

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08268

研究課題名(和文) 自然リンパ球とTLRに着目したアトピー性皮膚炎におけるバリア機能異常の制御

研究課題名(英文) Regulation of epithelial barrier by innate lymphoid cell and TLR

研究代表者

杉田 和成 (Sugita, Kazunari)

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40412647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ILC2はヒト末梢血中の希少細胞であるため、セルソーターを用いて、細胞を分取し、さらに本研究に用いるため、培養、増殖させた。ILC2とケラチノサイトの共培養において、ILC2存在下では、皮膚バリア機能が抑制することを経表皮電気抵抗やFITC-dextranを用いた細胞間隙透過性の評価によって確認した。その結果、TLR刺激下では、ヒトケラチノサイトのバリア機能が亢進するものの、自然リンパ球(ILC2)存在下では、その亢進が低下した。すなわち、TLR刺激によって、ケラチノサイトあるいは、ILC2のいずれか、あるいは両者を介して、皮膚バリア機能が修飾されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILCが自然免疫に関与するTLRやTLRリガンドとの関連については明らかにされていなかった。本研究はアレルギー炎症のイニシエーターエフェクターであるILCのバリアを制御する機構を解明するとともに、TLRを介したILCによるバリア制御機構の一端を明らかにした点が意義のあることであると考えられる。本研究は、ヒト免疫学を中心に形態学的な側面からも、タイトジャンクションの詳細な変化を明らかにした点も学術的意義があると思われる。さらに、本研究で明らかになったバリア機能の制御は、アレルギー性皮膚疾患だけでなく、ILCが関与する様々な疾患の病態を明らかにする手がかりとなる点で社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) have been shown to be involved in allergic diseases, such as asthma and atopic dermatitis. We explored the role of ILC2s in the regulation of the epithelial barrier by employing keratinocytes. Cocultures of epithelial cells and ILC2s were used to measure barrier integrity and determine transepithelial resistance and paracellular macromolecule passage. Coculture of keratinocytes with ILC2s revealed a significant decrease in transepithelial resistance. However, addition of TLR (Toll-like receptor) ligand in ILC2 cocultures with keratinocytes restored the barrier function. These data demonstrate that ILC2 and TLR may play a role in keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：バリア学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然リンパ球 (innate lymphoid cell: ILC) は、肺、腸管、皮膚など上皮直下に局在している。ILC は希少細胞であるが、アレルゲンなどの外的刺激や異物にすみやかに反応し、自然免疫応答に関与している。近年、ILC はアレルギーや免疫疾患に関わっていることが判明している。免疫系は自然免疫と獲得免疫の大きく 2 つに分類される。自然免疫は樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫細胞が、侵入してきた抗原を取り込む非特異的な免疫応答であるのに対し、獲得免疫は T リンパ球、B リンパ球などの獲得免疫細胞が抗原を認識する特異的な免疫応答である。ILC は、抗原特異的な認識機構をもたないため、自然免疫に関わる細胞である。加えて、ILC は抗原を認識する受容体を持つことなく、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する。ILC はサイトカインの産生能により 3 つのグループに分類される。1 型自然リンパ球は IFN- γ を、2 型自然リンパ球 (ILC2) は IL-5 や IL-13 を、3 型自然リンパ球は IL-17A や IL-22 をそれぞれ産生する。ILC2 は、血球系細胞の中でも希少な細胞である。ILC2 は、気管支喘息やアトピー性皮膚炎の炎症局所で増加していることが確認されており、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。そのため、ILC2 をいかに制御できるかがアトピー性皮膚炎などのアレルギー-炎症の病態の理解に重要と考えられる。しかしながら、アトピー性皮膚炎において、自然免疫を担う Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) に着目して自然リンパ球をいかに制御するかについては、不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ILC2 の同定を行い (図 1)、複数のセルラインの作成を試み、TLR 刺激下でのバリア機能について評価することを目的とした。

3. 研究の方法

ILC は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞などに発現する、いわゆる lineage マーカーが陰性で、かつ IL-7R が陽性である。末梢血単核球を lineage マーカーと IL-7R、CRTH2、c-kit、および NKp44 で染色し、ILC を同定する。ついで、ILC2 を分離し、セルラインを作成した。さらに、ヒトケラチノサイトと ILC2 を共培養し、ILC2 によるヒトケラチノサイトのバリア機能の詳細を明らかにする。その際に、TLR 刺激下での、バリア機能の評価する。さらに ILC2 における、TLR の発現レベルについても、フローサイトメトリやリアルタイム PCR 法で明らかにした。バリア機能の評価法として、経上皮電気抵抗や FITC デキストランによる評価指標も用いて検証した。

4. 研究成果

ILC2 はヒト末梢血中の希少細胞であるため、セルソーターを用いて、細胞を分取し、さらに本研究に用いるため、培養、増殖させた。ILC2 とケラチノサイトの共培養において、ILC2 存在下では、皮膚バリア機能が抑制することを経表皮電気抵抗や FITC-dextran を用いた細胞間隙透過性の評価 (図 2) によって確認した。その結果、TLR 刺激下では、ヒトケラチノサイトのバリア機能が亢進するものの、自然リンパ球 (ILC2) 存在下では、その亢進が低下した。すなわち、TLR 刺激によって、ケラチノサイトあるいは、ILC2 のいずれか、あるいは両者を介して、皮膚バリア機能が修飾されることが示唆された。

ヒトILC2の分離

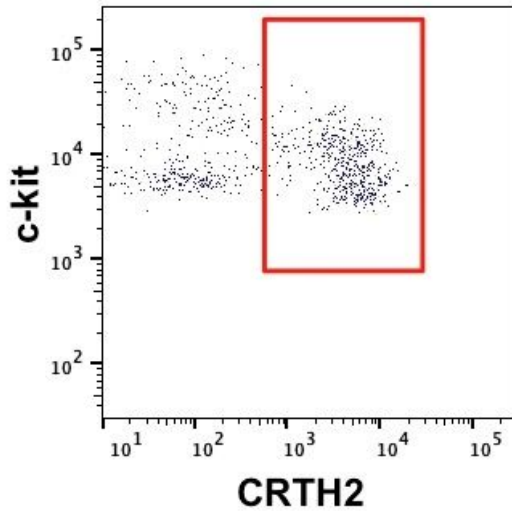


図1 ヒト ILC2 の同定と分離

ILC2 は希少細胞のため、末梢血中からヒト ILC2 を分離した。さらに、分離後、ILC2 を増殖させ、セルラインとして実験に用いた。

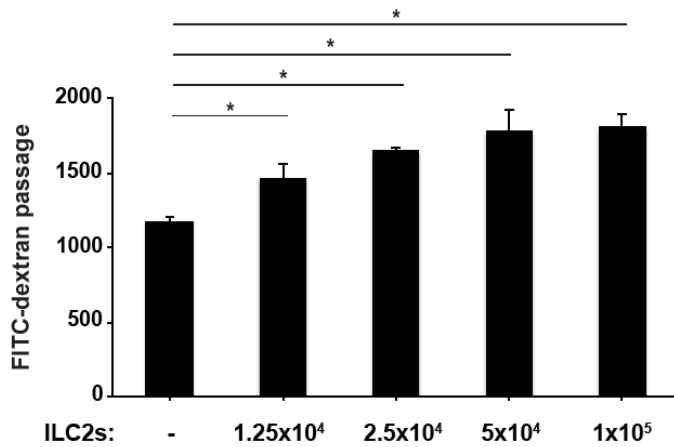


図2 FITC-dextran を用いたバリア機能評価

バリア機能評価方法として、経上皮電気抵抗値を用いて、TLR との関連について評価したが、図2のように、FITC デキストランを用いた評価方法も使用した。図は ILC2 の数が増えるとともに、ヒトケラチノサイトのバリア機能が低下することを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugita Kazunari, Altunbulakli Can, Morita Hideaki, Sugita Atsuko, Kubo Terufumi, Kimura Ryoko, Goto Hiroyuki, Yamamoto Osamu, R?ckert Beate, Akdis M?beccel, Akdis Cezmi A.	4. 巻 74
2. 論文標題 Human type 2 innate lymphoid cells disrupt skin keratinocyte tight junction barrier by IL 13	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2534 ~ 2537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.13935	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
1. 著者名 Sugita Kazunari, Soyka Michael B., Wawrzyniak Paulina, Rinaldi Arturo O., Mitamura Yasutaka, Akdis M?beccel, Akdis Cezmi A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Outside-in hypothesis revisited	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Allergy, Asthma & Immunology	6. 最初と最後の頁 517 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anai.2020.05.016	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
1. 著者名 Sugita Kazunari, Akdis Cezmi A.	4. 巻 69
2. 論文標題 Recent developments and advances in atopic dermatitis and food allergy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 204 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.08.013	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
1. 著者名 Sugita Kazunari, Kabashima Kenji	4. 巻 107
2. 論文標題 Tight junctions in the development of asthma, chronic rhinosinusitis, atopic dermatitis, eosinophilic esophagitis, and inflammatory bowel diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Leukocyte Biology	6. 最初と最後の頁 749 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JLB.5MR0120-230R	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazunari Sugita, Can Altunbulakli, Hideaki Morita, Terufumi Kubo, Beate Ruckert, Mubeccel Akdis, Cezmi A. Akdis
2. 発表標題 Human type 2 innate lymphoid cells disrupt skin keratinocyte tight junction barrier by IL-13
3. 学会等名 13th World Immune Regulation Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田和成
2. 発表標題 アレルギーと免疫治療
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazunari Sugita
2. 発表標題 Type 2 innate lymphoid cells disrupt epithelial tight junction barrier by IL-13
3. 学会等名 World Allergy Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------