制性の B 細胞群[1, 2, 3]が増加しており腫瘍進展に重要な役割を持っていることを見出した[4]。また、膵臓癌の発生及び進展における交感神経アドレナリンシグナルの重要性を報告しているが[5]、慢性膵炎発癌マウスモデルの膵において著明な神経組織の増加を認めたことから、このモデルにおける交感神経を介した発癌進展機序も示唆された。免疫細胞にはアドレナリン 2 型受容体などの神経伝達因子受容体が発現しており、炎症による腫瘍進展機序においては交感神経などの神経シグナルが重要である可能性が示唆された。

そこで本研究では、慢性膵炎からの発癌機序の解明のため、2つの機序について検討を加える。即ち第一に、慢性膵炎を背景とした膵臓癌における、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果について検討すること、第二に慢性膵炎からの膵発癌における交感神経を介した膵癌促進機序の重要性について検討することである。これらの検討を通して慢性膵炎による膵発癌の機序解明及び新規治療法の確立を目指す。

【方法・結果】

① 慢性膵炎に伴う膵臓癌における免疫チェックポイント阻害薬の治療効果解析

16 週齢の KCI マウスに対して抗 PD-1 抗体及び抗 CTLA4 抗体もしくは control IgG を投与し、24 週齢まで投与した(各 200 μ g 週 2 回 i.p.)。膵組織を回収して病理組織学的に解析したところ、膵腫瘍病変の進展は免疫チェックポイント阻害治療(ICB)を行ったマウスにおいて有意に抑制されていた(図 1A)。また腫瘍組織における CD8 陽性 T 細胞の浸潤も有意に抑制されており、抗腫瘍免疫の改善が示唆された(図 1B)。

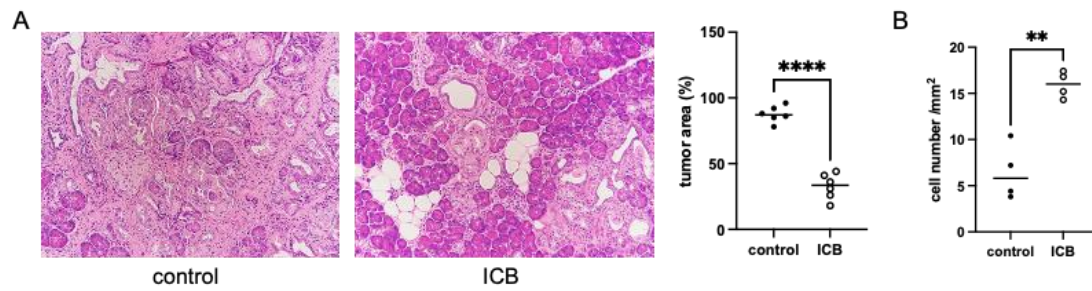


図1: KCIマウスにおける免疫チェックポイント阻害薬(ICB)治療による抗腫瘍効果

② 慢性膵炎による腫瘍内神経の増加及び神経を介した膵癌進展機序の解明

8 週齢の KCI マウスに対してアドレナリン $\beta 2$ 受容体(ADRB2)選択的阻害薬である ICI118,551 を投与($4\mu\text{g}$ 週 5 日 i.p.)して 13 週齢まで治療を行った。回収した膵を病理組織学的に解析したところ、膵腫瘍の進展は有意に抑制されているとともに炎症所見も改善傾向が認められた(図 2A,B)。フローサイトメトリーにより腫瘍内の免疫細胞浸潤について解析したところ、B 細胞の浸潤が抑制されると共に NK 細胞の浸潤が増加しており(図 2C)、病態への関与が示唆された。

慢性膵炎における ADRB2 の重要性について検討するため、Elastase-IL1 β マウスと ADRB2 ノックアウトマウスを交配して *Adrb2*KO; Elastase-IL1 β (AI)マウスを作成し、15 週齢において膵の状態を Elastase-IL1 β マウスと比較したところ、AI マウスにおいては炎症細胞浸潤が抑制されると共に膵臓における組織傷害が抑制されており(図 2D)、ADRB2 シグナルによる膵炎増悪機序の存在が示唆された。

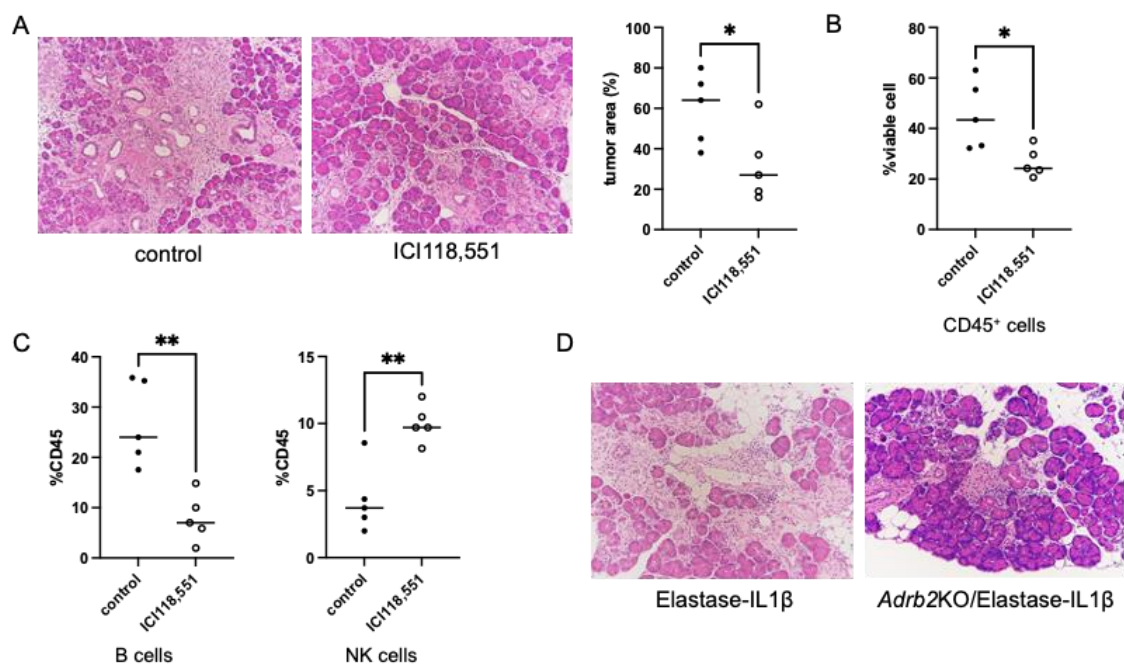


図2: KCIマウスにおけるADRB2シグナルを介した膵炎・膵腫瘍進展

【考察】

本研究では膵特異的な変異型 Kras を発現すると共に IL-1 β を発現して慢性膵炎による膵腫瘍進展を促進するマウスモデル(KCI マウス)を用いて、免疫チェックポイント阻害薬及び ADRB2 阻害薬の治療効果及び作用機序について検討を行った。免疫チェックポイント阻害薬治療により腫瘍進展が抑制され、抗腫瘍免疫の改善が示唆された。また ADRB2 阻害薬の投与でも抗腫瘍効果が認められ、腫瘍内交感神経シグナルによる膵炎の増悪と B 細胞, NK 細胞を介した抗腫瘍免疫抑制機序が示唆された。これらの結果により膵臓癌における慢性膵炎を介した抗腫瘍免疫抑制機序の一部が明らかになり、新たな治療標的となる可能性が示唆された。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人薬理学研究会の皆様深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1 Pylayeva-Gupta Y, Das S, Handler JS, Hajdu CH, Coffre M, Koralov SB, *et al.* IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov* 2016;**6**:247-55.
- 2 Gunderson AJ, Kaneda MM, Tsujikawa T, Nguyen AV, Affara NI, Ruffell B, *et al.* Bruton Tyrosine Kinase-Dependent Immune Cell Cross-talk Drives Pancreas Cancer. *Cancer Discov* 2016;**6**:270-85.
- 3 Lee KE, Spata M, Bayne LJ, Buza EL, Durham AC, Allman D, *et al.* Hif1a Deletion Reveals Pro-Neoplastic Function of B Cells in Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov* 2016;**6**:256-69.
- 4 Takahashi R, Macchini M, Sunagawa M, Jiang Z, Tanaka T, Valenti G, *et al.* Interleukin-1 β -induced pancreatitis promotes pancreatic ductal adenocarcinoma via B lymphocyte-mediated immune suppression. *Gut* 2021;**70**:330-41.
- 5 Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, *et al.* beta2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 2018;**33**:75-90 e7.

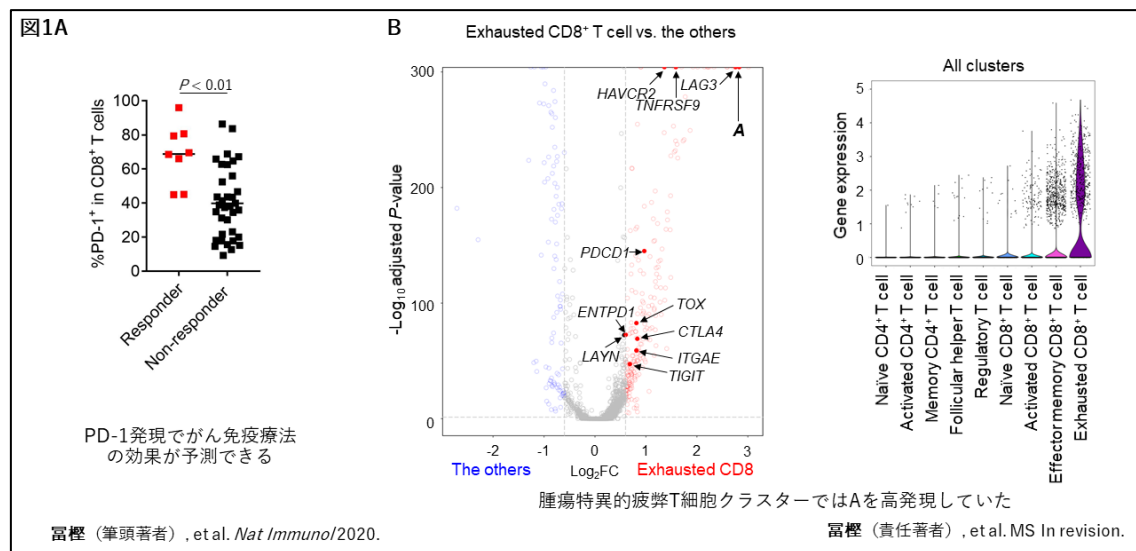
2. 腫瘍浸潤 T 細胞に発現する接着・遊走因子を標的にした新規治療開発

富樫 庸介

(岡山大学学術研究院医歯薬学域(医学系)腫瘍微小環境学分野)

【背景・目的】

免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法の効果が様々ながん種で証明されたが、その有効性はいまだ不十分で、効果予測バイオマーカーや新たな治療開発が求められている(1, 2)。免疫チェックポイント阻害剤は腫瘍浸潤 T 細胞を活性化させる治療であるが、腫瘍浸潤 T 細胞の中でも、がん細胞を特異的に攻撃している重要な T 細胞もあれば(腫瘍特異的 T 細胞)、無関係な非特異的 T 細胞も存在している(3, 4)。我々は患者検体の腫瘍浸潤 T 細胞解析から PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞が効果予測バイオマーカーである可能性を報告し(図 1A)(5)、さらにシングルセルシーケンスから腫瘍特異的 T 細胞を極めて正確に同定したうえで、そこに PD-1 や LAG-3 などの所謂疲弊関連分子が高発現していることも見出した(4)。この腫瘍特異的疲弊 T 細胞クラスターの網羅的な遺伝子発現解析からいくつかの接着・遊走因子が PD-1 など以上に極めて特異的に高発現していることも明らかにした(図 1B)。特に接着分子 A に関しては今まで報告がほとんどなく、T 細胞に強制発現させたところ T 細胞活性が低下した。そこで、分子 A の抗腫瘍免疫応答への影響を治療標的としての可能性も含めて詳細に明らかにし、新たな薬物治療やバイオマーカー開発に繋げる目的で研究を行った。



【方法】

既に有する患者由来のクローン化している腫瘍特異的 T 細胞に分子 A を強制発現させ、同じ患者由来がん細胞への反応性の変化を評価する。分子 A は様々な結合相手が報告

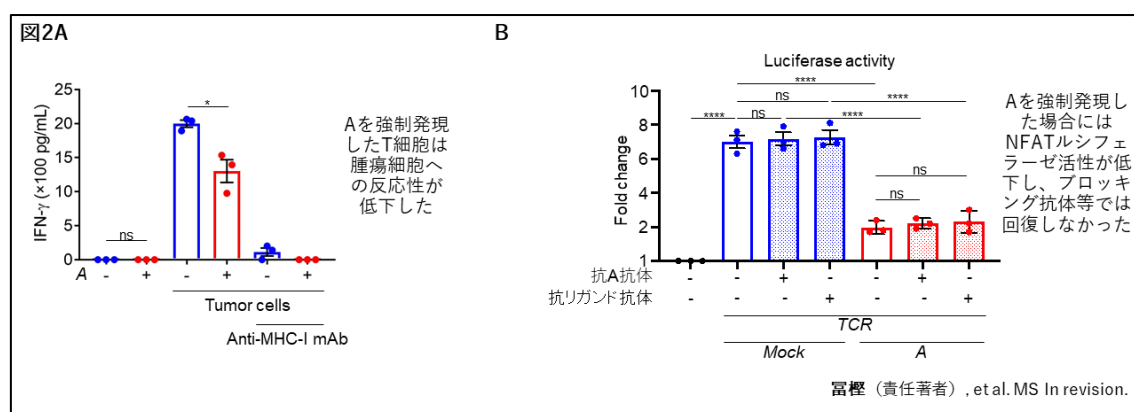
されているが抗体でブロックした際の変化なども解析する。

CD8 陽性 T 細胞特異的に分子 A をノックアウトするコンディショナルノックアウトマウスを作成し、腫瘍増殖や免疫チェックポイント阻害剤の効果を検証する。またその腫瘍浸潤 T 細胞も評価する。

最後に患者サンプルを用いて分子 A の発現と臨床病理学的な関連性を評価し、がん免疫療法の効果との関係も解析してバイオマーカーとしての役割や薬剤耐性時の発現状況なども明らかにする。

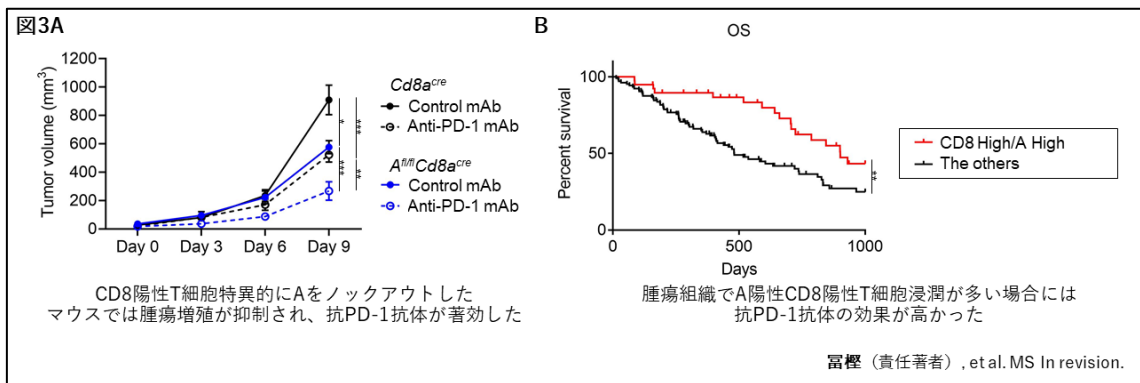
【結果】

レトロウイルスを用いて分子 A を腫瘍特異的 T 細胞に導入し、がん細胞と共培養したところ、予備検討と同様にインターフェロン γ の産生が低下した(図 2A)。そこで、反応性の T 細胞受容体(TCR)を誘導し、NFAT ルシフェラーゼも導入した Jurkat 細胞にも分子 A を強制発現し、がん細胞への反応性を検証したところ、ルシフェラーゼ活性は低下した(図 2B)。一方で、市販されている A やそのリガンドに対するブロッキング抗体ではこの効果は回復しなかった(図 2B)。



そこで、T 細胞活性を低下させる原因として、TCR への抑制性シグナルの関与を疑い、分子 A が結合する分子について検討を行った。分子 A を強制発現した場合には、代表的な PD-1 などの抑制性の免疫チェックポイント分子に関して発現に変化はなかったが、CD3 の細胞表面の発現が低下していた。共免疫沈降したところ分子 A と CD3/TCR との結合が確認された。

CD8 陽性 T 細胞特異的に分子 A をノックアウトするコンディショナルノックアウトマウスを作成し抗腫瘍免疫応答を評価したところ、このコンディショナルノックアウトマウスでも CD8 陽性 T 細胞浸潤が増えて、抗 PD-1 抗体の効果が上昇した(図 3A)。また 150 例程度の腫瘍組織を染色したところ、A 陽性 CD8 陽性 T 細胞浸潤が多いと抗 PD-1 抗体の効果が高かった(図 3B)。



【考察】

本研究では腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞に発現する A は効果予測バイオマーカー、かつ抗腫瘍免疫応答を抑制していることから新たな治療標的になり得ることを明らかにした。一方で、従来 A は接着分子としての役割が報告されていたが、その役割とは異なり、T 細胞では CD3/TCR と複合体を形成し、その細胞表面の発現を低下させてしまうことで、TCR シグナルを抑制していることを明らかにした。さらに代表的なリガンドとの接着をブロックするだけでは抑制は解除されなかった。従ってこのような TCR へ影響する機能を特異的に阻害することで抗腫瘍免疫応答を高める可能性があると考えている（論文投稿・リバイズ中）。

謝辞: 本研究のサポートをいただいた公益財団法人薬理研究会に深謝申し上げます。

【参考文献】

1. Togashi Y, et al. *Nat Rev Clin Oncol* 2019
2. Togashi Y, et al. *Cancer Sci* 2022
3. Simoni Y, et al. *Nature* 2018
4. Togashi Y, et al. *Cell Rep* 2022
5. Togashi Y, et al. *Nat Immunol* 2020

3. 記憶想起が回復する神経機構の解明

野村 洋

(名古屋市立大学 大学院医学研究科 脳神経科学研究所 認知機能病態学寄附講座)

【背景・目的】

記憶の想起障害は認知症の主症状の 1 つである。一度は覚えたが、時間の経過や認知症の進行によって思い出せなくなる。ところが、手がかりがあれば再び思い出せることから、記憶痕跡は脳内に残っており、記憶の想起を促進すれば回復できると考えられる。しかし、記憶想起の回復に関する研究は乏しく、想起を回復させる治療法は確立していない。私たちは抗ヒスタミン薬が記憶障害の副作用を有することに着眼し、脳内ヒスタミン神経活性化による想起回復を目指して研究を進めてきた。脳内のヒスタミンは結節乳頭核から脳広域へと放出され、睡眠・覚醒や記憶・学習などを調節する神経伝達物質である。私たちは、ヒスタミン H₃ 受容体拮抗薬によるヒスタミン神経系の活性化によって、忘れた記憶の想起が回復することを明らかにした (1)。さらに臨床研究を実施し、学習 1 週間後のヒトの記憶成績が改善することを見出した。こうした結果をもとにしてより優れた治療薬を開発するためには、想起が回復する神経メカニズムを解明する必要がある。私たちはこれまでに想起回復のメカニズムを *in vitro* で解析してきた。嗅周皮質スライスを用いて、ヒスタミンが嗅周皮質ニューロンを脱分極させること、学習時に活動したニューロンを特に活性化しやすいようにすること、この作用にヒスタミン H₂ 受容体の活性化が必要であることを明らかにした。また嗅周皮質ニューロンの活動を化学遺伝学により脱分極させると、想起が回復することを明らかにした。しかし記憶想起の回復と関連する *in vivo* での神経活動は不明であった。そこで本研究では、記憶想起の回復に関わる神経メカニズムを *in vivo* で明らかにすることを目的として行った。

【結果・考察】

1. 記憶の想起・非想起を解析する行動実験系の確立

記憶の想起と想起障害を解析するための行動実験系として、音と報酬の連合学習を用いた。頭部を固定したマウスに対して、2 秒間の音を与え、その 1 秒後に報酬としてスクロース水を与えた。この条件づけを繰り返すと、マウスは音を与えただけでスクロース水を予期して舌を舐める (リッキング) 行動を示すようになった。こうして条件づけが十分に成立した後でも、音によってリッキングが増加する試行と、音を聞いても全くリッキングが増加しない試行が共存していた。本実験系により想起試行と非想起試行について、同じマウスの同じセッション内で比較することができるため、記憶の想起や想起障害の神経機構解明に有用であると考えられる。

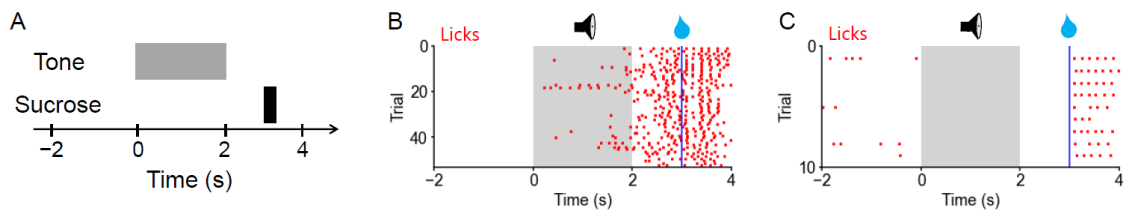


図 1. 記憶の想起・非想起を解析する行動実験系 (A) 2 秒間の音の 1 秒後にスクロース水をマウスに与えた。(B-C) 条件づけ成立後に音の提示によってリッキングが観察される試行 (B) とリッキングが観察されない試行が共存していた。

2. 記憶の想起と対応するヒスタミン神経の活動

ファイバーフォトメトリー法を用いてヒスタミン神経の活動を測定した。アデノ随伴ウイルスベクターを用いて結節乳頭核ヒスタミン神経に蛍光カルシウムセンサー GCaMP6s を導入した。神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は活動に伴って上昇するため、GCaMP の蛍光強度を解析することでヒスタミン神経の活動を測定することができる。結節乳頭核上部に埋め込んだ光ファイバーを介して、GCaMP6s の励起および蛍光の取得を行った。405 nm 励起光によって取得した蛍光を用いて補正することで、 Ca^{2+} 依存的な蛍光強度の上昇を算出した。記憶課題中のヒスタミン神経の活動を測定したところ、記憶課題で提示する様々な外部刺激に応答してヒスタミン神経の活動は上昇した。さらに、記憶の想起試行と非想起試行を区別して解析し、想起試行において特徴的な活動パターンを見出した。こうしたヒスタミン神経の活動が記憶・学習に寄与すると考えられる。

3. ヒスタミン神経活性化が投射先の神経活動に与える影響

in vivo カルシウムイメージングを用いて、ヒスタミン神経の活動が投射先の神経活動に与える影響を解析した。蛍光カルシウムセンサー GCaMP6m を嗅周皮質の神経細胞に導入した。そして、直径 0.6 mm の GRIN レンズを嗅周皮質の上部に埋め込み、GRIN レンズによって作られるイメージング像を頭部搭載型の小型顕微鏡 miniscope で撮影した (2)。本手法を用いることで、マウスが行動課題に伴って自由に動き回っている間の脳深部の神経活動を、多細胞にわたって測定することができる。

【今後の展望】

本研究によりヒスタミン神経の活動を測定することに成功した。しかし現在の方法ではヒスタミン神経をひとまとめにして扱っており、その多様性は不明である。ヒスタミン神経は様々な脳領域に軸索を伸ばし、様々な脳機能を調節している。今後は個々のヒスタミン神経を区別した解析を推進することで、様々な脳機能が適切に調節される神経メカニズムを解明できると期待される。

【謝辞】

本研究遂行にあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Hiroshi Nomura, Hiroto Mizuta, Hiroaki Norimoto, Fumitaka Masuda, Yuki Miura, Ayame Kubo, Hiroto Kojima, Aoi Ashizuka, Noriko Matsukawa, Zohal Baraki, Natsuko Hitora-Imamura, Daisuke Nakayama, Tomoe Ishikawa, Mami Okada, Ken Orita, Ryoki Saito, Naoki Yamauchi, Yamato Sano, Hiroyuki Kusuhara, Masabumi Minami, Hidehiko Takahashi, Yuji Ikegaya, Central Histamine Boosts Perirhinal Cortex Activity and Restores Forgotten Object Memories., *Biological Psychiatry*, 2019, 86, 230-239
2. Kyosuke Hirano, Yoshikazu Morishita, Masabumi Minami, Hiroshi Nomura. The impact of pitolisant, an H3 receptor antagonist/inverse agonist, on perirhinal cortex activity in individual neuron and neuronal population levels, *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 7015

4. 川崎病血管炎における単一細胞解析と mRNA-miRNA 相関解析による創薬基盤研究

平井 健太

(岡山大学病院 小児科)

【背景と目的】

川崎病は、1967 年に日本で最初に報告された全身性血管炎である。後天性小児心疾患の原因として最も頻度が高く、年々増加傾向にあるが、最初の報告から 50 年以上経過した現在でも血管炎が起こる原因は不明である。治療法として免疫グロブリン療法(IVIG)があるが、川崎病患者の約 20%は免疫グロブリン抵抗性であり、炎症が遷延すると重篤な合併症である巨大冠動脈瘤を生じ、冠動脈破裂や心筋梗塞により突然死のリスクとなる。

本研究では、川崎病モデルマウス¹⁾の心臓組織から抽出した細胞を用いて、単一細胞解析による mRNA の網羅的発現解析を行うとともに、mRNA と microRNA(miRNA)の相関関係を見出すことで、冠動脈微小環境における免疫細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞などの細胞間クロストークを網羅的に解析し、新規治療薬ターゲットの同定を目的とする。

【方法と結果】

1. 川崎病モデルマウスの単一細胞解析

4 週齢の DBA/2 マウスに *Candida albicans* 菌体抽出物(CAWS) 1mg を 5 日間連続で腹腔内投与すると、心臓病理組織で冠動脈周囲に免疫細胞浸潤を認め、川崎病モデルマウスが安定して作製可能であることを確認した。上記の予備実験をふまえて、IVIG 投与の有無による冠動脈微小環境の経時的変化を評価する目的で単一細胞解析を計画した(図 1A)。CAWS 投与によるモデル作製の前日に生理食塩水を前投与する CAWS 群、IVIG 前投与する IVIG+CAWS 群、炎症を惹起しないナীব群を設定した。CAWS 初回投与から 1、7、28 日後にマウスから心臓を摘出し、CD45 陽性/陰性細胞に分けて単一細胞解析を実施した。

単一細胞解析の時相ごとの結果をみると、CAWS 投与後に好中球や T 細胞、NK 細胞の割合が増加し、経時的に冠動脈微小環境の細胞分布が変化することを明らかにした。また IVIG を前投与することで、特に CAWS 投与 1 日後で T 細胞の増加が抑制されていた(図 1B)。

高次解析として、IVIG の有無による好中球のエンリッチメント解析を実施したところ、IVIG により細胞死や血小板活性化の関連遺伝子は抑制されていたが、NF- κ B 経路や好中球の血管内皮への migration は抑制されておらず、これらが IVIG 抵抗性の川崎病に対する治療ターゲットとなり得ることを明らかにした(図 1C)。現在、解析で得られた網羅的な遺伝子発現プロファイルを用いて、in silico 推測²⁾による治療薬候補化合物を探索中である(図 1D)。

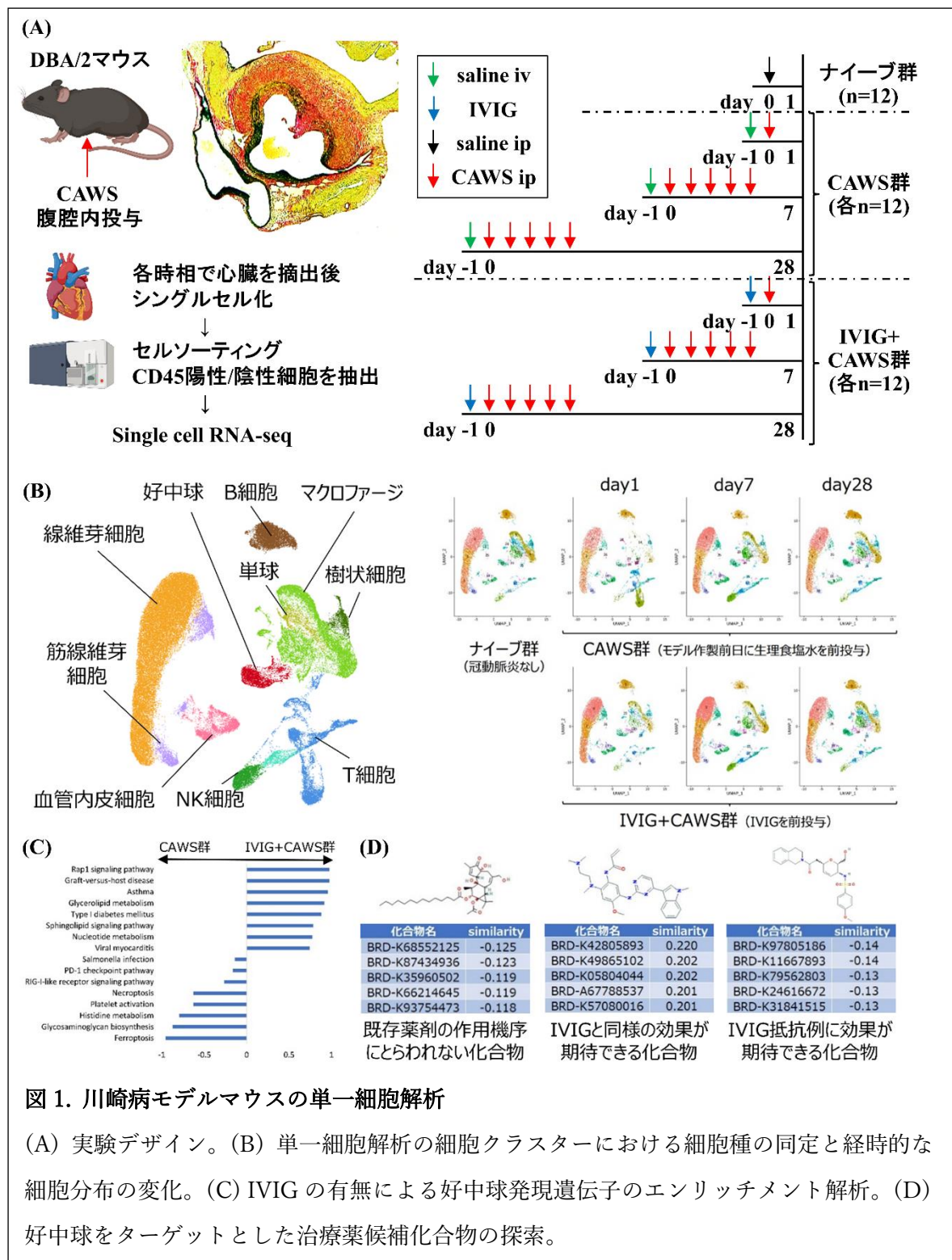


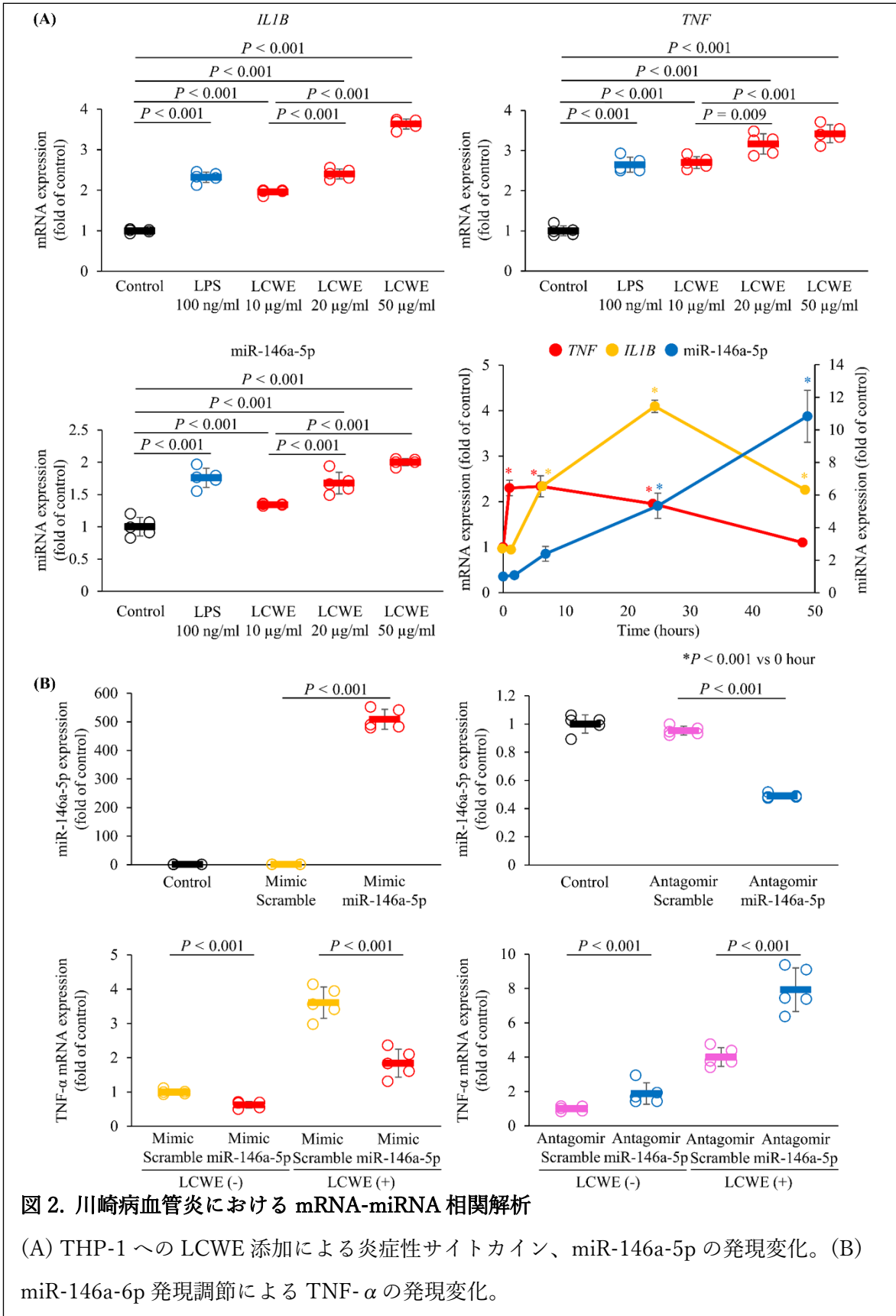
図 1. 川崎病モデルマウスの単一細胞解析

(A) 実験デザイン。(B) 単一細胞解析の細胞クラスターにおける細胞種の同定と経時的な細胞分布の変化。(C) IVIGの有無による好中球発現遺伝子のエンリッチメント解析。(D) 好中球をターゲットとした治療薬候補化合物の探索。

2. 川崎病血管炎における mRNA-miRNA 相関解析

CAWSと同様に川崎病様の血管炎を惹起する *Lactobacillus casei* cell wall extract (LCWE) を単球セルライン (THP-1) に添加することで、炎症性サイトカインや miRNA の発現変化を RT-PCR で定量した。THP-1 に LCWE を添加することで、LPS と同様に IL-1 β や TNF- α といった炎症性サイトカインの発現上昇を認めた。また miR-146a-5p は LCWE 添加後 48 時間まで徐々に発現の上昇を認めた (図 2A)。THP-1 に miR-146a-5p の mimic または

antagomir を transfection し、その後に LCWE を添加したところ、mimic miR-146a-5p により TNF- α の発現が低下し、逆に antagomir miR-146a-5p により TNF- α の発現上昇を認め、miR-146a-5p の発現亢進によって川崎病様炎症が抑制されることを見出した(図 2B)。



【今後の展望】

単一細胞解析で得られた網羅的遺伝子発現プロファイルをもとに、in silico 推測により既存治療の機序にとらわれない化合物、IVIG と同様の効果が期待できる化合物、IVIG 抵抗例に効果が期待できる化合物を探索中である(図 1D)。治療薬候補の化合物を設定後に、川崎病モデルマウスを用いて治療効果を確認し、川崎病に対する新規治療薬を見出す予定である。

また miRNA に関しては川崎病モデルマウスを用いて、miRNA の RNA-seq や miRNA 発現調節による冠動脈炎の抑制効果も確認していく予定である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Noval Rivas M, Arditi M. Kawasaki disease: pathophysiology and insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol*. 2020; 16:391-405.
- 2) Sawada R, Iwata M, Tabei Y, Yamato H, Yamanishi Y. Predicting inhibitory and activatory drug targets by chemically and genetically perturbed transcriptome signatures. *Sci Rep*. 2018; 8:156.

5. アトピー性皮膚炎におけるケモカイン受容体 CCR4を介した Th2 細胞の増殖機構解明と CCR4 を標的とした治療効果

松尾 一彦
(近畿大学 薬学部)

背景・目的

アトピー性皮膚炎 (AD) は、T ヘルパー (Th) 2 免疫応答に関連するアレルギー性皮膚疾患である。ケモカイン受容体 CCR4 は、アレルギー性疾患における Th2 細胞に選択的に発現する細胞遊走因子受容体である [1]。CCR4 リガンドである CCL17 および CCL22 は、AD 患者の皮膚病変で高発現し、CCR4 を介して Th2 細胞を皮膚病変に誘引すると考えられていることが報告されている。また、IL-4、IL-5、および IL-13 などの Th2 細胞由来のサイトカインは、B 細胞で IgE 産生を促進し、その後の IgE 介在性マスト細胞の活性化がさまざまなアレルギー反応を引き起こすことが知られている [2]。さらに、最近の研究では、Th17 細胞が AD の発症に重要な役割を果たすことが示されている。Th17 サイトカインである IL-17A は、IL-4 の産生および B 細胞の抗体分泌細胞への分化を促進することにより、AD マウスモデルで Th2 免疫応答を増強すると報告されている [3]。

末梢組織において抗原を補足した樹状細胞 (DC) は、所属リンパ節に移動し、抗原を Naïve または Memory T 細胞に提示し、T 細胞のクラスター形成と増殖を促進する [4]。この点について、我々は最近、メラノーマおよび乾癬マウスモデルの所属リンパ節において DC が CCR4 リガンドの 1 つである CCL22 を産生し、CCR4 発現メモリ Th17 細胞を誘引し、DC と Th17 細胞との相互作用およびその後の Th17 細胞の増殖を誘導することを示した [5, 6]。

本研究課題では、アレルギー疾患の代表例である AD モデルとして、ビタミン D アナログである MC903 を用いた AD モデル [7] を使用して、Th2 細胞の所属リンパ節における CCR4 を介した増殖機構を明らかにし、それを標的とした治療効果について検討した。

結果

所属リンパ節における Th2 細胞並びに Th17 細胞増殖に対する CCR4 の関与

AD モデルマウスに対して CCR4 の選択的阻害剤である Compound22 を投与し、所属リンパ節での Th2 細胞並びに Th17 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Compound22 の投与は濃度依存的に Th2 細胞と Th17 細胞の誘導を減少させた (Figure 1A)。これまでに、リンパ節において CCR4 を発現する Th17 細胞が CCL22 を分泌する樹状細胞と相互作用することによって、Th17 細胞の増殖に CCR4 系が関与することを報告している。そこで、本 AD モデルにおいても CCR4 が Th2 細胞や Th17 細胞の増殖に関与するかどうかを検討した。まず、本 AD モデルマウスの皮膚所属リンパ節における CCR4 リガンドの発現を解析した結果、CCL22 ならびに CCL17 の発現が有意に上昇し、その発現強度は CCL22 の方が高いことを明らかにした (Figure 1B)。免疫染色の結果から、CCL22 は樹状細胞マーカーである CD11c と共局在し、IL-4 は T 細胞様の小さく丸いリンパ球が発現することが示された。CCL22 と IL-4 の共染色の結果、CCL22 発現樹状細胞は IL-4 陽性リンパ球と相互作用することを明らかにした。そしてこの共局在の数は Compound22 処置マウスにおいて顕著に減少した (Figure 1C, D)。

そこで、in vitro における樹状細胞と T 細胞の共培養実験によって、Th2 細胞および Th17 細胞の増

殖に対する CCR4 の関与について検討した。その結果、Compound22 は濃度依存的に Th2 細胞ならびに Th17 細胞の増殖を抑制した (Figure 1E)。これらの結果は、CCR4 はリンパ節において Th17 細胞だけでなく、Th2 細胞の増殖にも寄与することを支持している。

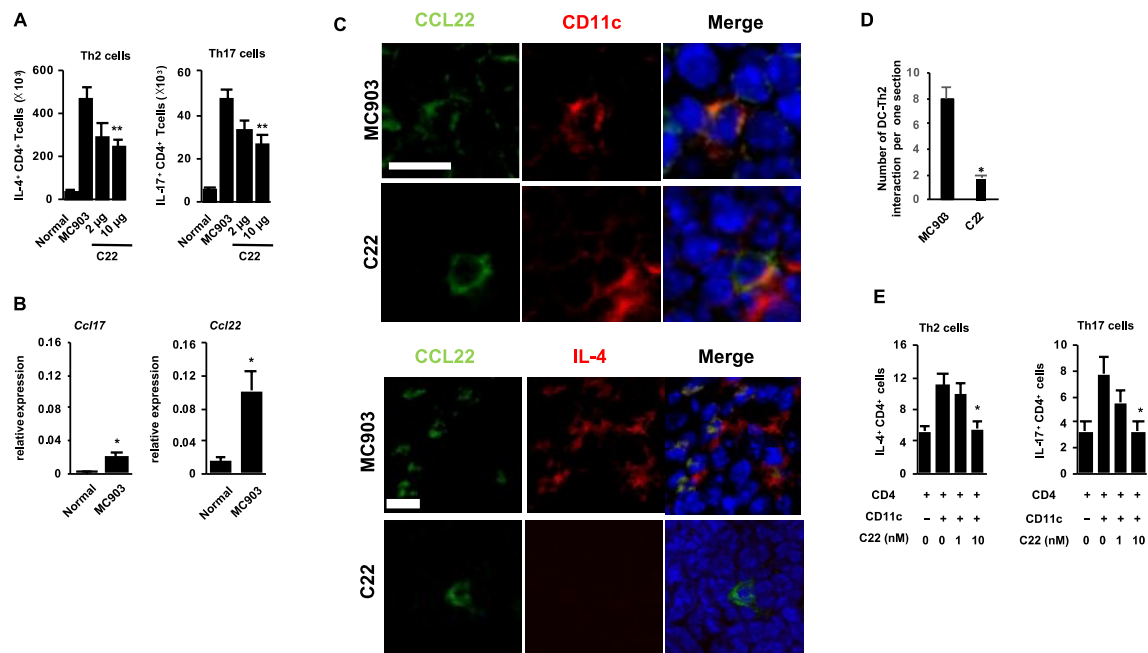


Figure 1. CCR4 contribution in the expansion of Th2 cells and Th17 cells in the regional lymph nodes of atopic dermatitis mice. (A) Count of Th2 cells and Th17 cells in the regional LNs of atopic dermatitis mice on days 12. IL-4⁺ CD4⁺ Th2 cells and IL-17A⁺ CD4⁺ Th17 cells were analyzed by flow cytometry using the CD45 gate. Data represent the mean $\pm$ S.E. of results from six mice. (B) The mRNA expression of CCL17 and CCL22 in the regional lymph nodes of atopic dermatitis mice were analyzed by real-time PCR. Data represent the mean $\pm$ S.E. of results from at least three independent experiments. (C) Lymph node sections from atopic dermatitis mice on day12 were double stained for CCL22 (green) and CD11c (red) or for CCL22 (green) and IL-4 (red). Representative results from at least three independent experiments are shown. Scale bar is 10 μ m. (D) The number of CCL22⁺ DC-IL-4⁺ Th2 cell interactions per one double-stained lymph node section was counted. Data represent the mean $\pm$ S.E. of results from at least three independent experiments. (E) In vitro expansion of Th2 cells and Th17 cells in coculture with CD11c⁺ DCs. CD11c⁺ DCs and CD4⁺ T cells were isolated from the regional lymph nodes of atopic dermatitis mice on day 12, and they were cocultured in the presence or absence of compound22. IL-4⁺ CD4⁺ Th2 cells and IL-17A⁺ CD4⁺ Th17 cells were analyzed by flow cytometry using the CD45 gate. Data represent the mean $\pm$ S.E. of results from 12 mice. * P < 0.05. ** P < 0.01.

Compound22 の塗布による AD 病変への影響

次に、CCR4 に対する選択的な阻害剤である Compound22 を用いて、CCR4 の阻害が MC903 誘発 AD 病変皮膚に対してどのような影響を与えるのかを検討した。Figure 2A, B, C に示す通り、MC903 によって引き起こされる皮膚病変（紅斑、表皮肥厚）は Compound22 の塗布によって有意に改善した。また、HE 染色ならびに肥満細胞を染色したトルイジンブルー（TB）染色像を観察したところ、MC903 誘発 AD マウスでは、肥満細胞を含む炎症性細胞の皮膚浸潤が亢進した。それに対して Compound22 の塗布は炎症性細胞の浸潤を有意に抑制することが判明した (Figure 2B, D, E, F)。さらに AD 関連因子である TSLP、CCL17、CCL22、IL-4 も Compound22 の塗布によって有意に抑制された (Figure 2G)。これらのことから、CCR4 は AD 様病変皮膚状態の形成に重要な役割を果たし、CCR4 の阻害は AD に対する治療効果を示すことを明らかにした。

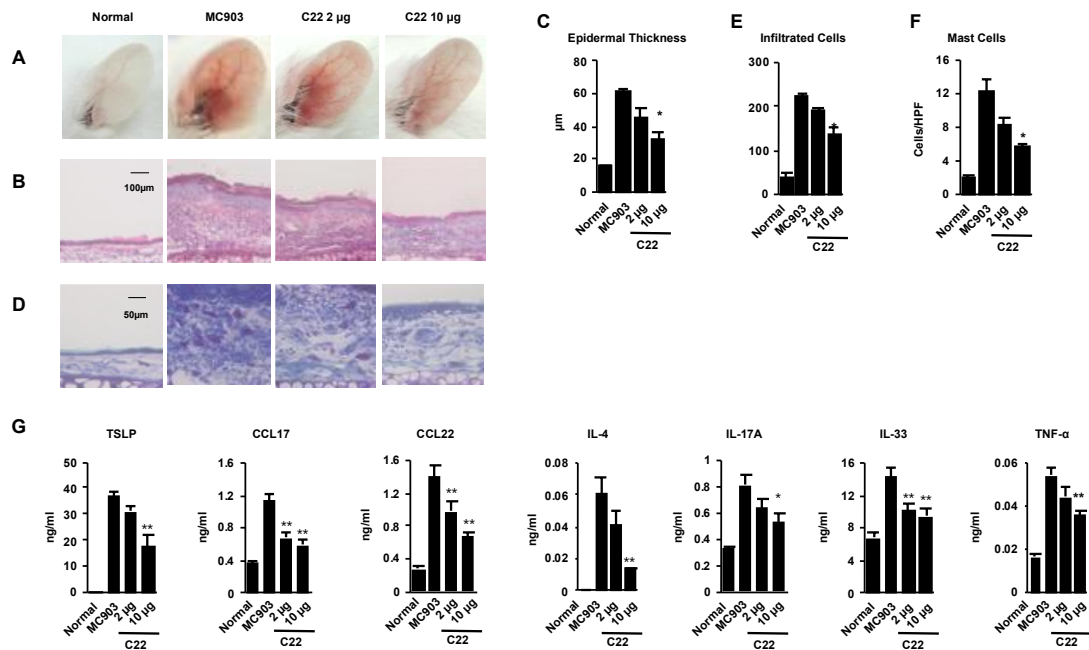


Figure 2. The effect of Compound22 in MC903-induced atopic dermatitis mice. atopic dermatitis -like skin inflammation was induced by M903 treatment, and the skins were treated with Compound 22 every day. (A) Representative pictures of ear skin lesions. (B) HE staining of skin lesions. Scale bar is 100 μm. (C) Measurement of epidermal thickness from HE staining images of skin samples. Data represent the mean ± S.E. of results from three mice. (D) TB staining of skin sections. Scale bar is 50 μm. (E) Count of inflammatory cells in the dermis of atopic dermatitis mice. Inflammatory cells were counted in five random fields of each HE staining image under the optical microscope at x400 magnification. Data represent the mean ± S.E. of results from three mice. (F) The protein expression levels of TSLP, CCL17, CCL22, IL-4, IL-17A, IL-33, and TNF-α in the skin lesions on day 12 were measured by ELISA. Data represent the mean ± S.E. of results from five mice for normal group and 15-20 mice for other groups. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

考察

アレルゲン特異的なT細胞はアレルゲンを補足した樹状細胞がナイーブT細胞に抗原提示することによって誘導される。アレルゲンを補足した樹状細胞がケモカイン受容体 CCR7 のリガンドである CCL19 を分泌することで CCR7 陽性ナイーブT細胞との相互作用が促進される [4]。そしてその後ナイーブT細胞は抗原特異的なエフェクター/メモリー細胞へと分化する。このようにアレルゲンに始めて感作されたときにはケモカイン CCR7 系が重要な役割を果たすことが知られている。一方で、二回目以降の感作においても抗原を補足した樹状細胞と抗原特異的なエフェクター/メモリーT細胞が相互作用することが必要である。しかしながら、この相互作用におけるケモカイン系の役割についてはほとんど明らかにされていなかった。

この点においては、我々はTh17疾患の病変部位の所属リンパ節においてエフェクター/メモリーTh17細胞の増殖はCCR4を介した樹状細胞との相互作用によって促進されることを報告した [5, 6]。本成果においても、CCR4選択的阻害剤であるCompound22はエフェクター/メモリーTh2細胞の増殖を抑制することをin vivoならびにin vitro実験によって明らかにした。従って、CCR4は皮膚所属リンパ節においてTh2細胞やTh17細胞の増殖にも関及すると考えられる。

また、申請者はこれまでにアトピー性皮膚炎マウスにおいてTh2細胞の皮膚病変への浸潤にCCR4が関与することを報告している [8]。このことから、CCR4はTh2細胞やTh17細胞の増殖並びに皮膚浸潤の両方に関与し、アトピー性皮膚炎の病態形成に寄与していると考えられる。

以上、ケモカイン受容体 CCR4 はTh2細胞をはじめとするアレルギー関連免疫細胞のリンパ節での増

殖に寄与することを明らかにした。これらの免疫応答が皮膚においてアレルギー病変を形成することを示した。そして CCR4 選択的阻害剤の投与によってアレルギー様病変が有意に抑制されたことから、CCR4 がアトピー性皮膚炎の治療標的として有望であることを明らかにした。

1. Zlotnik A and Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012 May 25;36(5):705-16.
2. Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, Nakajima S, Nomura T, Kaplan DH, Kabashima K. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol*. 2018 Dec;19(12):1286-1298.
3. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2122-2130.
4. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
5. Matsuo K, Itoh T, Koyama A, Imamura R, Kawai S, Nishiwaki K, Oiso N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T. CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma. *Cancer Lett*. 2016 Aug 1;378(1):16-22.
6. Matsuo K, Kitahata K, Kaibori Y, Arima Y, Iwama A, Ito M, Hara Y, Nagakubo D, Quan YS, Kamiyama F, Oiso N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T. CCR4 involvement in the expansion of T helper type 17 cells in a mouse model of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2021 Aug;141(8):1985-1994.
7. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Aug 1;103(31):11736-41
8. Matsuo K, Nagakubo D, Komori Y, Fujisato S, Takeda N, Kitamatsu M, Nishiwaki K, Quan YS, Kamiyama F, Oiso N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T. CCR4 is critically involved in skin allergic inflammation of BALB/c mice. *J Invest Dermatol*. 2018 Aug;138(8):1764-1773.

6. コリン性蕁麻疹発症メカニズムの解明と新規治療標的の探索

柳瀬 雄輝

(広島大学大学院医系科学研究科)

【背景・目的】

コリン性蕁麻疹は、運動、入浴や精神的ストレスなどで体温が上昇し、発汗を起こす状態に至った際に、直径 3-5mm 程度の紅斑を伴う、一過性、かつ限局性の浮腫（膨疹）が出現する皮膚疾患である^{1,2)}。通常は 10~20 代の若者に多く発現し、症状出現時には痒みと痛みを伴うため、患者の QOL を著しく低下させる。そのため、より効果的な新規の治療法・治療薬の開発が求められている。

コリン性蕁麻疹の発症機序は、発汗を制御する神経伝達物質であるアセチルコリン（Ach）と汗腺や皮膚マスト細胞に発現しているムスカリン受容体の関与が示唆されている。また、コリン性蕁麻疹の病態において抗ヒスタミン薬が一定の効果を示すため、皮膚マスト細胞から放出されるヒスタミンが膨疹の形成に寄与している事が予想されているが、詳細な機序は未だ明らかでない。そこで本研究では、Ach に加えて、発汗時に神経から放出され、血管に作用する神経ペプチド、血管作動性腸管ペプチド（VIP）とカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）や、汗中に含まれ血管外に漏出することが知られている抗菌ペプチド、 β -defencin と LL-37 が、皮膚マスト細胞に作用してヒスタミンなどを放出し得るか検討する。本研究により、コリン性蕁麻疹における膨疹形成機序を解明することができれば、詳細なコリン性蕁麻疹の発症メカニズムの解明と、より効果的な新しい治療法・治療薬の開発に繋がると期待される。

【方法・結果】

①皮膚マスト細胞の活性化における Ach・神経ペプチド・抗菌ペプチドの影響

ヒト皮膚マスト細胞は、手術の余剰皮膚からコラゲナーゼ処理により分離し、stem cell factor 存在下で数週間培養したものを使用した。また、皮膚マスト細胞の活性化は、ヒスタミン放出（脱顆粒反応）と同様の挙動を示す β ヘキソサミニダーゼ放出を指標とした。これまでの報告では、神経細胞から放出される Ach が直接マスト細胞を活性化して、ヒスタミン遊離を誘導し、蕁麻疹を形成する可能性が示されてきた。

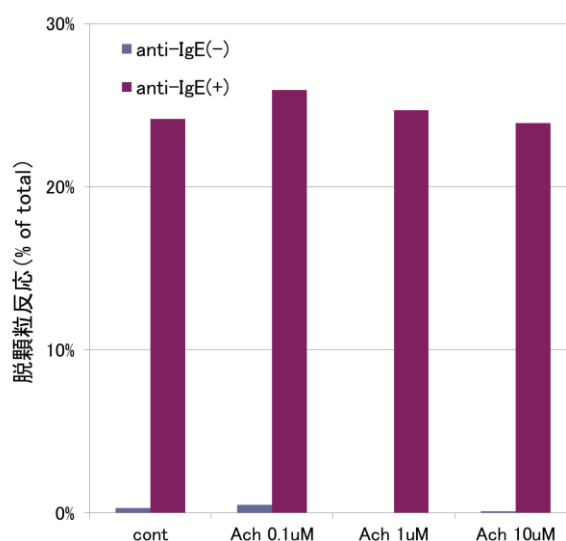


図1 ヒト皮膚マスト細胞の脱顆粒反応に対するAchの影響

そこで本研究では、ヒト皮膚マスト細胞を Ach 刺激した際の皮膚マスト細胞の脱顆粒反応について検討した。その結果、Ach 単独刺激では皮膚マスト細胞の脱顆粒が誘導されないことが示された (図 1)。また、Ach は IgE 受容体依存的な皮膚マスト細胞の活性化 (anti-IgE による刺激) も増強しないことが示された (図 1)。これらの結果は、コリン性蕁麻疹の病態において、Ach は皮膚マスト細胞の活性化に直接的に作用しない可能性を示唆している。

次に、神経から放出され、発汗を促すペプチドである VIP と CGRP、また、汗中に含まれる抗菌ペプチドである β -defencin と LL-37 が、皮膚マスト細胞の脱顆粒反応を引き起こすか検討した。その結果、これらのペプチドは、濃度依存的に皮膚マスト細胞に作用して、脱顆粒反応を誘導することが明らかとなった (図 2)。これらの結果は、コリン性蕁麻疹の病態において、神経から放出される VIP、CGRP 量の増加や、抗菌ペプチドの皮内漏出増加のいずれか、またはその組み合わせが原因となり、発汗刺激に伴うマスト細胞の活性化が引き起こされることを示唆している。

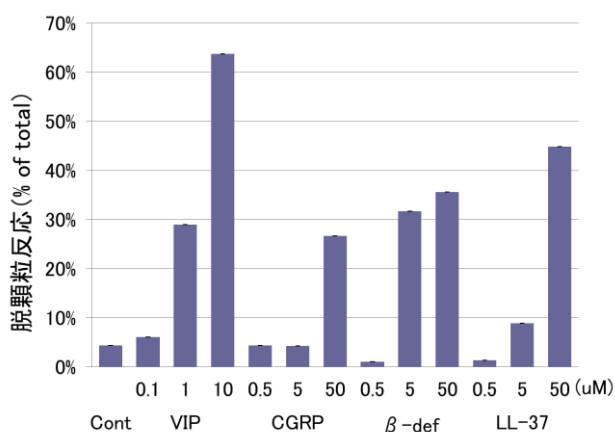


図2 ヒト皮膚マスト細胞の脱顆粒反応に対する神経・抗菌ペプチドの影響

②MRGPRX2 発現細胞の樹立とリガンドアッセイへの応用

皮内の神経末端から放出される神経ペプチド、VIP や CGRP はそれぞれに特異的作用する受容体を持つ。また、 β -defencin や LL-37 等の抗菌ペプチドは皮膚表面の微生物を駆除するために利用されている。近年、マスト細胞機能における神経ペプチドの役割に関する研究が進められるにつれて、神経ペプチドの一種である Substance P (SP) は、本来の生理的受容体である NK1 受容体ではなく、皮膚マスト細胞が発現する Mas-related G protein-coupled receptor X2 (MRGPRX2) 受容体を介してマスト細胞の脱顆粒反応を引き起こすことが報告されている³⁾。また我々の研究から、神経ペプチドの一種であるニューロメディン U (NMU) も、生理的に発現している NMU 受容体ではなく、MRGPRX2 受容体を介して皮膚マスト細胞を活性化することを見出した⁴⁾。さらに最近の研究から、VIP、CGRP、 β -defencin や LL-37 も MRGPRX2 のリガンドとなり得ることが報告されている³⁾。興味深い事に、MRGPRX2 の主要な発現細胞は皮膚マスト細胞であるため、これらのペプチドは MRGPRX2 を介して皮膚マスト細胞の脱顆粒を誘導し、蕁麻疹を形成している可能性が考えられる。そこで本研究では、MRGPRX2 恒常発現細胞を樹立し、上記のペプチドによる活性化が引き起こされるか検討した。

MRGPRX2 恒常発現細胞は、ヒト胎児腎細胞（HEK 細胞）にヒト MRGPRX2 発現ベクター（ベクタービルダー社より購入）を導入して作製した。また、MRGPRX2 を介した細胞の活性化は、細胞内カルシウム濃度の変化を指標とした。樹立した細胞を、既知の MRGPRX2 リガンド（substance P など）で刺激した結果、MRGPRX2 刺激による特異的な細胞の活性化を検出できた（データ示さず）。また、VIP、CGRP、 β -defencin や LL-37 などのペプチドも、MRGPRX2 に作用して細胞を活性化することを明らかにした（データ示さず）。

今回樹立した MRGPRX2 発現細胞は、これらのペプチドによる MRGPRX2 受容体の刺激・拮抗物質のスクリーニングアッセイとして利用する。

【結語】

本研究により、コリン性蕁麻疹の病態において、発汗・抗菌ペプチドによる MRGPRX2 を介した皮膚マスト細胞の活性化が寄与である可能性が示された。また、皮膚マスト細胞を用いずに、MRGPRX2 を介した細胞活性化を評価するスクリーニングアッセイ系を確立した。今後、これらのペプチドによる MRGPRX2 発現細胞の活性化を阻害する物質を探索すれば、コリン性蕁麻疹を効果的に抑制する拮抗薬の開発に繋がると期待される。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Tokura Y. Direct and indirect action modes of acetylcholine in cholinergic urticaria. *Allergol Int.* 2021;70(1):39-44.
2. Horikawa T, Fukunaga A, Nishigori C. New concepts of hive formation in cholinergic urticaria. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;9(4):273-9.
3. Ali H. Emerging Roles for MAS-Related G Protein-Coupled Receptor-X2 in Host Defense Peptide, Opioid, and Neuropeptide-Mediated Inflammatory Reactions. *Adv Immunol.* 2017;136:123-162.
4. Matsuo Y, Yanase Y, Irifuku R, Takahagi S, Mihara S, Ishii K, Kawaguchi T, Tanaka A, Iwamoto K, Watanuki H, Furuta K, Tanaka S, Inoue A, Aoki J, Hide M. Neuromedin U directly induces degranulation of skin mast cells, presumably via MRGPRX2. *Allergy.* 2018;73(11):2256-2260.