

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19682

研究課題名(和文)ヒト化マウスを用いた皮膚炎におけるICOSシグナルの役割

研究課題名(英文)The role of ICOS signal in dermatitis using humanized mice

研究代表者

小川 陽一 (OGAWA, Youichi)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20377542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞の完全な活性化には少なくとも2つのシグナルが必須であることが知られている。シグナル1；APCのMHC複合体とT細胞上のT cell receptor (TCR)の結合。シグナル2；主にAPCからT細胞へ供給される共刺激(co-stimulatory signals)。Co-stimulatory signalsを欠いたT細胞は十分な活性化に至らずanergyに陥る。ICOS signalが皮膚炎の発症・増悪にどのように関わっているかは不明である。Th1, Th2, Th17型皮膚炎モデルを用い、ICOSシグナルの役割を検討した。

研究成果の概要(英文)：Proper T cell activation requires at least two signals. Signal1: binding of MHC complex on APC and T cell receptor on T cells. Signal2: Co-stimulatory signals via APC to T cells. Lack of co-stimulatory signals results in inadequate T cell activation, leading to anergy of T cells. It is not clear how ICOS signal, one of the co-stimulatory signals, is involved in the development and exacerbation of dermatitis. We investigated the role of ICOS signal in Th1-, Th2-, Th17-type dermatitis.

研究分野：皮膚免疫、ウイルス感染症、膠原病

キーワード：共刺激分子 皮膚炎 接触性皮膚炎 アトピー性皮膚炎 乾癬 ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) T 細胞の完全な活性化には少なくとも 2つのシグナルが必須であることが知られている。

シグナル1; APCs の major histocompatibility complex (MHC)複合体と T 細胞上の T cell receptor (TCR)の結合

シグナル2; 主に APCs から T細胞へ供給される共刺激 (co-stimulatory signals)。

Co-stimulatory signals を欠いた T 細胞は十分な活性化に至らず anergy に陥る。

(2) co-stimulatory molecule と皮膚 T 細胞

近年我々は、Tumor-necrosis factor receptor (TNFR) superfamily に属する CD70-CD27 シグナルが Th1 反応に必須であることを共同研究者である順天堂大学免疫学教室八木田博士より供与された抗 CD70 抗体を用いて証明した (*J Invest Dermatol.* 131(6): 1252-1261, 2011)。

今回の研究のテーマとなる ICOS は Immunoglobulin superfamily に属する分子であり、ICOS ligand (ICOSL)-ICOS シグナルは、1. 活性化 T 細胞からの IL-10, IL-4 産生に必要であること、2. Th2 反応に重要であること、が報告されている (Dong, et al. *Nature*, 2001; McAdam, et al. *Nature*, 2001; Tafuri, et al. *Nature*, 2001)。

ICOS の発現を、皮膚とリンパ節/脾臓の T 細胞で比較検討したところ、興味深いことに ICOS はリンパ節/脾臓に存在する T 細胞では発現がほとんど認められないものの、皮膚の Tregs、また  $\gamma\delta$ T cells に高発現していた。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP<sup>-</sup> activated T cells は ICOS を発現するが、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP<sup>+</sup> Tregs はさらに高い ICOS 発現を示した。また、真皮の主要な  $\gamma\delta$ T 細胞である V $\gamma$ 4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T cells は高い ICOS 発現を示した。

## 2. 研究の目的

主に抗原提示細胞(APCs)から T 細胞へ供給される共刺激 (co-stimulatory signals)は T

細胞の完全な活性化に不可欠である。

我々は、co-stimulatory molecule の1つである inducible costimulatory molecule (ICOS) が皮膚内の制御性 T 細胞 (Tregs)、また真皮  $\gamma\delta$ T 細胞 ( $\gamma\delta$ T cells)に非常に強く発現することを見いだした (それぞれ 100%と 40%)。一方で、リンパ節や脾臓に存在する Tregs、 $\gamma\delta$ T cells における ICOS の発現は有意に低かった (それぞれ 10%と 0%)。

本研究では、様々な T 細胞誘導皮膚炎マウスモデル、およびヒト化マウスを用い、ICOS の皮膚炎における役割を検討し、最終的に臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

- ① Th1 反応 (DNFB による接触性皮膚炎モデル)、Th2 反応 (Vitamin D 製剤外用によるアトピー性皮膚炎モデル)、Th17 反応 (Imiquimod 外用による乾癬モデル)において抗 ICOSL 抗体を投与し、臨床反応の変化を観察する。
- ② Wild type mice, 上記皮膚炎を惹起したマウスの皮膚内の細胞 (Tregs,  $\gamma\delta$ T cells)における ICOS の発現変化を検討する。同様に ICOSL 発現細胞についても検討する。
- ③ 抗 ICOSL 抗体を投与した際の、皮膚内の細胞 (Tregs,  $\gamma\delta$ T cells)の数の変化、サイトカイン産生の変化を検討する。
- ④ 抗 ICOSL 抗体を投与した際の、皮膚 Tregs の suppressive function の変化を検討する。

ヒト化マウスを作成し、上記①~④の実験を繰り返す。

## 4. 研究成果

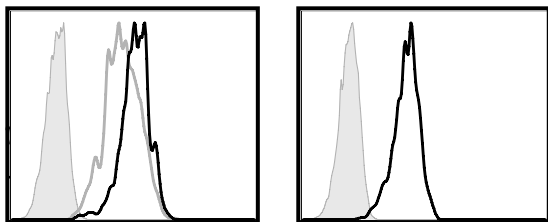
### (1) 皮膚 T細胞における ICOS 発現

B6 wild type mice の皮膚 T 細胞における ICOS の発現を、リンパ節・脾臓 T 細胞と比較した。

左図) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activated T cells に gate を

かけた。Gray line: FoxP3-, Black line: FoxP3+。FoxP3 陽性 Treg は高い ICOS 発現を認めた。リンパ節・脾臓 Treg ではほとんど ICOS 発現は認められなかった。

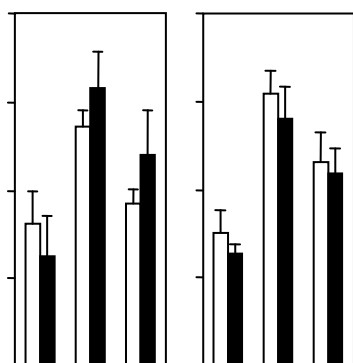
右図) マウス皮膚における主要な IL-17 サイトカイン産生細胞である Dermal V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells は高い ICOS 発現を認めた。リンパ節・脾臓 V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells ではほとんど ICOS 発現は認められなかった。



### (2) Th1 型皮膚炎モデル:接触性皮膚炎

DNFB による接触性皮膚炎モデルにおいて、感作相・惹起相のそれぞれに抗 ICOSL 抗体 (ブロッキング抗体) を腹腔内投与した。

感作相に抗 ICOSL 抗体を投与すると、control IgG 群と比較して有意に耳介腫脹が増強した。このことは、ICOS シグナルは接触性皮膚炎感作相において炎症を抑制することを示す。



DNFB 感作時に、control IgG あるいは抗 ICOSL 抗体を投与したマウスの皮膚所属リンパ節を in vitro で DNBS で刺激したところ、抗 ICOSL 抗体群では有意に高い IFN- $\gamma$ 産生が ELISA で確認された。

現在、Treg  $\cdot$  V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells のいずれの ICOS シグナルを抑制すると Th1 反応が増

強されるかを検討中である。

### (2) Th17 型皮膚炎モデル:乾癬

TLR agonist である Imiquimod (IMQ) cream 外用で誘導される Th17 型皮膚炎モデル (乾癬)において、control IgG あるいは抗 ICOSL 抗体を腹腔内投与した。

抗 ICOSL 抗体投与群は control IgG 投与群と比較して有意に IMQ 外用が惹起する炎症による体重減少が軽減されていた。また、紅斑・鱗屑・皮膚腫脹といった乾癬の臨床症状も有意に軽減されていた。

このことは Th17 型皮膚炎において ICOS シグナルは炎症を増強することを示す。

抗 ICOSL 抗体が Treg  $\cdot$  V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells のいずれの ICOS シグナルを抑制することで乾癬様症状を軽減するのか検討するため、Treg 除去抗体である抗 mouse FR4 抗体を尾静脈から投与した。Treg 除去後のマウスに IMQ を外用したところ、control IgG  $\cdot$  抗 ICOSL 抗体投与群の双方において Treg 除去による炎症増強が認められたが、両群に有意差は認められなかった。

次に、IMQ 外用マウスのリンパ節・脾臓から V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells を単離し、in vitro で IMQ を添加し、control IgG  $\cdot$  抗 ICOSL 抗体添加時の Th17 関連サイトカイン産生を ELISA で測定した。抗 ICOSL 抗体添加群では有意に IL-17A の産生が減少していた。このことは、Th17 型皮膚炎では IL-17A 産生細胞である V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells 上の ICOS シグナルが炎症を増強することを示唆する。

### (3) Th2 型皮膚炎モデル:アトピー性皮膚炎

ビタミン D3 製剤 (VitD3)外用で誘導される Th2 型皮膚炎モデル (アトピー性皮膚炎)において、control IgG あるいは抗 ICOSL 抗体を腹腔内投与した。

抗 ICOSL 抗体投与群は control IgG 投与群と比較して有意に VitD3 外用が惹起する

・鱗屑・皮膚腫脹・掻爬といったアトピー性皮膚炎の臨床症状が有意に軽減されていた。

VitD3 外用部位である耳介皮膚を用いたフローサイトメトリーでの検索で、抗 ICOSL 抗体投与群では Treg の増数・V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells の減数が認められた。皮膚を用いたリアルタイム PCR では、抗 ICOSL 抗体投与群において Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$ 、また Th17 サイトカインである IL-17A の発現低下が確認された。これは抗 ICOSL 抗体投与による V $\gamma$ 4+  $\gamma$  $\delta$ T cells の減数によると考えられた。

Th2 型皮膚炎において ICOS シグナルは炎症を増強すると示唆される。

ヒトでも同様の現象が認められるかヒト化マウスを用いて検討した。免疫不全マウスである NOG マウスにヒト臍帯血 CD34 陽性血液幹細胞を尾静脈から移入し、1ヶ月後、ヒトのアトピー性皮膚炎病変皮膚を背部に移植した。control IgG あるいは抗ヒト ICOSL 抗体を腹腔内投与したところ、抗ヒト ICOSL 抗体投与群において臨床症状の改善が認められた。現在、免疫学的な検討を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件) 投稿準備中

〔学会発表〕(計 0 件) 発表予定

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 陽一 (OGAWA, Youichi)

山梨大学 総合研究部 助教

研究者番号 : 20377542