

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10230

研究課題名(和文)NK細胞活性化によるアトピー性皮膚炎の新規治療の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment for atopic dermatitis by activating NK cells

研究代表者

岸 史子(Kishi, Chikako)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60402707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスに寄生虫を感染させ、皮膚炎の発症の抑制、症状の軽快が生じるメカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎の有効な治療法に繋げることを目標として研究を行った。NC/Ngaマウスにマラリアを感染させることにより、皮膚局所でNK細胞が増加し、湿疹病変が改善することを確認した。また、抗アシアロGM1抗体によってNK細胞の除去実験を行ったところ、マラリアによる皮膚の改善が見られなかった。次に、マラリア感染NC/Ngaマウスの脾臓よりNK細胞を分離し、湿疹を有するマラリア非感染NC/Ngaマウスに経静脈的に投与し皮膚炎の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果によって、十分に明らかになっていなかったアトピー性皮膚炎発症機序の一部にNK細胞が関与することが示唆された。皮膚炎の発症の抑制、症状の軽快が生じるメカニズムを実験的に解明することができ、今後、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患の有効な治療法に繋がることを期待される。また、今回の研究成果は、アトピー性皮膚炎の衛星仮説の機序の解明にもつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of parasite infection of NC/Nga mice, which are models of atopic dermatitis, in order to elucidate the mechanism of suppression of the onset of dermatitis and improvement of symptoms, and to develop an effective treatment for atopic dermatitis. Infection of NC/Nga mice with malaria resulted in an increase in NK cells locally in the skin and improved eczema lesions. The removal of NK cells by anti-acyaro-GM1 antibody did not improve the malaria-induced skin lesion. Next, NK cells were isolated from the spleen of malaria-infected NC/Nga mice and administered transvenously to malaria-free NC/Nga mice with eczema to investigate dermatitis.

研究分野：皮膚科

キーワード：アトピー性皮膚炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、世界的にアレルギー疾患が増加している。アレルギー疾患は新興国よりも先進国において多くみられ、特にヘルパーT細胞の内、Th2への免疫的偏向がアレルギー疾患の発症や増悪に重要な役割を果たしていることが広く知られている。その一方、寄生虫感染がアレルギー疾患を抑制することが疫学調査で明らかとなっている。これらの現象を説明し得るものとして「衛生仮説」がある。この仮説は、幼少期の感染性物質の曝露がアレルギー疾患の発症率を低下させるというものである。実験的にも共生微生物や寄生虫感染はアレルギー疾患の症状を抑制することが証明されており、総じて寄生虫感染はTh2への偏向を抑制すると予想される。

アトピー性皮膚炎の発症には、フィラグリン遺伝子異常などの遺伝的背景とダニ、埃などの環境ストレスによる複合的な関与が考えられている。今回研究で用いるNC/Ngaマウスはアトピー性皮膚炎モデルマウスとして知られており、ダニ、埃の存在する環境下(conventional)では皮膚炎を自然発症するがspecific pathogen free (SPF) 環境下では皮膚炎を発症しないという特徴をもつ(Int Immunol 1997;9:461)。NC/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎の研究は、Th2リンパ球を中心とした免疫学的解析(J Immunol 2001;167:5955)および種々の薬剤を投与し、皮膚炎の改善を検討した研究が中心であり(J Dermatol Sci 2015;79:30, Clin Exp Allergy 2007;37:296)、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いての寄生虫感染に関する研究はいまだ十分に行われていないのが実状である。

寄生虫感染の一種であるマラリアは生命を脅かす病であり、現在でも毎年2億人が感染している。マラリア原虫は宿主の免疫機構から巧妙に逃れ、宿主の免疫抑制を引き起こすことが知られている。この免疫抑制機序として、Toll様受容体9、制御性T細胞、NK細胞の関与が示されている。マラリアの免疫に対する研究は脳マラリアを中心に行われている。制御性T細胞が活性化されることでマラリア感染が増悪する(Nat Med 2004;10:29)、あるいはマラリア感染に伴う制御性T細胞の活性化にはToll like receptor 9が必要であることが報告されている(J Immunol 2008;180:2496)。このようにマラリア感染により宿主の免疫状態が変化することは広く知られており、アトピー性皮膚炎モデルマウスにマラリアを感染させた場合に免疫学的な機序により皮膚炎が改善することが予想される。

これまでに寄生虫感染を通して実験的な免疫修飾を行った報告はいくつかあるが、現在までにマラリア原虫をアトピー性皮膚炎モデル動物に感染させて免疫修飾の影響を検討した報告はなかった。そこで、私たちはマラリア原虫感染がアトピー性皮膚炎モデル動物であるNC/Ngaマウスの皮膚症状にどのような影響を与えるかを研究した。その結果、マラリア感染によって皮膚炎が軽快することを見出した(Allergy 2014;69:1412)。さらに、皮膚においてNatural Killer (NK)細胞が増加していることが示唆された。

アトピー性皮膚炎患者においては末梢組織および血液中のNK細胞の減少、NK細胞からのIFN- γ の産生低下が言われており、NK細胞の研究によりアトピー性皮膚炎患者の免疫機構におけるTh2への偏位や、易感染性を説明できる可能性がある。これまでにNC/NgaマウスにおけるNK細胞の役割を詳細に調べた報告はなく、SPF condition NC/Ngaマウスとconventional condition NC/NgaマウスにおけるNK細胞の分布や機能を調べることは皮膚炎の発症因子の検討に繋がると考えた。

2. 研究の目的

マラリア原虫感染による、アトピー性皮膚炎モデル動物であるNC/Ngaマウスの皮膚症状の改善機序を解明し、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患の有効な治療法に繋げることを目標とする。特に、NK細胞の役割に焦点を当て研究を行う。

3. 研究の方法

マラリア感染による皮膚炎、免疫反応の変化の観察

アトピー素因のあるモデルマウス(NC/Nga マウス) に弱毒株のマウスマラリア (Plasmodium berghei XAT) を腹腔内投与し感染させ、経時的にマラリア感染赤血球数をカウントし感染状況を確認する。また、皮膚炎の臨床的スコアリングを行うとともに、皮膚病理組織の免疫組織学的検討および皮膚炎部より mRNA を抽出しリアルタイム PCR でサイトカインや転写因子の発現を検討する。

NK 細胞除去実験

NK 細胞の細胞膜表面に発現する糖脂質のアシアロ GM1 を認識する抗アシアロ GM1 抗体を NC/Nga マウスに投与し、NK 細胞の除去実験を行う。NK 細胞を除去した後にマラリアを感染させ、マラリアによる皮疹の改善が見られないことを確認する。

NK 細胞移入実験

マラリア感染 conventional condition NC/Nga マウスの脾臓より Miltenyi Biotec 社の MACS システム (細胞分離用磁気ビーズ) を用いて NK 細胞を分離する。分離した細胞を湿疹を有するマラリア非感染 conventional condition NC/Nga マウスに経静脈的に投与し、皮膚炎の臨床的スコアリング、皮膚病理組織の免疫組織学的検討および免疫反応の検討を行う。これらの免疫学的検討をマラリア感染前後で比較することにより、NK 細胞の免疫学的作用のうち皮膚炎の改善に寄与している因子を探求する。

マラリア非感染 conventional condition NC/Nga マウス、あるいはマラリア非感染・感染 SPF NC/Nga マウスから NK 細胞を分離し、湿疹を有する conventional condition NC/Nga マウスに経静脈的に投与、移入する。その後、皮膚炎の臨床的スコアリング、皮膚病理組織の免疫組織学的検討および免疫反応の検討を行う。これらの結果に差がみられれば、移入する NK 細胞のドナーの差、つまり NK 細胞プロファイルによる影響が考えられる。

NK 細胞のプロファイルの研究

上記で得られた NK 細胞を、表面マーカーの観点、あるいは in vitro で刺激を行うことで産生されるサイトカイン (IFN- γ 、IL-5、IL-13) を測定することで NK1、NK2、regulatory NK 細胞のいずれかを同定する。これにより、どのプロファイルの NK 細胞が湿疹病変の改善に深く関与しているか明らかにすることができる。

4. 研究成果

マラリア感染により、湿疹病変が軽快することを確認した。さらに、末梢血、脾臓、リンパ節から抽出した単核球のフローサイトメトリーによる分析、および培養細胞上清の検討や脾臓から抽出した mRNA のリアルタイム PCR 解析により NK 細胞が皮疹の改善に寄与していることを見出した。

さらに、NC/Nga マウスにマラリアを感染させることにより、皮膚局所で NK 細胞が増加し、湿疹病変が改善することを確認した。また、抗アシアロ GM1 抗体を NC/Nga マウスに投与し、NK 細胞の除去実験を行ったところ、NK 細胞を除去した後にマラリアを感染させても、マラリアによる皮疹の改善が見られなかった。次に、マラリア感染 conventional condition NC/Nga マウスの脾臓より MACS システム (細胞分離用磁気ビーズ) を用いて NK 細胞を分離した。分離した細胞を湿疹を有するマラリア非感染 conventional condition NC/Nga マウスに経静脈的に投与したところ、皮膚炎の臨床的スコアリングに変化がみられる傾向が得られた。皮膚病理組織の免疫組織

学的検討の結果でも、マラリア感染 conventional condition NC/Nga マウスの NK 細胞の移入によって、炎症細胞浸潤数や細胞の種類に変化がみられる傾向であった。さらに、マラリア非感染 conventional condition NC/Nga マウス、あるいはマラリア非感染・感染 SPF NC/Nga マウスから NK 細胞を分離し、湿疹を有する conventional condition NC/Nga マウスに経静脈的に投与、移入したところ、皮膚炎の臨床的スコアリングや皮膚病理組織所見にて変化が得られる傾向がみられており、さらに詳細に検討を行っている。また、得られた NK 細胞の表面マーカーや in vitro で刺激を行うことで産生されるサイトカイン(IFN- γ 、IL-5、IL-13)を測定し、治療効果に寄与する NK 細胞の特徴を検討している。

本研究においてアトピー性皮膚炎モデルマウス (NC/Nga) にマウスマラリア原虫 (Pb XAT) を感染させることで、皮膚炎が改善する機序に NK 細胞が関与し、そのメカニズムの一部を明らかにしつつある。今後、更なる解析によって、アトピー性皮膚炎の改善に NK 細胞が重要な役割を果たしていることやその機序を解明することで、今後のアトピー性皮膚炎の新規治療の開発に役立つ可能性が示唆された。また、今回の研究成果は、アトピー性皮膚炎の衛星仮説の機序の解明にもつながる成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	天野 博雄 (Amano Hiroo) (70302487)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	茂木 精一郎 (Motegi Sei-ichiro) (20420185)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	