

令和 6 年 6 月 2 6 日現在

機関番号：3 2 2 0 3

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：2 0 K 1 7 3 2 6

研究課題名（和文）乾癬におけるMAIT細胞の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of MAIT cells in psoriasis

研究代表者

石井 英輔（ISHII, Eisuke）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：3 0 8 3 3 4 4 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：従来のマウスにはほとんどいないMAIT細胞が多いマウス(V α 19マウス)を用いて乾癬またはアトピー性皮膚炎マウスを作成し研究を進めていたがアトピー性皮膚炎のみに研究テーマを変更した。ヒトと同程度に血中T細胞の約20%をMAIT細胞が占めるV α 19マウスにMC903を外用しアトピー性皮膚炎様炎症を起こすと、MAIT細胞が血中にほぼ認めないコントロール群より炎症の程度が増悪し、MAIT細胞抑制作用のあるAc-6FP外用によりこれが抑制された。マウス皮膚組織の分析によりIL-6がこれらの結果と矛盾しない結果が得られ、IL-6がMAIT細胞の皮膚炎への増悪に関与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

本研究の独創性はヒトで豊富に存在するにも関わらずマウスでは殆ど存在しないため基礎研究の進んでいなかったMAIT細胞に焦点を当てるという点である。MAIT細胞はヒトの末梢血中に豊富に存在するが、通常のT細胞のようにin vitroで増殖させることができない。我々のグループではMAIT細胞をiPS化し更にそのiPS細胞からノックアウトマウスでもトランスジェニックマウスでもないMAIT細胞が豊富なマウスを作製した。このマウスを用いてin vivoにおけるMAIT細胞の役割を解明することは、新たな発症メカニズムの解明と新規治療法の開発のために重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：I had been conducting research by creating mice with psoriasis or atopic dermatitis using mice (V α 19 mice) that have a high content of MAIT cells, which are rare in conventional mice, but I changed my research theme to atopic dermatitis only. When MC903 was applied topically to V α 19 mice, in which MAIT cells account for about 20% of blood T cells, similar to humans, and atopic dermatitis-like inflammation was induced, the degree of inflammation was exacerbated compared to the control group, in which MAIT cells were hardly detected in the blood, and this was suppressed by topical application of Ac-6FP, which has an MAIT cell inhibitory effect. Analysis of mouse skin tissue showed results for IL-6 that were consistent with these results, suggesting that IL-6 is involved in the aggravation of dermatitis by MAIT cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 MAIT細胞

1. 研究開始当初の背景

MAIT 細胞は 1993 年に CD4/CD8 double neative T 細胞の中に存在するインバリアント TCR を持つ T 細胞のひとつとして同定された。その後、MR1 によって拘束されること、細菌・真菌によって活性化されることが明らかとなった。2012 年に細菌・真菌が持つ（哺乳類にはない）ビタミン B2 代謝中間産物を抗原として認識することが明らかになった。近年、MAIT 細胞が様々な炎症性疾患・自己免疫疾患・感染症で病態形成に関与するという報告が急増している。そのどれもがヒトの血中や病変での細胞数やサイトカインに着目した報告にとどまる。MAIT 細胞はヒトには非常に豊富に存在するが、ヒト MAIT 細胞は生体外では増殖が困難であり、実験用マウスではそもそも MAIT 細胞が非常に少なくマウス疾患モデルでの機能解析が不可能であることから、更なる病態形成メカニズムの解明には至っていない。

また、乾癬は慢性炎症性皮膚疾患の一つであり、その T 細胞依存的な炎症機序が解明されてきており、最近になって抗 IL-17 抗体、抗 IL-12/23p40 抗体などの抗体製剤が登場し関連性の高い炎症性サイトカインに注目が集まっているが、MAIT 細胞はその発見が比較的新しくその働きの多くは解明されていない。これらを踏まえて、我々の研究室で作製した MAIT 細胞が豊富なマウスを用いて乾癬モデルマウスを作成し、乾癬モデルマウスにおける MAIT 細胞の役割、炎症の病態形成にどのように寄与するのか、そのメカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の独創性はヒトで豊富に存在するにも関わらずこれまで見過ごされてきた MAIT 細胞に焦点を当てるという点である。我々のグループで MAIT 細胞の iPS 化に成功し、更にその iPS 細胞からノックアウトマウスでもトランスジェニックマウスでもない MAIT 細胞が豊富なマウスを作製した。MAIT 細胞はヒトの末梢血中にも豊富に存在するが、通常の T 細胞のように *in vitro* で増殖させることができない。マウスには MAIT 細胞自体が殆ど存在しないため、これまでいくつかの乾癬モデルマウスが作製され無数の報告があるが、MAIT 細胞の関わりについて技術的に解析できるのは現在の所我々のグループのみである。既存のマウスモデルでは出来ない、*in vivo* における MAIT 細胞の役割を解明することは、新たな発症メカニズムの解明と新規治療法の開発のために重要な意義がある。

MAIT 細胞が豊富なマウスを用いて、TLR7/8 を介したイミキモドで誘導される乾癬モデルを構築し、MAIT 細胞がその病態形成にどのような作用機序で病態の悪化を促進するのかを明らかにする。そのメカニズムを MAIT 細胞が樹状細胞、Th17 細胞、自然免疫細胞 3 型(ILC3)の機能をいかに調節するのかという側面に焦点を当てて明らかにする。

MAIT 細胞は炎症性サイトカイン IL-23 の誘導に必要な IL-22 とともに別の炎症性サイトカインである TNF- α を産生する。したがってイミキモドによって誘導される乾癬モデルでは MAIT 細胞はこれらサイトカインを介して Th17 細胞・樹状細胞の活性化を促し、あるいは自然免疫細胞の活性化を通して病態悪化に働いている可能性がある。

3. 研究の方法

野生型マウス、V α 19 マウスと V β 8 マウスの耳にイミキモドを塗布して、炎症皮膚組織、所属リンパ節の HE 染色にて病理解析を行い、炎症部位に免疫細胞が浸潤することを確認する。また、耳、所属リンパ節に存在する免疫細胞の種類を適切な抗体を組み合わせるフローサイトメトリーならびに免疫組織染色により、同定・定量する。この実験により MAIT 細胞が豊富な場合、いかなる免疫細胞が炎症部に集積するのかを明らかにできる。乾癬では ILC3 が病態形成に重要であることが示され、ILC3 から産生される炎症性サイトカイン IL-17A を標的としたモノクローナル抗体がすでに臨床応用されている。しかしながら、ヒトでは MAIT 細胞も主要な IL-17A 産生細胞であり、ILC3 分化に重要な IL-1 β を産生するので、乾癬モデルでは ILC3 の分化調節を行っている可能性がある。そこで、これを確かめるため、以下の実験を行う。

方法：野生型マウス、V α 19 マウスと V β 8 マウスの耳にイミキモドを塗布して耳、所属リンパ節から MAIT 細胞を調整し、細胞内染色により IL-17A / IL-1 β の産生をフローサイトメトリーで解析する。この実験を通してイミキモド刺激によって MAIT 細胞が ILC3 の分化に必要なサイトカインを産生するのかを明確にする。

また同様に、野生型マウス、V α 19 マウスと V β 8 マウスの耳に MC903 を 7 日間塗布することでアトピー性皮膚炎モデルを作成する。皮膚組織を STAR Protocols(Cell Press, December 18, 2020)により調整し、それぞれの群が皮膚組織においても MAIT 細胞の比率が増えていることをフローサイトメトリーを用いて評価を行う。

ELISA 法または LEGENDplex を用いた手法で、作成したマウスの皮膚組織のサイトカイン測定を行い、MAIT 細胞が多い事でどのサイトカインを産生するのかを明確にする。

4. 研究成果

マウスにはほとんどいない MAIT 細胞がヒト並みに多いマウスを用いて、乾癬マウスとアトピー性皮膚炎マウスを作成し同様の研究を進めていたが、研究の進行速度が遅いことから、アトピー性皮膚炎のみに研究テーマを変更している。

ヒト末梢血の MAIT 細胞の頻度と同等である V α 19 マウス (血中 MAIT 細胞が全 T 細胞の約 20%を占める)と V β 8 マウス (同 0.5%)に、MC903 を 7 日間外用し炎症を起こすと、コントロール群(MAIT 細胞が血中にほぼ認めないwild type)より炎症の程度が強い (耳の厚さ)ことを確認した (図 1)。

マウスの皮膚から免疫細胞を確認するため STAR Protocols(Cell Press, December 18, 2020)では、死細胞(角化細胞と推察される) が非常に多く、MAIT 細胞を soating する事が出来ないことを確認したため、表皮細胞の乖離酵素や死細胞除去の染色抗体などに改良を重ね、MAIT 細胞を検出することが出来た。表皮と真皮において野生型マウスよりも有意に MAIT 細胞が増えていることを確認した (図 2)。

また、病理学的に MAIT 細胞が多いマウスの方がコントロール群よりも好酸球、肥満細胞が増えていることも確認した。

MAIT 細胞抑制作用のある Ac-6FP を後半の 4 日間外用し MAIT 細胞を抑制すると、皮膚炎の程度が抑制されることを確認した (図 3)。

LEGENDplex や、ELISA 法により、IL-4, 5, 6, 13, TNF α , IL-17 を測定することで、Ac-6-FP を外用すると IL-6 において耳介腫脹の変化に合致するサイトカイン変化を確認した。また Ac-6-FP による耳介腫脹の抑制についても IL-6 においてサイトカインレベルでも炎症が軽減していることが確認できた。(図 4)

以上より、IL-6 を軸とした MAIT 細胞によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの炎症の可能性が示唆されており、論文作成中である。また補足の実験も追加を行う予定である。

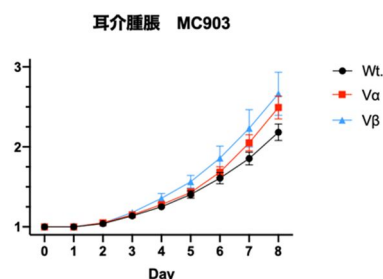


図 1 MC903 による耳介腫脹

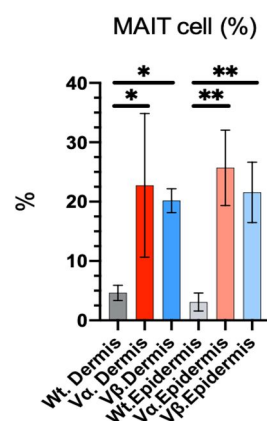


図 2 皮膚組織における MAIT 細胞比率

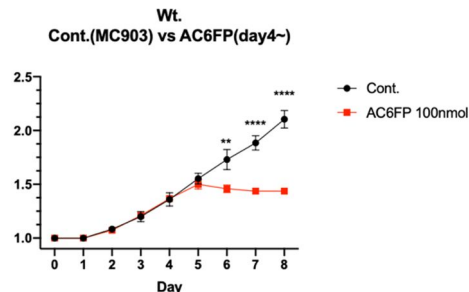


図 3 AC6FP による耳介腫脹の抑制

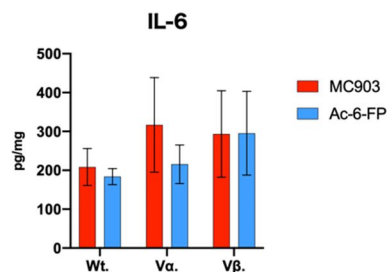


図 4 IL-6 サイトカイン評価

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〕

現在、論文作成であり、補足の実験も行う予定である。

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
---------	---------