

T細胞のステムネスを標的とした、乾癬治療法の研究

慶應義塾大学医学部

竹馬 俊介

IL-17-producing helper T (Th17) cells are long-lived and serve as central effector cells in chronic autoimmune diseases. The underlying mechanisms of Th17 persistence remain unclear. We demonstrated that abatacept, a CD28 antagonist, effectively prevented the development of skin disease in a Th17-dependent experimental autoimmune dermatitis model. Abatacept selectively inhibited the emergence of IL-7R-negative effector-phenotype T cells while allowing the survival and proliferation of IL-7R+ memory-phenotype cells. The surviving IL-7R+ Th17 cells expressed genes associated with alcohol/aldehyde detoxification and showed potential to transdifferentiate into IL-7R-negative effector cells. Inhibiting aldehyde dehydrogenase reduced IL-7R+ Th17 cells in vivo, independently of CD28, and exhibited additive effects when combined with abatacept. Our findings suggest that CD28 blockade prevents inflammation without eliminating persistent memory cells. These remaining memory cells can be targeted by other drugs, such as aldehyde dehydrogenase inhibitors, to limit their survival, thereby facilitating the treatment of chronic autoimmune diseases.

1. 緒言

T細胞による免疫反応は、(1) 抗原特異性、(2) 対応する抗原の多様性、(3) 記憶能を備え、ウイルスや細菌に対する生体防御に必須である。一方、T細胞の強すぎる活性化は時に生命を脅かす自己免疫疾患の原因となる。自己免疫疾患は人口の5%が罹患すると言われ¹⁾、この病理を理解することは重要である。筆者は、T細胞の抑制レセプターであるCTLA-4やPD-1分子の解析から、免疫の第4の法則である、「寛容」と、その破綻の結果として起こる自己免疫疾患の発症機構をテーマとして研究を行っている。

慢性の皮膚角化疾患である乾癬は、自己反応性のIL-17産生型ヘルパーT細胞(Th17)によって起こり、患者に著しい「生活の質」の低下をもたらすばかりか再発を特徴とする難治性疾患である。近年の研究では、Th17は他のT細胞に比して生体内で長期間生存し、自己複製を行うという、幹細胞様の性質(ステムネス)を有するとされ²⁾、これが、治療抵抗性や再発の原因であると考えられている。しかしながらTh17細胞が本当にステムネスを持つのか、あるいは長期生存に関する他のメカニズムがあるのかは明らかになっていない。

本研究では、皮膚反応性Th17細胞の移入によって、マウスに乾癬に類似した慢性皮膚炎を起こす実験系を樹立し、移入したTh17細胞を追跡することで、Th17細胞の生存

機構を明らかにしようと試みた³⁾。

2. 方法

2.1. 実験的皮膚炎

高橋ら⁴⁾が樹立した、デスモグライン3反応性Dsg3H1 TCRトランスジェニックマウスをCD45.1コンジェニックマウスに交配した。このマウスのリンパ節よりマグネティックソーティングを用いて調整したT細胞を、抗CD3抗体、および抗CD28抗体によって刺激し、Th17誘導に用いるTGFβ(2ng/mL)、IL-6、(20ng/mL)、IL-23(20ng/mL)に加え、炎症性サイトカインであるIL-1β(10ng/mL)を添加することで誘導病原性Th17へと分化誘導させた。培養後6日後に回収した細胞を、同系野生型マウスであるC57BL/6Nに静脈注射した。その後、肉眼的な皮膚炎の発症を観察すると同時に、移入後2-3週間で病理組織解析、FACS解析に供した。一部の実験では、生体内での細胞分裂を評価するため、移入前のT細胞をCellTrace Violet溶液(Thermo Fisher)で標識した。

2.2. 病理組織解析

イソフルラン深麻酔により犠牲死させたマウスの耳介を、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。4μm厚の病理切片を作成し常法によってヘマトキシリン・エオジン染色を施した。キーエンスBZ-X800顕微鏡およびEVOS M5000顕微鏡によって撮像した。

2.3. 細胞分離とFACS解析

皮膚所属リンパ節細胞は、腋下、鼠径、腕頭、頸部リンパ節を、滅菌プラスチック注射筒のピストン部により機械的に破碎することで得た。表皮および真皮からの細胞分離に関して、マウス耳介をまずピンセットにより2層



Development of a Therapy for Psoriasis
Targeting Stemness of T-helper 17

Shunsuke Chikuma

Keio University School of Medicine

に剥離し、2.5g/l-Trypsin/1mmol/l-EDTA 溶液（ナカライテスク）内で30分酵素消化した後、表皮の分離を行った。軟骨を含む真皮層は、コラゲナーゼD (1.6mg/mL, Roche)、ヒアルロニダーゼ (1.2mg/mL, Wako) および Dnase I (0.1mg/mL, Roche) を添加したRPMI培地中で1時間酵素消化することによって得た。以上のようにして粗精製したリンパ節、表皮、真皮細胞を100 μ mセルストレーナでろ過し、Flexible Viability Dye eFlour 780 (Thermo Fisher) および蛍光標識抗体によって免疫染色した。この細胞をBD 社 FACS CANTOIIまたはBeckman Coulter 社 CytoFlex Sにて解析した。また、RNA シークエンス解析に供するT細胞はBD FACS ARIA3セルソーターにより分離した。

2. 4. 治療モデル

病原性Th17を移植したマウスに、アバタセプト (Bristol-Myers Squibb; 100-200 μ g/body) または同量のヒト免疫グロブリン (Jackson ImmunoResearch Lab) を、移植時、2日目、4日目の3回腹腔内注射した。また、ALDH阻害剤の投与実験では、アバタセプトに加えて、シアナミド (東京化成工業) を水溶液として移植後毎日経口投与 (80mg/kg 体重) した。シアナミドの対照マウスには滅菌水を投与した。

2. 5. RNA シークエンス解析

T細胞からのRNA抽出は、Qiagen RNeasy Plus Micro キットを用いて行った。イルミナNOVOSEQを用いてペアエンドリードにて6Gbp程度のデータを取得し、HISAT2, Samtools, およびFeatureCountを用いて、マウスゲノム参照配列GRCm38p4 (mm10) へマッピングしリードカウントを得た。データの正規化および発現変動遺伝

子の同定にはDESeq2を用いた。変動遺伝子に基づく生物学的解析には、Metascape (metascape.org) および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, www.gsea-msigdb.org) を用いた。

3. 結果

3. 1. Th17 依存性皮膚炎モデル

Th17 が体内で長期間生存し、自己免疫疾患を起こすモデルを確立し、このモデルを解析することを試みた。皮膚抗原を認識するDsg3H1 TCRマウスのT細胞を、*in vitro* で活性化させ、多種の炎症性サイトカインを加えることで、Th17へと分化誘導させた。このT細胞は、Th17細胞の特徴であるIL-17Aだけでなく、病原性Th17細胞に特徴的なIL17Fサイトカインや、IL-23レセプター、GM-CSFの産生も起こすことがわかり、高い病原性を持つTh17が誘導されたと考えられた。この病原性Th17を野生型マウスに移植したところ、2～3週間を経て非常に強く慢性的な（3か月以上）皮膚炎を発症することがわかった。このような皮膚炎は、Dsg3H1 TCR マウスをTh1に分化させ移植したマウスには全く起こらなかった。移植したT細胞に特異的に発現するCD45.1をマーカーとして用い、移入後2週間後のマウスを解析したところ、Th1誘導したT細胞が体内で消失する一方で、病原性Th17の移入では2次リンパ組織（リンパ節、脾臓）での長期の生存と、皮膚への浸潤を起こし、皮膚炎を発症した。以上の結果より、Th17 依存性の慢性皮膚炎モデルを樹立することができた (図1)。

3. 2. 実験的皮膚炎モデルは、CD28 阻害薬で完全に阻害される

アバタセプトは、T細胞の活性化を担うCD28シグナル



図1 Th17 依存性慢性皮膚炎モデル
A 当モデルの概略。 B マウスに起こる皮膚炎。

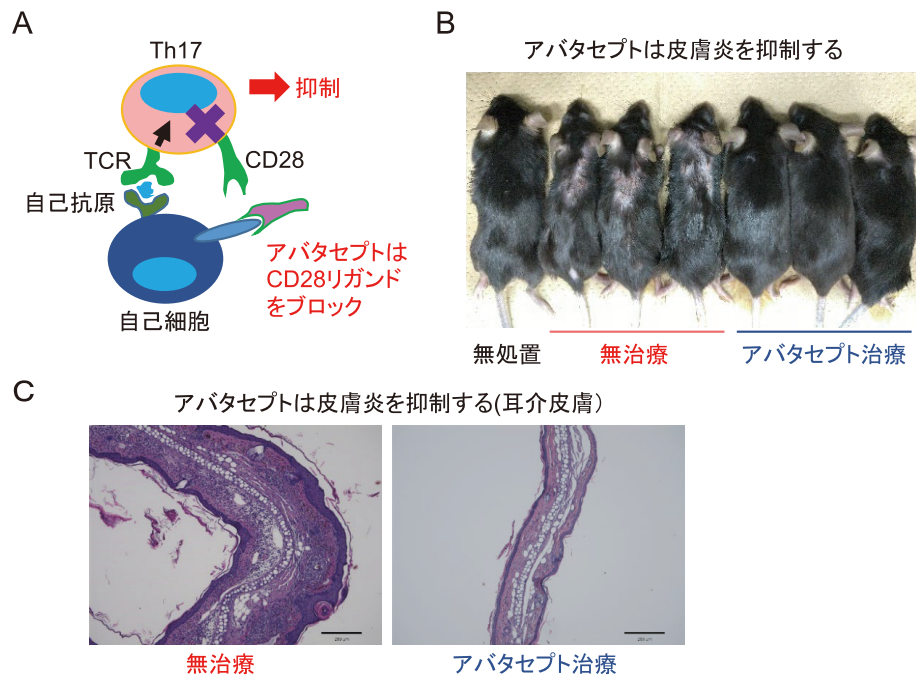


図2 Th17依存性皮膚炎におけるアバタセプトの効果

A アバタセプトの作動原理。自己免疫において、T細胞へ自己抗原を提示する自己細胞は同時に副刺激分子であるCD28のリガンド(CD80およびCD86)を発現する。アバタセプト(CTLA4-Ig)はこのリガンドに高親和性で結合し、CD28からのシグナルを阻害することで、T細胞を抑制する。BおよびC アバタセプトは、マウスに起こる肉眼的(B)組織学的な(C)皮膚炎を完全に抑制した。

を競合阻害する免疫抑制剤で、リウマチ性関節炎などの治療に用いられる。前項で樹立した皮膚炎モデルを免疫抑制剤であるアバタセプトにより治療できるかを検討した。病原性Th17を投与し、アバタセプト投与を行ったマウスでは、皮膚炎の発症が完全に抑制された(図2)。

3.3. CD28阻害薬は、Th17による炎症性反応を抑制する

CD28刺激は、ナイーブT細胞の活性化時に必要であるとされる一方で、すでに分化したTh17における機能は不明であった。そこで、分化させたTh17をCD28で刺激し、遺伝子発現の変化を調べた。CD28で刺激した細胞には、組織炎症に関わる多種の遺伝子が、わずか2時間で誘導され、CD28が炎症反応に重要であることがわかった(図3)。そこで、アバタセプト治療群のマウスにおいて、炎症性サイトカインの発現を調べたところ、これらのマウスでは無治療群に比して、自己を攻撃する炎症性サイトカインが大幅に抑制されていることがわかった。

3.4. CD28阻害によって治療したマウスにはTh17の一部が残存する

治療により皮膚炎を発症しなかったマウスで、移植したTh17が完全に消失したのかをFACSにより解析した。意

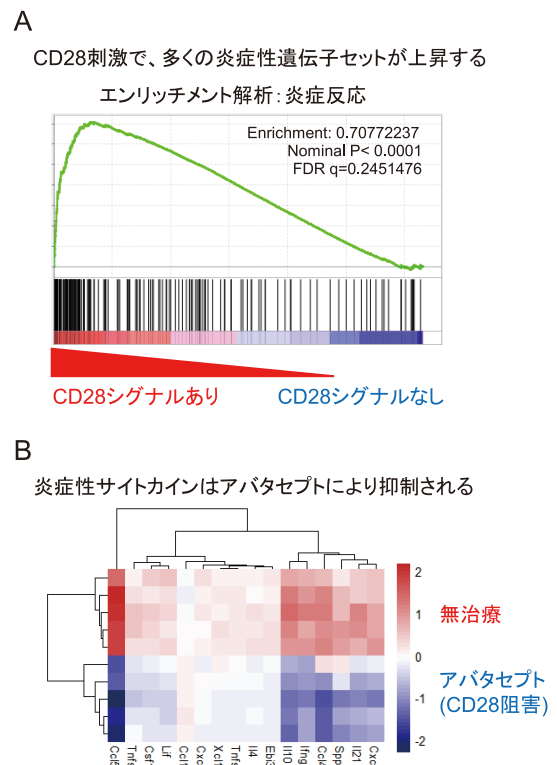


図3 アバタセプトによる炎症抑制効果

A CD28はin vitroで炎症性遺伝子の発現を強力に刺激する。B アバタセプトによって皮膚炎発症抑制されたマウスでは、多くの炎症性遺伝子が抑制される。

外なことに、一部のTh17が生存し、分裂していることがわかった。このような細胞は記憶性（メモリー）T細胞の特徴であるIL-7レセプターを発現し、リンパ節や脾臓といった、リンパ組織に残存していることがわかった（図4）。この、メモリー様Th17細胞を体内から回収し、あらたなマウスに移植すると、この細胞から、また炎症性サイトカインを出すTh17細胞が産生されることがわかった。つまりこの細胞は、免疫抑制治療を行っても体内に潜伏し、疾患の再発に貢献する細胞であることが考えられた。

3. 5. 治療後生存したTh17は、アルデヒド脱水素酵素を発現し、この阻害剤で除去できる

IL-7レセプター陽性細胞が、幹細胞のようにふるまうことから、この細胞を体内から除去できれば自己免疫疾患の完治を目指せると考えた。メモリー様Th17細胞と、炎症性Th17細胞を体内より分離し、発現遺伝子を詳細に比較した。前者の細胞は、アルコール代謝に関わる酵素群、特に、いくつかのアルデヒド脱水素酵素（ALDH）遺伝子を発現していた（図5）。ALDHは、がん細胞や造血幹細胞

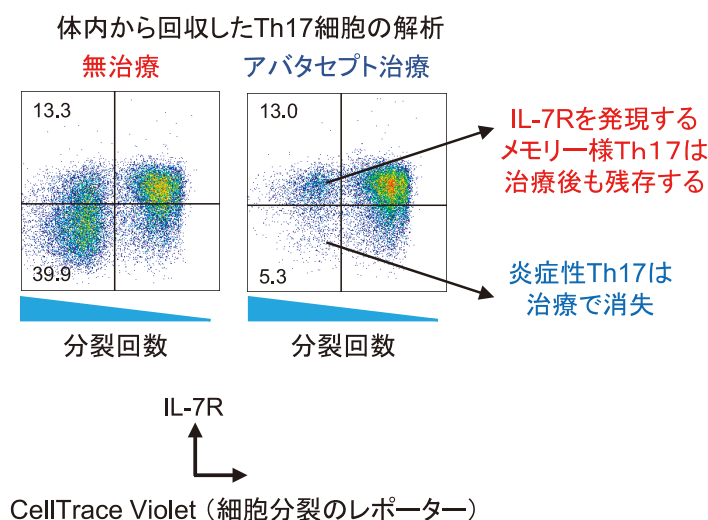


図4 アバタセプトは、メモリー様Th17は抑制しない

A 無治療およびアバタセプト治療群のマウスより、リンパ節細胞を調整しFACS解析した。多く分裂し、CellTrace Violetを低発現した細胞にはIL-7R陽性および陰性細胞が観察され、治療群ではIL-7R陰性の細胞が顕著に減少している一方、IL-7R陽性細胞はほとんど影響を受けず体内に残存していることがわかった。

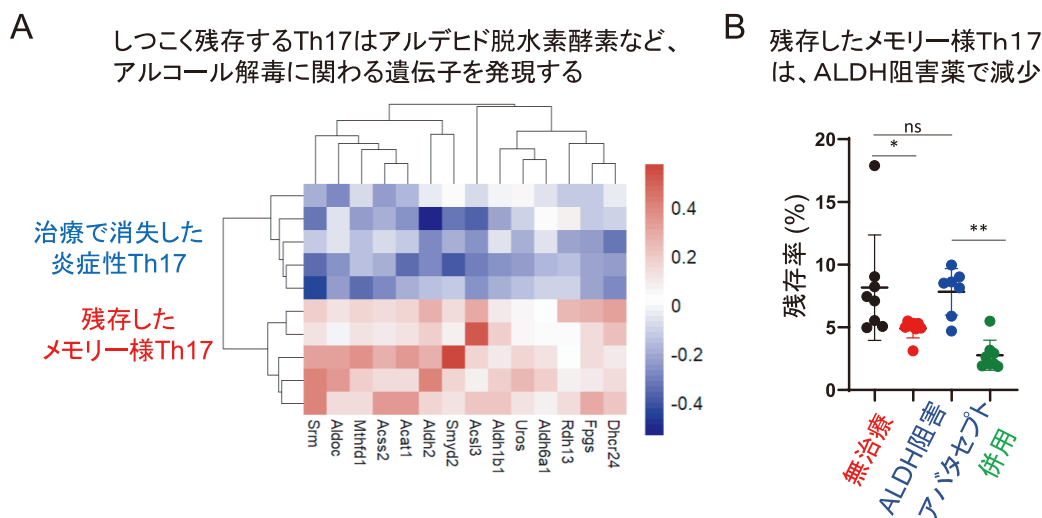


図5 残存するTh17は、アルデヒド脱水素酵素阻害剤で減少する

A 無治療およびアバタセプト治療群のマウスより、CD4陽性T細胞を調整しRNAシーケンス解析に供した。治療群に多く発現する遺伝子より、代謝関連酵素を抽出すると、いくつかのアルデヒド脱水素酵素（ALDH）を含む、アルコール代謝に関わる遺伝子が多数見出された。B ALDH阻害薬であるシアナミドを、Th17依存性皮膚炎モデルに適用したところ、アバタセプトでは阻害できなかったIL-7R陽性のメモリー細胞の生存阻害することがわかった。

の生存と深く関わっていることが知られている。IL-7レセプター陽性細胞が、ALDHを発現することから、ALDH阻害薬によってこの細胞を阻害できるのではないかと考え、古典的なALDH阻害薬であるシアナミドを皮膚炎モデルに適用した。結果として、シアナミドを投与したマウスでは、体内に残存するIL-7レセプター陽性細胞の数が優位に減少すること、この治療は、アバタセプトと相加的に、Th17の活性化と生存を抑制することがわかった。以上の実験より、Th17のうち、体内で長期生存するものはALDH阻害剤で除去できることが示された。

4. 考察とまとめ

近年、自己免疫疾患には、抗サイトカイン療法やT細胞をターゲットとする治療が行われるが、治療不応答や再発が問題となる。本研究で樹立した皮膚炎モデルは、多くの自己免疫疾患の中心とされるTh17細胞が、体内で長期的（数か月）の単位で生存し慢性皮膚炎を起こすという新規のモデルであり、自己免疫疾患の治療法探索には最適であると考えられる。

まず、CD28阻害薬であるアバタセプト治療後にマウスのリンパ組織を解析することで、Th17細胞には異なる性質を有する少なくとも2種の細胞があることを見出した。一つは、IL-17、TNF、GM-CSFといった炎症性サイトカインを放出し、自己組織を攻撃し皮膚炎の発症に寄与するが、アバタセプト治療によってほぼ完全に抑制された。一方で、炎症性サイトカインは放出しないものの、アバタセプトに全く影響を受けず分裂し、再び炎症性細胞に分化する能力を持つメモリー様Th17細胞が存在することがわかった。Th17は、長期生存し炎症細胞を産生する「幹細胞様の性質（ステムネス）」を持つと言われるが、メモリー様Th17細胞が体内で残存し、炎症細胞を生み出すという、まさに幹細胞様の性質を示すことが明らかになった（図6）。

さらに、アバタセプト抵抗性のメモリー様Th17細胞がALDH遺伝子を発現し、この阻害薬で生存抑制できることを示した。シアナミドは、飲酒時に服用すると肝臓のALDHを阻害することで、二日酔いの症状を増強するため、アルコール依存症の患者が飲酒習慣から脱却するための「嫌酒薬」として数十年の古くから用いられる。本研究では、

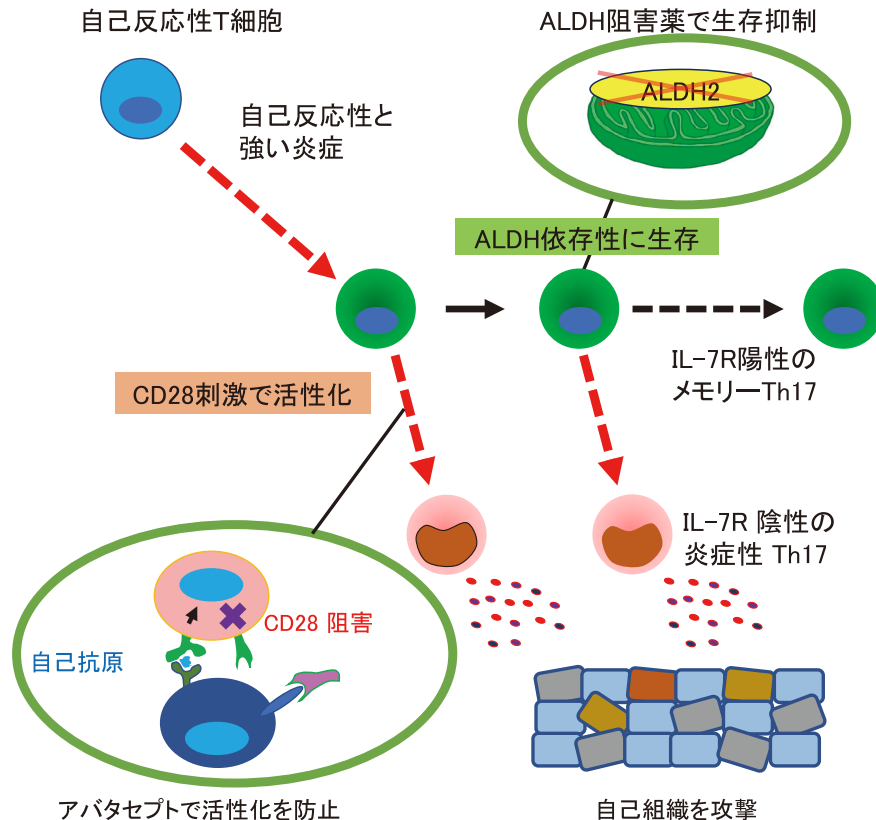


図6 本研究のまとめ

自己反応性Th17の中にはCD28依存性に活性化する炎症性Th17と、CD28に依存せず生存するメモリー様Th17があることがわかった。さらに後者の細胞は、ALDH依存性に生存すること、この阻害薬で生存抑制をできることが明らかになった。

シアナミドがTh17に作用してこの生存を阻害するという意外な効果を見出した。ALDH阻害薬は健常な組織にも毒性を持つため、直ちに免疫治療薬として臨床応用することは難しいと考えられる。しかしながら今後、免疫抑制剤治療に抵抗性のメモリー様Th17細胞をさらに深く調べる事で、ALDHに準ずる弱点を見つけ制御することができれば自己免疫疾患の根治につなげることができると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたって、多くの実験を補助していただいた慶應医学部微生物学免疫学教室技術員 時藤夕紀子さん、修士課程学生の早瀬帆高さん、RNAシーケンスのデータ解析をご指導いただいた慶應医学部百寿総合センター 佐々木貴史先生、マウスをご提供いただきました慶應医学部皮膚科学教室 天谷雅行先生および高橋勇人先生、実験の遂行および論文執筆にあたり多くの助言や討論をいただいた、慶應医学部薬理学教室 竹馬真理子先生および京都大学 廣田圭司先生に深く感謝いたします。最後に、研究の場を与えていただいた吉村昭彦教授には、いつも暖かく細やかなご指導をいただき深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Hayter, SM, Cook, MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 11, 754-765, 2012.
- 2) Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ, Roychoudhuri R, Ferreyra GA, Shen W, Durum SK, Feigenbaum L, Palmer DC, Antony PA, Chan CC, Laurence A, Danner RL, Gattinoni L, Restifo NP. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 35: 972-85, 2011.
- 3) Tokifuji Y, Hayabuchi H, Sasaki T, Hara-Chikuma M, Hirota K, Takahashi H, Amagai M, Yoshimura A, Chikuma S. Targeting abatacept-resistant T-helper-17 cells by aldehyde dehydrogenase inhibition. *iScience* 27, 108646, 2024.
- 4) Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest*. 121: 3677-88, 2011.