

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03705

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎における2型自然リンパ球の活性化調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of activation of group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis

研究代表者

小林 哲郎（KOBAYASHI, TETSURO）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：60624236

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではMC903アトピー様皮膚炎マウスモデルのILC2を解析することで皮膚ILC2の制御メカニズムを明らかにし、アトピー性皮膚炎新規治療開発のための情報基盤を築くことを目的とした。各種ノックアウトマウスを用いて本モデルを検討すると、TSLPがILC2の活性化に必須であり、interferon-シグナルが炎症の終息に重要であることがわかった。一方で機械的皮膚バリア破壊モデルにおいてはこれまでアレルギー性炎症で中心的な役割を持つと考えられていたILC2は表皮肥厚には必須ではなく、ILC2以外のILCが表皮肥厚に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫細胞の一つであるILC2は組織からのシグナルによって活性化し、IL-4やIL-5、IL-13などの2型サイトカインを産生することで寄生虫感染や気管支喘息、食物アレルギーなどの病態において重要な役割を果たすことから、臨床研究や創薬開発の標的として注目されている。ILC2は臓器特異的機構で活性化が制御され、皮膚ILC2のメカニズムが明らかになっているとは言い難い。本研究ではILC2活性化および抑制のメカニズムを示したとともに、皮膚ILCサブセットのヘテロジェネシティと機能の多様性の一端を示した。今後皮膚ILC研究を通して組織常在性免疫細胞の普遍的な機能が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the regulatory mechanism of skin ILC2 by analyzing ILC2 in the MC903 mouse model of atopic dermatitis to establish an information base for the development of new therapies for atopic dermatitis. Examination of this model using various knockout mice revealed that TSLP is essential for ILC2 activation and that interferon- signaling is important for the termination of inflammation. On the other hand, in the mechanical skin barrier disruption model, ILC2, which was previously thought to play a central role in allergic inflammation, is not essential for epidermal thickening, suggesting that ILCs other than ILC2 may be involved in epidermal thickening.

研究分野：免疫学

キーワード：皮膚 自然リンパ球 アトピー性皮膚炎 ILC2

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は生涯にわたって再発を繰り返す痒みの特徴とする慢性炎症性疾患で、“アレルギーマーチ”の引き金にもなることから患者とその家族に与える精神的苦痛、経済的負担が極めて大きい疾患である。IL-4 受容体を標的としたデュピルマブは皮膚炎改善に著明な効果を示し、このことは 2 型サイトカインがアトピー病態の中心的な役割を担うことを示唆する。一方で抗体医薬は高額な医療費の問題から生涯にわたって治療が必要なアトピー性皮膚炎では全患者に適用することは難しく、新たな治療ターゲットを見つけることはアトピー性皮膚炎の病態研究における重要課題である。

アトピー性皮膚炎は血清高 IgE を特徴とすることから獲得免疫系による抗原特異的反応を中心に病態の理解と治療法開発が進められてきた。しかしながら抗 IgE 抗体であるオマリズマブが慢性蕁麻疹に対して優れた効果を示す一方で、アトピー性皮膚炎に対する効果は限定的であることから、アトピー性皮膚炎の病態には抗原非特異的な反応が関わる可能性が疑われる。申請者らが報告した常在細菌叢異常によってアトピー様炎症を発症する Adam17 皮膚欠損マウス (Kobayashi et al. Immunity 2015) さらには JAK シグナル依存的にアトピー様皮膚炎を発症する Spade マウス、ビタミン D3 類似体 (MC903) 塗布アトピー様皮膚炎マウスのいずれもが、獲得免疫系のリンパ球非存在化でも皮膚炎を発症し、これはまさにアトピー性皮膚炎の病態に自然免疫が関わることを示唆している。

自然免疫細胞の一つである ILC2 は組織からのシグナルによって活性化し、IL-4 や IL-5、IL-13 などの 2 型サイトカインを産生することで寄生虫感染や気管支喘息、食物アレルギーなどの病態において重要な役割を果たすことがすでに示されており、臨床研究や創薬開発の標的として注目が集まっている。皮膚に関しては ILC2 が TSLP や IL-33 によって活性化されアトピー性炎症に関わるという報告がいくつかあるものの、その詳細なメカニズムが明らかになっているとは言い難い。研究が進まなかった理由の一つにこれまで皮膚 ILC2 研究が他の臓器の ILC2 の情報をもとになされてきたことが挙げられる。申請者らはシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) などを使った皮膚 ILC サブセットの網羅的な遺伝子発現解析によって、皮膚 ILC が他の臓器の ILC とは異なる表現型、免疫学的特徴を持つことを見出した (Kobayashi et al. Cell 2019)。つまり ILC2 は臓器特異的なメカニズムで活性化がコントロールされており、他臓器の特徴をもとに行われてきた研究は皮膚 ILC2 の機能を的確に捉えていない可能性が高い。

2. 研究の目的

前述したとおり、獲得免疫系のリンパ球を欠損した *Rag2*^{-/-}マウスにおいても MC903 塗布によってアトピー様皮膚炎が発症する。一方で、ILC2 を含む全てのリンパ球を欠損した *Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-}マウスでは MC903 アトピー様皮膚炎が起きないことを予備実験で確認している。そこで本研究では MC903 アトピー様皮膚炎の ILC2 を解析することで皮膚 ILC2 の制御メカニズムを明らかにし、アトピー性皮膚炎新規治療開発のための情報基盤を築く。

3. 研究の方法

皮膚 ILC2 の活性化、皮膚炎増悪因子の候補を探索するため、MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルをフローサイトメトリーやシングルセル RNAseq など用いた解析を行う。皮膚 ILC2 の活性化に関わる可能性のあるサイトカイン欠損マウスを用いて、アトピー様皮膚炎モデルにおける活性化サイトカインの同定を行う。さらにテープストリッピングによる機械的皮膚バリア損傷モデルを用いることで、表皮肥厚を促す ILC の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルにおける ILC の関与

まず MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルにおける ILC2 の活性化機構の解析を行った。これまで ILC2 の活性化に関わると報告されているサイトカインである IL-33、IL-25、TSLP の欠損マウスに MC903 を用いてアトピー様皮膚炎を誘導し、耳の肥厚を測定することで皮膚炎の程度を評価した。その結果、IL-33 および IL-25 欠損マウスでは野生型マウスとほぼ同程度の皮膚炎が形成される一方、TSLP 欠損マウスでは ILC2 の増殖と皮膚炎が顕著に減弱した (図 1)。このことから MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルにおいては TSLP が ILC2 の活性化に重要であることがわかった。これは皮膚 ILC2 の大部分が IL-33 と IL-25 の受容体を発現せず、TSLP の受容体を発

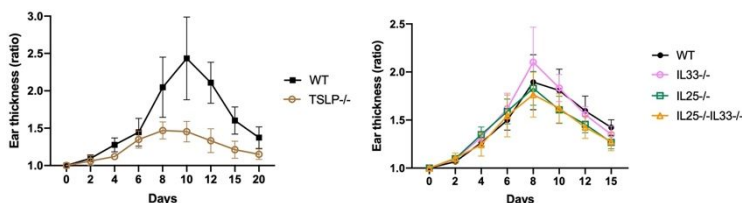


図1. IL-33およびIL-25欠損マウスでは野生型マウスとほぼ同程度の皮膚炎が形成される一方、TSLP欠損マウスではILC2の増殖と皮膚炎が顕著に減弱した

現している事実と一致した。

(2) MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルのシングルセル RNAseq 解析と ILC2 抑制における interferon- γ の関与

MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルのシングルセル RNAseq 解析を行い、皮膚炎前後における ILC2 における遺伝子変動を比較した。皮膚 ILC は発現遺伝子の変動によって 14 のクラスターに分かれ、皮膚 ILC のヘテロジェネイティが明らかとなった(図2)。このクラスターは MC903 塗布後に大きく変動し、これはアトピー様皮膚炎において皮膚 ILC にダイナミックに遺伝子発現の変動が起きたことを意味している。MC903 塗布後に出現した ILC2 のクラスターに発現する遺伝子の GO 解析を行うと、response to interferon-beta, regulation of defense response, regulation of leukocyte activation のパスウェイに関わる遺伝子発現が変動していることがわかった。このパスウェイの中で発現が上昇した遺伝子のリストを詳細に解析すると、GBP2, Ifi47, Igtf, Tgtp2, Stat1 など interferon- γ に関連した遺伝子群が浮かび上がってきた。interferon- γ は肺の ILC2 の活性化やサイトカイン産生を抑制するサイトカインであることが知られている。そこで皮膚 ILC2 に対しても抑制的に働く可能性を考え、interferon- γ の受容体を欠損した *IfngR* ノックアウトマウスにおける MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルを解析した。その結果、ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して皮膚の肥厚と ILC2 数の増加が皮膚炎の後期でも持続し(図2)、これは ILC2 の抑制系が適切に働かないことで皮膚炎の収束が起こらず炎症が慢性化したと考えられた。

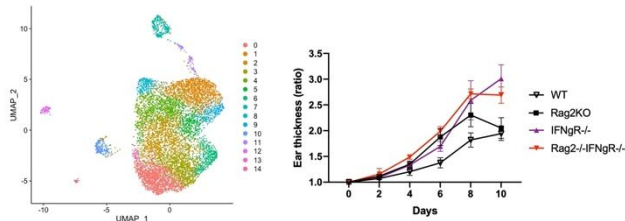


図2. シングルセルRNAseq解析の結果、皮膚ILCは14のクラスターを形成した。またIFNgRノックアウトマウスでは皮膚炎が悪化した。

(3) ILC2 活性化への IL-18 の関与

またシングルセル RNAseq の結果から皮膚 ILC2 は IL-18 の受容体を高発現していることがわかった。IL-18 は Th1 細胞や NK 細胞など 1 型の免疫細胞の分化などに関わるサイトカインとして知られており、2 型の免疫細胞である ILC2 にその受容体が発現することはこれまでほとんど報告がなく、ILC2 に対する IL-18 の重要性はわかっていない。そこで IL-18 の受容体を欠損した *Il18r* ノックアウトマウスに MC903 を塗布しアトピー様皮膚炎モデルを誘導し ILC2 の活性化と皮膚炎の程度を評価した。その結果、ノックアウトマウスは野生型マウスとほぼ同程度の皮膚炎が観察され、ILC2 の活性化および IL-5 や IL-13 の産生量も野生型マウスとの間で違いは認められなかった。このことから少なくとも MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルにおいては皮膚 ILC2 に対して IL-18 は関与していないことがわかった。ILC2 における IL-18 受容体の役割に関してはさらなる検討が必要であると考えられた。一方で MC903 誘導性アトピー様皮膚炎モデルは TSLP への依存度が高いことが欠点であり、このモデルを使用している限り TSLP 以外の経路を解析することが困難であるという問題点が浮かび上がってきた。このことからアトピー性皮膚炎の病態を部分的に模したモデルの作出を試みた。

(4) 表皮肥厚における ILC の関与

アトピー性皮膚炎を含めた慢性皮膚炎の病理学的な特徴の一つは表皮の肥厚である。表皮の肥厚は上皮細胞から産生される成長因子がオートクラインに働き、さらには免疫細胞から産生される液性因子がパラクラインに働くことで多様な細胞間ネットワークが構築されることで結果的に起こる現象であると考えられている。上皮細胞と ILC の細胞間相互作用を調べるにあたりよりモデルを単純化する必要があり、またアトピー性皮膚炎はバリア機能の低下が病態の重要な因子であることを考え、テープストリッピングによる機械的皮膚バリア破壊モデルを考案した。軽度なテープストリッピングを数回行うと表皮肥厚が誘導され、これは破壊されたバリアを修復する過程として考えられる。RNAseq 解析においても Keratinization および Epidermal cell differentiation に関連する遺伝子発現の上昇が認められた。そこでこのモデルを用いることで ILC の表皮肥厚への関与を調べた。その結果、T 細胞などのリンパ球を欠損した *Rag2*^{-/-} マウスでは野生型マウスと同程度に表皮の肥厚が起こったが、T 細胞および ILC を欠損した *Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-} マウスは表皮の肥厚が著しく減弱した。これよりテープストリッピング後の表皮肥厚のプロセスに ILC が関与している可能性が考えられた。一方で興味深いことに、この表皮肥厚は ILC2 を欠損した IL-7 ノックアウトマウスでも起こることがわかった。つまりこれまでアレルギー性炎症で中心的な役割を持つと考えられていた ILC2 は表皮肥厚には必須ではなく、ILC2 以外の ILC が表皮肥厚に関与している可能性が示唆された。今後皮膚の ILC 構成のヘテロジェネイティ解析をさらに進め、表皮肥厚を誘導する ILC およびその分子メカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zouboulis Christos C., Coenye Tom, He Li, Kabashima Kenji, Kobayashi Tetsuro, Niemann Catherin, Nomura Takashi, Olah Attila, Picardo Mauro, Quist Sven R., Sasano Hironobu, Schneider Marlon R., Torocsik Daniel, Wong Sunny Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sebaceous immunobiology - skin homeostasis, pathophysiology, coordination of innate immunity and inflammatory response and disease associations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.1029818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Tetsuro, Moro Kazuyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Tissue-Specific Diversity of Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1 - 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.885642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Tetsuro, Motomura Yasutaka, Moro Kazuyo	4. 巻 33
2. 論文標題 The discovery of group 2 innate lymphoid cells has changed the concept of type 2 immune diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 705 ~ 709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 小林哲郎
2. 発表標題 IL15-dependent ILC1s drive epidermal differentiation to sustain skin barrier
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuro Kobayashi
2. 発表標題 Epithelial, immune cell and microbial crosstalk in homeostasis and atopic dermatitis
3. 学会等名 9th World Congress of Veterinary Dermatology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuro Kobayashi
2. 発表標題 Amphiregulin-producing innate lymphoid cells promote skin barrier response after mechanical damage
3. 学会等名 The 6th RIKEN IMS-Stanford ISCBRM Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林哲郎
2. 発表標題 自然リンパ球による生体バリア恒常性維持機構
3. 学会等名 第2回 日本医学会連合 Rising Starリトリート (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林哲郎
2. 発表標題 Skin-resident ILC1 promote barrier response against mechanical stress
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuro Kobayashi
2. 発表標題 Heterogeneity of Skin ILCs
3. 学会等名 4th International Conference on Innate Lymphoid cells (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------