

脂質代謝依存 ACC1 誘導性 Th17 の乾癬での役割

千葉大学大学院医学研究院皮膚科学

松岡 悠美

1. 背景

尋常性乾癬は近年我が国でも罹患率の増加がいわれている慢性皮膚炎症性角化症の1つである。Th1に加え、Th17細胞の関与も明らかになり、臨床の現場では既存の免疫抑制剤などに加え、生物学的製剤として、抗TNF、抗IL-23p40、抗IL-17製剤等が治療として使用されている。しかし、これら現状の治療は副作用のリスクに加え、高額な抗体製剤の長期間の投与という医療経済そのものへの圧迫を招くことが大きな問題である。また、既存の治療はあくまで症状を抑制するに留まり、疾患の予防や治癒を達成するものではない。近年、メタボリックシンドロームと自己炎症の関連が徐々に明らかになり、肥満、脂質異常症、糖尿病など患者で乾癬の罹患率が高くなることも報告されている(Armstrong, *J Am Acad Dermatol*, 2013)¹⁾。実際、TLR (Toll-like receptor) 7のリガンドであるimiquimod外用により発症させる乾癬のマウスモデルにおいて、高脂肪食を与えると増悪するというデータがあるが、その機序については未だ明らかではない。脂肪酸合成経路においてアセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)はacetyl-CoA からmalonyl-CoA を合成する。このACC1のCD4特異的ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスを用いてT細胞におけるACC1の機能解析を行い、ACC1がTh17細胞の分化誘導に重要な役割を果たしていることが最近明らかになった(Berod, *Nat Med*. 2014)²⁾。当施設免疫学教室ではさらに、ヒト末梢血を用いた解析を行い、健常者に比較して肥満患者でTh17細胞の増加が見られると共に、CD4陽性細胞内でのACC1の発現が有意に上昇している事を見いだした(Endo, *Cell Rep*. 2015)³⁾。そこで、申請者らは、尋常性乾癬患者における末梢血Th17細胞の動態と、ACC1の発現の解析、および乾癬マウスモデルを用いた解析によってメタボリックシンドロームと乾癬発症の機序の解明を行い将来的に予防法及び治療法の足がかりを構築する事を着想した。

2. 方法

1. 乾癬患者におけるACC1発現Th17細胞の同定

1- ① 患者末梢血単核球細胞を用いた、乾癬患者におけるTh17細胞の比率解析:

ステロイドなどの外用剤のみで加療している千葉大学皮膚科に通院中の乾癬患者20名および、健常者20名(軽微な湿疹などの患者)の末梢血20 mlを採取、Ficoll比重分離により末梢単核球分画を採取する。採取した単核球をCD45RO、CD4、IL-17A、IFN- γ で染色し、フローサイトメトリーで、CD45RO+CD4+細胞分画のIL-17産生について検討する。

1- ② 患者末梢血単核球細胞を用いた、乾癬患者CD45RO+CD4+細胞におけるACC1の発現解析: 1-

①で得られた単核球のうち一部を、CD45RO+CD4+でCell sorting行い得られた分画よりmRNAを抽出、qRT-PCR法にてACC1遺伝子の発現を解析する。

1- ③ 実験手技および統計学的解析処理:

当施設免疫学教室により行われた、ヒト肥満患者と健常者におけるIL-17産生細胞の解析と、ACC1遺伝子発現解析結果を示す。細胞の末梢血からの単離、解析には精通しており、円滑に以上の実験計画を遂行できる。また、この臨床データに基づき、統計学的有意差を得るため、患者および健常者の予定数を20名と算出した。さらに、臨床検査データでメタボリックシンドロームを合併している乾癬患者群と非合併患者群においてACC1遺伝子発現量を比較検討する。

2, Imiquimod外用マウスモデルを用いたACC1発現により誘導されるTh17細胞の役割解析

2- ① CD4特異的ACC1トランスジェニックマウスおよびACC1ノックアウトマウスを用いた、Imiquimod誘導乾癬モデルマウスの解析: マウス皮膚にImiquimodを外用するとヒト乾癬の組織

学的特徴と共に、IL-17産生細胞の浸潤が非常に良く再現される。乾癬患者皮膚では、抗菌ペプチドLL37に修飾された細胞外RNAが高発現し、*in vitro*においてこの複合体が樹状細胞を活性化し、IFN- α の産生を起す事が報告されている (Ganguly, *J Exp Med.* 2009) ⁴⁾。申請者らの *Tlr7*^{-/-}, *Myd88*^{-/-}マウスを用いた実験でも Imiquimodが、ウイルスssRNAをリガンドとする TLR7-MyD88を介していることは明らかであり、Imiquimodが乾癬患者皮膚での細胞外RNAを模していると推測される。CD4特異的ACC1トランスジェニックマウスおよびACC1ノックアウトマウスはすでに免疫学教室にて保有しており、これらの遺伝子改変マウスとコントロール野生型マウスに Imiquimodを外用し、病理組織、qPCR法による遺伝子発現解析、フローサイトメトリーによる浸潤細胞の解析を行うことでACC1の役割を明らかにする。モデルマウスを用いる事で、乾癬皮膚の成り立ちとACC1の役割が明らかになれば、ACC1をターゲットとした今後の創薬にも役立つ基盤となると考えている。

3. 倫理面への配慮：臨床検体の取扱は、千葉大学の倫理審査委員会の審査の承認をうけてから行う。組み換えDNA実験および動物実験を行う際には、計画の申請を千葉大学の承認を受けた後、規定を守り研究計画を遂行する。

3. 結果 研究成果

以下の実験を千葉大学の倫理審査委員会の審査、動物実験計画書の審査の後開始した。

1- ① 患者末梢血単核球細胞を用いた、乾癬患者におけるTh17細胞の比率解析：

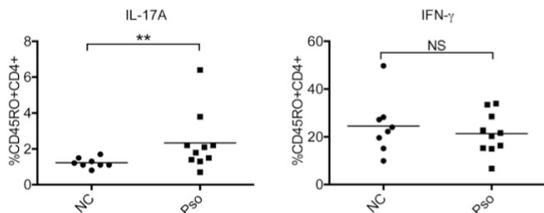


図1：健康者 (NC) と乾癬患者 (Pso) における末梢血CD45+CD4+細胞中のIL-17AおよびIFN- γ 陽性細胞の割合。内服、点滴などの全身的治療を行っていない皮膚生検にて診断した乾癬患者末梢血単核球を解析

健康者および、乾癬患者末梢血単核球分画を単離し、CD45RO+CD4+陽性細胞内のIL-17A産生細胞の割合を解析した。乾癬患者においては健康者と比較して、IL-17A陽性細胞数が有意に上昇しており、一方IFN-g陽性細胞数に差は認められなかった (図1)。

1- ② 患者末梢血単核球細胞を用いた、乾癬患者CD45RO+CD4+細胞におけるACC1の発現解析：統計学的有意差を得るために現在乾癬患者および健康者各20名ほどを引き続きリクルート行っている。1- ①でリクルートした患者では良好な結果が得られているので引き続き検体を採取し解析を終了する予定である。

2- ① CD4特異的ACC1トランスジェニックマウスおよびACC1ノックアウトマウスを用いた、Imiquimod誘導乾癬モデルマウスの解析：

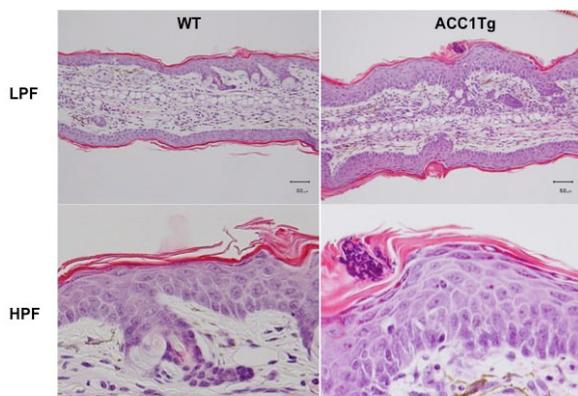


図2：野生型(WT)およびT細胞特異的ACC1トランスジェニックマウス(ACC1Tg)マウスにおける7日間IMQ外用後の病理組織HE染色像。ACC1TgではWTに比較して表皮の肥厚、炎症細胞浸潤が顕著である

野生型(WT)および、T細胞特異的ACC1トランスジェニック(ACC1Tg)マウス耳介皮膚にイミキモド(IMQ)外用を7日間行い、耳介の肥厚および、病理組織を検討した。ACC1TgマウスではWTに比較して有意に耳介肥厚が増強した。また、ACC1Tgマウス耳介病理組織像では、WTに比較して真皮及び表皮内への炎症細胞浸潤の増強、著名な表皮肥厚、乾癬患者病理組織で認められるような、Munroの微小膿瘍様の変化が観察された (図2)。申請者は現在、ACC1ノックアウトマウスの解析には着手していないが、これは乾癬という病態が、ACC1Tgマウスでより再現されるであろうという見解にもとづき、Tgマウスに解析を優先しているためである。今後、ACC1Tgマウスの解析を終了した後、その重要性をより確実にするデータ

が必要な場合、ノックアウトマウスにおいても検討を行う予定である。

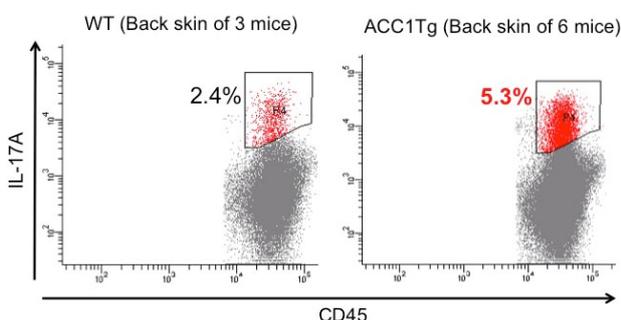


図3：野生型(WT)およびT細胞特異的ACC1トランスジェニックマウス(ACC1Tg)マウスにおける7日間IMQ外用後のIL-17A産生細胞の割合。ACC1TgマウスではIMQ外用により皮膚に浸潤するIL-17産生細胞の割合が増加する

次に、皮膚に浸潤するIL-17A産生細胞について詳細に解析するため、マウス背部皮膚を剃毛し、同様に7日間IMQ外用を行った後、皮膚を採取、細胞を単離しIL-17A産生細胞をフローサイトメトリーにて解析した。CD45陽性細胞中のIL-17A陽性細胞分画はWTに比較して、ACC1Tgマウスで増加していた (図3)。高脂肪食投与により、WTマウスの表現型および皮膚IL-17A産生細胞の数はACC1Tgマウスと同レベルまで上昇することが明らかになった。

4. 考察 まとめ

ACC1TgマウスのIMQモデルにおける表現系の増強は乾癬患者におけるメタボリックシンドロームの背景を反映している可能性が示唆された。このように良好な結果が得られたため、今後このマウスモデルを更に詳細に解析し、乾癬におけるメタボリックシンドロームの免疫系への寄与を明らかにしていく予定である。また、ヒト乾癬患者および健常者における解析も並行してすすめることで、脂肪酸合成経路の疾患への寄与を明らかにする。

5. 発表論文、参考文献

本研究テーマは、ヒトサンプルの採取状況、マウスの繁殖状況などに左右されるため、報告書作成時点で完了していない。引き続き解析を進め、英文雑誌への論文発表を予定している。

参考文献

1. Armstrong AW1, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Apr;68(4):654-62.
2. Berod L1, Friedrich C, Sparwasser T, et al. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat Med*. 2014 Nov;20(11):1327-33.
3. Endo Y, Asou HK, Matsugae N, et al. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep*. 2015 Aug 11;12(6):1042-55.
4. Ganguly D1, Chamilos G, Gilliet M, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1983-94.