

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17331

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患における2型自然リンパ球の遊走能に関する研究

研究課題名(英文) Study on the migration capacity of type 2 innate lymphocytes in inflammatory skin diseases

研究代表者

永井 諒 (Nagai, Makoto)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30791545

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)：IL-33は2型サイトカイン産生を促す炎症性サイトカインである。表皮でIL-33を過剰に産生する遺伝子改変マウス(hK14mIL33tg)は皮膚における2型自然リンパ球(ILC2)依存性にアトピー性皮膚炎(AD)の症状を自然発症する。本年度は、hK14mIL33tgマウスと細胞遊走を可視化できるKikGRマウスを交配することで皮膚ILC2の動態を可視化できることを確認し、皮膚病変部と所属リンパ節にILC2などの免疫細胞が遊走する動態について、AD様の皮膚炎が存在する部位の皮膚ILC2が所属リンパ節に遊走していたことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-33は2型自然リンパ球を活性化する物質で、皮膚にIL-33が過剰になる遺伝子改変マウス(hK14mIL33tg)はアトピー性皮膚炎になります。しかし、ILC2が皮膚からリンパ節に移動するかどうかは、不明でした。この研究では珊瑚(キクメイシ)の遺伝子をマウスの細胞に入れることで皮膚ILC2の動態を可視化し、皮膚病変部から所属リンパ節にILC2などの免疫細胞が遊走する動態を明かにします。本研究によって、ADにおけるILC2のリンパ節への遊走能とその意義が明らかになることで、アレルギー性疾患の新規治療法の開発や創薬に繋がることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：We previously generated a transgenic mouse line expressing skin-specific IL-33 (IL33tg mice) and showed that IL-33 elicits group 2 innate lymphoid cell (ILC2)-dependent atopic dermatitis-like skin inflammation. We sorted ILC2s from the skin and draining lymph nodes of IL33tg mice and analyzed their transcriptomes using the single-cell RNA sequencing technique, which revealed that the skin ILC2s had split into two clusters: circulating ILC2 and skin-resident ILC2. We tracked ILC2 migration using IL33tg-Kikume Green-Red mice. Exposing the IL33tg-Kikume Green-Red mice's inflamed skin to violet light allowed us to label the circulating ILC2s in their skin and track the ILC2 migration from the skin to the draining lymph nodes.

研究分野：2型自然リンパ球

キーワード：2型自然リンパ球 ILC2 アトピー性皮膚炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-33 は 2 型自然リンパ球を活性化する物質で、皮膚に IL-33 が過剰になる遺伝子改変マウス (hK14mIL33tg) はアトピー性皮膚炎になる。しかし、ILC2 が皮膚からリンパ節に移動するかどうかは不明であった。この研究では珊瑚 (キクメイシ) の遺伝子をマウスの細胞に入れることで皮膚 ILC2 の動態を可視化し、皮膚病変部から所属リンパ節に ILC2 などの免疫細胞が遊走する動態を明かにします。本研究によって、AD における ILC2 のリンパ節への遊走能とその意義が明らかになることで、アレルギー性疾患の新規治療法の開発や創薬に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

ヒトのアトピー性皮膚炎 (AD) の表皮ケラチノサイトでは IL-33 が高発現している。この病態を再現するためヒトケラチン 14 をプロモーターとして IL-33 を表皮で過剰産生する遺伝子改変マウス (hK14mIL33tg) を樹立した。このマウスでは IL-33 受容体を発現する 2 型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cells; ILC2) 依存性に AD に酷似する皮膚炎が自然発症した。本研究では、AD を自然発症する hK14mIL33tg マウスと、細胞遊走を可視化できる KikGR マウスを交配することで、皮膚 ILC2 の動態を可視化して、皮膚炎病変部から所属リンパ節に遊走した ILC2 の免疫学的な意義を明らかにする。本研究によって、AD における ILC2 のリンパ節への遊走能とその意義が明らかになることで、AD を含むアレルギー性疾患の新規治療法の開発や創薬に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

研究協力者の大阪大谷大学 戸村道夫教授らは、キクメイシ (珊瑚) の光変換蛍光タンパクであるキクメ Green-Red (KikGR) を発現する KikGR マウスを作製し、細胞を紫色光で赤色にマーキングすることによって細胞を可視化し、生体内における免疫細胞の時間・空間・数量的な解析を可能にしている。本研究では、AD モデルである hK14mIL33tg と KikGR マウスを交配し、皮膚およびリンパ節のリンパ球や ILC2 といった免疫細胞の動態を解析する。そのため、hK14mIL33tg と KikGR マウスを交配し、KikGR タンパクを発現する AD モデルマウス (hK14mIL33tg/KikGR マウス) を作出する。このマウスの皮膚に紫色光を照射して皮膚に存在する細胞を赤色 (キクメ Red) にマーキングし、経時的に皮膚、リンパ節、末梢血中における ILC2 を含む自然リンパ球等の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析する。各組織に存在する免疫細胞の比率を対照のマウスと比較検討する。以上により、AD モデルにおける免疫細胞の動態を明らかにする。

4. 研究成果

IL-33 は 2 型サイトカイン産生を促す炎症性サイトカインである。表皮で IL-33 を過剰に産生する遺伝子改変マウス (hK14mIL33tg) は皮膚における 2 型自然リンパ球 (ILC2) 依存性にアトピー性皮膚炎 (AD) の症状を自然発症する。我々は hK14mIL33tg マウスと細胞遊走を可視化できる KikGR マウスを交配することで皮膚 ILC2 の動態を可視化できることを確認し、皮膚病変部と所属リンパ節に ILC2 などの免疫細胞が遊走する動態について解析を行った。その結果、AD 様の皮膚炎が存在する部位の皮膚 ILC2 が所属リンパ節に遊走していたことを Photoconvertible Fluorescent Protein と Single-Cell RNA Sequencing を用いて明らかにした (Monitoring Cellular Movement with Photoconvertible Fluorescent Protein and Single-Cell RNA Sequencing Reveals Cutaneous Group 2 Innate Lymphoid Cell Subtypes, Circulating ILC2 and Skin-Resident ILC2)。以上の研究により皮膚 ILC2 の動態を可視化して、皮膚炎病変部から所属リンパ節に遊走した ILC2 の免疫学的な意義に迫ることができた。また角膜においても、hK14mIL33tg マウスで強い炎症が生じることが知られているが、hK14mIL33tg マウスを Th2 細胞を欠損させるために、Rag2KO マウスと交配させ、また ILC2 を欠損させるために、ILC2 を欠損した B6C3(Cg)-Rorasg/J マウスから骨髄移植すると、同マウスで角膜の炎症が生じないことがわかった。IL-33 誘発性角膜炎が、ILC2 依存性に発症することを明らかにした (IL-33-induced keratoconjunctivitis is mediated by group 2 innate lymphoid cells in mice)。また hK14mIL33tg マウスにお

る皮膚の炎症における、IL-23/17経路の関与についても、FCM解析によって検討を加えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakatani-Kusakabe Minori, Yasuda Koubun, Tomura Michio, Nagai Makoto, Yamanishi Kiyofumi, Kuroda Etsushi, Kanazawa Nobuo, Imai Yasutomo	4. 巻 1
2. 論文標題 Monitoring Cellular Movement with Photoconvertible Fluorescent Protein and Single-Cell RNA Sequencing Reveals Cutaneous Group 2 Innate Lymphoid Cell Subtypes, Circulating ILC2 and Skin-Resident ILC2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100035 ~ 100035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjidi.2021.100035	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 Imai Yasutomo, Kusakabe Minori, Nagai Makoto, Yasuda Koubun, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Dupilumab Effects on Innate Lymphoid Cell and Helper T Cell Populations in Patients with Atopic Dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100003 ~ 100003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjidi.2021.100003	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 Matsutani Masako, Imai Yasutomo, Inoue Yukako, Nakatani Kusakabe Minori, Natsuaki Masaru, Yamanishi Kiyofumi, Kanazawa Nobuo	4. 巻 48
2. 論文標題 Effectiveness and safety of tacrolimus ointment combined with dupilumab for patients with atopic dermatitis in real world clinical practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1564 ~ 1568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16039	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 Kunimoto Marin, Imai Yasutomo, Matsutani Masako, Nakatani Kusakabe Minori, Nagai Makoto, Natsuaki Masaru, Yamanishi Kiyofumi, Kanazawa Nobuo	4. 巻 5
2. 論文標題 Evaluation of long term disease control with dupilumab therapy using the Atopic Dermatitis Control Tool in real world clinical practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Immunology and Allergy	6. 最初と最後の頁 69 ~ 71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cia2.12212	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 藤本 真由, 夏秋 優, 北 佳奈子, 井上 裕香子, 永井 諒, 今 井 康友, 山西 清文	4. 巻 19
2. 論文標題 レボフロキサシンによるアナフィラキシーの1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 皮膚の科学	6. 最初と最後の頁 244-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Hayashi H, Kusakabe M, Nagai M, Imai Y, Yamanishi K	4. 巻 4
2. 論文標題 Switching to ixekizumab improves adalimumab induced interstitial lung disease in patients with psoriatic arthritis: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cutan Immunol Allergy	6. 最初と最後の頁 22-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cia2.12146	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 Imai Y, Kusakabe M, Nagai M, Yasuda K, Yamanishi K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Dupilumab effects on innate lymphoid cell and Th cell populations in patients with atopic dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 ID: 100003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xjidi.2021.100003	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Miyamoto Shoko, Nishiumi Shin, Matsutani Masako, Nagai Makoto, Yamanishi Kiyofumi, Kanazawa Nobuo, Imai Yasutomo
2. 発表標題 Identification of serum biomarkers predicting the therapeutic effect of dupilumab in atopic dermatitis by a targeted metabolomics approach
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Imai Y, Kusakabe M, Nagai M, Inoue Y, Natsuaki M, Yamanishi K
2. 発表標題 Dupilumab's Effects on Circulating Group 2 Innate Lymphoid Cell and T Helper Type 2 Cell Populations in Patients with Atopic Dermatitis
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kusakabe M, Imai Y, Nagai M, Yasuda K, Kuroda E, Tomura M, Yamanishi K
2. 発表標題 Single-Cell RNA Sequencing Reveals Novel Cutaneous Group 2 Innate Lymphoid Cell Subtypes, Circulating ILC2, and Skin-Resident ILC2
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020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