

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08293

研究課題名（和文）CARD11遺伝子変異に基づくアトピー性皮膚炎の病態・臨床像の解明

研究課題名（英文）Pathology and clinical profile of atopic dermatitis associated with CARD11 mutation

研究代表者

稲葉 正子（Inaba, Masako）

筑波大学・附属病院・病院助教

研究者番号：60881521

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）：日本人アトピー性皮膚炎の患者集団において、CARD11遺伝子バリエーションの保有率およびバリエーション様式を調査した。また、アトピー性皮膚炎患者ならびに健常対照者の血液を採取し、アトピー性皮膚炎の主要抗原であるダニに特異的に作用するT細胞を同定した。さらに、アトピー性皮膚炎患者と健常者の、ダニ特異的制御性T細胞（Treg）とダニ抗原特異的エフェクターT細胞（Teff）の頻度と表現型を調べ、単一の抗原に働くTregとTeffのバランスを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の発症が単一抗原に対して特異的に働くTregとTeffのバランスで規定されることがわかった。アトピー性皮膚炎の病態研究において抗原特異的T細胞に着目した研究はこれまでになく、本研究結果から、皮膚において抗原特異的にTregを誘導する様な免疫療法を開発することができれば、健常者に近いTreg優位のT細胞免疫バランスを作り出すことができ、アトピー性皮膚炎の根治的治療となり得ると期待される。

研究成果の概要（英文）：We analysed the prevalence and variant patterns of CARD11 gene variants in a population of Japanese patients with atopic dermatitis.

Blood samples from patients with atopic dermatitis and healthy controls were also collected to identify T cells that specifically act on mites, the major antigen of atopic dermatitis. In addition, the frequency and phenotype of mite-specific regulatory T cells (Tregs) and mite-specific effector T cells (Teffs) were examined in patients with atopic dermatitis and healthy controls to determine the balance between Tregs and Teffs acting on a single antigen.

研究分野：免疫、アレルギー

キーワード：CARD11 アトピー性皮膚炎 抗原特異的T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の有病率は成人の5%に及び、最も一般的な慢性皮膚疾患であるにも関わらず、未だ根本的治療の開発につながる病態解明はなされていない。家族内集積性がみられることから長年にわたり原因遺伝子の特定が行われてきたが、近年、欧米の重症アトピー性皮膚炎を呈する家系において、新たに CARD11 遺伝子の変異が同定された。CARD11 遺伝子変異保有者のアトピー性皮膚炎の発症率は7割に及び、これまでに報告されているアトピー性皮膚炎に関連したどの遺伝子よりも浸透率が高い。CARD11 はリンパ球機能の調節に関わる蛋白であり、マウスでは CARD11 の構成する CBM 複合体の機能異常がアレルギーの発症に関与することが示されているが、ヒトのアトピー性皮膚炎患者集団における CARD11 遺伝子変異に着目した研究はない。本研究では、日本人アトピー性皮膚炎患者集団における CARD11 遺伝子変異の保有率およびバリエーション様式の調査を行う。さらに、CARD11 変異保有者のリンパ球解析および、バリエーション毎の変異体を作製しリンパ球機能解析を行う。アトピー性皮膚炎の発症と極めて強い関連をもつこの CARD11 の変異保有者の臨床像および分子病態を解明することで、アトピー性皮膚炎の新規分子標的治療の開発に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、日本人アトピー性皮膚炎の患者集団において、CARD11 遺伝子バリエーションの保有率およびバリエーション様式を調査し、さらに検出された CARD11 遺伝子変異がどの様にアトピー性皮膚炎の発症に関与し、バリエーション様式により患者の臨床像とどの様に関連しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

<令和3年度・令和4年度>

東北メディカル・メガバンク (ToMMo) の日本人約20,000人のゲノムデータを解析し、アトピー性皮膚炎の患者群と健常群の間で有意差のある CARD11 遺伝子バリエーションを抽出する。得られた CARD11 遺伝子バリエーションの一覧から、患者間、家系間、また正常者との関連解析、比較解析を行い、病的と考えられる候補バリエーションを抽出する。抽出したゲノム情報を研究分担者の鹿児島大学 原教授らの研究グループに譲渡し、機能解析を行う。鹿児島大では遺伝子改変マウスを用いたフローサイトメトリーによるリンパ球解析や培養実験等を行い、抽出した候補バリエーションが、実際にアトピー性皮膚炎に与える影響について解析する。

筑波大関連施設で収集した患者末梢血(100名)から胚細胞系細胞のDNAを抽出し、次世代シーケンサを用いた全エクソン解析を行う。同定した CARD11 遺伝子のゲノム情報は、同様に鹿児島大学 原教授らの研究グループに譲渡し、機能解析を行う。収集した患者の診療録および血液検査結果の後方視的調査、リンパ球解析(フローサイトメトリー、蛋白発現解析、サイトカイン測定、培養実験)を行い、バリエーション毎の臨床像およびリンパ球機能を把握する。この解析結果が、鹿児島大で解析した変異体マウスの表現型と一致するかを確認する。

<令和5年度>

筑波大関連施設で収集した患者において、東北メディカル・メガバンク (ToMMo) のゲノムデータから抽出した CARD11 遺伝子バリエーションの保有者がいるかダイレクトシーケンスにより解析を行う。

CARD11 遺伝子変異保有患者において、アトピー性皮膚炎との関連が示されている最も代表的な遺伝子(フィラグリン遺伝子など)の異常がないか、ダイレクトシーケンスにより明らかにする。

4. 研究成果

(1) 東北メディカル・メガバンク (ToMMo) の日本人約20,000人のゲノムデータの解析により、アトピー性皮膚炎の発症リスクとなる CARD11 領域の3つの候補バリエーションを抽出した。これら3つの病的候補バリエーションはいずれもアレル頻度が0.01以下のレアバリエーションでオッズ比にして2~5($P < 0.01$)であった。

また、筑波大関連施設で収集した患者78名の末梢血よりDNAを抽出し、全エクソン解析を実施した。このうち16名に CARD11 領域の5つの部位の変異を認めたと、既報の欧米の重症アトピー性皮膚炎を呈する家系において同定された CARD11 遺伝子バリエーションと同一のバリエーションを保有する者はいなかった。

(2) アトピー性皮膚炎患者における抗原特異的T細胞解析

アトピー性皮膚炎患者ならびに健常対照者の血液を採取し、アトピー性皮膚炎の主要抗原であるダニに特異的に作用するT細胞を同定した。さらに、アトピー性皮膚炎患者と健常者の、ダニ特異的制御性T細胞 (Treg) とダニ抗原特異的エフェクターT細胞 (Teff) の頻度と表現型を

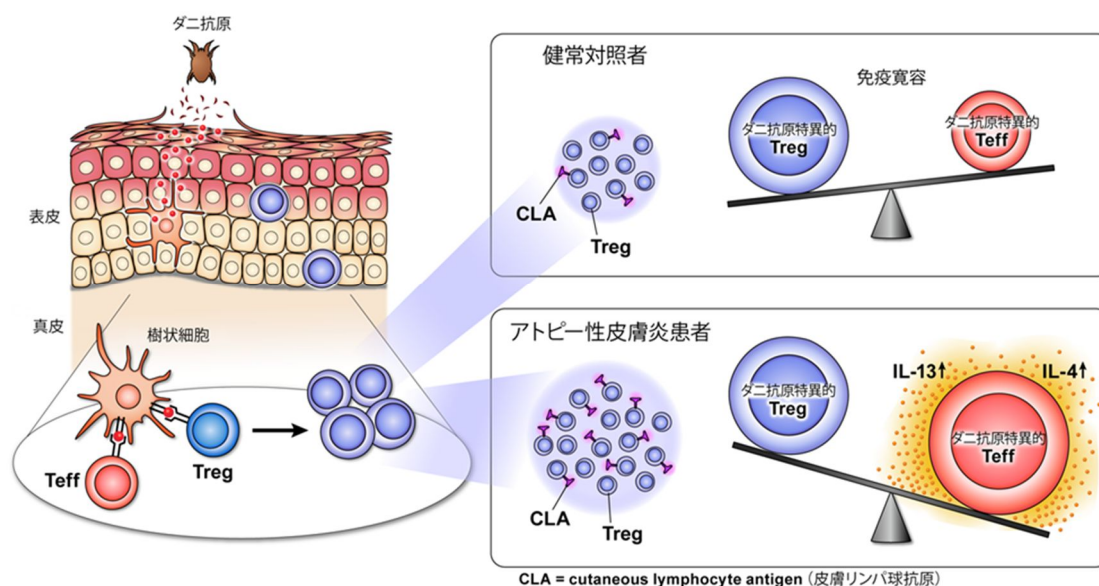
調べ、単一の抗原に働く Treg と Teff のバランスを明らかにした。

アトピー性皮膚炎の患者群は健常対照群に比べて Treg の総数が多い傾向がみられ、皮膚に浸潤する細胞であることを示す cutaneous lymphocyte antigen (CLA) が陽性の Treg の割合も、患者群で高い傾向を認めた。アトピー性皮膚炎の患者では、荒れた皮膚でより多くの抗原感作が起こるため、CLA 陽性の Treg が多く、結果的に Treg の総数も多くなると考えられた。実際、アトピー性皮膚炎の患者群では、重症度を示す EASI スコアと CD4 陽性細胞全体に占める Treg の割合に正の相関が認められた。しかし、ダニ単一抗原に特異的な T 細胞に着目して解析をすると、アトピー性皮膚炎の患者群におけるダニ特異的 Treg/Teff の割合は、健常対照群より有意に低いという結果が得られた。また、患者群のダニ抗原特異的 Teff は、アトピー性皮膚炎の病態の中心的役割を担う炎症性サイトカインである IL-4 および IL-13 を、健常対照群より多く産生していた。アトピー性皮膚炎の患者群と健常対照群でダニ特異的 Treg によるダニ特異的 Teff の増殖抑制機能の解析を行ったが、両群に差を認めなかった。

以上の結果から、アトピー性皮膚炎患者では Treg の総数が多い傾向にあるものの、ダニ特異的 T 細胞に着目すると、アトピー性皮膚炎患者では向炎症性の Teff 優位の免疫バランスが存在することから、ダニに対して免疫寛容を獲得できず、アトピー症状を呈すると考えられた。

<グラフィカルアブストラクト>

アトピー性皮膚炎患者と健常対象者におけるT細胞バランス



Treg = regulatory T cell (制御性T細胞), Teff = effector T cell (エフェクターT細胞)

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 Inaba Masako, Fukushima Hiroko, Hara Monami, Hosaka Sho, Fujiyama Satoshi, Maruo Kazushi, Nomura Toshifumi, Okiyama Naoko, Takada Hidetoshi	4. 巻 252
2. 論文標題 Antigen-specific T cell balance reveals Why patients with atopic dermatitis fail to achieve immune tolerance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 109649 ~ 109649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clim.2023.109649	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲葉正子、福島紘子、原モナミ、穂坂翔、藤山 聡、高田英俊
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎患者におけるダニ抗原特異的T細胞解析 なぜアトピー性皮膚炎患者はダニに対して免疫寛容を獲得できないのか
3. 学会等名 第51回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲葉正子、福島紘子、原モナミ、穂坂翔、藤山 聡、高田英俊
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎患者におけるダニ抗原特異的T細胞解析
3. 学会等名 第127回 日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究分担者	原 博満 (Hara Hiromitsu) (20392079)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	野口 恵美子 (Noguchi Emiko) (40344882)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

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