

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06985

研究課題名(和文)自然リンパ球による新規皮膚バリア制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of skin keratinocyte barrier by innate lymphoid cells

研究代表者

杉田 和成(SUGITA, KAZUNARI)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40412647

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文):2型自然リンパ球(Group 2 innate lymphoid cell, ILC2)は、Th2サイトカインを産生し、外界とのインターフェースに存在する。ILC2は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息の炎症局所に著しく浸出することから、アレルギー性炎症の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。したがって、アレルギー性炎症のイニシエータ・エフェクターであるILC2による皮膚バリア制御機構を明らかにすることは、アレルギー性皮膚疾患の病態の全容を解明する上で極めて重要と考えられる。本研究では、ILC2が皮膚のタイトジャンクションを介してバリア機能の破綻に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are capable of producing Th2 cytokines and play important roles in the initiation of inflammation at epithelial barrier surfaces. The main function of the epithelium is to form a protective barrier against external stimuli. Thus, the role of ILC2s in the epithelium is of great interest to determine the mechanism of allergic diseases, which may pave a way for prevention and new therapeutic approaches. We show here for the first time that ILC2s preferentially target tight junction barrier and promote barrier disruption.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：皮膚免疫 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (innate lymphoid cell, ILC) は、Tリンパ球やBリンパ球とは異なる性質を持つ、新たなリンパ球サブセットである。加えて、ILCは、インターフェロン (IFN) やインターロイキン (IL) など、さまざまなサイトカインを産生し、以下の3つのグループに分類される。1型自然リンパ球 (ILC1) は IFN- γ を、ILC2 は IL-5 や IL-13 を、3型自然リンパ球 (ILC3) は IL-17 や IL-22 をそれぞれ産生する。中でも ILC2 は、末梢血中にわずか 0.02%程度しか存在しないが、アトピー性皮膚炎や気管支喘息の炎症局所に著しく浸出することから、アレルギー性炎症の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。また、ILC2 は、皮膚や肺だけではなく、マウス腸管においても定常状態において認められるが、感染を契機としてその浸出細胞数が増加する。

他方、ヒトにおいてはケラチノサイトにより外界と隔てられることで、外的刺激から守られている。こうした皮膚バリア機能は、細胞間を密着接合するタイトジャンクション (TJ) が担っている。また TJ は細胞間隙の物質の通過を制御する働きをもつ。したがって、皮膚 TJ の機能失調により、水分の漏出や外界からの異物・アレルゲンの侵入が容易となり、アトピー性皮膚炎の発症や増悪をもたらす要因となる。実際、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、TJ の構成蛋白のひとつである occludin の発現が低下している。しかしながら、外界とのインターフェースにおいて、アレルギー性炎症や感染防御に重要な役割を担う ILC2 が皮膚バリア機能をどのように制御しているのか、その詳細なメカニズムは未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究は、アレルギー性皮膚疾患発症に占めるケラチノサイトのバリア機能と ILC2 発現の意義を明らかにすることを目的とする。

本研究に先立ち、ILC2 依存性炎症モデル (IL-33 を経気道投与) を用いて、ILC2 が上皮細胞のバリア機能に影響するのかを検証した。興味深いことに、C57BL/6 (B6) マウスおよび Rag2^{-/-} (T, B 細胞欠損) マウスに IL-33 を投与すると、TJ 構成分子の occludin 発現が有意に低下したが、Rag2^{-/-} γ c^{-/-} (T, B 細胞と ILC 欠損) マウスでは、その発現に変化はみられなかった (図 1)。このことは、**ILC2 が上皮のバリア形成に極めて強く関与していることが伺われる**。そこで、本研究の目的を達成するために以下の実験を実施した。

3. 研究の方法

(1) ILC2 は希少細胞であるため、研究に使用

するための ILC2 細胞株の樹立を行った。ヒト末梢血より ILC2 リンパ球をセルソーターにより分離・回収する。

(2) IL-2 添加 IMDM 培地にて ILC2 を培養維持した。他方、ケラチノサイトは transwell を用いた air-liquid interface 条件下で ILC2 リンパ球と共培養した。TJ バリア活性の評価には、経上皮電気抵抗値を指標として用いる。

(3) さらに、TJ バリア機能は FITC-dextran による透過速度指標を用いて検証する。

(4) ILC2 と共培養後のケラチノサイトのタイトジャンクション分子の遺伝子発現について、リアルタイム PCR を用いて調べる。

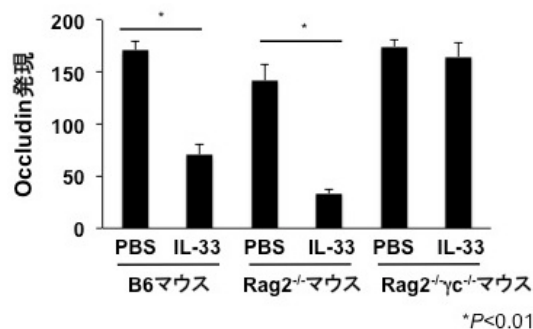


図 1 ILC 欠損下では occludin の発現は不変

4. 研究成果

前記 (1) の結果、ヒト末梢血の ILC (ILC1, ILC2, ILC3) は、lineage マーカーが陰性で、かつ IL-7R が陽性の細胞集団である。CRTH2, c-kit, および NKp44 で染色により、3種の ILC であることを確認した (図 2)。

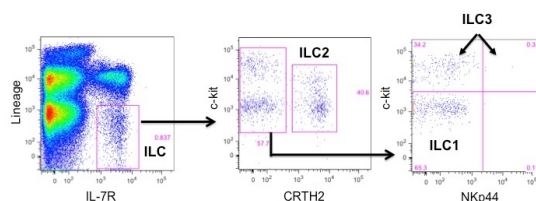


図 2 ヒト ILC の 3つのサブセット

(2) の検証の結果、ILC2 とケラチノサイト共培養下で、ケラチノサイトの経上皮電気抵抗値が有意に低下した。これは、ILC2 の細胞数に依存していた。さらに、(3) FITC-dextran による透過速度指標を解析した結果、ILC2 により透過速度が亢進することが明らかになった。また、前記 (4) の結果、ILC2 共培養下で、タイトジャンクション分子の 1つである、occludin の遺伝子発現が低下することも明らかになった。これらの結果より、ILC2 がケラチノサイトのタイトジャンクションをターゲットとして、皮膚バリア機能を制御している可能性が示唆された。

ILC2 は、アトピー性皮膚炎をはじめとする

アレルギー疾患の病態や増悪に関与するイニシエータ・エフェクターである。しかし、ILC2 が外界とのインターフェースであるバリアをいかに制御するかについてはこれまで不明であった。加えて、皮膚バリアを構成するケラチノサイトは、環境の変化にいち早く応答し、免疫系にシグナルを送るセンサーであることを勘案すると、アレルギー炎症に重要な ILC2 とケラチノサイトとの相互作用をバリア学の見地から検証することは、アレルギー性皮膚疾患発症の根拠を提示する上でも極めて重要と考えられる。本研究では、ILC2 が生体バリアとくに TJ の制御機構に着目した点に特色がある。ヒトの免疫応答を見据えた本研究成果は、アレルギー性皮膚疾患のみならず、ILC2 の局所浸出と密接に関わる感染症に対する検査・治療・予防に繋がる新規薬剤開発やその臨床応用への波及効果が期待できると考える。

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 6 件)

(1) Ito A, Sugita K, Tsutsumi R, and Yamamoto O: Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia on the abdomen with dendritic cell infiltration. *Eur J Dermatol* 28:85-86, 2018
doi: 10.1684/ejd.2017.3148. (査読有)

(2) Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Altunbulakli C, Morita H, Castro-Giner F, Kubo T, Wawrzyniak P, Rückert B, Sudo K, Nakae S, Matsumoto K, O' Mahony L, Akdis M, Takei F, and Akdis CA: Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 141:300-310, 2018
doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.038.
(査読有)

(3) Kimura R, Sugita K, Ito A, Goto H, and Yamamoto O: Basophils are recruited and localized at the site of tick bites in humans. *J Cutan Pathol* 44: 1091-1093, 2017
doi: 10.1111/cup.13045. (査読有)

(4) Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T, Komlosi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O' Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen

W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz OF, Zakzuk JS, and Akdis CA: Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 138: 984-1010, 2016
doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.
(査読有)

(5) Wawrzyniak P, Kubo T, Altunbulakli T, Sugita K, Wawrzyniak M, Akdis M, and Akdis CA: Regulation of epithelial barrier in asthma. *CIA symposium proceedings* 53-55, 2016 (査読無)

(6) Tan HT, Sugita K, and Akdis CA: Novel Biologicals for the Treatment of Allergic Diseases and Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 16:70, 2016
doi: 10.1007/s11882-016-0650-5. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Sugita K, Steer CA, Martinez-Gonzalez I, Morita H, Kubo T, Wawrzyniak P, Rückert B, O' Mahony L, Akdis M, Takei F, and Akdis CA: Role of group 2 innate lymphoid cells and IL-13 in bronchial epithelial cell tight junction barrier leakiness. 31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Charleston, South Carolina, USA, 2016

(2) Kubo T, Wawrzyniak P, Morita H, Sugita K, Wanke K, Kast J, Altunbulakli C, Rückert B, Akdis M, and Akdis CA: 気管支上皮のバリア維持における CpG-DNA の役割 第 44 回日本臨床免疫学会, 東京, 2016

[図書] (計 1 件)

(1) Kubo T, Morita H, Sugita K, and Akdis CA: Introduction to mechanism of allergic diseases. *Middleton's Allergy Essentials* 1st edition 1-27, 2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 和成 (SUGITA KAZUNARI)
鳥取大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40412647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()