

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16211

研究課題名(和文) 炎症性皮膚疾患における病原性抗原提示細胞と治療標的の同定

研究課題名(英文) Identification of pathogenic antigen-presenting cells and therapeutic targets in inflammatory skin diseases.

研究代表者

中溝 聡 (Nakamizo, Satoshi)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：30769740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：フローサイトメトリー解析と1細胞RNAシーケンス解析を組み合わせ、ヒト皮膚樹状細胞をDC1、DC2、DC3、活性化DCの4つの集団に、マクロファージをCCR1陽性、MARCO陽性、TREM2陽性マクロファージの3つの集団に分類した。活性化DCはアトピー性皮膚炎と乾癬とともに増加しており、皮膚炎に重要なIL-15を産生していた。DC3は乾癬でのみ増加し、乾癬発症に必須のIL-1BとIL-23Aを産生していた。これらの結果は、新たに同定された活性化DCやDC3が炎症性皮膚疾患に極めて重要な役割を担ってい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

学術的な意義として、1.細胞RNAシーケンス解析とフローサイトメトリー解析を組み合わせ、皮膚の抗原提示細胞分画を詳細に解析したこと、2.新たに同定された活性化DCとDC3が皮膚炎症に重要な役割を担っている可能性を示したことが挙げられる。これらの知見は、皮膚免疫システムの理解を大きく進展させ、炎症性皮膚疾患の病態解明につながる可能性がある。社会的な意義としては、この研究成果が新規治療薬開発につながる可能性が考えられる。また、皮膚の免疫システムの理解を深めることで、皮膚がんや感染症などの皮膚疾患への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometry analysis combined with one-cell RNA sequencing analysis was used to classify human cutaneous dendritic cells into four populations, DC1, DC2, DC3 and activated DC, and macrophages into three populations, CCR1-positive, MARCO-positive and TREM2-positive macrophages. Activated DCs were increased in both atopic dermatitis and psoriasis and produced IL-15, which is important for dermatitis; DC3 were increased only in psoriasis and produced IL-1B and IL-23A, which are essential for the development of psoriasis; TREM2-positive DCs were increased in psoriasis and produced IL-15, which is important for psoriasis; TREM3-positive DCs were increased in atopic dermatitis and produced IL-15, which is important for psoriasis. These results suggest that newly identified activated DCs and DC3 may play a pivotal role in inflammatory skin diseases.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 尋常性乾癬 樹状細胞 マクロファージ 1細胞RNAシーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーの発達と技術の進化により、遺伝子を1細胞レベルで網羅的に解析することが安価にできるようになった。それにより、単一と思われていた細胞分画が異なる細胞群により構成されており、真の病原性細胞が同定され新たな治療に結びつくことが報告されている (Kim ら、2020 年)。

アトピー性皮膚炎および尋常性乾癬といった慢性炎症性皮膚疾患は、皮膚科診療で最も頻繁に遭遇する皮膚疾患群である (Guttman-Yassky ら、2011)。皮膚内の抗原提示細胞が炎症の方向付け、病態形成に重要であることがわかってきており、それを慢性炎症性皮膚疾患で正確に分類、特徴づけすることが重要であると考えた。尋常性乾癬においては、抗原提示細胞から分泌される炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) や IL-23A が臨床における炎症惹起物質として特定されているが、炎症性サイトカインの中和抗体製剤は非常に高価であり (一か月の薬価が7万円以上) 医療費の面から導入できない患者も多い。また、治療は一生にわたり必要であるため、国の医療財政の圧迫にもつながる。そのため、低分子化合物による治療薬の開発が急務である。そのため、低分子化合物の標的となる細胞種、細胞内シグナルなどの同定が必要である。しかし、TNF や IL-23A を分泌する抗原提示細胞が何であるのか、という点については未だに議論の渦中である。また、近年1細胞 RNA シークエンス技術の発達により抗原提示細胞の分画はいくつかの表面抗原だけではなく、網羅的な遺伝子発現に基づいて再分類されている (Dutertre ら、2019; Chakarov ら、2019)。そのため、皮膚の抗原提示細胞も網羅的な遺伝子発現に基づいて分類する必要がある。

申請者はこの問題を解決するために、まず健常者の皮膚を用いて皮膚抗原提示細胞における1細胞 RNA シークエンスの系の確立を行った。その結果、皮膚の抗原提示細胞は4種類の樹状細胞と2種類のマクロファージに分類できることを見出した (図1)。申請者は本研究においてさらにアトピー性皮膚炎、尋常性乾癬患者にも同様の解析を行い、炎症性皮膚疾患における病態形成の司令塔のような役割を担う病原性抗原提示細胞を特定する。さらに病原性抗原提示細胞の表面受容体や細胞内シグナルを同定し、それらを標的にした低分子化合物による治療につなげたいと考えている。

本研究の学術的「問い」は『炎症性皮膚疾患の病原性抗原提示細胞は何か？病原性抗原提示細胞を制御する低分子化合物の治療標的は何か？』である。

### 2. 研究の目的

本研究ではアトピー性皮膚炎、尋常性乾癬における病原性抗原提示細胞と新たな治療標的を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では患者検体を用いてフローサイトメトリーと1細胞 RNA シークエンスにより皮膚の抗原提示細胞の分類を行う。次いで病原性抗原提示細胞、病原性抗原提示細胞特異的なマーカーを同定する。

フローサイトメトリーと1細胞 RNA シークエンスによるアトピー性皮膚炎・尋常性乾癬における皮膚抗原提示細胞の分類 (2021 - 2022年)

本研究項目ではアトピー性皮膚炎・尋常性乾癬患者の健常部と病変部の生検皮膚を用いる。アトピー性皮膚炎4例、尋常性乾癬4例を予定している。生検皮膚を酵素処理し、単細胞懸濁液を作成した後、17種類の蛍光抗体で表面抗原を標識しフローサイトメトリーセルソーターにより表面抗原タンパク情報を取得し、抗原提示細胞の特徴を持つ CD45 陽性、主要組織適合遺伝子複合体クラス II (HLA-DR) 陽性細胞を分離する。その後、1細胞の RNA ライブラリを作成し、1細胞 RNA シークエンスを行う。これにより同一細胞のフローサイトメトリーによるタンパク質発現情報と RNA シークエンスによる遺伝子発現情報を得ることができる。この情報をもとに各細胞の分類を行い、皮膚抗原提示細胞の新たな分類図を作成する。また、健常部と病変部を比べることにより病変部で増加している分画を明らかにする。また、アトピー性皮膚炎と尋常性乾癬を比較し同一の分画が増加しているのか、それぞれの分画の機能に差異があるのかを検証する。

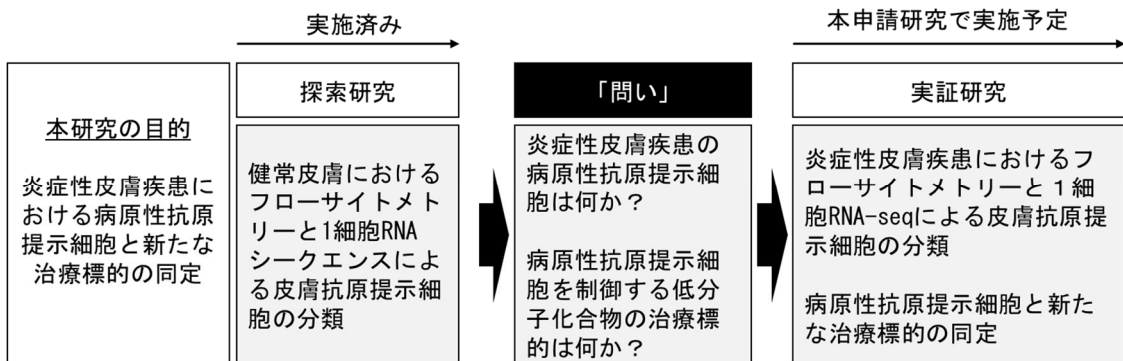
病原性抗原提示細胞と新たな治療標的の同定 (2022年)

で分類した抗原提示細胞の分画のうちどの分画が TNF や IL-23A のような炎症を悪化させる分子を発現しているのか RNA シークエンスデータを用いて解析する。また、病原性抗原提示細胞特異的なマーカー、その分画で動いている細胞内シグナルについても RNA シークエンスのデータを用いて解析する。

次に上記で得られた RNA がタンパク質として実際に翻訳されているのか確かめるために、健

常皮膚とアトピー性皮膚炎、尋常性乾癬患者皮膚のパラフィン包埋切片を用いた免疫染色を行う。免疫染色にはアトピー性皮膚炎20例、尋常性乾癬20例程度を予定している。

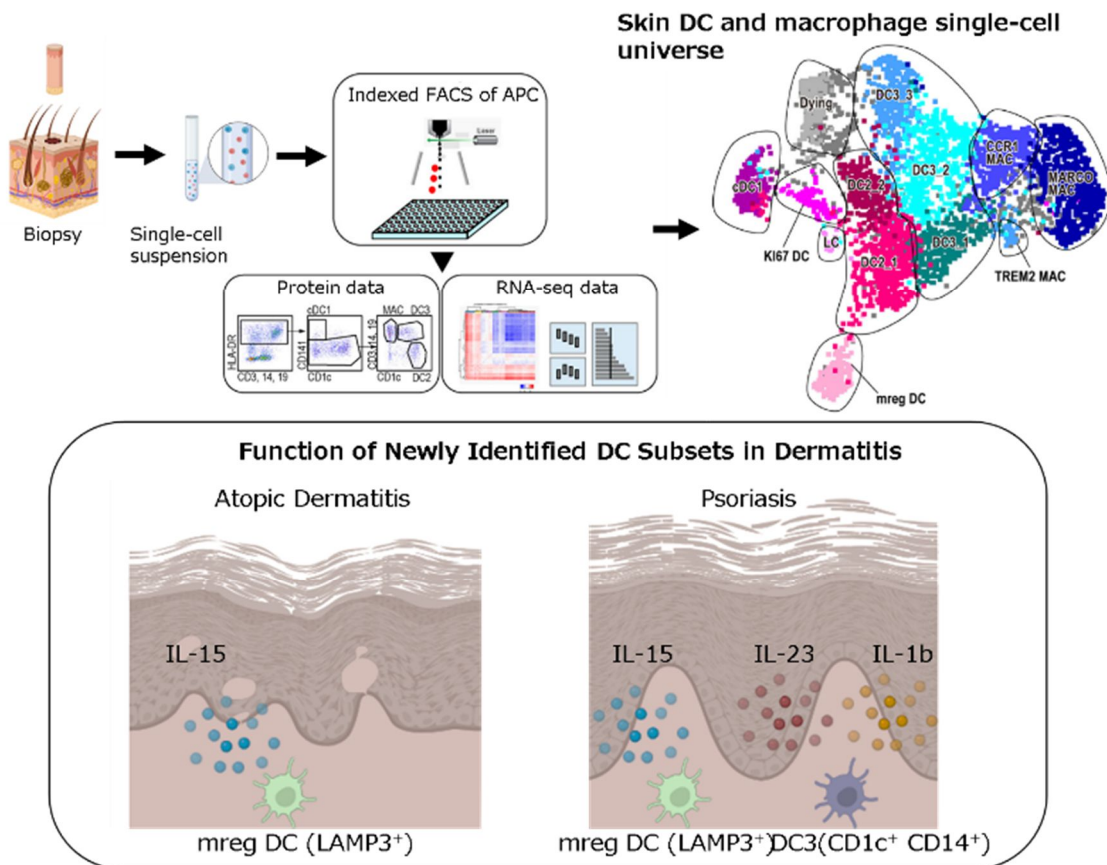
以上の検討により、皮膚抗原提示細胞の分類、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬における病原性抗原提示細胞の同定、病原性抗原提示細胞を制御する治療標的の同定を行う。



本申請研究の骨子

#### 4. 研究成果

フローサイトメトリー解析と1細胞RNAシーケンス解析を組み合わせ、ヒト皮膚樹状細胞をDC1, DC2, DC3, 活性化DCの4つの集団に、マクロファージをCCR1陽性、MARCO陽性、TREM2陽性マクロファージの3つの集団に分類した。活性化DCはアトピー性皮膚炎と乾癬とともに増加しており、皮膚炎に重要なIL-15を産生していた。DC3は乾癬でのみ増加し、乾癬発症に必須のIL-1BとIL-23Aを産生していた。これらの結果は、新たに同定された活性化DCやDC3が炎症性皮膚疾患に極めて重要な役割を担っている可能性を示唆している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamizo Satoshi et al.	4. 巻 218
2. 論文標題 Single-cell analysis of human skin identifies CD14+ type 3 dendritic cells co-producing IL1B and IL23A in psoriasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20202345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20202345	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

1. 著者名 Nakamizo Satoshi, Honda Tetsuya, Sato Tomohito, Al Mamun Md., Chow Zachary, Duan Kaibo, Lum Josephine, Tan Kahbing Jasmine, Tomari Kaori, Sato Reiko, Kitoh Akihiko, Tay Angeline S.L., Common John E.A., Guan Ng Lai, Setou Mitsutoshi, Ginhoux Florent, Kabashima Kenji	4. 巻 148
2. 論文標題 High-fat diet induces a predisposition to follicular hyperkeratosis and neutrophilic folliculitis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 473 ~ 485.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.02.032	査読の有無 無
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 Oiwa Tomohiro, Nakamizo Satoshi, Nomura Takashi, Tomari Kaori, Horiguchi Yuji, Kabashima Kenji	4. 巻 48
2. 論文標題 Reduction of E cadherin expression in the lesion of molluscum contagiosum: A possible explanation for the lack of Langerhans cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e600-e601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16171	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中溝聡
2. 発表標題 Single-cell analysis of inflammatory skin diseases identifies the new subpopulations of antigen presenting cells in human
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中溝聡
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing of antigen-presenting cells in inflammatory skin diseases
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中溝聡
2. 発表標題 Single cell RNA analysis of antigen-presenting cells in inflammatory skin diseases
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
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