

神経ペプチドシグナルを介したアレルギー発症メカニズムの解明と皮膚炎軽減効果

北海道大学遺伝子病制御研究所

北村 秀光

Not a few people are suffering from allergic skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis. With the development of medicine, patients with skin diseases are relieved by the treatment with anti-inflammatory or steroidal drugs. However, there are some patients having not only side effects such as drug allergies and anaphylaxis but also refractory patients. Therefore, it is important to elucidate the onset and aggravation mechanisms of skin diseases from a new perspective. In the previous studies, we revealed that a neurokinin A receptor, NK2R-mediated neuropeptide signals, activated in a STAT1-dependent manner, augmented antigen presentation ability of dendritic cells and induced allergen-specific T cell immune responses.

In this study, we investigated the involvement of STAT1-mediated neuropeptide signals in the onset and clinical condition of skin diseases by using a psoriasis mouse model. We established a psoriasis model by the treated with imiquimod (IMQ) to the skin and found that body weight loss scale formation and thickness of skin in STAT1-deficient mice were significantly reduced compared to wild-type mice. Ly6C-expressing myeloid cells were transiently induced in the IMQ-treated wild-type mice were significantly lower in the STAT1-deficient mice. Furthermore, we confirmed that IL-17A and NK2R gene expression levels were down-regulated in the spleen cells of IMQ-treated STAT1-deficient mice compared to that of wild type mice. These data suggested that STAT1 activation were closely related to the pathogenesis of in the IMQ-induced psoriasis model mice.

Base on the present findings, we speculate that STAT1-mediated neuropeptide signaling cascade and the related molecules may be promising drug targets to improve skin diseases such as psoriasis.

1. 緒言

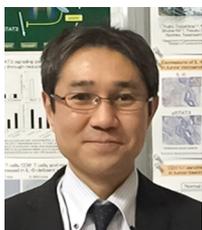
アトピー性皮膚炎などの免疫・アレルギー性皮膚疾患に苦しむ方が増えている。近代医学の発展により、効果の高い抗炎症薬、抗アレルギー薬、またはステロイド薬が開発され、数多くの患者さんを救済している。しかしながら、薬剤アレルギー・アナフィラキシーなど副作用の発生や完全に寛解できない患者さんも存在することから、これまでの視点とは異なる皮膚疾患の発症、重篤化メカニズムの解明と副作用の少ない安全な治療法の開発は重要であると考えられる。

これまでの先行研究で、痛みやストレス、あるいは侵襲などの刺激により神経系から放出される神経ペプチドタキキニン類の一つ、ニューロキニンAの受容体であるNK2RがI型インターフェロン(IFN- α/β)あるいはII型インターフェロン(IFN- γ)の刺激により、STAT1依存的に免疫細胞の一つである樹状細胞に発現誘導され、炎症・免疫応答の重篤化に関与すること、さらにNK2Rに対する拮抗阻害薬がアレルギー特異的T細胞の誘導と活性化を有意に抑制することを見出した¹⁾。またIFN- γ 誘発ステロイ

ド抵抗性重篤化喘息マウスモデルを構築し、これにNK2R拮抗阻害薬を投与することで、病態の発症、重篤化が軽減されるデータを得た^{2,3)}。これらの発見は、IFN-STAT1の活性化によるNK2Rの発現誘導を介した神経ペプチドシグナルが、過剰な免疫応答により誘導される慢性炎症に密接に関与することを示唆する。

乾癬は、角化細胞の分化不全と過剰増殖を特徴とする慢性皮膚疾患で、患者の割合は世界人口の約2~3%であると推定されている。一般的に、乾癬の症状として、皮膚表面が隆起する肥厚、そこに境界明瞭な赤い発疹である紅斑が生じ、その表面に乾燥した銀白色の角質が付着する鱗屑が認められる^{4,5)}。これまで、乾癬の治療には紫外線療法やCD4陽性T細胞やマクロファージの活性化を抑制するシクロスポリン製剤のような免疫抑制剤や、乾癬に関与するサイトカインに作用する抗TNF- α 、IL-12、IL-23、IL-17抗体などの生物学的製剤などが使用されており、症状の軽減や早期治療による効果は認められている。しかしながら、現在まで乾癬の根治には至っておらず、強い免疫抑制作用による副作用や治療の長期化が問題となっている⁶⁻⁸⁾。

イミキモドは、イミダゾキノリン系の低分子化合物で、樹状細胞やマクロファージが発現するtoll様受容体(TLR7)のアゴニストで、インターフェロン制御因子によるIFN- α/β の産生が起こる。またマウスの皮膚に対してイミキモドの塗布により、乾癬様の病態が誘発されることが報告されている⁹⁾。イミキモドによって誘発された皮膚炎症では、紅斑、角化細胞の過剰増殖による表皮肥厚や分化不全による鱗屑が観察され、ヒトにおける乾癬の症状と



Elucidation of the onset mechanism of allergy mediated by neuropeptide signals and the relieving effect on dermatitis

Hidemitsu Kitamura

Institute for Genetic Medicine,
Hokkaido University

非常によく似ていることが知られている¹⁰⁻¹²⁾。

そこで本研究では、皮膚炎症性疾患の改善・寛解を目指し、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを作出し、その病態の発症と重篤化および炎症・免疫細胞におけるIFN-STAT1 依存的な神経ペプチド受容体NK2Rの発現増強を介した神経ペプチドシグナルの活性化制御メカニズムの解明を行うとともに、皮膚疾患の発症・重篤化との関連を検討した。

2. 方法

2.1. イミキモド誘発乾癬モデルの作出

野生型C57BL/6マウスあるいは同系のSTAT1欠損マウスを使用し、はじめに背部の剃毛を行った2日後、自然免疫系の活性化に重要なToll様受容体TLR7/8のアゴニストで、IFN- α/β を産生誘導する作用効果のあるイミキモドを含む市販クリーム(BESELNA CREAM 5%, 持田製薬株式会社, Tokyo, Japan)をマウスの皮膚に塗布した。コントロールとして市販のワセリンを使用した。塗布を開始した日をDay0とし、Day6までの7日間、連続塗布し、その翌日まで、マウスの体重の変化を計測するとともに、皮膚の炎症の程度を解析、評価した(図1)。

2.2. 乾癬様皮膚炎症の重症度スコア

重症度指数(PASI: Psoriasis Area Severity Index)を用いて背部皮膚の炎症状態を評価した。スコアは炎症面積を考慮せず評価を行った。紅斑、鱗屑および皮膚の厚さは0

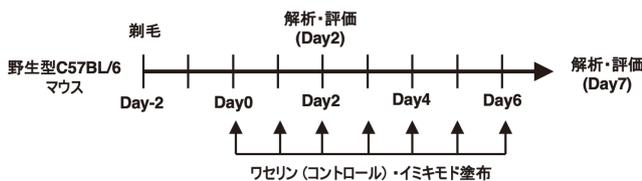


図1 イミキモド誘発乾癬モデルの構築と解析・評価

から4の範囲(0、なし 1、軽度 2、中程度 3、重症 4、極めて重症)で採点した。総合スコアは上記3つの項目の合計(0~12)で表した。

2.3. 皮膚の組織学的解析

イミキモドクリームを2日、あるいは7日間塗布した後、マウス背部の皮膚を採取し、サンプルを4%パラホルムアルデヒドで固定した後、HE染色標本を作成し、光学顕微鏡による組織学的な観察を行った。

2.4. イミキモド誘発乾癬モデルにおける免疫担当細胞の解析

イミキモドクリームを2日、あるいは7日間塗布した後、マウスより脾臓細胞を回収し、フローサイトメトリーにて各種免疫担当の解析を行った。また、各種炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現レベルを定量PCR法により評価した。

2.5. 統計解析

有意差検定は、Studentの*t*検定を用いて行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

3.1. イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける病態の発症とNK2Rの発現

皮膚炎症性疾患領域における新たな制御メカニズムの解明を目指し、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを作出し、病態の発症における神経ペプチドシグナルの関与について検討した。イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重を計測したところ、イミキモド塗布後、1から2日において、一過性に体重が減少することを見出した(図2A)。さらに7日後、皮膚の外観より、肥厚と鱗屑の症状が認められるとともに、皮膚の組織学的観察から、表皮および真皮の肥厚、

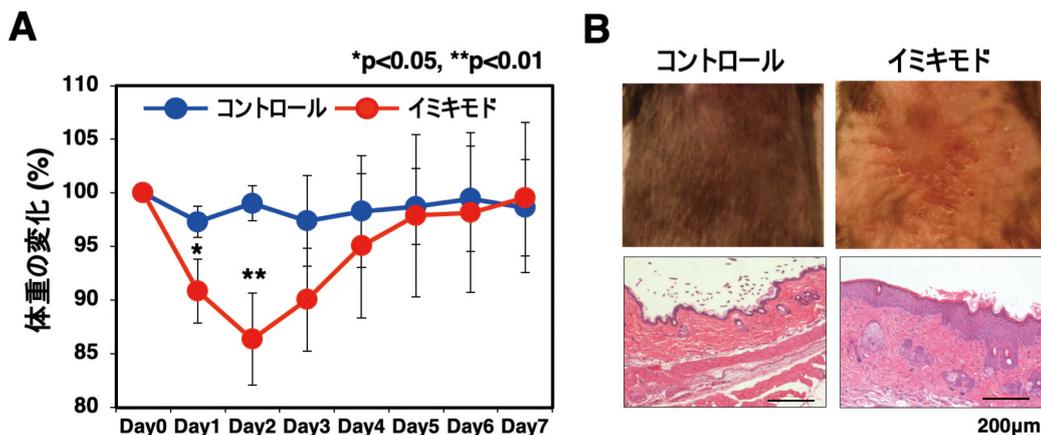


図2 イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重変化および皮膚の外観とHE染色像

血管の造成および炎症・免疫細胞の浸潤を確認した(図2A)。

そこで、イミキモド塗布2日後に、マウスから脾臓を回収し、フローサイトメトリーによる、各種免疫担当細胞を解析した結果、Ly6Cを中程度発現し、Ly6Gを発現しない単球系の細胞およびLy6CとLy6Gを共発現する顆粒球系の細胞の割合が増加することを見出した(図3)。

さらにイミキモド塗布2日後、マウス脾臓細胞において、各種サイトカインおよび神経ペプチド関連遺伝子の発現を解析した結果、炎症性サイトカインIL-6および神経ペプチドタキニン類の一つニューロキニンAの受容体NK2Rの発現レベルが有意に増加することを確認した(図4)。

以上の結果から、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける病態の発症過程においてNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの関与の可能性が示唆された。

3. 2. イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態発症におけるSTAT1の関与

次に、STAT1欠損マウスを使用し、イミキモド誘発乾癬モデルの病態発症におけるSTAT1の活性化とシグナル伝達の関係について検討した。イミキモド塗布1-5日後において、野生型マウスの体重減少の割合がSTAT1欠損マウスでは有意に減弱するとともに(図5A)、皮膚の外観から肥厚や鱗屑の症状が野生型マウスに比べ、STAT1欠

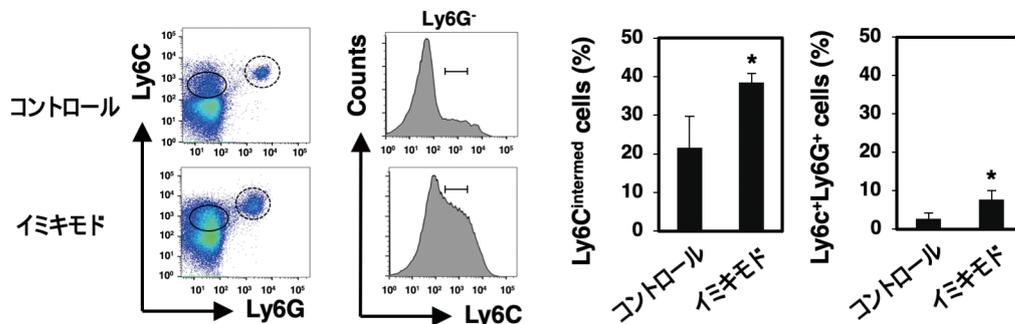


図3 イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のLy6C/Ly6G陽性細胞の解析

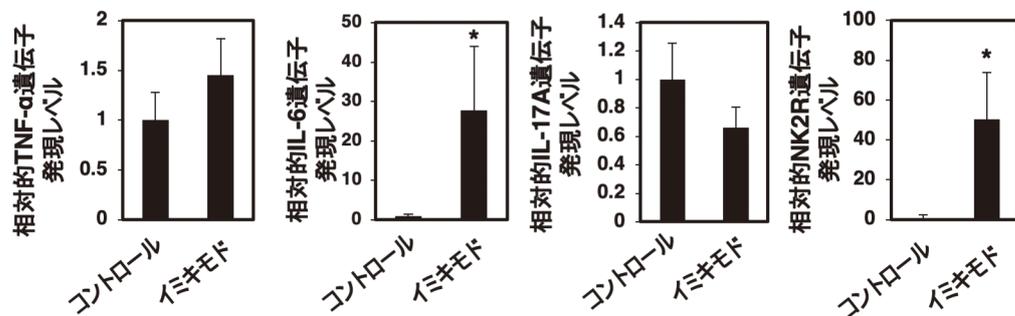


図4 イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のサイトカインおよびNK2R遺伝子発現の解析

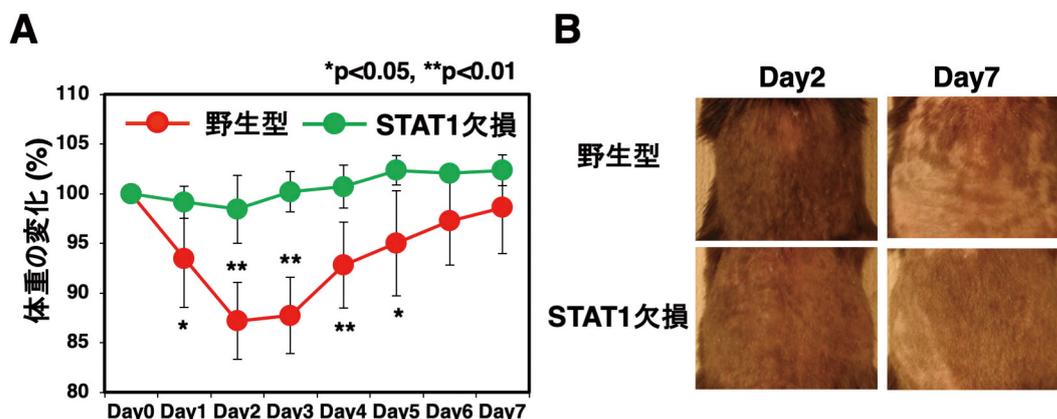


図5 イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重変化および皮膚の外観におけるSTAT1の効果

損マウスにおいて、軽減されることを認めた(図5B)。

さらに、PASIを用いてイミキモド誘発乾癬モデルの病態に対するSTAT1の関与を検討した。イミキモドの塗布により野生型マウスにて生じた皮膚の肥厚・鱗屑および総合のスコア増加が、STAT1欠損マウスにおいては、特に6日から7日後、有意に抑制されることが明らかになった(図6)。

さらに皮膚の組織学的観察から、野生型マウスに比べ、STAT1欠損マウスにおける真皮の肥厚が著しく減弱することを確認した(図7)。

以上のデータから、イミキモド誘発乾癬マウスモデルにおける病態の発症と重篤化においてSTAT1の活性化とそのシグナル伝達機構が重要であることが示唆された。

3.3. イミキモド誘発乾癬モデルマウスの炎症反応・免疫応答におけるSTAT1およびNK2Rの関与

STAT1欠損マウスを使用したイミキモド誘発乾癬モデルにおける炎症・免疫担当細胞の誘導および活性化を検討

した。野生型マウス脾臓細胞において、イミキモド塗布2日後一過性に誘導されるLy6Cを中程度発現し、Ly6Gを発現しない単球系の細胞の割合が、STAT1欠損マウスにおいて有意に減少することを認めた(図8A)。一方、Ly6CとLy6Gを共発現する顆粒球系の細胞の割合は、イミキモド塗布2日後および7日後のいずれにおいても、野生型マウスに比べSTAT1欠損マウスにおいて増加することを確認した(図8Aおよび8B)。

イミキモド塗布2日後、野生型およびSTAT1欠損マウスの脾臓細胞において、各種サイトカインおよびNK2R遺伝子の発現レベルを解析した。その結果、STAT1欠損マウス脾臓細胞において、IL-17A遺伝子の発現レベルが有意に減弱するとともに、NK2R遺伝子の発現レベルが減少する傾向にあることを確認した(図9)。

以上のデータから、イミキモド誘発乾癬モデルマウスの炎症反応と免疫応答において、STAT1はIL-17の産生誘導とNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの制御に関与する可能性が示唆された。

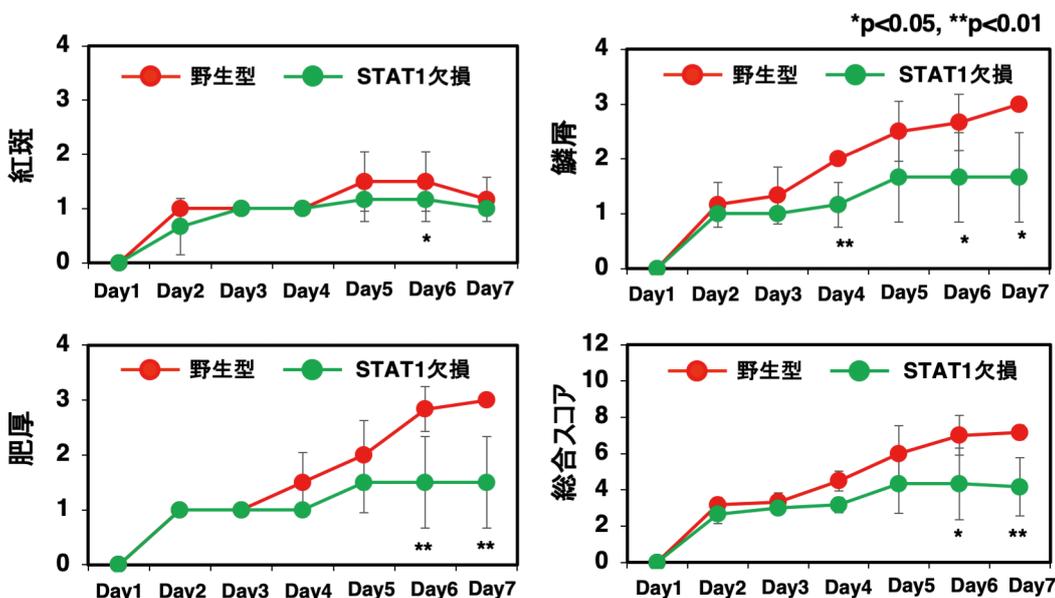


図6 イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態におけるSTAT1の効果

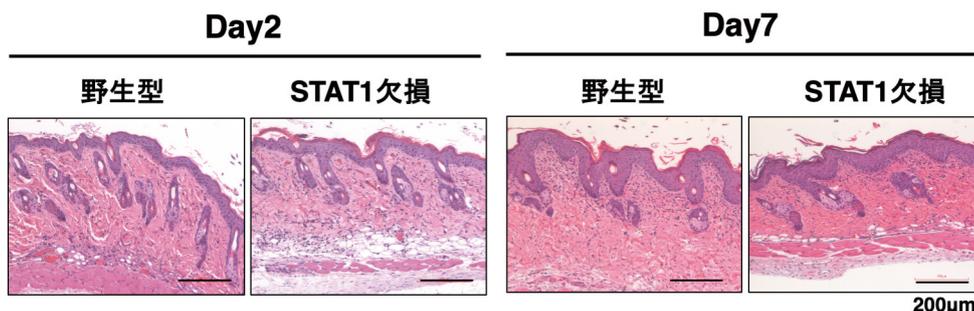


図7 イミキモド誘発乾癬モデルマウスの皮膚組織におけるSTAT1の効果

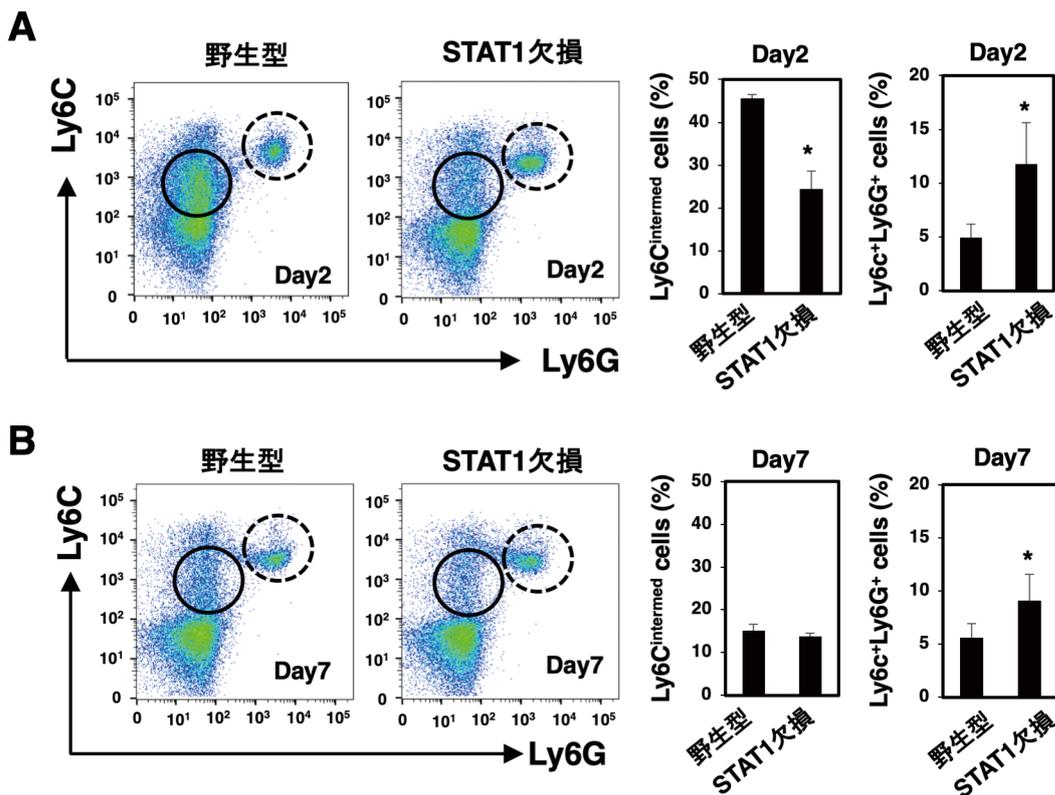


図8 イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のLy6C/Ly6G細胞におけるSTAT1の効果

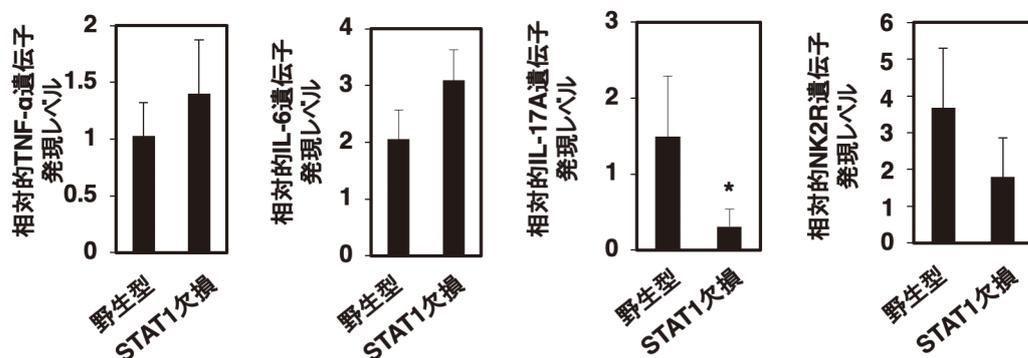


図9 イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のサイトカインおよびNK2R遺伝子発現におけるSTAT1の効果

4. 考察

乾癬は紅斑、丘疹、鱗屑、異常な角化を特徴とする難治性の慢性皮膚疾患であり、これまで、効果の高い抗炎症薬、副作用の少ないステロイド薬に加えて、TNF- α やIL-23、IL-17を標的とする治療薬も開発されている⁶⁻⁸⁾。最近、乾癬患者において、STAT1およびその下流標的、関連分子の発現レベルと病態との関連が報告され^{13,14)}、またヒト遺伝子発現プロファイルの解析においても、乾癬の病態とSTAT1との関連が示されている¹⁵⁾。

本研究のイミキモド誘発乾癬マウスモデルにおいて、STAT1が欠損した条件では、一過性に誘導されるLy6C

を中程度発現し、Ly6Gを発現しない単球系の細胞の割合がするとともに、IL-17産生レベルの低下、および乾癬の発症、病態の重篤化が軽減することを見出した。また我々はSTAT1が欠損した条件では、IFN- α/β あるいはIFN- γ 刺激による樹状細胞の活性化や抗原特異的T細胞の応答性が著しく減弱することも確認している(未投稿データ)。一般に乾癬の病態発症および重篤化の過程で、CD4陽性T細胞からTh1、Th17への分化が誘導され、Th1からIFN- γ 、Th17からIL-17、IL-22が産生されることが知られ、特にTh17と病態に関する報告が多くなされている¹⁶⁾。

本研究成果および先行研究による知見から、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、IFN-STAT1の活性化とそれ

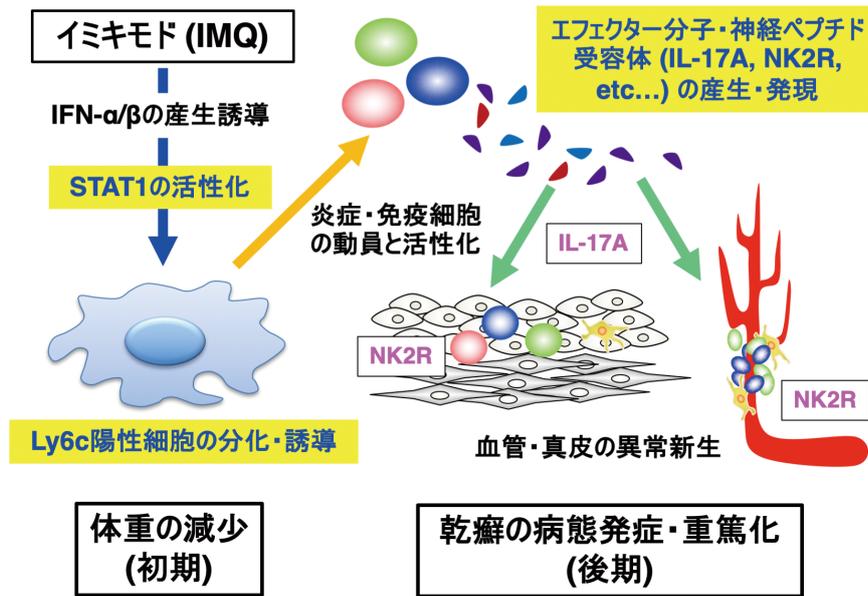


図10 イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態発症および重篤化におけるSTAT1-NK2R関与モデル

に引き続き炎症反応・免疫応答の過程で発現誘導されるIL-17とNK2Rを介した神経ペプチドシグナルが、皮膚疾患の発症および重篤化において関与することが考えられた(図10)。

これまで我々の研究グループは、ヒト単球由来樹状細胞についてIFN-α/βで刺激することによりニューロキニンA受容体NK2Rが発現誘導されるとともに、NK2Rに対する拮抗阻害薬がヒト樹状細胞に作用し、シラカバ花粉抗原特異的T細胞応答を有意に抑制することを見出した¹⁾。またマウス樹状細胞においてもIFN-γの刺激でSTAT1依存的にNK2Rが発現誘導されるとともに、IFN-γ誘発ステロイド抵抗性重篤化喘息モデルマウスに対してNK2R拮抗阻害薬を投与することで、病態の発症、重篤化が軽減されるデータを得ている^{2,3)}。また他の研究グループからも、*in vitro*細胞培養評価系およびイミキモド誘発乾癬モデル、あるいはヒト臨床検体を使用した臨床研究において、JAK-STAT1シグナル伝達経路の活性化とその阻害による病態の減弱効果が報告されている¹⁷⁻²²⁾。従って、今後、乾癬モデルの炎症・免疫担当細胞について詳細な解析を引き続き行い、IFN-STAT1依存的なNK2Rの発現制御メカニズムを解明するとともに、NK2Rを介した神経ペプチドシグナルによる病態の発症、重篤化への関与を検証することで、皮膚炎症領域における新たな予防・改善法や治療ターゲットの同定と創薬に繋ぐ科学的エビデンスが得られると考えられる。

5. 総括

本研究により、イミキモド誘発乾癬モデルにおいてSTAT1依存的な炎症・免疫応答の惹起と神経ペプチド受容体NK2Rの発現増強、およびそれらの病態の発症および重篤化への関与が示された。今後、STAT1依存的な神経ペプチドシグナルの制御は、新たな皮膚疾患の予防、改善法あるいは治療戦略の一つとして期待できる。

謝辞

本研究における乾癬モデルの構築および評価法について、信州大学農学部の中田沙智先生にご指導頂きました。また病態や免疫担当細胞の解析について、当教室大学院生の沈輝棟君に協力頂きました。最後に、本研究のご援助受け賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, Kishikawa T, Terada S, Sumida K, Masuko K, Ohno Y, Kita T, Iwabuchi S, Shinohara T, Tanino Y, Takemura T, Tanaka S, Kobayashi H, Kitamura H. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.*, 2015, 136, 1690-1694.

- 2) Kobayashi M, Ashino S, Shiohama Y, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T. IFN- γ elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. *Eur J Immunol.* 2012, 42, 393-402.
- 3) Kitamura H, Kobayashi M, Wakita D, Nishimura T. Neuropeptide signaling activates dendritic cell-mediated type 1 immune responses through neurokinin-2 receptor. *J Immunol.*, 2012, 188, 4200-4208.
- 4) Rosa P, Deborah P.M. S, Christopher E.M. G, Darren M. A. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol.* 2013, 133, 2, 377-385.
- 5) Boehncke WH, Schon MP. Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. PlumX Metrics, 2015, 386, 983-994.
- 6) Papp KA, Tying S, Lahfa M, Prinz J, Griffiths CEM, Nakanishi AM, Zitnik R, Van De Kerkhof PCM. A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *Br J Dermatol.* 2005, 152, 6, 1304-1312
- 7) Mark L, Bruce S, Alan M, Kenneth G, Jolanta W, Dr.Med., Lluís P, Kim P, Lynda S, Darryl T, Francisco K, April W. A, Georg S. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med.* 2015, 373, 1318-1328.
- 8) Kenneth BG, Andrew B, Kim AP, Richard GL, Thomas L, Mamitaro O, Kristian R, David A, Susan GB, Daniel KB, Gregory SC, Janelle E. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2016, 375, 345-356.
- 9) Wu, JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australas. J. Dermatol.* 2004, 45, 47-50.
- 10) Fujisawa H, Shivji G. M, Kondo S, Wang B, Tomai M. A, Miller R. L, Sauder D. N. Effect of a novel topical immunomodulator, S-28463, on keratinocyte cytokine gene expression and production. *J Interferon Cytokine Res.* 1996, 16, 555-559.
- 11) Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994, 13, 71-76.
- 12) Lowes, Bowcock MA, Krueger AM. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007, 445, 866-873.
- 13) Hald A, Andrés RM, Salskov-Iversen ML, Kjellerup RB, Iversen L, Johansen C. STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2013, 168, 302-310.
- 14) Grabarek B, Krzaczynski J, Strzałka-Mrozik B, Wcisło-Dziadecka D, Gola J. The influence of ustekinumab on expression of STAT1, STAT3, STAT4, SOCS2, and IL17 in patients with psoriasis and in a control. *Dermatol Ther.*, 2019, 32, e13029.
- 15) Zeng F, Liu H, Lu D, Liu Q, Chen H, Zheng F. Integrated analysis of gene expression profiles identifies transcription factors potentially involved in psoriasis pathogenesis. *J Cell Biochem.*, 2019, 120, 12582-12594.
- 16) Leslie F, Sabine M, Jane SAV, Marius K, Louis B, Jon DL, Ferry C, Anne-MM, Edwin F, Errol PP, Erik L. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J Immunol.* 2009, 182, 9, 5836-5845.
- 17) Qin X, Chen C, Zhang Y, Zhang L, Mei Y, Long X, Tan R, Liang W, Sun L. Acitretin modulates HaCaT cells proliferation through STAT1- and STAT3-dependent signaling. *Saudi Pharm J.*, 2017, 25, 620-624.
- 18) Li B, He S, Liu R, Huang L, Liu G, Wang R, Yang Z, Liu X, Leng Y, Liu D, Ye C, Li Y, Chen Y, Yin H, Fang W. Total glucosides of paeony attenuates animal psoriasis induced inflammatory response through inhibiting STAT1 and STAT3 phosphorylation. *J Ethnopharmacol.*, 2019, 243, 112121.
- 19) Morelli M, Scarponi C, Mercurio L, Facchiano F, Pallotta S, Madonna S, Girolomoni G, Albanesi C. Selective Immunomodulation of Inflammatory Pathways in Keratinocytes by the Janus Kinase (JAK) Inhibitor Tofacitinib: Implications for the Employment of JAK-Targeting Drugs in Psoriasis. *J Immunol Res.*, 2018, 2018, 7897263.
- 20) Li L, Zhang HY, Zhong XQ, Lu Y, Wei J, Li L, Chen H, Lu C, Han L. PSORI-CM02 formula alleviates imiquimod-induced psoriasis via affecting macrophage infiltration and polarization. *Life Sci.* 2020, 243, 117231.
- 21) Lin SH, Chuang HY, Ho JC, Lee CH, Hsiao CC. Treatment with TNF- α inhibitor rectifies M1 macrophage polarization from blood CD14+ monocytes in patients with psoriasis independent of STAT1 and IRF-1 activation. *J Dermatol Sci.*, 2018, 91, 276-284.
- 22) Clarysse K, Pfaff CM, Marquardt Y, Huth L, Kortekaas Krohn I, Kluwig DLüscher B, Gutermuth J, Baron J. JAK1/3 inhibition preserves epidermal morphology in full-thickness 3D skin models of atopic dermatitis and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 2019, 33, 367-375.