

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16216

研究課題名（和文）乾癬における新規細胞性免疫活性化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel mechanism of activating cellular immunity in psoriasis

研究代表者

前田 耕平（MAEDA, Kohei）

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：00882549

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）：本研究では、乾癬における病的なTh17細胞サブセットの同定を試みた。さらに、乾癬の増悪に関連するCD8+T細胞の活性化に当該サブセットがどのように影響するのか検討した。我々はMCAM+CD161- Th17 subsetを乾癬における病的なTh17細胞サブセットとして同定し、このサブセットに特異的にCD8+T細胞活性化分子であるCD83をコードする遺伝子が発現していることを明らかにした。MCAM+CD161- Th17 subsetは、IL-17Aの産生とCD83を介した細胞接触により、CD8+T細胞を活性化させ、異常な免疫反応を引き起こしている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Th17細胞から産生されるIL-17Aや、Th17細胞の活性化に関連するIL-23などを標的とした分子標的治療が乾癬に対して非常に優れた有効性を示すことから、Th17細胞が乾癬の増悪に寄与していることは明らかであったが、近年、IL-17Aを産生するCD8+T細胞や、皮膚に常在するレジデントメモリーCD8+T細胞が乾癬の皮膚炎症を惹起している可能性が明らかとなってきた。しかし、乾癬におけるTh17細胞とCD8+T細胞の相互作用に関して検討している研究は我々の知るところでは存在せず、本研究が初めて詳細な解析を実施した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to identify a pathogenic Th17 subset in a pathogenesis of psoriasis. We also examined the effect of this putative pathogenic Th17 subset on CD8+ T cell activation associated with psoriasis exacerbation. We identified the MCAM+CD161- Th17 subset as the pathogenic Th17 subset in a pathogenesis of psoriasis. Also, we found the CD83 gene, a CD8+-T-cell activator, is specifically expressed in this subset. These results suggested that the MCAM+CD161- Th17 subset may activate CD8+ T cells through IL-17A production and CD83-mediated cell contact, leading to an abnormal immune response in psoriasis.

研究分野：免疫学

キーワード：乾癬 Th17細胞 Tc17細胞 CD83

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬はアトピー性皮膚炎と同様に、T 細胞を始めとした免疫担当細胞の異常な反応が原因として起こる慢性的な炎症性の皮膚疾患であり、ヘルパーT 細胞のサブセットの一つである T helper 17 (Th17)細胞が、IL-17A、IL-22などを産生し、表皮ケラチノサイトの増殖活性化、および病変部における炎症の惹起に関与していることが知られている。⁽¹⁾抗 IL-17A 抗体や、Th17 細胞の活性化に関わる IL-23 に対する抗体などが乾癬の治療薬として使用され、^(2, 3)高い効果が得られていることから乾癬の病態において Th17 細胞が重要な役割を担っていることが伺える。

しかし、近年 Th17 細胞だけでなく IL-17A 産生性 CD8+T 細胞 (Tc17 細胞)の活性化が乾癬の病態悪化に寄与している可能性が明らかになってきた。その内容を以下に示す。

- I. 乾癬患者の病変部に Tc17 細胞が集積していた^(4, 5)
- II. 乾癬モデルマウスに抗 CD8+抗体を投与し、CD8+T 細胞の表皮への浸潤を阻害すると、乾癬の病理学的特徴である表皮の肥厚が改善した⁽⁶⁾
- III. 乾癬のリスクアレルである HLA-Cw6 は、表皮に存在する自己抗原である ADAMTSL5 を認識し、CD8+T 細胞に抗原提示することで乾癬病変の進展、悪化に寄与している⁽⁷⁾

以上の報告から、乾癬の病態において重要な役割を担う細胞は Th17 細胞というよりも Tc17 細胞であることが推察される。しかし、Tc17 細胞の誘導、活性化のメカニズムは不明な点が多く、特にヒト Tc17 細胞の誘導に関する情報は限られている。⁽⁸⁾

我々は従来から乾癬の病態に関与していることが考えられてきた Th17 細胞が、CD8+T 細胞となんらかの相互作用を行うことによって Tc17 細胞への誘導、もしくは細胞性免疫の活性化を惹起し、皮膚病変の進展、病態の悪化に寄与しているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

乾癬における病的な Th17 サブセットを同定し、当該サブセットに特異的に発現する遺伝子から、Tc17 細胞の誘導に関与する分子をスクリーニングし、Th17 細胞による Tc17 細胞の誘導メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた乾癬における病的な Th17 サブセットの同定

乾癬患者および健康な成人の末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、フローサイトメトリーを用いて CCR6+CD4+T 細胞分画(CD3+CD4+CD8-CCR6+)における Th17 細胞のマーカーMCAM および CD161 の発現を解析した。フローサイトメトリーを用いたゲーティングによって乾癬患者の PBMC における CCR6+CD4+T 細胞を MCAM と CD161 の発現の有無によって 4 つのサブセット(MCAM+CD161-、MCAM+CD161+、MCAM-CD161-、MCAM-CD161+)に分割し、各サブセットの存在割合と乾癬の重症度スコア(PASI score)との相関を確認した。さらに、各サブセットの割合が乾癬の治療前後で変動を認めるか否か検討した。

(2) in vitro による病的な Th17 サブセットの同定

フローサイトメトリーを用いて、健康成人の PBMC から各 MCAM/CD161 サブセットをソーティングし、抗 CD3/CD28 抗体および Th17 細胞誘導刺激(IL-1 β +IL-23)で 7 日間刺激した後、細胞内 IL-17A の発現を解析した。各サブセットを CD8+T 細胞と共培養し、培養後の CD8+T 細胞の細胞数、細胞内 IL-17A 発現を解析した。

(3) SAGE 法を用いた細胞性免疫活性化分子の探索

健康な成人の PBMC から Naive CCR6+CD4+T 細胞をフローサイトメトリーによってソーティングし、Th17 細胞誘導刺激および抗 CD3/CD28 抗体で 2 日間刺激したのち、フローサイトメトリーによって MCAM/CD161 サブセットをソーティングした。各サブセットにおける遺伝子発現を SAGE (serial analysis of gene expression) 法によって網羅的に解析し、MCAM+CD161-サブセットに特異的に発現する細胞性免疫活性化に関わる分子を探索した。

(4) CD83 に着目した MCAM+CD161-サブセットと CD8+T 細胞の相互作用の検討

健康な成人の PBMC から MCAM+CD161-サブセットおよび CD8+T 細胞をフローサイトメトリーによってソーティングし、Th17 細胞誘導刺激および抗 CD3/CD28 抗体存在下で共培養した。Inhibition assay では、CD83 の機能を阻害する目的で Recombinant Human CD83 Fc Chimera Protein を、MCAM SP サブセット由来の IL-17A を阻害する目的で Recombinant Human IL-17RA/IL-17R Fc Chimera Protein を MCAM+CD161-サブセットおよび CD8+T 細胞の共培養に添加した。共培養後の CD8+T 細胞の細胞数、細胞内サイトカイン発現を解析した。

4. 研究成果

(1) CCR6+CD4+ 分画における MCAM+CD161-サブセット(MCAM SP)の割合は、健康な成人と比較して乾癬患者のほうが有意に高く(Figure 1a)、かつ PASI score と有意な正の相関関係にあった(Figure 1b)。さらに、乾癬治療後における MCAM SP サブセットの割合は、治療前の割合と比較して有意に低かった。

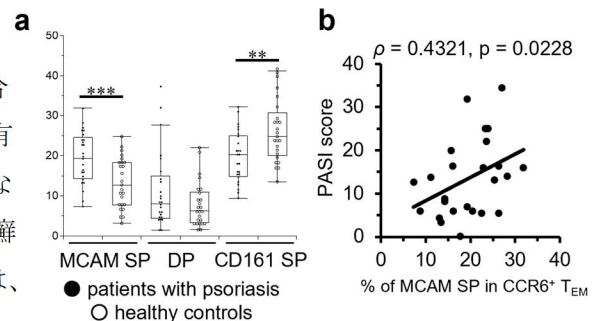


Figure 1.

(2) 各 MCAM/CD161 サブセットを Th17 細胞誘導刺激および抗 CD3/CD28 抗体で刺激した後、細胞内 IL-17A 発現を FACS で解析した結果、MCAM SP サブセットが最も高い割合で IL-17A を発現していた。さらに、各サブセットを CD8+T 細胞と共培養した結果、特に MCAM SP サブセットとの共培養によって CD8+T 細胞における細胞内 IL-17A 発現が上昇し(Figure 2a)、CD8+T 細胞の細胞増殖が活性化された(Figure 2b)。(1)および(2)の結果を踏まえ、MCAM SP サブセットが乾癬における pathogenic Th17 subset である可能性が考えられた。

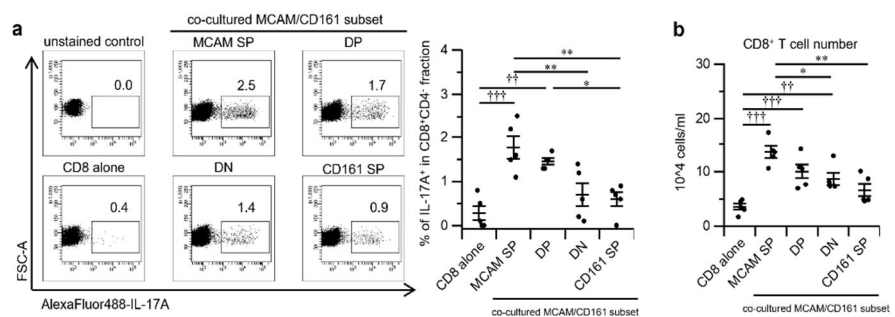


Figure 2.

合で IL-17A を発現していた。さらに、各サブセットを CD8+T 細胞と共培養した結果、特に MCAM SP サブセットとの共培養によって CD8+T 細胞における細胞内 IL-17A 発現が上昇し(Figure 2a)、CD8+T 細胞の細胞増殖が活性化された(Figure 2b)。(1)および(2)の結果を踏まえ、MCAM SP サブセットが乾癬における pathogenic Th17 subset である可能性が考えられた。

(3) SAGE による遺伝子発現解析およびクラスター解析の結果、MCAM SP サブセットが他のサブセットと明確に異なるクラスターであることが明らかとなった(Figure 3)。さらに、MCAM SP サブセット特異的に、細胞性免疫活性化分子である CD83⁽⁹⁾の発現を認めた。

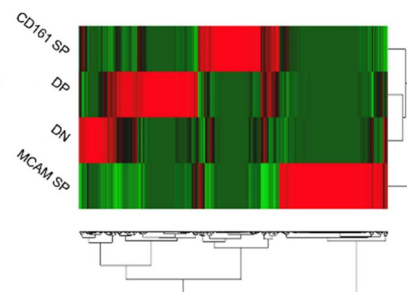


Figure 3.

(4) MCAM SP サブセットと CD8+T 細胞の共培養に Recombinant Human CD83 Fc Chimera Protein を添加すると、MCAM SP サブセットが有する CD8+T 細胞の増殖を活性化する機能が抑制された(Figure 4a)。しかし、Recombinant Human CD83 Fc Chimera Protein の投与は共培養後の CD8+T 細胞にお

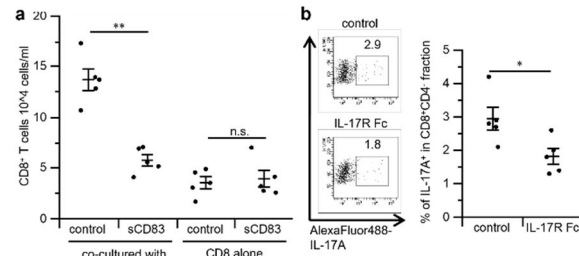


Figure 4.

ける細胞内 IL-17A の発現に影響を及ぼさなかった。この結果から、CD8+T 細胞から Tc17 細胞を誘導するためには、CD83 を介した Th17 細胞との相互作用ではなく、他の要因が関係している可能性が考えられた。(2)で示したように、MCAM SP サブセットは他のサブセットと比較して IL-17A の産生能が高かったため、IL-17A の paracrine によって Tc17 細胞の誘導に寄与している可能性を考え、両細胞の共培養に Recombinant Human IL-17RA/IL-17R Fc Chimera Protein を加えたところ、Tc17 細胞の誘導が抑制された(Figure 4b)。以上の結果から、MCAM SP サブセットは CD8+T 細胞に対し、CD83 を介した直接的な細胞接触と IL-17A の paracrine によって、細胞増殖の活性化および Tc17 細胞への誘導を惹起している可能性が考えられた。

引用文献

1. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-55.
2. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med.* 2014;371(4):326-38.
3. Gordon KB, Duffin KC, Bissonnette R, Prinz JC, Wasfi Y, Li S, et al. A Phase 2 Trial of Guselkumab versus Adalimumab for Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2015;373(2):136-44.
4. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, et al. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol.* 2009;86(2):435-43.
5. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, Bos JD, et al. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One.* 2010;5(11):e14108.
6. Di Meglio P, Villanova F, Navarini AA, Mylonas A, Tosi I, Nestle FO, et al. Targeting CD8(+) T cells prevents psoriasis development. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):274-6 e6.
7. Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, Besgen P, Kim SM, Rühl G, et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med.* 2015;212(13):2203-12.
8. Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol Lett.* 2016;178:20-6.
9. Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansen S, von Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D, et al. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood.* 2006;107(4):1528-36.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Kohei, Tanioka Toshihiro, Takahashi Rei, Watanabe Hideaki, Sueki Hirohiko, Takimoto Masafumi, Hashimoto Shin-ichi, Ikeo Kazuho, Miwa Yusuke, Kasama Tsuyoshi, Iwamoto Sanju	4. 巻 210
2. 論文標題 MCAM+CD161- Th17 Subset Expressing CD83 Enhances Tc17 Response in Psoriasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1867～1881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2200530	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前田 耕平, 谷岡 利裕, 高橋 玲, 磯崎 健男
2. 発表標題 CD83を発現するTh17細胞は乾癬におけるTc17反応を増幅する
3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 MAEDA Kohei, TANIOKA Toshihiro, TAKAHASHI Rei, IWAMOTO Sanju,
2. 発表標題 The Different Expression of Soluble and Membranous CD83 in CD4+ T Cell Subsets
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------