

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07460

研究課題名(和文) アレルギー性皮膚炎の重篤な複合的増悪化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of exacerbation of allergic skin inflammation

研究代表者

北島 雅之 (Kitajima, Masayuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：00401000

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)：重篤なアレルギー性皮膚炎患者の炎症組織では複数の炎症増悪化経路が存在すると考えられているものの、その詳細なメカニズムは不明である。本課題では、アレルゲンに化学的刺激や物理的刺激を組み合わせることで炎症増悪化が観察できる新規炎症増悪化マウスモデルを構築した。さらに損傷組織から放出されるIL-33に着目し、ST2(IL-33受容体)欠損マウスを用いて炎症増悪化におけるIL-33の役割を検討した結果、アレルギー性炎症の増悪化には共通してIL-33が重要であることを明らかにした。この結果はIL-33がアレルギー性炎症の増悪化を抑制する治療標的の一つとなる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、アレルゲンと物理的刺激もしくは化学的刺激を複合的に組み合わせた新規皮膚炎症増悪化モデルマウスを構築した。さらにアトピー性皮膚炎病態との関連がみられるIL-33の受容体ST2を欠損したマウスを用いた解析から、IL-33がこれらのマウスモデルの皮膚炎増悪化因子の一つであることを明らかにした。本研究成果は、新たな炎症増悪化メカニズムの理解と根治治療法開発に向けた基礎研究基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis (AD) is one of the chronic inflammatory skin diseases characterized by type 2 inflammation, impaired skin barrier, and intense itching. The pathogenesis of AD is involved in genetic and environmental factors. The complexity of human AD is not fully reproduced by available animal models. IL-33 is a newly cytokine, and is secreted from inflamed and damaged tissues may be involved in the pathogenesis of AD, but the role of IL-33 in AD is unresolved. To understand the exacerbation factors in skin inflammation, we established novel skin inflammation models using hapten (allergen, Th2 inducer) combined with physical stress (tape stripping) or chemical stress (surfactant, irritant). We found that ST2 (IL-33 receptor)-deficient (KO) mice were reduced skin inflammation in these models, but not hapten-induced inflammation. These results suggest that IL-33 has a novel role for promoting skin inflammation as an exacerbation factor.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー性皮膚炎 IL-33

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性皮膚炎（以下アトピー性皮膚炎）患者は、日本を含めた先進国の子供約 15-30%、大人約 2-10% を占め、近年さらに増加傾向にある。アトピー性皮膚炎は、個々の患者でことなる環境要因と遺伝的要因が関与する多因子疾患である。そのため炎症発症機序、悪性化因子等の解明が難しく、その根治治療法は確立されていない。近年、アトピー性皮膚炎患者に対する抗 IL-4R α 鎖抗体の治療効果が実証され、アトピー性皮膚炎に対する免疫療法が注目されている。このような現状のもとアトピー性皮膚炎の根治治療開発に向けた基礎研究が世界的に進められている。

このような背景のもと、アレルゲンによって上皮細胞から産生される Thymic Stromal lymphoPoietin (TSLP) に注目が集まっている。その理由として、1. ヒトとマウスのアレルギー性皮膚疾患と TSLP 発現は相関関係がある。2. ゲノムワイド関連解析 (GWAS) から、TSLP 遺伝子多形がアトピー性皮膚炎患者と相関する。3. TSLP は、マウスアレルギー性皮膚炎モデルである Th2 細胞に依存する接触性過敏症の発症に必須の分子であることが挙げられる。遂行者らは、TSLP レセプター (TSLPR) を欠損するマウスではアレルゲンを取り込んだ樹状細胞のリンパ節への遊走能の低下と Th2 細胞分化を誘導する能力が低下することを報告している (Kitajima, Ziegler. *Jl* 2013, Bell, Kitajima et al. *Nat Immunol* 2013)。また試験管内において TSLP と Th2 細胞から産生される IL-4 が増幅ループを形成することで相乗的に炎症を増悪化するモデルを世界で初めて提唱した (Kitajima, Ziegler. *EJl* 2011) が、実際アトピー性皮膚炎患者やマウスモデルの検討から IL-4 の重要性は認められているものの、TSLP が直接 Th2 細胞に作用することがどの程度アレルギー性皮膚炎症の重症化に重要なかわかっていなかった。令和 1 年度まで実施する基盤研究 (C)「アレルギー性皮膚炎の増悪化機構の解明」において、遂行者が既存モデルを新規改変したアレルゲン反復曝露による新規皮膚炎症増悪化マウスモデルと条件付き TSLPR 欠損マウスを用いることで、TSLP が直接 CD4T 細胞に作用し IL-4 産生を増強することが炎症の増悪化に必須であることを見出した (Kitajima et al. *Jl* 2020)。

一方アトピー性皮膚炎患者では、極少量のアレルゲン曝露でも、細胞に損傷を与えるような化学的刺激や搔痒などによる物理的刺激が伴うことで炎症が重篤に増悪化すると考えられている。特に強い化学的・物理的ストレスを介した細胞のネクローシスによって放出される IL-33 は、アトピー性皮膚炎患者の血中濃度とその炎症重症度とに強い相関関係が認められている。さらに IL-33 は自然リンパ球や T 細胞、樹状細胞などを活性化することで炎症に関連することが知られている。またそれらの刺激による皮膚バリアの破壊はアレルゲンや細菌などが侵入しやすくすなり、その結果かゆみと搔破の悪循環に陥ることで炎症を増悪化すると考えられている。これらの事実からアトピー性皮膚炎患者の炎症組織では複数の炎症増悪化経路が存在すると考えられているものの、その重篤な複合的炎症増悪化メカニズムについての詳細は明らかとなっていない。

本研究では、実際のアトピー性皮膚炎患者で問題となるアレルゲン、化学的・物理的刺激が複合的に作用することで生じるさらに重篤な炎症増悪化メカニズムを解明するために、遂行者が確立した独自のマウスモデルとその研究成果の蓄積を活かすことができる。すなわち独自モデルに化学的・物理的ストレスを加えることでより臨床病態に近い重篤に炎症が増悪化する新たな複合的アレルギー性皮膚炎症増悪化モデルを創造することで、これまでにない視点から複合的炎症増悪化メカニズムの解明が期待できる。本課題が遂行できれば、慢性期の皮膚炎の病態解明および新規治療法の開発に発展する可能性は高い。

2. 研究の目的

本研究は上記のような課題に答えるために、アレルギー性皮膚炎症の増悪化を引き起こすアレルゲン誘導因子 TSLP と他因子との相乗作用によって生じる複合的かつ重篤な炎症増悪化メカニズムを理解し、皮膚慢性炎症根治治療のための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、皮膚炎症の重篤な増悪化におけるアレルゲン (TSLP 誘導因子) と他因子による相乗的な役割を明らかにすることを目的として実施する研究計画を下記する

(1) アレルゲンと強い化学的ストレスによる重篤な炎症増悪化機構の解析

遂行者が確立したフルオレセインイソチオシアネート/フタル酸ブチル (FITC/DBP) 反復曝露による皮膚炎症増悪化マウスモデルや同試薬を用いた急性炎症マウスモデルと IL-33 を誘導する化学物質 (2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)) を同時に耳介に塗布する新規モデルを構築する。また皮膚バリアを破壊できる界面活性剤 (ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)) においても同様に最適な条件を探索する。それぞれの試薬の濃度、曝露回数、免疫場所 (腹部や耳介)、免疫回数を網羅的に検討することで、より最適なモデルを探索する。アレルゲンと化学的ストレスとの併用刺激による耳介の肥厚をマイクロキャリパーによって測定し、炎症増悪化のパラメーターとして皮膚肥厚の増大を確認する。IL-33 依存的炎症増悪化を証明するために、皮膚肥厚の増大が IL-33 欠損マウスもしくは ST2 (IL-33 受容体) 欠損マウスで抑制されることを確認したのち、浸潤細胞の種類と数、組織内サイトカインの種類と量など炎症の質と量の変化を解析する。

細胞特異的に ST2 遺伝子を欠損できる条件付き IL-33R 欠損マウスを用いることで、IL-33 の標的細胞を同定する。特に、FITC/DBP 皮膚は Th2 型炎症応答を誘導することが知られているた

め、CD4T 細胞の ST2 を欠損するマウスを優先する。

(2) アレルゲンと物理的ストレスによる重篤な炎症増悪化機構の解析

物理的刺激モデルとして汎用されているテープストリッピング法 (TS) にアレルゲン曝露マウスモデルを組み合わせた新規モデルを構築する。テープストリッピングの回数やテープの素材、ストリッピングの時期を変化させることでより強く炎症が増悪化される条件を探索する。モデル構築後、1.と同様に解析を進める。

4. 研究成果

(1) ST2 欠損マウスは界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) による FITC/DBP 皮膚炎の増悪化を減弱する。

研究開始当初、遂行者が確立した反復チャレンジによる炎症増悪化モデルと SDS 塗布の組み合わせによる炎症増悪化モデルを検討していたが、野生型マウスと IL-33 欠損マウスに安定して有意な違いが観察されなかった。次に既存の急性モデルに切り替えて最適化を実施したが、大きな炎症増悪化が観察されなかった。そこで免疫過程において、より高い FITC/DBP 濃度で 2 回、かつ免疫場所を耳介し、さらにチャレンジ時の濃度を低下させた。その結果、チャレンジ 1 日前に SDS を塗布することで、野生型マウスの皮膚肥厚が亢進し、ST2 欠損マウスでは、その皮膚肥厚の亢進が有意に低下することが観察された (図 1、赤矢印)。さらに耳介に浸潤する好酸球数が、皮膚の肥厚と相関すること、すなわち SDS 塗布により浸潤好酸球が上昇し、ST2 欠損マウスで減少することも確認された。また ST2 欠損マウスの CD4T 細胞数も、野生型マウスと比較して若干の減少がみられた。この結果は、SDS のような界面活性剤による皮膚バリアの破壊が IL-33 依存的にアレルギー性炎症を増悪化する機構の存在を示唆している。今後界面活性剤による違いや SDS とアレルゲンによる IL-33 産生メカニズムなどを深く追求していくことで、アレルギー性炎症の治療法や洗剤を用いる生活環境を大きく改善できる可能性を期待できる。

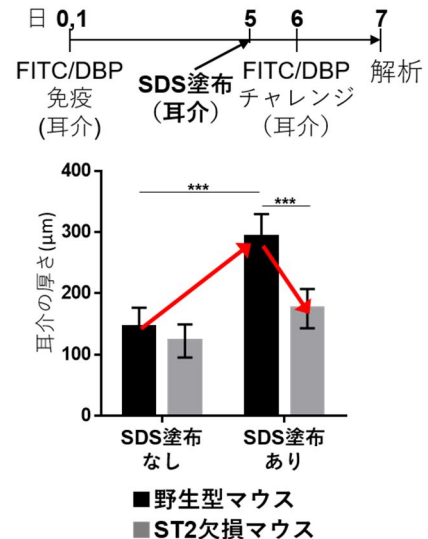


図 1 SDS による炎症増悪化は、ST2 欠損で減弱する。

(2) ST2 欠損マウスは DNFB による FITC/DBP 皮膚炎の増悪化を減弱する。

(1)と同じ実験スケジュールでは、野生型マウスと ST2 欠損マウスの間で安定して皮膚肥厚の違いが観察されなかった。おそらく DNFB が誘導する免疫応答がアレルギー反応を複雑化していると考え、チャレンジ時の濃度を上昇させ、免疫回数を 1 回に変更した。その結果、DNFB 入り FITC/DBP による皮膚の肥厚が ST2 欠損マウスでは低下することが観察された (図 2、赤矢印)。また SDS 塗布時と同様に、炎症組織への好酸球浸潤と皮膚肥厚に関して相関関係がみられた。この結果は、DNFB のような強い化学的刺激が IL-33 依存的にアレルギー性炎症を増悪化するメカニズムの存在を示唆している。今後、このモデルを用いた研究を進めることで、アレルゲンと化学刺激を有する化学物質の同時刺激と考えられる重篤なアレルギー性炎症疾患の治療や予防法を進展させる研究基盤となることが期待できる。

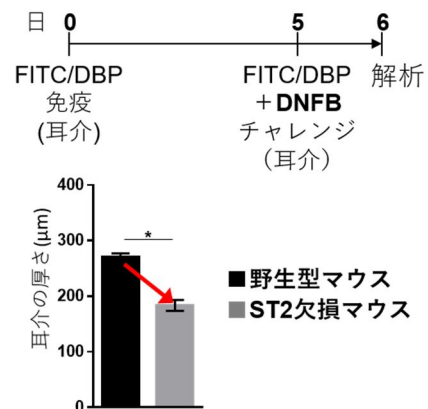


図 2 DNFB による炎症は、ST2 欠損で減弱する。

(3) ST2 欠損マウスはテープストリッピング (TS) による FITC/DBP 皮膚炎の増悪化を減弱する。

(1)と同様に遂行者が確立した反復チャレンジによる炎症増悪化モデルと TS (テープ種類、TS回数、TSの時期)の組み合わせによる炎症増悪化モデルについて検討していたが、なかなか安定した結果が得られなかった。特にTSの回数の増加や強い粘着力による皮膚バリアの大きな損傷は、IL-33非依存的に皮膚肥厚を増大させる可能性が考えられた。その最適化の最中に SDS を用いた炎症増悪化モデルで良好な成果が得られたため、(1)と同様の実験スケジュールを基本として再検討した結果、FITC/DBP チャレンジ前に TS を 1 回実施するのみで有意な皮膚肥厚の増大が観察された (図3、赤矢印)。また SDS 塗布時と同様に、耳介への好酸球浸潤と皮膚肥厚が相関していた。この結果は、TSのような物理的刺激による皮膚バリアの破壊がIL-33依存的にアレルギー性炎症を増悪化するメカニズムの存在を示唆している。今後、このモデルを用いた研究を進展させていくことで、アレルゲンと物理的刺激によるアレルギー性炎症の増悪化に対する治療法に向けた研究基盤となる可能性が期待できる。

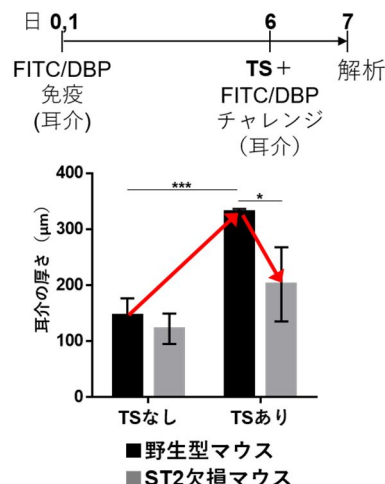


図3 TSによる炎症増悪化は、ST2欠損で減弱する。

(3) CD4 特異的 ST2 欠損マウスは SDS による FITC/DBP 皮膚炎の増悪化を減弱する。

(1)で良好な成果が得られたため、CD4 特異的 ST2 欠損マウスを用いた解析を行った。その結果、CD4 特異的 ST2 欠損マウスの皮膚の肥厚の増大は、コントロールマウスに比較して減少していた (図4、赤矢印)。また ST2 欠損マウスと同様に、炎症組織への好酸球浸潤と皮膚肥厚に相関関係がみられた。この結果は、SDS による IL-33 依存的なアレルギー性炎症の増悪化には、CD4T 細胞上の ST2 が重要な役割をしていることが示唆された。特に好酸球の浸潤が確認されたことから、好酸球浸潤を誘導する IL-5 が CD4T 細胞から誘導されていることが考えられる。動物実験を模した試験管内の予備実験では、CD4T 細胞から分化誘導した Th2 細胞に Th2 誘導因子と IL-33 を同時に刺激することで、IL-5 が強く発現誘導されることが確認できている。これらの結果は、CD4T 細胞が IL-33 によるアレルギー性炎症の増悪化の一端を担っていることを示唆している。

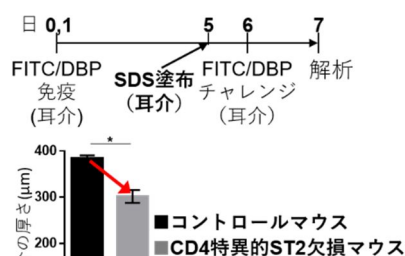


図4 SDSによる炎症増悪化は、CD4特異的ST2欠損で減弱する。

本研究課題を遂行した結果、新規構築した動物モデルによって化学的ストレスと物理的ストレスという全く異なるストレスによるアレルギー性皮膚炎症の増悪化には、共通してIL-33が関与することが示唆された。今後、このような遺伝子改変動物を用いた新規動物モデルと試験管内の研究を推進し、結果を考察することによってIL-33の役割を明確化していくことは、アレルギー性炎症の増悪化を誘導する新たなメカニズムの提唱、新規治療法の開発につながる価値のある基盤研究となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitajima, M., Kubo M., Ziegler, SF., Suzuki, H	4. 巻 205
2. 論文標題 Critical role of TSLP receptor on CD4 T cells for exacerbation of skin inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 27-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900758	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 Kasuya Tadamichi, Tanaka Shigeru, Tamura Jun, Etori Keishi, Shoda Jumpei, Hattori Koto, Endo Yusuke, Kitajima Masayuki, Kageyama Takahiro, Iwamoto Taro, Yokota Masaya, Iwata Arifumi, Suto Akira, Suzuki Kotaro, Suzuki Harumi, Ziegler Steven F., Nakajima Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epithelial cell-derived cytokine TSLP activates regulatory T cells by enhancing fatty acid uptake	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28987-1	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 M Kitajima, T Okada, H Suzuki
2. 発表標題 Low dose of hapten-induced allergic skin inflammation is aggravated in Themis overexpressing mice.
3. 学会等名 The 50th Annual meeting of the Japanese society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Kitajima, T Okada, H Suzuki
2. 発表標題 Themis in peripheral CD8 T cells regulates hapten-induced allergic skin inflammation.
3. 学会等名 The 51th Annual meeting of the Japanese society for Immunology
4. 発表年 2022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
---------	---------