

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08772

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患における皮膚浸潤T細胞のMDR1発現とステロイド抵抗性

研究課題名(英文)Corticosteroid resistance by the skin infiltrating T cells in inflammatory skin disorders

研究代表者

藤山 俊晴 (FUJIYAMA, Toshiharu)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60402301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬などの炎症性皮膚疾患の治療においては、ステロイド外用療法が行われており、一般的には高い有効性を示す。しかし、特に長期にわたってステロイドを使用し続けている一部の症例では、さらなる外用療法を行っても十分な効果が得られず、治療抵抗性を示し、その原因は治療アドヒアランスの低下によるものと考えられていた。

本研究では、皮膚の炎症部位に浸潤し、重要な役割を果たしているT細胞の一部が、ステロイド抵抗性に関連するとされるMDR1を発現しており、炎症性皮膚疾患においてもT細胞のMDR1発現がステロイド外用剤に対する抵抗性と関連す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

近年では、ステロイド剤に代わる炎症性皮膚疾患の治療薬が次々と開発され使用できるようになってきた。それらの薬剤の多くは高い有効性を示す一方で非常に高価であることが多く、すべての患者に使用できるわけではない。従って、今後もステロイド外用剤は炎症性皮膚疾患治療の基礎として位置づけられる。患者のアドヒアランス低下によって、十分な薬を外用しないという以外の理由でステロイド外用剤に抵抗性を示す機序が示されたことで、今後はステロイド抵抗性の有無が、新規の薬剤の使用を決定する根拠として考慮されるようになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In some inflammatory skin disorders, including atopic dermatitis or psoriasis, topical corticosteroid applications are frequently used as a first line treatment. Although it is usually very effective, in some cases, especially in the cases which have very long history of the treatment, we can't achieve good response and the inflammation is resistant to corticosteroid treatment. This phenomenon has been explained by the impaired adherence of the patients.

The results of our study indicated that some T cells, which play important role in the pathogenesis of various inflammatory disorders express MDR1. Since MDR1 is reported to be associated with corticosteroid resistance in other diseases, MDR1 expression by skin infiltrating T cells possibly associated with the resistance to topical corticosteroid treatments.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：炎症性皮膚疾患 アトピー性皮膚炎 乾癬 ステロイド抵抗性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) ステロイド外用剤による治療とその不応例

感染症を除く炎症性皮膚疾患の治療には、副腎皮質ステロイド(以下ステロイド)の外用剤や内服薬・注射薬などが広く用いられている。ステロイドはリンパ球や好酸球の活動を抑制し、多くの疾患の治療に非常に高い有効性を示すが、症例によっては十分な効果が得られなかったり、使用中に効果が減弱したように感じられたりすることも多い。

たとえば、アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬などの慢性的な経過を示す炎症性皮膚疾患においては、ステロイド外用剤が長期にわたって使用される。このようなケースで、ステロイド外用治療を開始した時や、中断して再開した時には高い有効性を実感できるが、しばらく継続して残存している皮疹に外用剤を用いても、十分な効果や満足度が得られないことがしばしばある。このような現象は、タキフィラキシーと呼ばれたりする。しかし、その分子生物学的な機序はほとんど解明されておらず、その存在すら疑問視されることもある。実際に外用剤の効果が弱くなる理由としては、長期にわたって治療することで患者が精神的に疲労してしまったり、長時間を外用療法に割くことで、生活の質が低下してしまったりして、治療に対するアドヒアランスが低下することで、当初のようにしっかりと外用しなくなってしまう、効果が出ないと説明されることも多い。実際にそれを示唆する、研究報告も存在する。

しかし患者によっては、しっかりと外用を続けているにもかかわらず十分な効果が得られないと訴え、実際に外用剤の処方量も当初と変わらないことも多い。このようなケースでは、ステロイド外用療法の効果の低下をアドヒアランスのみで十分に説明することは困難である。

#### (2) アドヒアランス低下以外の可能性

MDR1 (Multiple drug resistance 1) は ABC トランスポーター (ATP Binding Cassette transporter) に属する分子で、P 糖タンパクや CD243 とも呼ばれている。ABC トランスポーターは ATP のエネルギーを用いて物質の輸送を行う膜輸送体の一群であり、生体膜を通して様々な基質、脂質、糖、ビタミン、その他の代謝に関わる物質、外来の薬物、イオン、ペプチド、タンパク質などを輸送する。中でも、MDR1 は最も詳しく研究されており、かつてはがんの化学療法耐性の原因として注目され研究されてきた。広い範囲の脂溶性の薬物、異物を基質として細胞外に排出する役割が知られており、副腎皮質ステロイドもその基質となりうることから、ステロイド抵抗性に関わる分子としても注目されている。

多くの炎症性皮膚疾患の病態においては、リンパ球、特に T 細胞が病変部の皮膚組織に多く浸潤しており、これらが重要な役割を担うことが示されている。一方で、近年の研究では、T 細胞の一部は MDR1 を発現しており、ステロイド抵抗性に関与すると報告されている。

私たちは、小さな皮膚生検組織の中から、皮膚に浸潤した T 細胞を取り出して培養増幅する技術を確立させ、様々な炎症性皮膚疾患における、皮膚浸潤 T 細胞の機能や形質を調べてきた。この技術を用いて皮膚浸潤 T 細胞の MDR1 発現とその機能を解析することで、アドヒアランス低下以外のステロイド外用剤抵抗性のメカニズムを解明できる可能性があると考えて、本研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究では代表的な炎症性皮膚疾患である乾癬およびアトピー性皮膚炎を対象として、その皮膚浸潤 T 細胞における MDR1 の発現を確認し、この T 細胞の MDR1 発現と、疾患の治療におけるステロイド抵抗性との関係性を明らかにすることを目的とした。この機序を明らかにすることで、タキシフィラキシーの分子生物学的な機序の 1 つを示すことができる。その機序を明らかにすることで、今後の炎症性皮膚疾患に対する外用療法の治療戦略にも一石を投じることになると考えた。

### 3. 研究の方法

私たちは、これまでに各種の炎症性皮膚疾患から皮膚生検を施行し、その皮膚に浸潤した T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体付着ビーズとインターロイキン-2 (IL-2) を用いて培養増幅してその機能、形質などを解析して報告してきた。本研究では、このようにして得られた皮膚浸潤 T 細胞を用いて、その MDR1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で、タンパク発現をフローサイトメトリーで、その機能を主に Rhodamine 123 efflux assay 評価した。Rhodamine 123 は細胞に無害な蛍光色素で、MDR1 の基質でもある。細胞を Rhodamine 123 で染色後、インキュベートすると MDR1 陽性細胞では MDR1 の輸送作用によって細

胞内の Rhodamine 123 の濃度が低下し蛍光が減弱するのに対して、MDR1 陰性細胞では、その蛍光強度は変わらず、フローサイトメトリーで蛍光を測定することで、細胞の MDR1 の機能の有無を評価できるとされている。皮膚組織におけるリンパ球の MDR1 発現は免疫組織化学染色で確認した。

本研究では、代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、薬疹を対象疾患とした。既存検体を用いた検討ではオプトアウトを行い、新規の検体では被験者より書面による同意をえて、生検検体の一部を使用させていただいた。得られた、皮膚浸潤 T 細胞の MDR1 発現データとドナーの治療歴を参照し、その相関を検討した。機能的に MDR1 を発現した細胞と発現しない細胞の、病態における重要性を比較するため、それぞれの細胞の遺伝子発現、サイトカイン産生や形質をリアルタイム PCR 法やフローサイトメトリーで確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MDR1 の遺伝子、タンパク発現、機能と Rhodamine 123 efflux assay の妥当性

本研究では、主に乾癬の病変部皮膚より培養した T 細胞を用いて検討した。まず、これらの T 細胞で MDR1 遺伝子 (*ABCB1*) が発現していることをリアルタイム PCR 法で確認した。次いでそのタンパク発現をフローサイトメトリーで確認することを試みたが、その染色性が連続的で、陽性と陰性をクリアに染め分けることは困難であった。皮膚生検組織の、MDR1 を免疫組織化学染色を試みたところでは、こちらも陽性細胞と考えられる細胞が確認できた一方で、染色性は連続的で陽性/陰性の区別が困難であった。そこで、培養 T 細胞の MDR1 の機能を Rhodamine 123 efflux assay で確認したところ、明確に陽性細胞と陰性細胞を区別することが可能であった。そこで、本方法の妥当性を検討した。

Rhodamine 123 efflux assay 後に陽性細胞と陰性細胞をフローサイトメトリーでソーティングし、それらの MDR1 蛋白の発現を再度、蛍光抗体を用いてフローサイトメトリーで確認した。その結果、機能的に MDR1 陽性 (Rhodamine 123 陰性) の細胞では、陰性の細胞 (Rhodamine 123 陽性) に比べて MDR1 蛋白の蛍光染色の強度 (MFI) が高く、機能的に MDR1 陽性細胞は同タンパクを発現していることが確認された。更に Rhodamine 123 efflux assay 後にソーティングした細胞の *ABCB1* 遺伝子をリアルタイム PCR で確認したところ、Rhodamine 123 陰性の細胞の *ABCB1* 遺伝子発現は Rhodamine 123 陽性細胞のそれと比べて明らかに高く、Rhodamine 123 efflux assay の遺伝子発現の裏付けも得られた。続いて、Rhodamine 123 efflux assay の結果が MDR1 の発現だけを反映しているのか、ほかの ABC トランスポーターの発現の影響もうけているのかを確認した。MDR1 の阻害薬であるシクロスポリンやベラパミルを添加すると、MDR1 の機能はほぼ完全に阻害されることを確認した。

次いで、培養によって MDR1 の機能が変化するかどうかを確認するため、Rhodamine 123 efflux assay 後にソーティングした MDR1 陽性細胞および陰性細胞を同条件で再度培養し、培養後の細胞の MDR1 機能を再度 Rhodamine 123 efflux assay で確認した。その結果、培養によって MDR1 の機能は変化しないことを確認した。これらの結果から、Rhodamine 123 efflux assay による評価の妥当性がある程度示されたと考えた。

しかし、さらに他の ABC トランスポーターの影響を考慮するため、Rhodamine 123 efflux assay 後にソーティングした細胞を用いてリアルタイム PCR で、他の ABC トランスポーターの遺伝子発現を網羅的に解析したところ、Rhodamine 123 陰性の細胞では陽性細胞に比べて *ABCB1* を含む 4 種類のトランスポーターの遺伝子発現が高まっていた。このうち 1 種類は T 細胞での発現は極めて低く関与の可能性は低いが、それ以外のトランスポーターの関与を完全に除外することはできていない。また、これらトランスポーターの一部は、その機能が十分に解明されていないものであった。このように、他のトランスポーターの関与を完全に否定できない状況だが、本稿では便宜的に Rhodamine 123 陰性の細胞を MDR1 陽性細胞と呼ぶ。

##### (2) MDR1 陽性/陰性 T 細胞の病原性の検討

MDR1 陽性 T 細胞が、病態に関わるかどうかを検討した。乾癬の皮膚より培養して得た T 細胞を Rhodamine 123 陽性/陰性細胞でソーティングして、それらの遺伝子発現の解析を行った。その結果、乾癬の病態に関わるとされている Th17 細胞のマスター遺伝子である *RORC* の遺伝子発現は MDR1 陽性細胞で陰性細胞より強く発現していることが確認された。さらに、MDR1 陽性細胞と陰性細胞のサイトカイン産生能を検討した。その結果、MDR1 陽性細胞では陰性細胞に比べて乾癬の病態に重要とされる IL-17A や IL-22 を産生する T 細胞の比率が高かった。これらの結果から、MDR1 陽性細胞も乾癬の病態に関わる細胞を含むことが示された。

##### (2) MDR1 と *in vitro* におけるステロイド抵抗性の検討

IL-2 非存在下に皮膚より培養増幅した T 細胞にステロイドを種々の濃度で添加して培養すると、特に CD4 陽性 T 細胞においては濃度依存性に MDR1 陽性細胞の比率が増加する様子が確認された。一方で、CD8 陽性 T 細胞においてはステロイドの添加によって軽度の MDR1 陽性細胞の比率の増加が確認できたが、はっきりとした濃度依存性は確認できず、MDR1 を介したステロイド抵抗性は、主に CD4 陽性 T 細胞においてより重要であると考えられた。高濃度 IL-2 存在下においては、ステロイド添加によって細胞の生存率はあまり減少しなかった。このことは、高度な炎症の下では組織中のサイトカイン濃度が高く、ステロイドの効果が低い可能性を想起させた。

#### (4) ステロイド外用剤治療による MDR1 の変化

尋常性乾癬において、ステロイドなどで加療した皮膚より採取した T 細胞と、ビタミン D3 外用剤や生物学的製剤による加療を受けて改善した皮膚より採取した T 細胞を用いて、Rhodamine123 efflux assay の結果を比較した。その結果、ステロイド外用加療をした皮膚では MDR1 陽性 T 細胞の比率が高いことが明らかになった。

ステロイド外用療法を受けた後の皮膚ではしていない皮膚と比べて *ABCB1* の遺伝子発現も亢進していた。先述の Rhodamine123 陰性の細胞で発現の高かった MDR1 以外のトランスポーターの遺伝子発現は、ステロイドを外用加療した皮膚としていない皮膚で明らかな差はみられなかった。

アトピー性皮膚炎で、日常的にステロイドを外用している患者と、ステロイド忌避がありステロイド外用剤をほとんど使用していない患者から皮膚生検を行い、皮膚浸潤 T 細胞の MDR1 発現を Rhodamine123 efflux assay で検討した。その結果、ステロイド外用中の患者の皮膚には MDR1 陽性細胞多数見られたのに対して、ステロイド忌避の患者では MDR1 陽性細胞はわずかであった。

これらの結果から、ステロイド外用により、ステロイド感受性のある T 細胞の浸潤が減少し、相対的にステロイド抵抗性の MDR1 陽性細胞の比率が増加した可能性や、さらにはステロイド外用治療を継続することで、次第にステロイド抵抗性の T 細胞が炎症の首座を担うようになり、ひいてはその皮膚病変がステロイド抵抗性になっていく可能性を示唆するものであった。

#### (5) 今後の課題

Rhodamine123 efflux assay の結果に影響を与えている可能性のある他のトランスポーターの働きはどうなっているのか(ステロイド抵抗性に関与するのか)、ステロイド存在下で MDR1 の発現の有無は、サイトカイン産生能や細胞増殖能を左右するのか、更にステロイド抵抗性に関わる MDR1 以外の因子はないのか、などさらに解明すべき課題が残っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshiharu Fujiyama
2. 発表標題 Topical treatment with vitamin D3 analogue decreases MDR1-expressing T cells infiltrating in plaque psoriasis
3. 学会等名 The 24 th World Congress of Dermatology (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
---------	---------