

氏 名 ちょう げつ
張 珮

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 377 号

学位授与年月日 令和 3 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 **Effects of targeting inhibitors of plasmacytoid dendritic cell migration
in immune diseases**
(特異的形質細胞様樹状細胞遊走抑制剤の免疫疾患に対する治療効果)

論文審査委員

(主査) 教授 宗 孝紀

(副査) 教授 櫻井 宏明

(副査) 教授 小泉 桂一 (指導教員)

Effects of targeting inhibitors of plasmacytoid dendritic cell migration in immune diseases

課程・専攻名 博士後期課程・薬科学専攻

氏 名： 張 玥 (ZHANG YUE)

(本文)

Trafficking of dendritic cells (DCs) *in vivo* is essential in maintaining immunological homeostasis by orchestrating innate and adaptive immune responses. DCs respond to foreign substances and activate immunocytes such as T cells and B cells via migration to inflamed sites and lymph nodes (LNs). DCs are mainly divided into 2 subtypes: conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). pDCs rarely exist in peripheral tissues in the normal state but accumulate in infected sites and rapidly secrete massive amounts of type 1 IFN once viral infection occurs. Chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19) and chemokine (C-C motif) ligand 21 (CCL21), as ligands of C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) expressed on mature pDCs guide pDCs into the LNs.

Migration of pDCs towards LNs is involved in the pathogenesis of many immune diseases via interaction with other immunocytes. Infiltration of pDCs has been found in the skin of systemic sclerosis patients. Depletion of B220⁺ PDCA-1⁺ pDCs reduces skin thickness in a skin fibrosis model. In addition, increase of pDCs has been found in inflamed sites in patients with contact dermatitis and atopic dermatitis. Accordingly, pDCs are required for the pathogenic mechanism and defense mechanism of skin disorders, such as atopic dermatitis.

Furthermore, pDCs reportedly play a pivotal role in the onset of inflammatory bowel disease (IBD). A large number of pDCs infiltrate in the colonic mucosa of IBD patients. pDCs are increased in the inflamed colon of ulcerative colitis (UC) patient and Crohn's disease patients. Also, it is reported that pDCs are decreased in the peripheral blood of UC patients. The population of pDCs is increased in the mouse colon in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model, and the depletion of pDCs suppresses the inflammation in the colon of DSS-induced colitis mice. On the contrary, the depletion of pDCs aggravates severe colitis in a *Citrobacter rodentium*-induced colitis model by impairing gut barrier functions. Thus, pDCs are considered to play various roles in the pathology of many inflammatory diseases, while the roles of pDCs remain

unclear.

To the best of our knowledge, few agents have been found to effectively and potently regulate pDC functions, especially pDC migration. Therefore, we utilized traditional Japanese herbal medicines as a resource for drug discovery. Traditional Japanese herbal medicines have been widely used for various immune diseases, such as rheumatoid arthritis and IBD. Kampo formulas or compounds in natural medicines have been used in the study of inflammatory diseases. Our study focused on the pDC migration in allergic dermatitis model and DSS-induced colitis model. Furthermore, Kampo formulas and compounds in natural medicines were used in the disease models to elucidate the effect and role of inhibition of pDC migration in inflammatory diseases.

1. Therapeutic benefit in allergic dermatitis derived from the inhibitory effect of byakkokaninjinto on the migration of plasmacytoid dendritic cells [1]

pDCs have been reportedly related to inflammatory skin disorders for the increase and accumulation in inflamed sites in patients with contact dermatitis. Even pDCs are increased in the lesional skin of atopic dermatitis patients. Similarly, pDCs also infiltrate in the skin of systemic sclerosis patients and meanwhile, depletion of pDCs reduces skin thickness in a skin fibrosis model.

CCR7-driven migration of pDCs to the lymph nodes is considered play a pivotal role in pathogenesis of immune diseases via activating T cells or B cells. Therefore, our study focused on the inhibition of pDC migration. We screened 86 kinds of Kampo formulas and examined that byakkokaninjinto was the inhibitor of pDC migration by reducing the number of migrated bone marrow-derived pDCs (BMpDCs) and suppressing the velocity and directionality of BMpDC migration in a chemotaxis assay. Furthermore, *Gypsum Fibrosum* and *Ginseng Radix* which are the components of byakkokaninjinto, obviously suppressed the velocity of BMpDC migration. *Gypsum Fibrosum* significantly suppressed the directionality of BMpDC migration. Besides, byakkokaninjinto had no effect on the expression of CCR7 on BMpDCs. Then the effect of byakkokaninjinto on a (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) DNFB-induced allergic contact dermatitis model was investigated. Orally administration of byakkokaninjinto markedly relieved ear swelling in the late-phase allergic reactions.

These findings prove that byakkokaninjinto which has an inhibitory effect on pDC migration may contribute to ameliorate the occurrence of allergic contact dermatitis. Inhibition of pDC migration is anticipated to become a therapeutic agent for pDC-related diseases, such as atopic

dermatitis.

2. Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis [2]

It has been reported that pDCs participate in the onset of IBD. Infiltration of pDCs is found in the colonic mucosa of IBD patients. And highly enrichment of pDCs correlates with disease severity of IBD patients. In a DSS-induced colitis model, pDCs are increased in the mouse colon. And depletion of pDCs suppresses inflammation in the colon. However, depletion of pDCs also impairs gut barrier function and causes heavy colitis in a pathogenic bacterium induced colitis model. In another Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) disease model, ablating type-I IFN signaling in WAS protein null mice rescues colitis and makes pDCs show tolerance to further stimulation. On the other hand, pDC has been reported that it does not have a major role in the pathology of colitis caused by deficiency in WAS protein. Therefore, these contradictory reports suggest that pDCs perform multiple functions in the intestine.

Our study targets the inhibition of pDC migration. 80 compounds in natural medicines were searched for inhibitors of pDC migration using BMpDCs. Astragaloside IV (As-IV) and oxymatrine (Oxy) suppressed the migration of BMpDC by reducing the number of migrated BMpDCs and suppressing the velocity and directionality of BMpDC migration in a chemotaxis assay. Meanwhile, As-IV and Oxy had no effect on bone marrow-derived conventional DCs. To elucidate the pathogenesis role of pDCs in the intestinal immunity, DSS-induced colitis model was established. The number of pDCs was markedly increased in the colonic lamina propria (LP) of DSS-induced colitis model. Intraperitoneal injection of As-IV or Oxy reduced symptoms of colitis but not affect the number of pDCs in the colonic LP. By the immunohistochemical staining, expression of CCL21 was obviously observed in colonic isolated lymphoid follicles (ILFs). As-IV or Oxy reduced the accumulation of pDCs in colonic ILFs. Furthermore, migration of BMpDCs to colonic ILFs was significantly decreased by treatment with As-IV or Oxy in a BMpDC adoptive transfer model.

These findings prove that accumulation of pDCs in the ILFs is relative to the onset and progression of colitis. As-IV and Oxy exert preventive effects on colitis by suppressing pDC migration to colonic ILFs. The inhibitor of pDC migration may become a potential therapeutic approach for treating colonic inflammatory diseases.

Conclusion

CCR7-driven migration of pDCs to the lymph nodes leads to activation of T cells or B cells. In this study, we discovered inhibitors of pDC migration toward the lymphoid tissues. Our present results have demonstrated that the migration of pDCs toward the lymphoid tissues is involved in the pathogenesis of immune diseases such as contact dermatitis and colonic inflammation. Inhibition of pDC migration contributes to alleviate these diseases. Therefore, the inhibitors of pDC migration may have potentials to become useful lead drugs for immunological diseases.

References

- [1]. Yamamoto T, Zhang Y, Kigasawa A, Hayashi S, Kadowaki M.: Therapeutic benefit in allergic dermatitis derived from the inhibitory effect of Byakkokaninjinto on the migration of plasmacytoid dendritic cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020; 2020: 9532475.
- [2]. Zhang Y, Yamamoto T, Hayashi S, Kadowaki M.: Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021; 141: 111881.

学位論文審査の要旨

<p>報告番号</p>	<p>富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号</p>	<p>氏 名</p>	<p>張 珮</p>
<p>審査委員</p>	<p>職 名 氏 名</p> <p>(主査) 教授 宗 孝紀</p> <p>(副査) 教授 櫻井 宏明</p> <p>(副査) 教授 小泉 桂一</p>		
<p>(論文題目) Effects of targeting inhibitors of plasmacytoid dendritic cell migration in immune diseases. (特異的形質細胞様樹状細胞遊走抑制剤の免疫疾患に対する治療効果)</p>		<p>(判定) 合格</p>	
<p>(論文審査の要旨) (2頁以内)</p> <p>樹状細胞は自然免疫系および獲得免疫系の制御に中心的な役割を担う細胞であり、サイトカインの分泌や T 細胞や B 細胞の成熟化や活性化など様々な免疫反応を行う。この免疫制御のために樹状細胞は適切な時に適切な場所に遊走することが知られている。現在、樹状細胞は、古典的樹状細胞と形質細胞様樹状細胞に大別されており、形質細胞様樹状細胞はウイルス感染時に多量の I 型インターフェロンを分泌する免疫細胞として同定されたが、近年では炎症を伴う疾患での炎症部位での増多や T 細胞の活性化を介し獲得免疫系を制御することなども報告されている。また、形質細胞様樹状細胞の遊走についても、小腸への遊走は CCR9 を介するが大腸への遊走には関与しないことや、ケモカイン CCL21 による受容体 CCR7 を介した遊走には dock2-rac1 の pathway が必須であることなどが報告されている。しかし、形質様樹状細胞の疾患の病態形成への関与の有無やその詳細な免疫制御について、未だ詳細は明らかになっていない。</p> <p>そこで、張 珮さんは、免疫系のバランスを改善することを目的として処方される漢方薬が多くあることから、免疫系を制御する細胞である樹状細胞の遊走制御にも効果があると考え、漢方方剤および方剤成分を用いて樹状細胞の遊走制御する物質を探索し、スクリーニングにより見出した方剤や成分を用いて、形質細胞様樹状細胞の病態形成への関与および治療効果の検討を行った。</p> <p>本研究の骨子および審査結果は次のとおりである。</p> <p>1. 白虎加人参湯の形質細胞用樹状細胞の遊走阻害効果によるアトピー皮膚炎治療効果の研究</p> <p>形質細胞様樹状細胞は、接触性皮膚炎やアトピー性皮膚炎などの皮膚炎を発症した患者の炎症部位で増加していることが報告されている。しかし、皮膚炎における形質細胞様樹状細胞の病因や病態への関与の詳細は明らかになっていない。また、炎症に関与する T 細胞や B 細胞が成熟化や活性化されるリンパ組織への形質細胞様樹状細胞の遊走には、CCL21-CCR7 系によって誘導されることも示唆されている。</p> <p>そこで、張 珮さんは、形質細胞用樹状細胞の遊走を制御する漢方方剤を探索し、スクリーニングにより、白虎加人参湯が CCL21 によって誘導される形質細胞用樹状細胞の遊走を抑制することを明らかにした。また、白虎加人参湯を構成する各生薬成分の検討を行い、石膏が最も強い抑制効果を示すことを明らかにした。次に、皮膚炎病態モデルとして、耳浮腫モデルを確立し、</p>			

白虎加人参湯の皮膚炎に対する効果を検討し、白虎加人参湯が3相性の炎症反応のうち初期の数時間内に誘発される反応に抑制傾向を示すこと、リンパ球が関与する2-3日後に惹起される反応を抑制することを明らかにした。

本研究により張 玥さんは、形質細胞様樹状細胞の遊走を抑制する白虎加人参湯が、皮膚炎の治療薬候補となる可能性を示唆した。

2. 大腸孤立リンパ節への形質細胞様樹状細胞の遊走抑制による大腸炎発症抑制効果の研究

炎症性腸疾患（IBD）は、遺伝的素因や腸管粘膜免疫系の異常、環境因子などが複合的に関与して引き起こされる多因子性疾患として知られており、未だに有効な治療薬は確立していない。近年、形質細胞様樹状細胞がIBD患者の大腸粘膜に増多していることが明らかにされ、IBDの病態形成への関与や役割の検討が行われているが、形質細胞様樹状細胞が複数の免疫制御反応に関与することから、未だ統一した見解が得られていない。

形質細胞様樹状細胞は適時適切な場所に遊走することによって免疫制御を行うことが知られている。そこで、張 玥さんは、漢方方剤含有成分から形質細胞様樹状細胞の遊走制御物質の探索を行い、この探索された遊走制御物質を用いてIBDにおける形質細胞様樹状細胞の病態生理学的役割を明らかにすると共に、この遊走制御物質の新規IBDの治療薬候補としての可能性を、IBD病態モデルを用いて検討した。

そして、張 玥さんは、漢方方剤成分から形質細胞様樹状細胞の遊走抑制物質（astragaloside IV、oxymatrine）を見出し、これらの遊走抑制物質が、活性化された成熟形質細胞様樹状細胞の大腸孤立リンパ節への遊走を阻害することにより、大腸炎の発症を抑制することを明らかにしました。

従って、張 玥さんは、形質細胞様樹状細胞がIBDの大腸炎の病態形成に関与することを明らかにし、探索された形質細胞様樹状細胞の遊走抑制物質であるastragaloside IVあるいはoxymatrineが、全く新しい作用機序をもつIBDの新規治療薬のシーズとなり得る可能性を示唆しました。

張 玥さんはスクリーニングにより形質細胞様樹状細胞の遊走抑制物質（白虎加人参湯、astragaloside IV、oxymatrine）を見出し、アトピー性皮膚炎モデルやIBDモデル用いて形質細胞様樹状細胞の病態生理学的役割を明らかにすると共に、これらの形質細胞様樹状細胞遊走抑制物質が皮膚炎やIBDの新規治療薬の創製に寄与する可能性を示したと考えられる。

主査および副査は、申請者である張 玥さんに面接試験を行うと共に、論文について審査を行い、博士（薬科学）を授けるに値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名,論文題目,掲載誌名,巻,最初の頁と最後の頁,年を記載)

1. Yamamoto Takeshi, **Zhang Yue**, Kigasawa Ai, Hayashi Shusaku, Kadowaki Makoto.

Therapeutic benefit in allergic dermatitis derived from the inhibitory effect of Byakkokaninjinto on the migration of plasmacytoid dendritic cells.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 9532475, 2020

2. **Zhang Yue**, Yamamoto Takeshi, Hayashi Shusaku, Kadowaki Makoto.

Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis.

Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 141:111881, 2021