

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17333

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎の炎症長期化にともなう血管機能変化の制御機構解明

研究課題名(英文)Functional alterations in blood vessels in skin tissue in refractory atopic dermatitis

研究代表者

関田 愛子 (Sekita, Aiko)

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・研究員

研究者番号：10804289

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)：アトピー性皮膚炎(AD)は慢性難治性の皮膚炎であり、特に症状が長期化した皮膚組織では重度の苔癬化が見られる。本研究では、異なる炎症ステージにある皮膚組織の詳細な病理解析および組織トランスクリプトーム解析を実施した。免疫細胞および血管内皮細胞に発現する血管外遊走・組織内浸潤に関わる遺伝子群とマクロファージ等による細胞貪食・クリアランスに関わる遺伝子群の発現量に着目したところ、重度の苔癬化がみられる皮膚組織では前者が後者に比べ優位になる傾向があることを見出した。すなわち重度に炎症が慢性化した皮膚組織において血管の機能が低下し、免疫細胞浸潤・クリアランスのバランスが破綻してい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

これまでにADの皮膚組織における炎症の発生・維持に関わる分子メカニズムが多数報告されているものの、炎症の慢性化状態の違いによる皮膚の組織学的あるいは分子的な変化については未だ十分に明らかにされていなかった。本研究では、患者横断的な皮膚組織の病理学的解析および遺伝子発現解析を通して、皮膚炎慢性化にともない生じる血管機能に関わる遺伝子発現変化を捉えた。本研究で得られた知見は、これまで「皮膚炎」とひとまとめにされていたAD皮膚組織における生物学的変化の、より高い解像度での理解につながる。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis (AD) is a chronic skin disease characterized by combination of skin presentations including erythema, papulation and lichenification. In this study, biology of lichenification, a major sign of repeated occurrence of skin inflammation which is frequently observed in patients with refractory AD, were assessed both by histological and transcriptome approach. Lichenification was found to be associated with disruption in regulation of cell infiltration in skin tissue that are potentially linked with blood vessel function, suggesting functional alterations in blood vessel in skin tissue as a key element for chronicity of skin inflammation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 血管内皮 炎症 皮膚組織病理 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

ADは強いかゆみと紅斑、丘疹、苔癬化などが組み合わさった多様な皮膚症状を特徴とする慢性難治性の皮膚炎である。ADの治療には、現状ではステロイド外用薬による炎症の鎮静が基本とされるが、ステロイド外用により症状を一時的に緩和できたとしても、ある期間の後に同じ部位で再び炎症を引き起こしてしまう。申請者はこれまでにを行ったAD患者の横断的な病理学的解析から、AD患者の皮膚組織における炎症のパターンは患者ごとに極めて多彩であること、また同一の患者でも部位や時期により状態が大きく変わることから、組織の状態を理解するには炎症の慢性化状態あるいは増悪/寛解の周期のどのフェーズにあるのかといった時間軸要素を紐づける必要性を強く感じた。現時点での一般的な理解として、ADの慢性化状態を反映しているとされる表現形の代表が苔癬化、すなわち「皮膚が固くなり皮溝および皮丘の形成が顕著な状態」と定義される皮疹である。これは臨床上の経験に基づいた知見であり広く認知されているものの、実際には苔癬化の厳密な評価法は十分に確立しておらず、苔癬化を起こした皮膚における生物学的変化は未解明のままである。

一般に、ADの皮膚炎症反応では真皮や表皮内へのT細胞をはじめとした免疫細胞の浸潤を特徴とするが、炎症にともない皮膚組織に浸潤してきた大量の免疫細胞は、細胞種ごとの寿命の後にはマクロファージ等により貪食され皮膚組織から除去つまりクリアランスされる必要がある。炎症がある時期に終焉に向かう場合には、炎症の開始から終焉にかけて、免疫細胞の組織内浸潤-組織クリアランスのバランスは過不足なしとなることが予想されるが、炎症が持続している状態あるいは悪化していく過程においては免疫細胞の組織内浸潤が組織クリアランスに比べて優位となっている可能性がある。免疫細胞の組織内浸潤においては、皮膚組織における血管内皮細胞とT細胞などの免疫細胞がセレクチンなどの分子を介して相互作用することにより免疫細胞が血管内から血管外つまり組織へと移動する。一方、組織クリアランスにおいてはマクロファージによる死細胞の貪食(phagocytosisあるいはefferocytosis)が重要な役割を果たすが、マクロファージは組織内で自己複製するほか血管から供給される単球由来のマクロファージが存在する。以上のことから、組織における免疫細胞浸潤および組織クリアランスには血管の機能が鍵となっていると考えられ、炎症を長期間にわたって繰り返している皮膚組織では、血管の機能異常を起点として、免疫細胞の組織内浸潤-組織クリアランスのバランスが破綻している可能性があると考えた。そこで、本研究では病理学的観点から苔癬化の度合いを評価するとともに、皮膚組織トランスクリプトーム解析を実施することにより皮膚炎の長期化にともなう生物学的変化を明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、これまで「皮膚炎」とひとまとめにされていたADの皮膚組織の状態を、病理および遺伝子発現の両面から血管に着目した解析を行うことで、炎症の長期化状態の違いによりどのような生物学的な変化が生じているのか、という高い解像度での皮膚炎の理解を目指した。

## 3. 研究の方法

慶應大学病院に通院中のAD患者102名および健常人20名から採取した皮膚1mmパンチバイオプシー検体を用いて、病理学的解析と皮膚組織RNA-seq解析を実施した。病理学的解析では、HE染色のほかCD4陽性T細胞や血管内皮細胞マーカーCD31の免疫組織学的染色を行い、得られた組織像から苔癬化に関連する各病理所見(表皮肥厚、過角化、不全角化、ケラチノサイトの空胞変性、真皮乳頭層での線維化および血管垂直上昇、表皮内へのリンパ球浸潤)をスコア化し、その合計点を病理に基づく病理苔癬化度(severity of lichenification, SL)として患者ごとに評価した。皮膚RNA-seq解析では、患者ごとの血管および血管を介した免疫細胞組織浸潤に関連する遺伝子の発現変化をgene set enrichment analysis (GSEA, <http://www.broad.mit.edu/gsea>)により評価した。遺伝子発現解析を含む全ての統計学的評価にはR v3.6.2を使用した。患者群間の比較にはBrunner-munzel検定を実施し、p値をHolm法により補正した。

## 4. 研究成果

病理解析において、苔癬化に関連する各病理所見に基づき患者ごとに病理苔癬化度を評価しAD患者と健常人とで比較したところ、AD患者が健常人に比べ病理苔癬化度が有意に高かった。ここでAD患者の病理苔癬化度の値は広がり大きいのが、患者間での病理学的特徴と遺伝子発現上の特徴のリンク解析を容易にするために、病理苔癬化度に従ってAD患者をmild, moderate, severeの3群に分類した。血管内皮細胞マーカーCD31の免疫染色を行った際の各群の病理画

像の例を図 1. に示す。Mild, moderate, severe の各患者間で血管走行の状態が大きく異なるばかりでなく、血管付近の免疫細胞の浸潤の度合いにも大きな違いがあることが見てとれる。二次元イメージングの定性的評価には限界があるものの、mild 患者では血管がほとんど像中に入りこまない程度であるのに対し、moderate 患者では真皮乳頭に沿った顕著な血管走行、severe 患者では真皮浅層で毛細血管の拡張およびその周囲での強い免疫細胞（大部分を CD 4 陽性細胞が占めることを確認している）が観察された。

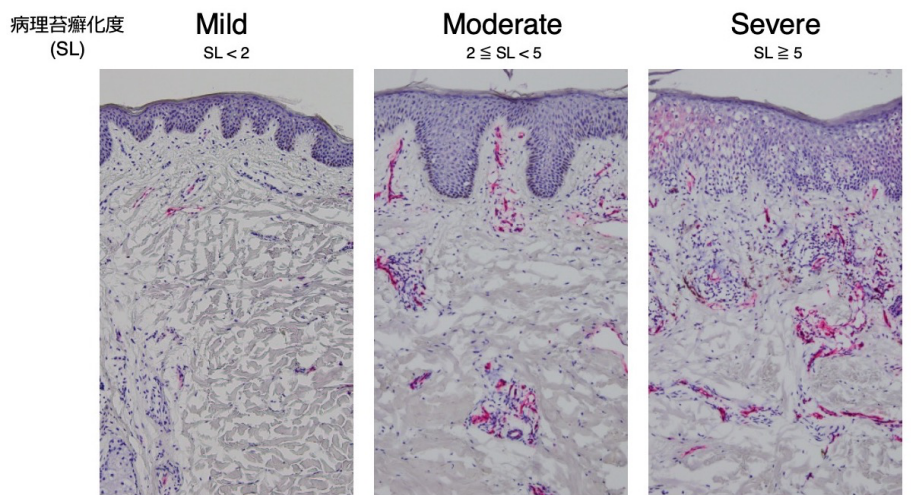


図 1. アトピー性皮膚炎患者の皮膚組織 CD31 免疫組織化学染色像 (赤色: CD31)

続いて病理苔癬化度に基づき層別化した AD 患者 3 群間で、血管および血管を介した免疫細胞浸潤に関わる遺伝子の発現パターンに違いがあるかどうかを皮膚組織 RNA-seq データを用いて調査した。機能的経路の遺伝子セットとして、血管内皮細胞増殖 (Endothelial cell proliferation, VEGFA など)、免疫細胞の血管外遊走/組織浸潤 (Extravasation, SELL, ICAM1, VCAM1 など) およびマクロファージによる死細胞クリアランス (Apoptotic clearance, TREM2 など) に関わる遺伝子セットを MSigDB (Broad institute) より抽出し、その遺伝子セットの発現の偏りを GSEA スコアとして患者ごとに評価した。この GSEA スコアを健常人と AD 患者全体で比較すると、いずれのパスウェイも AD 患者が健常人に比べ有意に高かった。また、病理苔癬化度に基づく層別化患者群間で比較したところ、群間でこれらの遺伝子セットの発現パターンが異なることが明らかとなった。(図 2.)

Endothelial cell proliferation に関しては、3 患者群で違いが見られなかった一方で、Extravasation のスコアは mild 群に比べ moderate 群および severe 群が有意に高かった。さらに、Apoptotic clearance のスコアは mild 群に比べ moderate 群が高かった。Moderate 群と severe 群の比較においては、いずれのパスウェイにおいても両者の間で統計学的な有意差は見られなかったものの、Apoptotic clearance スコアの中央値は moderate 群に比べて severe 群において小さく、severe 群の一部の患者では Extravasation pathway high かつ Apoptotic clearance pathway low という状態となっていることが判明した。このことは、moderate 群と severe 群はどちらも血管の形成が促進され免疫細胞浸潤が増大しているが、severe 群の一部の患者つまり高度に苔癬化した患者皮膚組織では免疫細胞浸潤-クリアランスのバランスが破綻している可能性を示唆する。

本研究では苔癬化と血管を介した免疫細胞の組織浸潤/クリアランスの関連について患者横断的解析における傾向を捉えたが、今後は病理苔癬化の評価法の妥当性検証を行うとともに、炎症段階の評価に時間軸要素を考慮し同一患者内での経時的変化の解析を含めることにより、皮膚炎が長期化する過程で起きる生物学的変化についてより詳細な検討を行う。

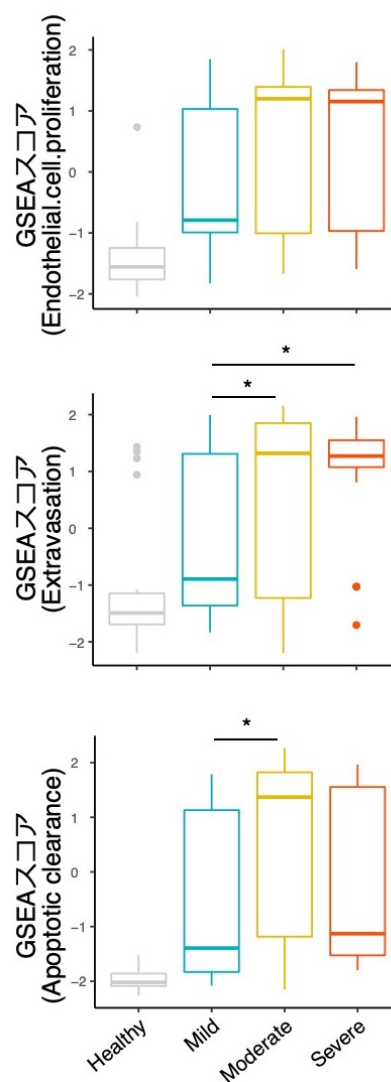


図 2. 病理苔癬化度に基づき層別化された AD 患者群間の皮膚組織における遺伝子発現パターンの違い

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyai T., Kawasaki H., Matsunaga H., Hosokawa M., Sekita A., Takeyama H., Amagai M., Koseki H.	4. 巻 141
2. 論文標題 162 Application of microdissection-based spatial transcriptomics for mechanistic and biomarker investigations in dermatology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 S29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.02.182	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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