

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21649

研究課題名(和文)慢性期の皮膚炎におけるTSLPの役割の解明

研究課題名(英文)Role of TSLP in skin inflammation at chronic stage

研究代表者

北島 雅之(KITAJIMA, MASAYUKI)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：00401000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Thymic Stromal Lymphopoietin (以下TSLP)はアレルギー性皮膚疾患の発症に重要であると多数報告があるが、慢性期の皮膚炎症におけるTSLPの役割は明らかではない。我々は、慢性期のTSLPの役割を解析できる皮膚炎モデルを構築し、TSLPが慢性期にも炎症の増悪化に重要であることを明らかにした。またTSLP標的細胞候補として樹状細胞、T細胞を同定した。TSLPレポーターマウスの解析からは免疫細胞からのTSLP産生も確認された。これらの結果は、慢性期の皮膚炎症局所における免疫細胞間相互作用による増悪化メカニズムの更なる解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The cytokine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) has been implicated in the development and progression of allergic inflammation in humans and mice. However, its role in chronic skin inflammation has not been elucidated. To understand the role of TSLP in chronic phase of skin inflammation, we established novel skin inflammation mouse models utilizing TSLP receptor (TSLPR)-deficient mice and conditional TSLPR-deficient mice in the current study. Results from these models revealed that TSLP has pivotal roles in skin inflammation in chronic stage. In addition, we found that dendritic cells and T cells are the target of TSLP in chronic skin inflammation by using cell type specific conditional TSLPR-deficient mice. Additionally, analysis from TSLP-reporter mice indicated that dendritic cells and monocyte cells produced TSLP in chronic inflamed skin region. Collectively, our current results proved the essential requirement of TSLP in chronic skin inflammation.

研究分野：免疫学

キーワード：慢性炎症 アレルギー性皮膚炎 TSLP

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性皮膚炎(以下アトピー性皮膚炎)患者は、日本を含めた先進国の子供約15-30%、大人約2-10%を占め、近年さらに増加傾向にある。治療の中心は、抗原回避、生活習慣の改善と免疫抑制剤等による長期的な薬物療法であるが、生活の質(QOL)を損なう可能性は常につきまとう。これらの現状からアトピー性皮膚炎の根治治療開発に向けた基礎研究が世界的に進められている。

このような背景のもと、アレルゲンによって上皮細胞から産生される Thymic Stromal Lymphopoietin (以下 TSLP)が注目されている。その理由として、1. ヒトとマウスのアレルギー性皮膚疾患と TSLP 発現は、相関関係がある、すなわち、アトピー性皮膚炎患者の急性および慢性炎症組織において、TSLP 産生が強く認められる。一方マウスでは、皮膚に TSLP を過剰発現させると、炎症が惹起され、皮膚の肥厚、Th2 細胞を含む免疫細胞の浸潤が認められる。2. ゲノムワイド関連解析(GWAS)から、TSLP 遺伝子多形がアトピー性皮膚炎患者と相関する。3. TSLP は、マウスアレルギー性皮膚炎モデルである Th2 細胞に依存する接触性過敏症の発症に必須の分子である。TSLP レセプターを欠損するマウスでは、皮膚の肥厚や、炎症細胞の浸潤が顕著に減少する。特にアレルゲンを取り込んだ樹状細胞のリンパ節への遊走が、野生型マウスと比較して減少する (Kitajima, Ziegler. *J* 2013)。さらに TSLP は、ヒトとマウスの CD11c⁺樹状細胞に作用し、Th2 細胞分化を誘導する能力を付与する (Bell, Kitajima et al. *Nat Immunol*2013)。このような結果から、アレルゲンによって表皮細胞から産生誘導された TSLP は、樹状細胞のリンパ節への遊走させ、Th2 細胞を分化誘導する。その Th2 細胞は、アレルゲン反応組織に戻り、Th2 サイトカインを産生することで、急性炎症

を開始すると考えられている。

炎症の反復によって生じる慢性炎症は、持続した多種類の免疫細胞の浸潤、血管新生、組織のリモデリングなどによって特徴づけられ、難治性であるために治療方法の確立が求められている。上に述べたように TSLP はアレルギー性炎症開始因子であることが示唆されるものの、一方で慢性炎症時における TSLP の役割については解明されていない点が多い。未解明な点として、1. 炎症が持続することから未知な TSLP 誘導因子や TSLP 産生細胞が存在している可能性、2. 多種類の免疫細胞が浸潤していることから、樹状細胞以外の未知な TSLP 標的細胞が存在している可能性がある。

2. 研究の目的

TSLP は、アレルギー性皮膚疾患の発症開始に重要であると多数報告があるが、慢性炎症における役割は十分に解明されていない。本研究は、TSLP による皮膚慢性炎症の制御メカニズムを解明し、皮膚慢性炎症根治治療のための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 皮膚慢性炎症における TSLP の役割を明らかにするために、TSLP に依存的した慢性皮膚炎を発症するマウスモデルを探索するとともに、慢性炎症における TSLP の重要性の評価をおこなう。

皮膚に対して TSLP 産生誘導がすでに報告されている刺激物質(FITC/DBP)と、条件付き TSLP レセプター(TSLPR)欠損マウスを使用する。炎症誘導後、タモキシフェンを投与し TSLPR を欠損させることで TSLP への反応性を欠損させる。炎症の程度は、耳介の肥厚等によって評価する。

皮膚へ反復刺激後に TSLP 産生誘導される可能性がある刺激物質(DNFB)と、条件付き TSLPR 欠損マウスを用いて上記と同様に

炎症程度等の評価をおこなう。

(2) 条件付き TSLPR 欠損マウスと、特定の細胞のみに Cre を発現するマウスを掛け合わせることで、特定の細胞のみ TSLP に反応しないマウスを作製する。そのマウスに、(1) で確立した慢性炎症モデルを誘導し、その炎症程度を評価することによって、TSLP の標的細胞を同定する。

(3) (1) で確立した慢性炎症モデルを TSLP-ZsGreen レポーターマウスに誘導する。耳介に存在する TSLP 産生細胞を示す蛍光色素 ZsGreen の蛍光をフローサイトメトリー等を用いて同定する。

4. 研究成果

(1) 反復刺激による慢性期の炎症モデルにおいて、TSLP 依存的に炎症が増悪化するモデルを2つ構築した。

TSLP 産生誘導がすでに報告されているアレルゲン(FITC/DBP)刺激後に TSLPR を欠損させたところ、TSLPR を欠損させていないマウスと比較し、耳介の肥厚の増加が明らかに抑制された(図1)。

A. FITC反復刺激モデル

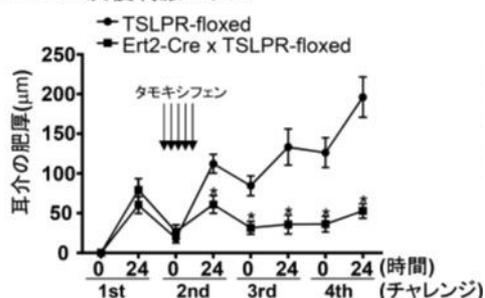


図1. FITC 反復刺激モデル

TSLPR 欠損(TSLPRKO)マウスに反復して DNFB 塗布をおこなったところ、3回目以降の耳介の肥厚の増加が抑制された(図2)。また反復 DNFB 刺激による TSLP mRNA 発現を調べたところ、4回刺激後では TSLP 発現が有意に上昇していた(図3)。この結果は、

反復刺激による TSLP 産生の増大が皮膚の肥厚の増加に關与していることを示唆している。

B. DNFB反復刺激モデル

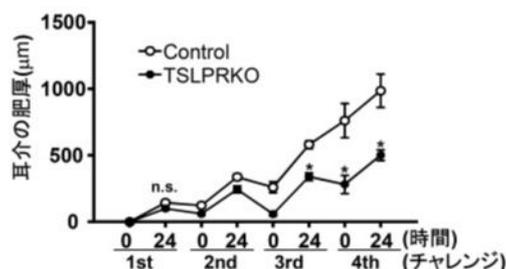


図2. DNFB 反復刺激モデル

C. 耳介TSLP発現 (DNFB反復刺激モデル)

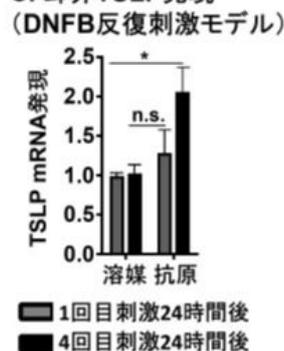


図3. DNFB 刺激による TSLP 発現

(2) CD4 細胞特異的に TSLPR を欠損させることで、上記モデルにおける耳介の肥厚が有意に減少していることが確認された。CD4 細胞の役割を証明するためには、今後さらなる研究が必要とされる。

(3) TSLP レポーターマウスに DNFB 皮膚炎を誘導したところ、耳介に浸潤する樹状細胞や単球から TSLP 産生が確認された。

まとめると、慢性期の皮膚炎症でも TSLP は炎症増悪化に重要な役割を担っていることを見いだした。さらに慢性期の炎症における TSLP は、炎症開始時とは異なる作用をすることで、炎症応答を増悪化している可能性が示唆された。今回得られた結果は、慢性期の皮膚炎の解明に向けた研究基盤となりうる。今後は TSLP を介した細胞間相互作用による炎症の増悪化メカニズムの解明に繋がることが期待される。

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 3 件)

Moriyama, T., Suzuki, T., Chang, Mo., **Kitajima, M.**, Takaku, H.: Baculovirus directly activates murine NK cells via TLR9. *Cancer Gene Therapy*. 24:175-179 (2017). 査読あり DOI: 10.1038/cgt.2017.2

Takikita, S., Muro, R., Takai, T., Ootubo, T., Kawamura, Y., Dohi, T., Oda, H., **Kitajima, M.**, Oshima, K., Hattori, M., Endo, TA., Toyoda, T., Shinkai, Y., Suzuki, H.: A histone methyltransferase ESET is critical for T cell development. *J Immunol*. 197:2269-2279 (2016). 査読あり DOI: 10.4049/j immunol.1502486

Oo Chang, M., Suzuki, T., Kitajima, M., Takaku, H. Baculovirus infection of human monocyte-derived dendritic cells restricts HIV-1 replication. *AID Res Hum Retrovirues*. 10:1023-1031 (2015). 査読あり DOI: 10.1089/AID.2015.0060

〔学会発表〕(計 3 件)

北島雅之, 木村彰宏, 鈴木春巳,
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis through homeostasis of epidermal $\gamma\delta$ T cells. 第45回
日本免疫学会総会・学術集会
2016.12.5-2016.12.7 沖縄市

北島雅之, 木村彰宏, 鈴木春巳,
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis through homeostasis of epidermal $\gamma\delta$ T cells. Immunology 2016, The American Association of Immunologists Annual meeting
2016.5.13-2016.5.17 Seattle

北島雅之, 木村彰宏, 鈴木春巳,
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis. 第4

4回 日本免疫学会総会・学術集会

2015.11.18-2015.11.20 札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 雅之 (KITAJIMA, MASAYUKI)

国立国際医療研究センター研究所・免疫病

理研究部・上級研究員

研究者番号: 00401000

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし