

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32633

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23852

研究課題名（和文）乾癬の病態形成におけるレクチンを発現する真皮樹状細胞の重要性の解明

研究課題名（英文）Possible involvement of dermal dendritic cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin in Psoriasis

研究代表者

善家 由香理（ZENKE, Yukari）

聖路加国際大学・聖路加国際病院・医幹

研究者番号：80848325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Macrophage galactose-type C-type lectin陽性（MGL+）細胞は、ヒト皮膚の真皮上層脈管周囲主体に分布し、乾癬（Pso）とアトピー性皮膚炎（AD）の皮膚では、健常と比較しMGL+細胞数が有意に増加した。また、血清と組織中ケモカインとMGL+細胞の単位面積あたりの細胞数との関連では、ADにおいて、血清TARC/CCL17とIgE値、及び組織中のTARC/CCL17陽性細胞数と、MGL+細胞数が正の相関を示した。また自然免疫細胞亜集団マーカー発現に対する蛍光多重染色では、MGL+細胞の主要部分はCD1c陽性で、一部がCD1a、CD14、CD68と共染色された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト皮膚に分布するMGL+細胞は、主に真皮上層の脈管周囲に存在し、健常皮膚と比較しPsoやADなどの疾患皮膚において有意に顕著な増加を認めた。MGL+細胞が炎症に伴い誘導されるもしくはMGLの発現自体が増加する可能性が考えられる。これらの細胞はCD1c陽性主体の樹状細胞であり、一部のCD1a陽性樹状細胞あるいはマクロファージにも発現すると考えられる。さらに、MGL+細胞数が、ADの病勢及びTh2型免疫応答の指標となる血中TARC/CCL17及び血清IgE値と正の相関が認められた点は注目され、ヒトMGL+細胞のTh2応答との関わりが新たに示唆され、病態解明に迫る有意義な結果が得られた

研究成果の概要（英文）：Macrophage galactose-type C-type lectin positive (MGL+) cells distributed in the upper dermis, especially around small vessels. In both Psoriasis (Pso) and Atopic dermatitis (AD) skin, the distribution pattern was not different from healthy control (HCs), however the number and density of MGL+ cells in the dermis and epidermis was significantly greater than in HCs. The relationship between the number of MGL+ cells and the serum levels of TARC/CCL17 and total IgE, the number of TARC/CCL17+ cells in the skin. In AD patients, positive correlations were found between the number of MGL+ cells in the dermis and the serum levels of TARC/CCL17, total IgE, and the number of TARC+ cells in the dermis. Double-staining with antibodies specific for innate immune cells revealed that the major MGL+ cell population was CD1c+, but few CD1a+, CD14+, and CD68+ cells were also observed.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：C-type lectin psoriasis atopic dermatitis chemokine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

乾癬（Pso）は、原因不明の全身性炎症性疾患であり、世界人口の約3%にあたる約1億2500万人が罹患しており、近年本邦でも増加傾向にある。皮膚に存在する樹状細胞（DC）は免疫応答を制御する重要な細胞であるが、Pso皮膚ではDCの過剰な活性化によるサイトカイン産生が指摘されている。特にインターフェロン（IFN）を産生する plasmacytoid DC や、腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）、誘導性の一酸化窒素誘導酵素（iNOS）を産生する inflammatory DC と呼ばれる真皮 DC が病変部位に存在し、IL-23/Th17 経路を活性化し炎症を起こすと言われており<sup>1)</sup>、近年 TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-23 を標的とした生物学的製剤による治療が可能となったが、それでもなお治療に難渋する重症例も多く、更なる病態の解明が望まれる。

DCには数多くのC型レクチンが発現していることが知られ、C型レクチンには、細胞の局在の制御やシグナル伝達を介して細胞の分化や活性化に影響するものがあることから、DCに発現するレクチンがDCを制御し、病態形成に関与している可能性がある。2018年に初めてPsoのモデルマウスにおいて、MGL2（Macrophage galactose-type C-type lection 2）陽性真皮DCがIL-23を高レベルに産生し、皮疹発症に関与することが示された<sup>2)</sup>ことを受け、ヒトの乾癬患者においてもMGLを発現するDCが病態形成の鍵となる可能性およびMGLによるDCの機能制御の可能性を考えた。マウスMGL2のカウンターパートであると考えられるヒトMGLを発現する細胞が、ヒトの皮膚にも存在することは既に示されているが、ヒトの免疫応答における位置付けや乾癬の病態形成との関連は明らかでない。

本研究においてヒトの皮膚においてMGL陽性細胞を同定し、乾癬における分子機能を明らかにすることは、乾癬の病態解明や治療開発に繋がることが期待される新たな試みであり、極めて重要な知見が得られるものと期待される。

## 2．研究の目的

本研究では、まず（1）ヒトの正常またはPso皮膚においてMGL陽性細胞の分布、同定を行い、MGL陽性細胞の表面マーカーやサイトカイン発現パターンを明らかにし、比較を行うこと（2）MGLの分子機能を解明し、真皮DCとMGLとの関連性を明らかにすることにより、Psoの病態形成との関連を明らかにすることを目的とする。なお、一連の解析において、Psoの比較対象となる疾患としてアトピー性皮膚炎（AD）皮膚を用いた。MGL陽性細胞について、健常、Pso、ADを比較して詳細にヒトで検討した先行研究はなく、大変独創的である。また、本研究で用いる抗MGLモノクローナル抗体は、我々の研究グループで樹立したリガンド結合阻害活性を持つ抗体であり、ヒトMGLの発現分布及び機能を世界的に見て有利に解析することが可能である。さらにPsoの発症や増悪にMGLが関与することが明らかになれば、新たな乾癬治療開拓の基盤となることが期待される。

## 3．研究の方法

2018年3月から2021年10月までに聖路加国際病院皮膚科を受診し診断・治療目的に皮膚生検・手術を施行した患者のうち、本研究に対する同意書を取得したPso、比較対象としてアトピー性皮膚炎（AD）、健常皮膚（HC）を対象とした。小児や膿疱性乾癬患者は除外とし、健常皮膚は炎症のない良性的皮膚腫瘍からの余剰皮膚を使用した。MGLに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて染色を行った。採取し得られた皮膚の一部は、ホルマリン固定後切片を作製し、免疫組織染色を行い、細胞の同定・分布・数を確認した。一部はOCTコンパウンドに包埋、-80度で凍結保存し、クライオスタットを用いて凍結切片を作製し、蛍光多

重染色により MGL に加え、DC (CD1a、CD1c、CD14 など) やマクロファージ (CD68) のサブセットを同定する抗体を併用し、また Th2 免疫応答に関わるケモカインである TARC/CCL17 に対する抗体を用いて、MGL 陽性細胞と共染色の有無と、各検体あたり 3 視野の共陽性細胞数をカウントした割合を比較した。更に、AD においては皮膚生検から数日以内に採取した血清より TARC/CCL17 と Total IgE 値を確認し、MGL 陽性細胞との関連を検討した。MGL 陽性細胞の数、分布・MGL 発現レベルとの関係を、電子カルテより収集した Pso と AD の重症度スコア (PASI、EASI スコア) との相関の有無を解析し、病態形成に MGL 陽性細胞が関与するか検討した。MGL 陽性細胞数の疾患皮膚における増加について、公共のデータベース解析を用い健常と疾患皮膚における MGL 遺伝子発現レベルの差異を確認することで、データの妥当性を検証した。統計学的解析は SPSS を使用し、MGL 細胞数の比較には Kruskal-Wallis test、血清マーカーとの相関は Spearman's rank correlation を用いた。公共データベース解析には、R を用い解析を行った。P<0.05 を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 患者背景

本研究では、Pso16 名に加え、比較対象として AD11 名、HC12 名を対象とした。男女比は AD が 2:1、Pso と HC は 1:1 であり、各々の年齢の中央値は 49.5 歳(四分位範囲 (IQR): 39.5-62.0)、Pso は 47.0 歳(IQR: 44.0-52.5)、HC は 47.0 歳 (IQR: 33.0-60.5)であった。AD の重症度を示す EASI スコアの中央値は 22.4 (IQR:16.3-30.65)、Pso では PASI スコアの中央値は 11.8 (IQR: 7.1-14.7)であった。

##### (2) ヒト皮膚における MGL 陽性細胞の分布と密度についての検討

MGL 陽性細胞は、ヒト正常組織及び病変組織共に、主に真皮上層、特に脈管周囲に多く分布していた。AD と Pso では、真皮のみならず表皮内に MGL 陽性細胞が観察されたが、HC では表皮内に陽性細胞を認めなかった。実際の細胞数を定量したところ、正常皮膚と比較し、全層表皮、真皮共に MGL 陽性細胞は有意に増加していた。この結果の妥当性を検証するため、公共のデータベースを用いて MGL の遺伝子発現の健常と疾患皮膚における MGL 遺伝子発現レベルの差異を解析した。現在公表されている Gene Omnibus (GEO) database (National Center for Biotechnology Information, 2000) と the EBI Array Express database (European Bioinformatics Institute, 2002)の中で、AD、Pso と HC での比較が可能であり、症例数が多く、本研究と母集団の疾患の重症度が同程度である事を条件に抽出し、GEO GSE121212 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE121212>) (AD  $n = 27$ , Pso  $n = 28$ , HC  $n = 38$ )と EBI Array Express E-MTAB-8149 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-8149/>) (AD  $n = 91$ , Pso  $n = 134$ , HC  $n = 126$ )の 2 つのデータセットについて解析を行った。その結果、GSE121212 及び E-MTAB-8149 とともに、HC と比較し AD、Pso 共に MGL mRNA の発現が高いことが確認された。

##### (3) Pso と AD 皮膚における MGL 陽性細胞と組織学的、血清学的パラメータとの相関について

臨床的に AD の重症度との関連を示すパラメーターである Th2 ケモカインである TARC/CCL17 に着目し、血清 TARC/CCL17、Total IgE もしくは組織中の TARC/CCL17 陽性細胞の数との相関を調べた。さらに、疾患の重症度と MGL 陽性細胞数との相関についても検討した。Pso 皮膚に関しては、TARC/CCL17 陽性細胞と表皮、真皮の MGL 陽性細胞の数において有意な正の相関と認め

たが、乾癬の重症度を示す PASI スコアと MGL 陽性細胞の数との相関は認められなかった。一方 AD では、真皮における MGL 陽性細胞の数は血清 TARC/CCL17、Total IgE 共に有意な相関を示した。さらに、組織中の TARC/CCL17 陽性細胞の数と真皮 MGL 陽性細胞においても有意な相関が認められた。表皮 MGL 陽性細胞に関しては有意差を認めないものの、正の相関傾向を示した。また、EASI スコアと MGL 陽性細胞の数との相関は認めなかった。

#### (4) MGL 陽性細胞と樹状細胞もしくはマクロファージマーカーの共染色結果

次に、MGL 陽性細胞と樹状細胞もしくはマクロファージのサブセットを確認するために、MGL、CD1a、CD1c、CD14、CD68 に特異的な抗体を用いて蛍光多重染色を行い、免疫組織学的に正常と病的皮膚との比較を行った。健常、病的皮膚共に主に共染色される細胞集団は CD1c 陽性であったが、一部 CD1a、CD14、CD68 も真皮上層で共染色された。注目すべき点として、AD においては CD1c 陽性の MGL 陽性細胞が主に表皮に見られ、一部 CD1a 陽性 MGL 陽性細胞も見られていたが、CD68 との共染色は見られなかった。

#### (5) Pso と AD における MGL と TARC 共陽性細胞についての検討

上記の結果に基づき、我々は MGL 陽性細胞が AD 真皮や Pso の皮膚において TARC/CCL17 を共発現している可能性を考えた。この可能性を検証するために、各々 3 例ずつ HC、Pso と AD 皮膚で MGL と TARC に特異的な抗体を用いた染色を行い、共染色される細胞の数の割合を示した。結果として、AD 真皮では MGL 陽性細胞のうち 59.6% が TARC/CCL17 を発現し、Pso 表皮では MGL 陽性細胞全体の 42.3%、真皮では 28.6% に TARC/CCL17 との共発現が見られた。一方、真皮 TARC 陽性細胞のうち MGL が共染色された割合に関しては、AD で 59.0%、Pso で 66.7% であった。

#### 得られた成果の国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

本研究は、健常と病的なヒト皮膚を用いて MGL 陽性細胞の分布や定量を試みた初めての報告である。MGL 陽性細胞は、主にヒト真皮上層の脈管周囲に存在しており、HC と比較し有意に Pso や AD などの病的皮膚において増加することを確認した。公共データベースを用いた解析からも、MGL mRNA 発現が HC と比較して AD または Pso で高いことが確認された。以上の結果から、MGL 陽性細胞が炎症に伴い誘導される、もしくは MGL の発現自体が増加する可能性が考えられる。更にそれらの細胞は、CD1c 陽性細胞を共発現する細胞が多数を占めており、CD1a、CD14、CD68 も部分的に共発現していた。

本研究では、Pso に関しても Th2 免疫応答に関わるとされるケモカインである TARC/CCL17 との関連が示唆され、MGL 陽性細胞が Pso の病態に関与している可能性が示された。また、当初予期していなかった新たな知見として、AD において組織中 TARC/CCL17 と共発現する細胞が有意に多く認められ、AD における Th2 免疫に関わる病態の機序に迫る結果を見出すことができた。過去にマウスにおいて MGL2 陽性細胞は Th2 免疫応答に関わることが報告されていたが、TARC/CCL17 との関わりについては明らかでなかった。TARC/CCL17 は様々な細胞から産生されることが知られており、MGL 陽性細胞が TARC/CCL17 の産生細胞のうち主要なものであるのかは不明であるが、本研究において AD の約半数、Pso の半数以下で共染色が確認され、TARC/CCL17 を発現する MGL 陽性細胞と皮膚疾患との関わりが示された。今後、MGL 陽性細胞における TARC / CCL17 発現の重要性を明らかにすることで、新たな病態解明や治療法の開発につながる事が期待される。

<引用文献>

- 1) Di Cesare et al: *J Invest Dermatol* :129: 1339: 2009
- 2) Kim TG et al: *J Invest Dermatol* :138:844-853: 2018

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
研究協力者	伝田 香里  (DENDA Kaori)		
研究協力者	村上 龍一  (MURAKAMI Ryuichi)		
研究協力者	野地 美樹  (NOJI Miki)		
研究協力者	恒田 直人  (TSUNEDA Naoto)		
研究協力者	イシイシュレイド カトリン  (ISHII-SCHRADE Katrin)		
研究協力者	鹿股 直樹  (KANOMATA Naoki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	新井 達  (ARAI Satoru)		
研究協力者	入村 達郎  (IRIMURA Tatsuro)		
研究協力者	池田 志學  (IKEDA Shigaku)		

## 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
---------	---------