

令和元年6月17日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07096

研究課題名（和文）自然免疫細胞を標的としたアトピー性皮膚炎における難治性痒みの新規治療法の開発

研究課題名（英文）Possible roles of immune cells and sensory nerve communication in atopic dermatitis

研究代表者

外山 扇雅（Toyama, Sumika）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・博士研究員

研究者番号：50805893

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）：アトピー性皮膚炎（AD）の患者数は増加しており、なかでもその痒みは難治である。本研究ではかゆみへの関与が未だ不明瞭である神経細胞と免疫細胞の相互作用に着眼し、かゆみにおける役割を解明するために、ADモデルマウス及び患者皮膚を用いて研究を行った。炎症皮膚の特性化により、好酸球浸潤が明らかとなった。AD皮膚に浸潤する好酸球は神経細胞に接触しており、相互に作用していることが示唆された。以上のことから、好酸球を標的としたADの痒みの新規治療法の開発に繋がると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

かゆみは『掻破したいという欲望を起こさせる不快な感覚』として定義されており、近年では外部異物に対する自己防衛反応や全身の異常を知らせる警告（アラーム）として考えられている。知覚異常としてのかゆみは、痛みと同様にQOL(qualityoflife)を著しく低下させる。特に、既存治療が無効な難治性のかゆみは不眠、自殺率（願望）の増加、労働・勉強障害等の一因となっており、世界中で難治性かゆみの新規治療法の開発が進められている。

本研究結果により、ADにおける好酸球の新規制御法の開発及び好酸球を標的とした新規痒み治療法の開発に繋がると考えられ、大変意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated that interaction between immune cells and sensory nerves, and to find new therapy targets for itch in atopic dermatitis (AD). As a result, B cells and regulatory T cells (Treg) number was decreased in NC/Nga mouse, an AD model. In addition, eosinophils migrated to lesional skin of AD model mice and patients. Moreover, eosinophils contacted to sensory nerves at eosinophils co-culture with sensory nerves. Therefore, this finding suggest that eosinophils may be new target for itch in AD.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 難治性痒み 好酸球 神経線維

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痒みは不快な感覚として定義されており、強い搔破行動と湿疹をもたらす、患者の QOL (Quality of Life) を著しく低下させる。なかでもアトピー性皮膚炎 (AD) における痒みは、様々な遺伝及び環境因子が絡み合う複雑な機序で発症することから、その制御法も病態に応じて異なり、既存薬である抗ヒスタミン薬が奏功し難い『難治性痒み』と言われる。難治性痒みを制御する方法は、我々の研究グループがその開発に携わった kappa-オピオイド受容体アゴニスト (ナルフラフィン) 以外、ほとんど開発されていない。最近の世界的な透析の統計調査によると、痒みの強い透析患者はややうつ傾向で、睡眠障害が著しく、痒みの強さは生存率と負の相関を示した (Pisoni et al. *Nephrol Dial Transplant*. 2006.)。難治性痒みを呈する疾患は AD のほか、乾癬、結節性痒疹、腎疾患、胆汁うっ滞性肝障害等があげられ、疾患横断的な難治性痒みの新規予防法及び治療法が開発が求められている。また、AD をはじめとするアレルギー疾患罹患率は年々増加傾向にあり、その病態解明と治療法の確立は急務である。

このような背景から、これまで申請者の研究グループでは AD における難治性痒みの発症機序の解明を目指した研究を行ってきた。その過程で AD 炎症局所において、表皮内に感覚神経が侵入していることが難治性痒みの原因の一つであることを明らかにし (Tominaga M et al. *J Dermatol*. 2014.)。皮膚バリア機能が破綻している AD 患者や乾皮症、またはそれらのモデルマウスの皮膚において、神経伸長因子 [Nerve Elongation Factor; NEF] (Nerve Growth Factor : NGF、Amphiregulin : AREG) の発現亢進並びに、神経線維を退縮させる神経反発因子 [Nerve Repulsion Factor; NRF] (Sema3A、anosmin-1) の発現低下を見出した (Tominaga et al., *Exp Rev Dermatol*, 2010, Kamo et al., *J Dermatol Sci*, 2011, Tominaga M et al. *Biol Pharm Bull*. 2013.)。以上のことから、神経線維の増生が起痒刺激の受容に繋がり、外部刺激によって表皮内神経線維が容易に興奮することが考えられる。

AD の発症原因についても不明点が多いが、その原因因子の一つとして Interleukin (IL)-33 が注目されている。IL-33 が上皮細胞核内に発現し、様々なアレルギー疾患や自己免疫疾患に関与する、IL-1 サイトカインファミリーの 1 つである。AD においては、ケラチノサイトから放出された IL-33 が 2 型自然リンパ球 (ILC2) に作用し、好酸球遊走性サイトカインである IL-5 や IL-13 の産生を誘導する。これらのサイトカインにより AD の炎症局所に好酸球が浸潤することから、ILC2 や好酸球が AD の病態形成に関与することが示唆されている (Imai Y et al. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2013.)。近年我々は、IL-33 によって刺激されたマスト細胞が IL-2 を産生し、T 細胞に作用することで制御性 T 細胞 (Treg) の分化・増殖を促進するという新規 Treg 誘導機構を発見した。また、この Treg は、IL-10 を産生することで ILC2 の分化・増殖を抑制し、結果的に好酸球浸潤を抑制する (Morita H & Toyama S et al. *Immunity*. 2015.)。以上のことから、AD 炎症局所においても IL-33 による炎症カスケード及び炎症抑制カスケードが起こっていることが推定されるが、その詳細は不明瞭である。

また、AD 炎症局所に浸潤するとされる好酸球は、神経伸長因子である NGF や AREG を産生することから (Kobayashi H et al. *Blood*. 2002., Matsumoto K et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009.)、AD 皮膚における神経線維の増生にも関与することが推測される。さらに我々は、セリンプロテアーゼの 1 つである PRSS33 がヒト好酸球に恒常的かつ特異的に発現することを見出し、プロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR-2) を介して他の細胞に作用することを報告している (Toyama S et al. *Allergol Int*. 2017.)。マスト細胞が産生するプロテアーゼであるトリプテースが神経線維に作用し、起痒に繋がることは知られていることから (Ui H et al. *Eur J Pharmacol*. 2006.)、好酸球由来 PRSS33 等プロテアーゼも同様に起痒に関与する可能性が考えられる。また一方で、IgE 依存的慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) において重要な役割を果たす好塩基球は、マスト細胞同様に起痒因子であるヒスタミンを放出し (Borriello F et al. *Handb Exp Pharmacol*. 2017.)、プロテアーゼを産生する (Iki M et al. *Blood*. 2016., Tsutsui H et al. *J Biol Chem*. 2017.) ことから、起痒に関与する可能性が示唆されている。以上のことから、AD 炎症局所に浸潤する免疫細胞が起痒に関与することが考えられるが、その詳細は未だ不明である。

先行研究において、好酸球を標的とした抗 IL-5 抗体による AD 治療の検討が行われたが、皮膚炎症状に対する効果は認められなかった (Oldhoff JM et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006.)。しかし、抗 IL-5 抗体は無効と言われてきた気管支ぜんそくにおいても、近年では血中好酸球数が高値である重症患者に有効であり、抗 IL-5 抗体 (メポリズマブ) である『ヌーカラ』及び抗 IL-5 受容体抗体 (ベンラリスマブ) である『ファセンラ』は、重症気管支喘息への効果及び効能が 2016 年及び 2018 年に日本においてもそれぞれ承認された。以上のことから、病態ごとの治療法の選択が必要であり、AD においても好酸球を標的とした治療法の真の有効性を検討することが必要である。

このように、これまで AD における感覚神経線維あるいは免疫細胞各々に着目した研究は数多く行われてきた。しかしながら、AD 病変部における免疫細胞の相互の関係性や神経細胞等の非免疫細胞への作用等、詳細な役割に関する報告は断片的であり、特に痒みにおける役割は不明瞭である。以上の背景から、感覚神経線維と免疫細胞は AD 炎症局所で接触し、相互に作用している可能性が高いと仮説を立てた。好酸球をはじめとする免疫細胞が神経細胞の興奮及び起痒に関与する可能性が考えられ、免疫細胞及びその分化・増殖を制御するサイトカインを制御することが新たな治療法に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

これまで痒みにおける感覚神経線維及び免疫細胞それぞれの役割については研究されているが、これらの相互作用に着目した痒み発症メカニズムについてはほとんど解明されていない。これまでの背景から、我々は好酸球をはじめとする免疫細胞と神経線維が AD 炎症局所において相互に作用していると考え、その結果、神経線維が興奮し、起痒に繋がると考えた。

そこで本研究では、痒み発症の鍵となりえるこれらの相互作用に着目し、その詳細を解明するため、感覚神経線維と免疫細胞の相互作用の観点から、(1) AD モデルマウス皮膚病変部における免疫細胞の特性化、(2) AD モデルマウス及び患者皮膚病変部における感覚神経線維と免疫細胞の分布解析、(3) 後根神経節 (DRG) 細胞と骨髄由来好酸球 (BMEos) の共培養を行い、AD における難治性痒みの発症メカニズムの解明と新規治療法・予防法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) AD モデルマウス皮膚病変部における免疫細胞の特性化

アトピー性皮膚炎の炎症局所に浸潤する免疫細胞の特性化を行うために、本疾患のモデル動物である NC/Nga マウスを利用した。4% SDS 溶液で NC/Nga マウスの皮膚バリアを破壊後、にコナヒョウヒダニ虫体成分含有軟膏 (ピオスタ AD) をマウスの背部に週 2 回 100mg / site で塗布し、この操作を 3 週間行うことで AD モデルマウスを作製した。AD モデルマウスから採取した皮膚をトリプシン処理 (37 45 分) にて表皮と真皮に分離した。表皮はホモジナイザーにて破碎・ろ過をしたものを、真皮はコラゲナーゼ (Type 2) 及び DNase で処理した後に破碎・ろ過をしたものを単一細胞とした。採取した細胞を細胞種のマーカー抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて検出した。各細胞は、好酸球 : Siglec-F+、好中球 : Gr-1+、好塩基球 : Fc ϵ R +c-kit-、マスト細胞 : Fc ϵ R +c-kit+、樹状細胞 : CD11c+、マクロファージ : F4/80+、B 細胞 : B220+、T 細胞 : CD4+ or CD8+、NK 細胞 : CD49b+、Treg : CD4+CD25+Foxp3+、ILC2 : Lineage-KLRG1+sca-1+を検出した。

(2) AD モデルマウス及び患者皮膚病変部における感覚神経線維と免疫細胞の分布解析

AD モデルマウスおよび患者の皮膚病変部サンプルを 4% パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片 (厚さ 20 μ m) を作製した。ヒト皮膚生検は、健常者および AD 患者の皮膚検体 (3 mmパンチ) を採取した。神経線維及び好酸球を視覚化するため、凍結切片は神経マーカーである抗 PGP9.5 と好酸球マーカーである抗 Siglec-F 及び抗 Siglec-8 抗体で二重免疫染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、皮膚での感覚神経と好酸球の分布を比較検討した。

(3) マウス後根神経節 (DRG) 細胞とマウス骨髄由来好酸球 (BMEos) の共培養

マウスから DRG 細胞を摘出し、酵素及びコラゲナーゼ (Type 2) 処置を行った後、DRG 細胞を分散培養した。好酸球は、骨髄をマウスから採取し、リコンビナント (r) SCF 及び Flt3-Ligand 存在下で 4 日間、IL-5 存在下で 6 日以上培養することで誘導した (BMEos)。BMEos は rIL-33 存在下で 15 分培養することで炎症部位に遊走した活性化好酸球を模倣した。誘導した BMEos を PBS でよく洗浄し、分散培養した DRG 細胞と共培養を行い、72 時間まで経時的に観察を行った。

(4) ヒト iPS 細胞由来末梢神経細胞とヒト末梢血由来好酸球の共培養

理研 BRC より提供を受けた 201B7 株を用い、iPS 細胞 (hiPS) から神経堤 (Neural Crest : NC) 細胞を誘導し、さらに hiPS-derived NC 細胞から末梢神経細胞を誘導した。好酸球は末梢血から比重遠心及び免疫磁気ビーズを用いて分離し、rIL-5 によって活性化させた。分離した好酸球をよく洗浄した後、誘導した末梢神経細胞と共培養を行い、72 時間まで経時的に観察を行った。共培養 72 時間後に上清を取り除き、PBS にて洗浄した後、0.5% トリパンブルーにて染色を行い、顕鏡にて形態学変化を観察した。

4. 研究成果

(1) AD モデルマウス皮膚病変部における免疫細胞の特性化

これまで AD 皮膚病変には様々な免疫細胞が浸潤するとの報告がある。しかしながらこれらの報告は断片的であり、網羅的に浸潤する免疫細胞を同定した研究はこれまでになかった。そこで本研究では、NC/Nga マウスの背部にピオスタ AD 軟膏 (コナヒョウヒダニ虫体成分) を反復塗布することで、AD 様症状を誘発した。誘導した AD モデルマウスは、コントロール群と比較し、AD 様皮膚炎が認められ、掻破行動回数が有意に増加していた。また、血清中 IgE レベル、経皮水分蒸散量の増加、表皮の肥厚が認められた。このマウスを用い、その病変部に浸潤する免疫細胞の特性化を網羅的に行った。

その結果、コントロール(4% SDS 塗布)群では B 細胞が皮膚に浸潤しており、皮膚炎重症度と負の相関を示した。一方で AD(4% SDS + コナヒョウヒダニ塗布)群ではプラズマ細胞マーカー(CD138)陽性細胞が増加しており、血清中 Total IgE 値も経時的に増加していた。未処置マウスと比較し、コントロール群で B 細胞数が増加することも踏まえ、以上のことから、皮膚バリア破壊によって B 細胞が抗体を産生するために炎症局所に浸潤し、IgE 抗体産生に伴い B 細胞からプラズマ細胞に分化する過程で B 細胞が減少するよう見えると示唆された。

また、コントロール群と比較し、AD 群では Treg の細胞数が減少していた。Treg 細胞数もまた皮膚炎重症度及び搔破回数は負の相関を示した。また、これまでの報告にあった通り、AD 群ではコントロール群と比較して好酸球細胞数が増加しており、組織学的検討においても、AD モデルマウス皮膚局所における好酸球の浸潤が認められた。

我々のこれまでの研究から、ダニ等の抗原由来プロテアーゼによるバリア破壊により、上皮細胞から IL-33 が活性を有した状態で放出され、マスト細胞を刺激することが明らかとなっている。IL-33 の刺激を受けたマスト細胞は、IL-2 を産生し、T 細胞に作用し、Treg に分化・増殖することを見出している。また、IL-2 によって分化・増殖した Treg は IL-10 を産生し、ILC2 の増殖を抑制することで結果的に好酸球性炎症を抑制することを明らかにしてきた。また一方で、自己免疫疾患では Treg が減少することが知られている。以上のことから、AD においても同様に皮膚バリア破壊によって IL-33 をトリガーとする炎症が起こり、Treg が炎症局所に浸潤するが、さらなる抗原の侵入によって免疫が破綻し、Treg 細胞数が減少すると考察された。また、今回の結果から、IL-10 及び Treg を炎症局所に補充することで好酸球浸潤を抑制することができると考えられ、AD の新規治療法となる可能性が示唆された。

(2) AD モデルマウス皮膚病変部における感覚神経線維と免疫細胞の分布解析

実験(1)の結果から、好酸球が AD 炎症局所に浸潤することが明らかとなった。好酸球は神経伸長因子や、起痒因子となりあるプロテアーゼ等を産生することから、炎症局所で起痒に関与することが考えられた。またこれまでの我々の研究から、AD 炎症局所において神経線維が増生している。そこで感覚神経線維と好酸球が AD 炎症局所で近接している可能性が考えられたため、蛍光二重免疫染色法にて好酸球と神経線維を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

その結果、AD モデルマウス皮膚において、PGP9.5 陽性神経線維の稠密化が観察された。また、Siglec-F 陽性好酸球の浸潤も認められ、この好酸球が神経線維に接触している染色像が確認された。AD 患者皮膚においても同様に、PGP9.5 陽性神経線維の稠密化及び Siglec-8 陽性好酸球の浸潤が認められ、神経線維と好酸球の接触が確認された。

以上のことから、好酸球が AD 炎症局所に浸潤し、神経線維に接触して神経線維を興奮させ、痒みを引き起こす可能性が考えられた。

(3) マウス後根神経節(DRG)細胞とマウス骨髄由来好酸球(BMEos)の共培養

実験(2)の結果から、AD 炎症局所において好酸球と神経線維が接触し、痒みに関与する可能性が示唆された。しかしながら、好酸球が炎症により局所に浸潤し、神経伸長因子を産生することで神経伸長が促され神経線維が稠密化し、起痒に繋がるのか、それとも神経線維の稠密化が起こっている局所に好酸球が遊走し、神経線維に接近していくのか、またその作用点は不明である。そこで本研究ではまず、好酸球と神経線維の直接的な接触がどのように起こるのかを明らかにするため、in vitro において神経細胞(DRG)と好酸球(BMEos)の共培養系を確立し、継時的に観察した。

その結果、非活性型好酸球と神経細胞との共培養系では神経線維の伸長が認められるのに対し、活性型好酸球と神経細胞の共培養においては好酸球が神経細胞に接触し、神経伸長が妨げられ、神経線維の形態の変化が確認された。

(4) ヒト iPS 細胞由来末梢神経細胞とヒト末梢血由来好酸球の共培養

我々はこれまで、ヒト iPS 細胞から末梢神経細胞の誘導方法の開発を行い、機能的な末梢神経細胞の誘導に成功している(論文投稿中)。そこで、この細胞を用い、好酸球との共培養系を確立した。

その結果、実験(3)と同様に、非活性化好酸球と共培養した末梢神経細胞は伸長が認められるのに対し、活性化好酸球と共培養した末梢神経細胞は、神経線維の伸長が認められなかった。また、共培養 72 時間後、活性化好酸球と共培養した末梢神経線維は、トリパンプルー陽性の死細胞が増加していた。

研究成果(3)及び(4)から、神経線維が伸長している AD 炎症局所に好酸球が浸潤し、神経線維に直接接触して作用し、傷害することで神経線維の伸長を妨げ、退縮させることが示唆された。近年、慢性化した AD や乾癬等の患者皮膚では、健常者よりも表皮内神経線維の数(密度)が低下していることが報告されている(Tsutsumi et al. *British Journal of Dermatology*, 2016., Tan et al. *Journal of Investigative Dermatology*, 2018.)。本研究の研究結果をふまえると、皮膚炎症の慢性化により好酸球が炎症局所に浸潤し、神経伸長を退縮させるため、AD 等の慢性皮膚炎症表皮では神経線維数が減少している可能性が示唆された。また、慢性皮膚炎では痒みが強いいため、表皮を掻き崩している患者が多い。この時に真皮内神経線維に起痒因子が直接接触れ、痒

みを引き起こしていることが考えられた。

総じて、本研究では AD 炎症局所における免疫細胞の分布を網羅的に検討し、ILC2 を標的とした Treg 及び IL-10 による好酸球性炎症の抑制機構を提言し、AD の新規治療法の開発に繋がると考える。また、好酸球と神経細胞が AD 炎症局所で相互に作用していることが示唆され、好酸球を標的とした新規痒み治療法の開発に繋がる大変意義のある結果である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Toyama S, Migita O, Fujino M, Kunieda T, Kosuga M, Fukuhara Y, Nagahara Y, Li X-K, Okuyaram T. New treatment method for mucopolysacchridosis type by liver transplantation. *Pediatrics International*. 61(2):180-189. 2019. 査読有
2. Arae K, Morita H, Unno H, Motomura K, Toyama S, Okada N, Ohno T, Tamari M, Orimo K, Mishima Y, Suto H, Okumura K, Sudo K, Miyazawa H, Tguchi H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Chitin promotes antigen-specific Th2 cell-mediated murine asthma through induction of IL-33-mediated IL-1 production by DCs. *Scientific Reports*. 6;8(1):11721.2018. 査読有
3. Emi-Sugie M, Toyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K. IL-33 induces functional CCR7 expression in human mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 142(4):1341-1344.2018. 査読有
4. Toyama S, Okada N, Matsuda A, Morita H, Saito H, Fujisawa T, Nakae S, Karasuyama H, Matsumoto K. Human eosinophils constitutively express a unique serine protease, PRSS33. *Allergol Int*. 66(3):463-671.2017. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Toyama S, Sayo-Fukami R, Ogawa H, Suga Y, Tominaga M, Takamori K. Possible roles of eosinophil-sensory nerve communication in atopic dermatitis. 第 118 回 日本皮膚科学会総会、名古屋、2019 年 6 月
2. 富永光俊、古宮栄利子、本田耕太郎、外山扇雅、鎌田弥生、高森建二 加齢皮膚におけるアロネーシスの発症メカニズムの解明と治療法の開発 第 15 回 加齢皮膚医学研究会 熊本 2019 年 3 月
3. 古宮栄利子、富永光俊、波多野良、伊藤匠、大塚春奈、本田耕太郎、外山扇雅、鎌田弥生、大沼圭、森本幾夫、高森建二 加齢皮膚で誘発される機械的かゆみ調節機構の解明 第 15 回 加齢皮膚医学研究会 熊本 2019 年 3 月
4. Toyama S, Matsuda H, Kosaka R, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Regulatory T cells modulate skin inflammation in atopic dermatitis model mouse. 日本皮膚研究科学会 第 42 回年次学術大会・総会 高知 2017 年 12 月
5. Kosaka R, Tominaga M, Takahashi N, Toyama S, Ogawa H, Nishiyama C, Takamori K. Involvement of spinal microglia in the pathogenesis of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis model mice. 9th World Congress on Itch, Wroclaw, 2017. Oct.

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。