

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09765

研究課題名(和文) 制御性T細胞の減少による免疫学的不均衡が皮膚炎に及ぼす影響の研究

研究課題名(英文) Study of the effect on dermatitis by immunological imbalance due to reduced number of regulatory T cells

研究代表者

野村 尚史 (Nomura, Takashi)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：60346054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎や自己免疫性皮膚炎の病態はまだ完全に解明されていない。その一因は免疫系の過剰反応と考えられる。免疫系の過剰反応を抑えるリンパ球として、制御性T細胞が知られる。本研究では、接触皮膚炎モデルマウス、IgE依存性慢性アレルギー炎症マウス、円形脱毛症モデルマウス、アトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスを用いて、制御性T細胞を減少させた際、皮膚炎の重症度がどう変化するかを解析した。その結果、惹起相での制御性T細胞の減少は、接触皮膚炎やIgE依存性慢性アレルギー炎症を増強させることがわかった。今後、円形脱毛症モデルマウスやアトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスを用いた検討を続ける予定である。

研究成果の概要(英文)：Although etiology of atopic dermatitis, psoriasis, and collagen diseases is not fully clarified, it is partly explained by excessively activated immune system. Such over-activation is inhibited by special lymphocytes called regulatory T cells. In this study, we used contact dermatitis mouse model, IgE-dependent chronic allergic inflammatory mouse model, alopecia areata mouse model, and atopic dermatitis mouse model in order to analyze the severity of dermatitis when the number of regulatory T cells were transiently decreased. We found that the decrease of regulatory T cells in the induction phase enhanced contact dermatitis and IgE dependent chronic allergic inflammation in mice. We will continue to examine using alopecia areata model mouse and atopic dermatitis spontaneous model mouse.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚免疫 免疫制御 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

FoxP3 陽性制御性 T 細胞は、免疫反応を抑制する CD4 陽性 T 細胞である。FoxP3 は、制御性 T 細胞の発生をつかさどる転写因子である。FoxP3 をコードする遺伝子を欠損させたマウスは、致命的炎症を発症して生後まもなく死亡する。ヒトにおける FoxP3 遺伝子の機能不全は、主として内分泌系機能低下と腸炎を発症する伴性遺伝性疾患 IPEX の原因である。IPEX の重症患者は、生後まもなく死亡する。一部の IPEX 患者では、症状が軽く生存率が高くなるが、アトピー性皮膚炎様皮膚炎などの慢性皮膚炎を発症する。

一方、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、接触皮膚炎、円形脱毛症などの炎症性皮膚疾患患者においては、FoxP3 の発現低下や機能低下は確認されていない。そのため、皮膚炎における制御性 T 細胞の役割は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、接触皮膚炎、IgE 特異的慢性アレルギー反応、円形脱毛症、アトピー性皮膚炎における、制御性 T 細胞の役割をマウスモデルを用いて検証することである。

3. 研究の方法

(1) 接触皮膚炎 / IgE 依存性慢性アレルギー炎症モデルを用いた制御性 T 細胞の機能解析

C57BL/6 マウス、Rag2 欠損マウス (C57BL/6 背景)、抗 hCD2 抗体で制御性 T 細胞を除去できる Foxp3-hCD2 マウス (C57BL/6 背景) に、TNP 特異的 IgE を静脈投与し、TNP 特異的 IgE に対して「感作」させた。翌日、TNP-OVA で耳介に皮膚炎を惹起し、耳介の

厚みを測定した。

制御性 T 細胞をマウスに養子移入する場合は、制御性 T 細胞が hCD2 (ヒト CD2) を発現する Foxp3-hCD2 マウスのリンパ節 / 脾臓から、抗 hCD2 抗体と MACS 分離器 (ミルテニー社) を用いて、Foxp3 を発現する制御性 T 細胞を分離し、Rag2 欠損マウスに移入した。

(2) 円形脱毛症モデルにおける制御性 T 細胞の役割

円形脱毛症を自然発症する C3H/HeJ マウスに、S4B6 抗体 (IL-2 に対する抗体で、マウスに投与すると制御性 T 細胞が一過性に低下する) を投与し、円形脱毛症の発症率を観察した。

(3) アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける制御性 T 細胞の役割

フィラグリンの発現が低下する Flaky tail マウス (Flgft/ft) マウスと、制御性 T 細胞を抗 hCD2 抗体で除去できる Foxp3-hCD2 マウスを交配した。このマウスに抗 hCD2 抗体を投与した際のアトピー性皮膚炎の重症度の観察を計画した。

4. 研究成果

(1) 接触皮膚炎 / IgE 依存性慢性アレルギー炎症モデルを用いた制御性 T 細胞の機能解析

TNP-IgE で感作させた Foxp3-hCD2 マウスの耳介に、TNP-OVA を塗布することで、耳介に接触皮膚炎を惹起させた。この接触皮膚炎は、IgE 依存性慢性アレルギー炎症 (以下、IgE-CAI) と呼ばれる反応である。惹起後 3 日で、耳介の腫脹がピークを迎え、その後、

10 日で正常にもどることが確認できた (図 1)。この条件で、あらかじめ抗 hCD2 抗体を投与し体内の制御性 T 細胞を減少させた Foxp3-hCD2 マウスに対して、IgE-CAI を誘導した。すると、炎症の程度が増強するだけでなく、耳介の腫脹も 10 日では元の状態に戻らず、皮膚炎が遷延した (図 1)。

IgE-CAI は、Rag 欠損マウスでも誘導される (図 2 上 /)。野生型の C57BL/6 (図 2 上 /) と比較すると、Rag 欠損マウスの IgE-CAI は 6 日以降も遷延する (図 2 上 / *)。このことから、リンパ球の中に、IgE-CAI を抑制する細胞が存在することが示唆された。その候補として制御性 T 細胞があげられた。

そこで、IgE-CAI を惹起した Rag2 欠損マウスに制御性 T 細胞を養子移入が抑制するか検討した (図 2 / 下)。制御性 T 細胞を移入した Rag2 マウスでは、IgE-CAI の反応が抑制され、6 日以降の遷延化もみられなかった (図 2 / 下)。

IgE-CAI の皮膚炎は、好塩基球が中心的役割を果たすことが知られている。そこで、制御性 T 細胞による皮膚炎の抑制が、好塩基球の抑制を介するか検討した (図 3)。IgE-CAI を惹起した Rag2 欠損マウスの耳介の好塩基球数を数えたところ、制御性 T 細胞を移入した場合は、好塩基球が減少していた (図 3 / + Treg)。

以上から、制御性 T 細胞が好塩基球の浸潤を抑制することで、IgE 依存性慢性アレルギー反応を抑制することが示唆された。ヒトの接触皮膚炎でも同様の機構が存在するかは、今後の研究課題である。

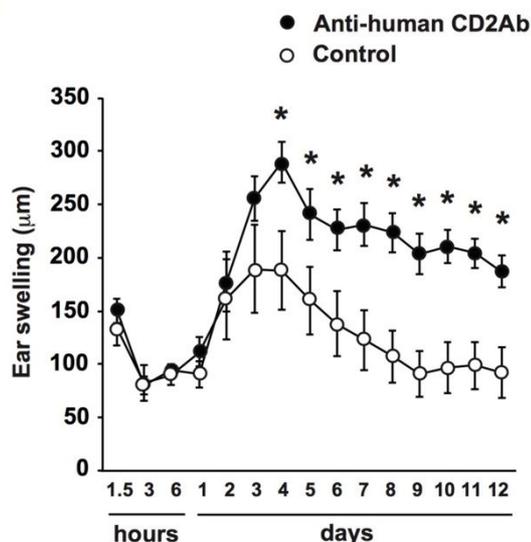


図 1: 制御性 T 細胞による IgE 特異的慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) の抑制。TNP 特異的 IgE をあらかじめ投与したマウスの耳介に、TNP-OVA を塗布すると、接触皮膚炎を惹起できる ()。マウスの制御性 T 細胞をあらかじめ減少させておくと、皮膚炎が重症化するだけでなく、遷延化する ()。

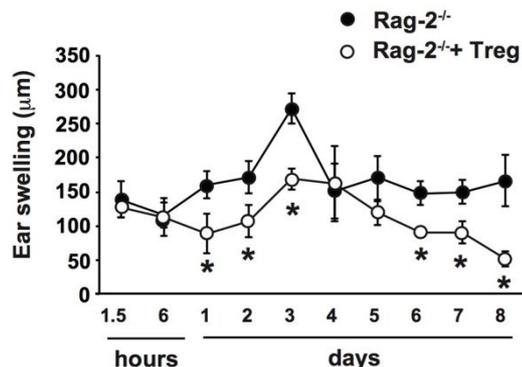
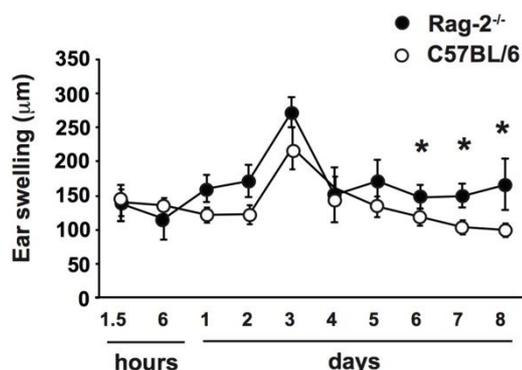


図 2: 制御性 T 細胞による Rag2 マウスの IgE-CAI の抑制。リンパ球を欠く Rag2 欠損マウスは、C57BL/6 と比較すると IgE-CAI が重症化し遷延化する (上段)。制御性 T 細胞はそれを抑制する (下段)。

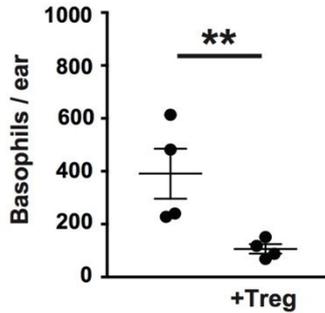


図3：制御性T細胞による好塩基球浸潤の抑制。Rag2欠損マウスのIgE-CAIの重症度と遷延が抑制される際、炎症部位の好塩基球数が減少する（+Treg）。このことから、IgE-CAIにおいて、制御性T細胞の標的が好塩基球であることが示唆される。

(2) 円形脱毛症モデルにおける制御性T細胞の役割

C3H/HeJ マウスに、S4B6 抗体を投与したが、円形脱毛症の発症率の変化を捉えることはできなかった。C3H/HeJ の脱毛発症率が非常に低いことがその一因と考えた。今後、脱毛症モデルを改善し、制御性T細胞の役割を検討する予定である。

(3) アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける制御性T細胞の役割

Flgft/ft マウスと Foxp3-hCD2 マウスの作成が遅れたため、実験を遂行できなかった。今後、検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sugita K., Hanakawa S., Minegaki Y., Nakamizo S., Doi H., Tomari K., Nakamura M., Miyachi Y., Kabashima K., Nomura T.
Regulatory T cells suppress

basophil-dependent chronic allergic inflammation.
In preparation.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名 野村尚史 (Takashi Nomura)

研究機関名 京都大学

部局名 大学院医学研究科

職名 特定講師

研究者番号 60346054