

称号及び氏名	博士（獣医学）	天野 渉
学位授与の日付	平成30年2月28日	
論文名	A study of mechanism of action of the JAK inhibitor JTE-052 on Atopic Dermatitis (JAK 阻害薬 JTE-052 のアトピー性皮膚炎に対する作用メカニズムに関する研究)	
論文審査委員	主査	竹内 正吉
	副査	笹井 和美
	副査	小森 雅之
	副査	中嶋 秀満

論文要旨

【序章】

アトピー性皮膚炎（**Atopic Dermatitis, AD**）は、皮膚バリア機能異常，慢性に経過する免疫炎症応答と掻痒を特徴とする炎症性皮膚疾患である。**AD** の発症には遺伝的背景と環境因子が関与すると考えられているが，詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。多くの **AD** 患者では過剰な **Th2** 型の免疫応答，高濃度の血清中 **IgE** の産生および皮膚バリア機能の低下が認められる。

AD における過剰な **Th2** 型の免疫応答にはサイトカインによって活性化される **Janus Kinase(JAK)-signal transducers and activators of transcription(STAT)** 経路が重要な役割を演じることが報告されている。また，**Th2** 型サイトカインの 1 種である **Interleukin(IL)-4** は表皮細胞にも作用し，**JAK-STAT** 経路を介して皮膚バリア関連因子発現の抑制に関与し，さらに **Th2** 型サイトカインである **IL-31** は **AD** 患者の掻痒に関与することが報告されている。これらの知見から，様々な因子が絡み合った **AD** の病態において，サイトカイン-**JAK-STAT** シグナルは中心的な役割を演じていると推察される。

JAK はチロシンキナーゼの 1 種であり，**JAK** ファミリー蛋白には **JAK1**，**JAK2**，**JAK3** および **Tyk2** の 4 つが存在する。多くのサイトカインは細胞表面のサイトカイン受容体に結合し，下流の **JAK-STAT** 経路の活性化を介してその

生理作用を発現させる。**JTE-052** は、**JAK1**, **JAK2**, **JAK3** および **Tyk2** 酵素活性に対してそれぞれ **IC₅₀** 値 **2.8**, **2.6**, **13** および **58 nM** の阻害活性を示す新規 **JAK** 阻害薬である。**JTE-052** は **IL-2**, **IL-6**, **IL-23**, **granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)** および **interferon (IFN)-α** といった様々なサイトカインシグナルを抑制することから、**AD** において新たな治療薬となることが期待される。一方で、多様なサイトカインシグナルを抑制する **JAK** 阻害薬の病態における作用メカニズムは不明な点が多い。そこで、**AD** 病態における **JAK** 阻害薬 **JTE-052** の作用メカニズムを明らかにすることを目的として、第 1 章ではマウス接触皮膚炎 (**Contact Hypersensitivity; CHS**) モデルを用いた **JTE-052** の皮膚免疫応答に対する作用について、また、第 2 章では表皮細胞 (ケラチノサイト) 及びマウス **AD** 病態モデルを用いた **JTE-052** の皮膚バリア機能への作用について研究を行った。

【第 1 章 : **JAK** 阻害薬 **JTE-052** は **T** 細胞の活性化と分化を抑制的に調整することにより接触型過敏症を調節する】

アレルギー性接触皮膚炎 (**Allergic contact dermatitis ; ACD**) は、ケラチノサイトの刺激により引き起こされる刺激性皮膚炎 (**Irritant contact dermatitis ; ICD**) とは異なり、抗原に対する獲得免疫応答による炎症が特徴である。**ACD** の発症には①感作相と②惹起相の 2 つの段階があると考えられている。①感作相において、抗原提示細胞である樹状細胞 (**Dendritic cells ; DC**) が皮膚表面を通過した抗原を捕獲した後、所属リンパ節 (**draining Lymph Node ; dLN**) に遊走し、抗原情報をナイーブ **T** 細胞に伝え (抗原提示)、抗原特異的なメモリー**T** 細胞を誘導する。②感作が成立した個体に再び同じ抗原が接触することによって惹起相が開始され、局所に遊走した抗原特異的なメモリー**T** 細胞が **DC** により再度抗原提示を受けてサイトカインを放出することにより、皮膚炎症が引き起こされる。**ACD** では主に **CD4** 陽性の **I** 型ヘルパー**T** 細胞 (**Th1**) 及び **CD8** 陽性の細胞障害性 **T** 細胞 (**Tc1**) とそれらの細胞から産生されるインターフェロン (**IFN**)- γ が重要であると考えられている。**JAK** 阻害薬は、**ACD** の病態モデルとして用いられているマウス **CHS** モデルにおいて抗炎症作用を示すことが報告されているが、その標的細胞や抗炎症作用メカニズムは不明である。そこで第 1 章では **JTE-052** の **CHS** モデルに対する作用メカニズムを検討した。

まず、マウス **CHS** モデルに対する **JTE-052** の有効性を検証した。**CHS** モデルは **dinitrofluorobenzene (DNFB)** をマウス腹部に塗布 (感作) し、感作が成立した 5 日後に耳介に **DNFB** を塗布 (惹起) することにより作成した。**JTE-052** は、感作相-惹起相を通して 1 日 1 回経口投与することにより **CHS** による耳介腫脹を抑制した。一方で **JTE-052** は、クロトンオイルによって引き起こされる **ICD** に対しては効果を示さなかった。さらに抗原を認識した **DC** の **dLN** への移行についてフローサイトメトリーを用いて解析した結果、**JTE-052** は **DC** の移行に作用を示さないことが明らかとなった。そこで、**DC** 移行後の抗原提示によ

る T 細胞の活性化に対する作用を検討したところ、**JTE-052** は *in vitro* において、抗原提示刺激による **dLN** 細胞の増殖と **IFN γ** を含む T 細胞に由来するサイトカインの産生の増加を濃度依存的に抑制した。また、感作相の期間にのみ **JTE-052** を投与したマウスでは、耳介腫脹の抑制傾向と耳介に浸潤したメモリー T 細胞数の減少が認められた。

次に惹起相における **JTE-052** の作用を検討した。**JTE-052** を惹起相にのみ投与した結果、**CHS** 耳介腫脹および耳介 **IFN γ mRNA** の発現は有意に減少した。メモリー T 細胞の惹起局所への移行に対する作用を検討したところ、**JTE-052** は T 細胞の移行に対して抑制作用は示さず、耳介腫脹を抑制した。以上の結果から、**JTE-052** は **CHS** において **dLN** または局所における抗原刺激によるメモリー T 細胞の増殖・活性化を抑制することにより、それに続く皮膚炎症を抑制することが示唆された。

【第 2 章 : **JAK** 阻害薬 **JTE-052** は **STAT3** シグナルの抑制を介して皮膚バリア機能を回復する】

皮膚、特に表皮は外界に面する生体防御の最前線であり、水分の喪失や外来異物による物理化学的な刺激からの防御といったバリア機能を有する。多くの **AD** 患者では皮膚の乾燥とバリア機能の破綻が認められる。2006 年に、ケラチノサイトに発現するフィラグリン (**FLG**) 遺伝子の変異と **AD** 有病率に相関関係があることが報告された。この知見は、皮膚における **FLG** 機能の重要性だけでなく、バリア機能の破たんが **AD** の発症を引き起こすことを示唆する重要な報告であり、以来、**FLG** はバリア機能と **AD** の発症に関わる重要因子として注目を浴びている。**FLG** は表皮顆粒細胞において産生され、ケラチン線維を凝集させることにより、皮膚バリア機能に最も重要な角層の形成に働く。さらに角層の外層部では **FLG** の分解産物であるアミノ酸とその誘導体が天然保湿因子 (**natural moisturizing factor; NMF**) として角層の水分量と **pH** の維持に働く。

FLG 遺伝子変異を有さない **AD** 患者でも **FLG** や **NMF** 量が減少していることが報告されており、多くの **AD** 患者の病態に **FLG** が関与していると考えられる。2008 年に、培養表皮細胞における **FLG** の発現が **Th2** 型のサイトカインである **IL-4** 及び **IL-13** (**IL-4/IL-13**) 存在下で減少することが報告されたことから、**AD** 皮膚では **Th2** 型サイトカインがケラチノサイトに直接作用した結果、**FLG** やその分解産物である **NMF** 産生が低下していることが示唆されている。このようにサイトカインが皮膚バリア機能に影響を与えることが示唆されている一方で、これまで **JAK** 阻害薬の表皮に対する作用は検討されておらず、バリア機能への効果は不明である。そこで、**JTE-052** の皮膚バリア機能への作用を検討した。

まず、**IL-4/IL-13** の 3 次元培養角化細胞に対する影響について、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。既報のデータと同様に、**IL-4/IL-13** 存在下では **FLG** などのバリア関連遺伝子の低下が認められ、**CCL26** などの炎症関連遺伝子の増加が認められた。これら遺伝子変動は **JTE-052** 存在下で消失し、ウエ

スタンブロットティング法を用いた検討から、**JTE-052** は **IL-4/IL-13** により低下した **FLG** タンパク産生を促進することが示された。サイトカインシグナル伝達について解析を実施した結果、**IL-4/IL-13** 存在下では **STAT3** と **STAT6** のリン酸化が認められ、**JTE-052** 存在下ではこれらのリン酸化は消失した。**SiRNA** 法を用いて **STAT3** または **STAT6** をノックダウンした結果、**IL-4/IL-13** による **FLG** の発現抑制には **STAT3** シグナルが関与することが明らかとなり、一方で **STAT6** は **CCL26** の発現促進に関与することが明らかになった。

次に、*in vivo* における **JTE-052** の皮膚バリア機能に対する効果を検討した。**AD** 様症状を自然発症した **NC/Nga** マウスに **JTE-052** を 1 日 1 回 28 日間塗布した結果、皮膚症状の改善が認められた。**JTE-052** を塗布したマウスでは皮膚バリア機能の指標として用いられる経皮水分蒸散量 (**TEWL**) の改善が認められ、**FLG** タンパクの増加が認められた。また、ラマン分光光度計を用いた解析から、**JTE-052** 塗布群では **NMF** が回復していることが明らかになった。また、免疫細胞の関与が少ないとされるドライスキンマウスモデルにおいても **JTE-052** 塗布により **TEWL** の改善、**FLG** の増加と **NMF** の増加が認められた。さらに **JTE-052** は、免疫不全マウスに移植したヒト皮膚組織においても **FLG** 産生と **NMF** 量を増加させることが示された。これらの結果から、**JTE-052** はケラチノサイトに直接作用して、**STAT3** のリン酸化を抑制することにより低下した **FLG** や **NMF** の産生を促進し、低下した皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。

【総括】

ステロイド外用による炎症のコントロールと保湿剤を用いた皮膚バリア機能の保持は、**AD** 治療戦略の基本である。一方で **AD** の根本的な治療法は未だに確立されていない。本研究から、**JAK** 阻害薬 **JTE-052** は、**T** 細胞活性化の抑制による炎症鎮静効果とバリア関連分子産生の促進によるバリア機能改善効果という 2 つの作用メカニズムを有することが明らかとなった。新規メカニズムに基づいた新たな **AD** 治療薬の誕生は、患者への治療オプションを提供し、患者への長期治療介入による薬剤の副作用リスクや精神的な負担を軽減させる効果が期待される。

さらに、皮膚バリア機能を改善する薬剤の出現は **AD** の治療戦略において重要な意味を持つと考えられる。**AD** 患者の治療には保湿剤を用いたバリア機能の保持が必須であり、現時点において皮膚本来のバリア機能を取り戻す治療法はない。**2014** 年に、保湿剤による皮膚バリア機能保持が乳幼児における **AD** の発症率を低下させることが報告された。これらの知見は、①皮膚バリア機能の低下が **AD** 発症の原因となっていること、②皮膚バリア機能の改善誘導は **AD** 病態改善に有効である可能性を示している。本研究における新たな知見は、患者に薬剤の新規作用メカニズムに基づく治療オプションの選択を提供することにとどまらず、将来的にはバリア機能改善効果に基づく病態の根治、**AD** に続いて

発症する喘息などのアレルギーマーチの予防、リスクを有する個人の発症そのものを抑制する予防法の創出へと広がっていくことが期待される。

審査結果の要旨

アトピー性皮膚炎 (**Atopic Dermatitis; AD**) は、皮膚バリア機能異常、慢性に経過する免疫炎症応答と掻痒を特徴とする炎症性皮膚疾患である。**AD** の発症には遺伝的背景と環境因子が関与すると考えられているが、詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。

AD では過剰な **Th2** 型の免疫応答が認められるが、それにはサイトカインによって活性化される **Janus Kinase(JAK)-signal transducers and activators of transcription(STAT)** 経路が重要な役割を演じることが報告されている。これらの知見から、様々な因子が絡み合った **AD** の病態において、サイトカイン-**JAK-STAT** シグナルが中心的な役割を演じていると推察される。**JAK** はチロシンキナーゼの **1** 種であり、**JAK** ファミリー蛋白には **JAK1, JAK2, JAK3** および **Tyk2** の **4** つが存在する。多くのサイトカインは細胞表面のサイトカイン受容体に結合し、下流の **JAK-STAT** 経路の活性化を介してその生理作用を発現させる。**JTE-052** は、**JAK1, JAK2, JAK3** および **Tyk2** 酵素活性に対してそれぞれ **IC₅₀** 値 **2.8, 2.6, 13** および **58 nM** の阻害活性を示す新規 **JAK** 阻害薬であり、様々なサイトカインシグナルを抑制することから、**AD** において新たな治療薬となることが期待されている。一方で、多様なサイトカインシグナルを抑制する **JAK** 阻害薬の病態における作用メカニズムは不明な点が多い。そこで、**AD** 病態における **JAK** 阻害薬 **JTE-052** の作用メカニズムを明らかにすることを目的として、第 **1** 章ではマウス接触皮膚炎 (**Contact Hypersensitivity; CHS**) モデルを用いた **JTE-052** の皮膚免疫応答に対する作用について、また、第 **2** 章では表皮細胞 (ケラチノサイト) 及びマウス **AD** 病態モデルを用いた **JTE-052** の皮膚バリア機能への作用について研究を行っている。

第 **1** 章では、マウス **CHS** モデルに対する **JTE-052** の有効性を検証した。**CHS** モデルは **dinitrofluorobenzene (DNFB)** をマウス腹部に塗布 (感作) し、感作が成立した **5** 日後に耳介に **DNFB** を塗布 (惹起) することにより作製した。**JTE-052** は、感作相-惹起相を通して **1** 日 **1** 回経口投与することにより **CHS** による耳介腫脹を抑制した。一方で **JTE-052** は、クロトンオイルによって引き起こされる **ICD** に対しては効果を示さなかった。さらに抗原を認識した樹状細胞 (**Dendritic cells ; DC**) の **dLN** への移行についてフローサイトメトリーを用いて解析した結果、**JTE-052** は **DC** の移行に作用を示さないことが明らかとなった。そこで、**DC** 移行後の抗原提示による **T** 細胞の活性化に対する作用を検討

したところ、**JTE-052** は *in vitro* において、抗原提示刺激による所属リンパ節（draining Lymph Node ; dLN）細胞の増殖と $\text{IFN}\gamma$ を含む T 細胞に由来するサイトカインの産生の増加を濃度依存的に抑制した。また、感作相の期間にのみ **JTE-052** を投与したマウスでは、耳介腫脹の抑制傾向と耳介に浸潤したメモリー T 細胞数の減少が認められた。次に惹起相における **JTE-052** の作用を検討した。**JTE-052** を惹起相にのみ投与した結果、**CHS** 耳介腫脹および耳介 $\text{IFN}\gamma$ mRNA の発現は有意に減少した。メモリー T 細胞の惹起局所への移行に対する作用を検討したところ、**JTE-052** は T 細胞の移行に対して抑制作用は示さず、耳介腫脹を抑制した。以上の結果から、**JTE-052** は **CHS** において dLN または局所における抗原刺激によるメモリー T 細胞の増殖・活性化を抑制することにより、それに続く皮膚炎症を抑制することを示唆している。

第 2 章では、**JTE-052** の皮膚バリア機能への作用を検討した。**IL-4/IL-13** の 3 次元培養角化細胞に対する影響について、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。**IL-4/IL-13** 存在下ではフィラグリン (**FLG**) などのバリア関連遺伝子の低下が認められ、**CCL26** などの炎症関連遺伝子の増加が認められた。これら遺伝子変動は **JTE-052** 存在下で消失し、ウエスタンブロッティング法を用いた検討から、**JTE-052** は **IL-4/IL-13** により低下した **FLG** タンパク産生を促進することが示された。サイトカインシグナル伝達について解析を実施した結果、**IL-4/IL-13** 存在下では **STAT3** と **STAT6** のリン酸化が認められ、**JTE-052** 存在下ではこれらのリン酸化は消失した。**SiRNA** 法を用いて **STAT3** または **STAT6** をノックダウンした結果、**IL-4/IL-13** による **FLG** の発現抑制には **STAT3** シグナルが関与することが明らかとなり、一方で **STAT6** は **CCL26** の発現促進に関与することが明らかになった。次に、*in vivo* における **JTE-052** の皮膚バリア機能に対する効果を検討した。**AD** 様症状を自然発症した **NC/Nga** マウスに **JTE-052** を 1 日 1 回 28 日間塗布した結果、皮膚症状の改善が認められた。**JTE-052** を塗布したマウスでは皮膚バリア機能の指標として用いられる経皮水分蒸散量 (**TEWL**) の改善が認められ、**FLG** タンパクの増加が認められた。また、ラマン分光光度計を用いた解析から、**JTE-052** 塗布群では天然保湿因子 (**natural moisturizing factor; NMF**) が回復していることが明らかになった。また、免疫細胞の関与が少ないとされるドライスキンマウスモデルにおいても **JTE-052** 塗布により **TEWL** の改善、**FLG** の増加と **NMF** の増加が認められた。さらに **JTE-052** は、免疫不全マウスに移植したヒト皮膚組織においても **FLG** 産生と **NMF** 量を増加させることが示された。これらの結果から、**JTE-052** はケラチノサイトに直接作用して、**STAT3** のリン酸化を抑制することにより低下した **FLG** や **NMF** の産生を促進し、低下した皮膚バリア機能を改善する可能性を示している。

今回の研究結果から、**JAK** 阻害薬 **JTE-052** は、T 細胞活性化の抑制による炎症鎮静効果とバリア関連分子産生の促進によるバリア機能改善効果という 2 つの新規作用メカニズムを有することを明らかにしている。さらに、①皮膚バリア機能の低下が **AD** 発症の原因となっていること、②皮膚バリア機能の改善誘

導は **AD** 病態改善に有効である可能性を示唆した。

本研究におけるこれら新たな知見は、**AD** 患者に薬剤の新規作用メカニズムに基づく治療オプションの選択を提供することにとどまらず、将来的にはバリア機能改善効果に基づく病態の根治、**AD** に続いて発症する喘息などのアレルギーマーチの予防、リスクを有する個人の発症そのものを抑制する予防法の創出へと広がっていくことが期待される。これらの研究成果は、医学および獣医学における皮膚疾患研究の新たな展開と治療戦略を示したものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。