

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08803

研究課題名(和文) アレルギー性皮膚炎の増悪化機構の解明

研究課題名(英文) Exacerbation mechanism of allergic skin inflammation

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Thymic Stromal Lymphopoietin (以下TSLP)は、ヒトとマウスモデルにおいて、アレルギー性皮膚炎を含むアレルギー性疾患の発症に重要であると多数報告があるが、増悪期の皮膚炎症におけるTSLPの詳細な役割は明らかではない。我々は、独自の皮膚炎増悪化マウスモデルと遺伝子改変マウスを駆使することで、TSLPが直接CD4T細胞の生存とIL-4産生を上昇させることで炎症増悪化を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は新規慢性皮膚炎症マウスモデルを構築し、アレルギー性皮膚炎の重症化メカニズムの一端を明らかにした。このメカニズムは、早期炎症応答による炎症環境の変化がさらなる炎症重症化を導くという新しい概念を提示する意義深い成果である。本研究成果は、皮膚慢性炎症根治治療のための研究基盤となる炎症増悪化メカニズムのさらなる解明に繋がることが期待できる社会的意義の大きい成果でもある。

研究成果の概要(英文)：Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) is an important mediator for the development of Th2-type allergic diseases, including atopic dermatitis (AD), in both human patients and murine models. However, the physiological role of TSLP signaling by CD4 T cells in the development of skin inflammation by chronic allergen exposure remains to be elucidated. To investigate the role of TSLP in the progression of allergic inflammation, we used Tslpr conditional KO mice and a newly developed skin chronic inflammation model that features repetitive allergen challenge. In this study, we demonstrated that TSLP on CD4 T cells is critical for development of chronic skin inflammation through enhancing IL-4 production and inhibiting cell death.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー性皮膚炎 TSLP Th2 IL-4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。アトピー性皮膚炎は、個々の患者でことなる環境要因と遺伝的要因が関与する多因子疾患である。そのため炎症発症機序、悪性化因子等の解明が難しく、その根治治療法は確立されていない。近年、アトピー性皮膚炎患者に対する抗 IL-4R α 鎖抗体の治療効果が実証され、アトピー性皮膚炎に対する免疫療法が注目されている。このような現状のもと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 TSLP に注目が集まっている。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. *Jl* 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。

抗原の反復刺激によって生じる炎症の増悪化は、浸潤した免疫細胞の活性化、血管新生、組織のリモデリングなどを惹起し、慢性炎症症状を引き起こす。上に述べたように TSLP はアレルギー性炎症関連因子であることが示唆されるものの、一方で炎症の増悪時における TSLP の役割については解明されていない。未解明な点として、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 TSLP 標的細胞が存在している可能性がある。急性炎症の開始には TSLP による樹状細胞の活性化が重要であるが (Bell, Kitajima et al. *Nat Immunol* 2013 など)、しかし炎症が始まると平常時には存在しない Th2 細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球などの細胞浸潤が観察される。本研究ではとくに T 細胞に着目する。それは申請者は試験管内において TSLP と TCR 刺激を同時に Th2 細胞に作用させると、Th2 サイトカイン産生の亢進、細胞死の抑制、Th2 サイトカイン (IL-4) を介した TSLP レセプターの発現上昇を誘導することを報告した (Kitajima et al., *Eur J Immunol* 2011)。この報告では TSLP と IL-4 が Th2 細胞の活性化増強サイクルを形成することを提唱しており、生体内でも同様の炎症増強サイクルが生じている可能性がある。

申請者はこれまで、アレルギー性炎症関連因子 TSLP による皮膚炎症の開始メカニズムについて明らかにしてきた (Kitajima et al., *Eur J Immunol* 2011, Bell, Kitajima et al. *Nat Immunol* 2013, Kitajima, Ziegler. *Jl* 2013)。その研究活動の中で、皮膚炎の増悪化における TSLP 機能の未解明な点を見だし、本研究の着想をえた。また、本研究課題に必要なとされる新規の皮膚炎症マウスモデルをすでに構築している。

2. 研究の目的

アレルギー性皮膚疾患の発症開始には、TSLP が重要であると多数報告がある。しかし、TSLP の炎症の増悪化因子としての役割は十分に解明されていない。本研究は、アレルギー性皮膚炎症の増悪化における TSLP の役割を解明し、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

本研究では、皮膚炎の増悪化における TSLP の役割を明らかとすることを目的として、下記の研究項目にとりくんだ。

(1) 皮膚炎の増悪化時における TSLP の標的細胞を同定・解析

申請者が構築した新規皮膚炎症増悪化モデルと Ziegler 博士より提供していただいた条件付き TSLP レセプター欠損マウスによって作製した T 細胞のみ TSLP レセプターを欠損するマウスの皮膚炎を増悪化させ、耳介の厚さを経時的に計測、耳介浸潤細胞をフローサイトメトリーに 1 細胞レベルの解析、炎症組織の免疫染色による解析、組織中のサイトカイン量の測定などによって炎症病態を評価する。

炎症増悪化中に TSLP レセプターを欠損させるために、タモキシフェン投与によって TSLP レセプターを欠損するマウスを用いた。このマウスでは、タモキシフェンを投与しなければ、野生型マウスと同等に炎症応答が誘導される。このマウスに免疫 5 日後に所属リンパ節 CD4T 細胞を分離し、全身的 TSLP レセプター欠損マウスに移入し、ハプテンを曝露した。2 回目の曝露後にタモキシフェンを投与することで、炎症増悪化の最中に TSLP レセプターを欠損させた。

炎症増悪化過程における CD4T 細胞に対する TSLP の役割を調べるために、免疫した野生型マウスと T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスの所属リンパ節から CD4T 細胞を分離して 1 対 1 で混合し、リンパ球が存在しない Rag2 欠損マウスに移入した。このマウスにハプテンを反

復曝露することによって、TSLP レセプターの有無による CD4T 細胞競合解析をおこなった。TSLP が標的細胞に作用することによって生じる病因性について解析するために、Th2 サイトカイン産生 (IL-4、IL-5、IL-13)、細胞増殖 (BrdU、Ki-67)、細胞死 (AnnexinV)、TSLP レセプターの発現量の観点から解析をおこなう。IL-4 産生は、理研・久保允人先生より供与された IL-4 レポーターマウスを掛け合わせて解析する。また IL-4 の役割を解析するために、IL-4 欠損マウスを使用する。

(2) TSLP 機能制御による皮膚炎悪化への影響を評価

同定した TSLP 標的細胞が炎症の増悪化に関わっていること、また治療標的としての可能性を評価するために、TSLP シグナルやエフェクター分子のシグナルに關与する分子機能を阻害し、炎症の増悪化が抑制されるかどうかを検討する。TSLP シグナルには JAK1 と JAK2 の活性化、IL-4 シグナルには JAK1 と JAK3 の活性化が重要であることから、JAK 阻害剤の使用を検討する。阻害剤は、まず試験管内において、より下流のシグナルを抑制できるかどうかを確認する。その後、炎症増悪化モデルにおいて、チャレンジ前とチャレンジ 1 日後に塗布することで炎症抑制効果の評価をおこなう。

4. 研究成果

(1) T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスでは皮膚炎症増悪化が抑制される。

申請者が構築したハプテン反復曝露による皮膚炎の増悪化モデルを用いて T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスを解析すると、1 回目の曝露 24 時間後の皮膚の肥厚は野生型マウスと比べて有意な差はなかったが、2 回目の曝露以降による皮膚肥厚の増大が有意に抑制されることが明らかとなかった。また 3 回曝露 24 時間後の組織の HE 染色像、フローサイトメトリー解析や炎症組織の染色による炎症性免疫細胞 (好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞など) の数の減少、組織中の Th2 サイトカイン量 (IL-4、IL-5、IL-13) が、T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスにおいて全身的 TSLP レセプター欠損マウスとほぼ同等に減少していた。一方、より高い濃度のハプテンを使用した急性皮膚炎症モデルにおいて T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスでは、曝露 24 時間後の皮膚の肥厚、炎症性免疫細胞数、Th2 サイトカイン濃度の減少は観察されなかったが、全身的 TSLP レセプター欠損マウスは有意な減少が観察された。また急性炎症において重要な樹状細胞のリンパ節への遊走能、活性化の指標となる共刺激分子 CD86 の発現に有意な差はなかった。これらの結果は、T 細胞上の TSLP レセプターがこの皮膚炎症の 2 回目曝露以降の炎症増悪化に重要な役割をもっていることを示している。

(2) CD4T 細胞上の TSLP レセプターを炎症増悪化中に欠損させると炎症増悪化を抑制できる。

申請者はさらに T 細胞上の TSLP レセプターが炎症の増悪化に重要である確証を与えるために、タモキシフェン投与によって TSLP レセプターを欠損するマウスを用いた。炎症増悪化の最中に CD4T 細胞特異的に TSLP レセプターを欠損させた結果、皮膚の肥厚、炎症性免疫細胞の浸潤が有意に抑制された。この結果は、CD4T 細胞上の TSLP レセプター発現はこの炎症増悪化において中心的な役割をしていることを示しており、これまで知られていなかった皮膚炎症増悪化過程における CD4T 細胞上の TSLP レセプターの重要性を示唆している。

(3) 炎症増悪化中の TSLP は、CD4T 細胞の増殖よりも細胞死を抑制する。

炎症増悪化過程において、CD4T 細胞の細胞死における TSLP の役割を調べるために、2 種類の CD4T 細胞を Rag2 欠損マウスに移入し、炎症増悪化を誘導する CD4T 細胞の競合解析をおこなった。その結果、TSLP レセプターを欠損する CD4T 細胞が、野生型 CD4T 細胞に比べて有意に細胞割合が減少し、一方で AnnexinV 陽性細胞割合が増加していた。また炎症増悪化過程の CD4T 細胞の増殖に対する TSLP の役割を調べるために、炎症増悪化を誘導した T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスを解析した。その結果、T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスの BrdU 陽性 CD4T 細胞割合と Ki-67 陽性 CD4T 細胞割合は、野生型マウスと比較して有意な差は認められなかった。これらの結果は炎症増悪化過程において TSLP が CD4T 細胞の細胞増殖よりも細胞死の抑制に關与することを示している。

(4) 炎症増悪化中の TSLP は、直接 CD4T 細胞の Th2 サイトカイン産生を増強する。

炎症増悪化過程において、TSLP による CD4T 細胞の IL-4 産生を調べるために、IL-4 レポーターマウスと T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスを掛け合わせたマウスを解析した。その結果、炎症増悪化誘導後の T 細胞特異的 TSLP レセプター欠損マウスの耳介浸潤 CD4T 細胞において、全身的 TSLP レセプター欠損マウスとほぼ同等に、IL-4 産生細胞の割合と数、IL-4 産生量が減少していた。また細胞内染色による解析から、IL-5 と IL-13 産生細胞割合も同様に減少していることが明らかとなった。これらの結果は、TSLP が直接 CD4T 細胞の Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) 産生を増強することを示している。

(5) 炎症増悪化中の TSLP は、IL-4 を介して CD4T 細胞の TSLP レセプターの発現を増強する。

はじめに IL-4 欠損マウスにおける炎症の増悪化を解析したところ、TSLP レセプター欠損マウスと同等に皮膚の肥厚や炎症性細胞の耳介への浸潤が抑制された。また耳介浸潤 CD4T 細胞の

TSLP レセプターの発現は、野生型マウスの CD4T 細胞に比べて有意に減少していた。IL-4 による CD4T 細胞上の TSLP レセプター発現の減少を確認するために、Rag 欠損マウスに野生型 CD4T 細胞もしくは IL-4 欠損 CD4T 細胞を移入した後、皮膚炎症の増悪化を誘導した。その結果、野生型 CD4T 細胞と比較して、IL-4 欠損 CD4T 細胞の TSLP レセプターの発現は、耳介 CD4T 細胞では減少していたのに対し、脾臓組織の CD4T 細胞では減少していなかった。次に CD4T 細胞から産生される IL-4 の役割を確認するために、免疫マウス由来 CD4T 細胞を移入した IL-4 欠損マウスに炎症の増悪化を誘導した。その結果、溶媒を投与した IL-4 欠損マウスと比べて、野生型 CD4T 細胞を移入した IL-4 欠損マウスでは炎症増悪化が誘導され、ホストである IL-4 欠損マウス由来 CD4T 細胞の TSLP レセプターの発現も有意に上昇した。これらの結果は、炎症組織に存在する IL-4 産生 CD4T 細胞が、同組織に存在する CD4T 細胞の TSLP レセプターの発現を制御していることを示している。

(6) 炎症増悪化は、JAK1/2 阻害剤によって抑制できる。

TSLP シグナルは JAK1 と JAK2 の活性化、IL-4 シグナルは JAK1 と JAK3 の活性化が重要であることから、市販の JAK1/2 阻害剤の使用することにした。この JAK1/2 阻害剤は、試験管内の CD4T 細胞において、TSLP によって誘導される STAT5 のリン酸化を抑制することができた。また皮膚炎症の増悪化モデルに JAK1/2 阻害剤を使用したところ、溶媒に比べて有意に皮膚の肥厚、組織 IL-4 量、IL-4 産生 CD4T 細胞数、CD4T 細胞の TSLP レセプター発現を減少させた。この結果は、TSLP シグナルや IL-4 シグナルの下流に存在する JAK1/2 の活性化を阻害する阻害剤が炎症の増悪化の抑制に有効であることを示唆している。

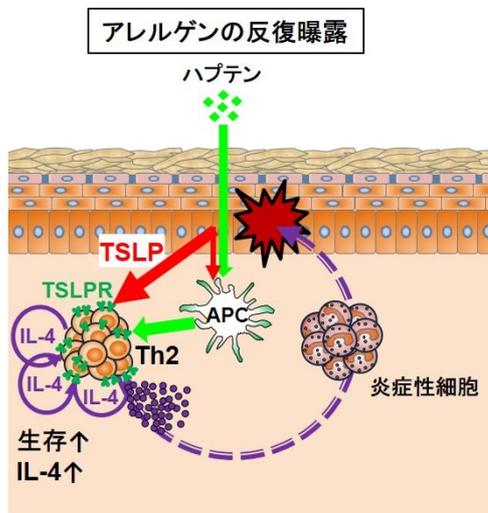


図 まとめ

アレルゲンの反復曝露によって、TSLP が直接 CD4T 細胞の生存と IL-4 産生を亢進することによって皮膚炎症を増悪化するという炎症重症化機構の新たな一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1. Kimura, A., Kitajima, M., Nishida, K., Serada, S., Fujimoto, M., Naka, T., Fuji-Kuriyama, Y., Ito, T., Handa, H., Tanaka, T, Yoshimura, A., Suzuki, H.	4. 巻 215
2. 論文標題 NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting I B- degradation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of experimental medicine	6. 最初と最後の頁 2197-2200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20172024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitajima Masayuki, Kimura Akihiro, Suzuki Harumi	4. 巻 200
2. 論文標題 Cutting Edge: Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1701389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muro Ryunosuke, Nitta Takeshi, Kitajima Masayuki, Okada Toshiyuki, Suzuki Harumi	4. 巻 496
2. 論文標題 Rasa13-mediated T cell survival is essential for inflammatory responses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 25 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama T, Suzuki T, Chang M O, Kitajima M, Takaku H	4. 巻 24
2. 論文標題 Baculovirus directly activates murine NK cells via TLR9	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 175 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cgt.2017.2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima Masayuki, Kubo Masato, Ziegler Steven F., Suzuki Harumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Critical Role of TSLP Receptor on CD4 T Cells for Exacerbation of Skin Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900758	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 M Kitajima, SF Ziegler, H Suzuki
2. 発表標題 The Pathogenesis of TSLP-responded Th2 cells in exacerbation of skin inflammation.
3. 学会等名 The 47th Annual meeting of the Japanese society for Immunology, Fukuoka, Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Kitajima, SF Ziegler, H Suzuki
2. 発表標題 Role of TSLPR on CD4 T cells in exacerbation of skin inflammation.
3. 学会等名 The 46th Annual meeting of the Japanese society for Immunology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 A Kimura, M Kitajima, H Suzuki
2. 発表標題 The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading I B-
3. 学会等名 The 46th Annual meeting of the Japanese society for Immunology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 A Kimura, M Kitajima, H Suzuki
2. 発表標題 The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading.
3. 学会等名 The Cytokines (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----