

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15980

研究課題名（和文）皮膚メモリーT細胞の駐在機構解明に基づく犬アトピー性皮膚炎治療への応用

研究課題名（英文）Application to the treatment of canine atopic dermatitis based on the mechanism of the retention of skin memory T cells

研究代表者

朝比奈 良太（Asahina, Ryota）

京都大学・医学研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：00837487

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー性皮膚炎におけるCD4+組織常在型メモリーT（TRM）細胞における皮膚駐在機構の解明を目指し、実験を行った。遅延型過敏症マウスモデルにおいて、CD4+TRM細胞は古典的樹状細胞2型（cDC2）とともに血管周囲にクラスターを形成して駐在した。また、cDC2からはCXCL16が産生され、CXCL16中和抗体の投与によりCD4+TRM細胞の数とクラスター形成が減少した。さらに、CXCR6陽性CD4+TRM細胞は抗原再曝露時にサイトカインを産生して迅速な炎症を誘導する病原性TRM細胞であった。これらの研究知見はアトピー性皮膚炎のモデルマウスにおいても同様に認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、アレルギー性皮膚炎におけるCD4+TRM細胞の皮膚駐在に関わるCXCL16を介した真皮樹状細胞とのクロストーク機構を明らかにした。また、再燃誘導において中心的な役割を果たす病原性TRM細胞サブセットとして、CXCR6陽性CD4+TRM細胞を新たに同定した。以上より、CD4+TRM細胞によるアトピー性皮膚炎の再燃病態が明らかになった。今後は、CXCR6/CXCL16を標的としたCD4+TRM細胞の駐在制御に基づいたアトピー性皮膚炎に対する新規治療開発に応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Experiments were conducted to elucidate the mechanism of retention of CD4+ tissue-resident memory T (TRM) cells in allergic dermatitis. In a mouse model of delayed-type hypersensitivity, CD4+TRM cells co-localized with classical dendritic cell type 2 (cDC2) in perivascular clusters. In addition, cDC2 highly produced CXCL16, and administration of a CXCL16-neutralizing antibody decreased the number and cluster formation of CD4+TRM cells. Furthermore, CXCR6-positive CD4+TRM cells were pathogenic TRM cells that produced cytokines to induce a rapid relapse upon antigen re-exposure. These findings were also observed in a mouse model of atopic dermatitis.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 組織常在型記憶T細胞 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、増悪と寛解を繰り返す慢性皮膚疾患であり、原因抗原に対する CD4+T 細胞の過剰な免疫応答を低下させる治療開発が求められている。近年、組織浸潤後に長期間駐在し、抗原の再曝露に対して迅速に炎症反応を誘導するメモリーT 細胞サブセットである組織常在型メモリーT (TRM) 細胞が発見された。そのため、CD4+TRM 細胞が寛解後も皮膚に駐在することで、アトピー性皮膚炎は再燃しやすい状態にあると考えられる。しかしながら、アレルギー性皮膚炎における CD4+TRM 細胞の皮膚駐在メカニズムは明らかにされておらず、再燃機序は不明な点が多い。したがって、CD4+TRM 細胞の皮膚駐在機構および再燃機序を解明し、ヒトおよびイヌのアトピー性皮膚炎に対する新規寛解維持戦略の確立が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CD4+TRM 細胞の皮膚駐在メカニズムを解明し、イヌおよびヒトのアトピー性皮膚炎に対する新たな寛解維持療法開発の基盤を構築することである。以下の3点を到達課題として設定する。

- (1) CD4+TRM 細胞の駐在に関与する細胞の同定
- (2) 上記細胞を介した CD4+TRM 細胞の駐在制御因子の同定
- (3) 上記因子の阻害によるアトピー性皮膚炎の再燃制御効果の検証

3. 研究の方法

上記3点に対する具体的な研究方法は以下の通りである。

(1) CD4+TRM 細胞の駐在に関与する細胞の同定

- ① 初めに、蛍光標識した卵白アルブミン (OVA) 特異的 CD4+T 細胞 (GFP+OT2 細胞) を移入した遅延型過敏症マウスモデルを用いて、炎症収束後も皮膚に長期生存する CD4+T 細胞を解析した。CD4+T 細胞の表現型をフローサイトメトリーで解析し、その皮膚での駐在を光変換タンパク (KikGR) 発現 CD4+T 細胞の移入実験および並体結合 (パラビオーシス) を用いて評価した。
- ② 次に、炎症収束期の皮膚での CD4+T 細胞の挙動および共局在する細胞を、二光子励起顕微鏡による生体イメージングおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学により解析した。この際、抗 CD31 抗体を用いて血管を描出し、CD4+T 細胞の血管との位置関係の評価した。
- ③ 上記で同定した細胞をジフテリア毒素により特異的に除去できる遺伝子改変マウスを用いて、細胞除去後の CD4+TRM 細胞の数および局在をフローサイトメトリーおよび二光子励起顕微鏡を用いて評価し、CD4+TRM 細胞の駐在における当該細胞の関与を検討した。

(2) 上記細胞を介した CD4+TRM 細胞の駐在制御因子の同定

- ① 上記 (1) -③で当該細胞を除去前後でのケモカインの発現変動を RT-PCR を用いて評価した。また、発現低下を認めたケモカインに対応する CD4+TRM 細胞の受容体発現をフローサイトメトリーにより評価した。
- ② 上記で抽出したケモカインに対する中和抗体を投与し、CD4+TRM 細胞の数および局在の変化をフローサイトメトリーおよび二光子励起顕微鏡を用いて評価した。
- ③ 野生型または当該受容体を欠損させた CD4+T 細胞を移入した遅延型過敏症モデルを用いて、当該受容体の発現が CD4+TRM 細胞の皮膚駐在に関与するかをフローサイトメトリーおよび二光子励起顕微鏡により検討した。

(3) 上記因子の阻害によるアトピー性皮膚炎の再燃制御効果の検証

- ① 遅延型過敏症モデルマウスを用いて、抗原 (OVA) 再曝露後の耳介腫脹、病理組織学的変化および CD4+TRM 細胞のサイトカイン産生をフローサイトメトリーにより解析した。その後、上記 (2) -②で用いた当該ケモカインの中和抗体を投与した後、抗原再曝露時の反応を解析した。
- ② ハプテン (オキサゾロン) 反復塗布によるアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、炎症収束後皮膚に抗原 (オキサゾロン) を再曝露し、耳介腫脹および CD4+TRM 細胞におけるサイトカイン発現をフローサイトメトリーにより解析した。その後、上記 (2) -②で用いた当該ケモカイン受容体の欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、炎症収束後皮膚での CD4+TRM 細胞の数および再曝露時の反応を比較した。

4. 研究成果

(1) CD4+TRM 細胞の駐在に關与する細胞の同定に關する結果は以下の通りである。

- ① 炎症収束後の皮膚において CD4+細胞では、TRM 細胞マーカー (CD69, CD103) を発現していた。また、これらの CD4+T 細胞は光照射 2 日後またはパラバイオーシス 4 週間後のマウスを用いて、皮膚に駐在することが証明された。
- ② 炎症収束後の皮膚では CD4+TRM 細胞は、血管周囲にクラスターを形成して局在していた。また、同クラスター内では CD4+TRM 細胞は真皮樹状細胞サブセットの 1 つである conventional DC2 (CD11c+CD301b+細胞) と近接していた。
- ③ CD301b+細胞をジフテリア毒素投与により特異的に除去できる遺伝子改変マウス (CD301bDTR マウス) において、炎症収束後の皮膚から CD301b+細胞を除去すると CD4+TRM 細胞の数が減少し、クラスター形成も抑制された。

以上より、CD4+TRM 細胞は、cDC2 とともに血管周囲性クラスターを形成して皮膚に駐在することが示された。

(2) 上記細胞を介した CD4+TRM 細胞の駐在制御因子の同定に關する結果は以下の通りである。

- ① CD301b+細胞を除去したマウスの真皮では、ケモカインである CXCL16 の発現低下を認めた。また、炎症収束後皮膚の CD4+TRM 細胞はその受容体である CXCR6 を高発現していた。
- ② 抗 CXCL16 中和抗体を皮内投与したところ、CXCR6 陽性 CD4+TRM 細胞の数およびクラスターが減少した。
- ③ CXCR6 を欠損させた CD4+T 細胞と野生型 CD4+T 細胞の数を比較すると、急性期皮膚では両者の数に差は認めなかったが、炎症収束期の皮膚においては CXCR6 欠損 CD4+細胞の数が減少していた。

以上より、CD4+TRM 細胞は CXCR6 を発現し、CXCL16 を介した cDC2 との相互作用により皮膚に駐在することが示唆された。

(3) 上記因子の阻害によるアトピー性皮膚炎の再燃制御効果の検証に關する結果は以下のとおりである。

- ① 遅延型過敏症モデルマウスに抗原を再曝露すると、迅速な耳介腫脹を誘導し、病理組織学的評価から真皮浮腫を認めた。また、抗原再曝露により CXCR6 陽性 CD4+TRM 細胞からサイトカイン (IFN-g、IL-13) 産生を認めた。CXCL16 中和抗体により CXCR6 陽性 CD4+TRM 細胞が減少した皮膚に抗原を再曝露させると、炎症反応の減弱を認めた。
- ② オキサゾロン反復塗布のアトピー性皮膚炎モデルマウスに抗原再曝露すると、迅速な耳介腫脹および CD4+TRM 細胞からのサイトカイン (IL-13、IFN-g) 発現を認めた。CXCR6 欠損マウスでは、炎症収束後の CD4+TRM 細胞の数が減少し、かつ抗原再曝露時の耳介腫脹が減弱した。

以上より、CXCR6 陽性 CD4+TRM 細胞はサイトカイン産生を介してアレルギー性皮膚炎の再燃を誘導することが示唆された。さらに、CXCR6/CXCL16 を阻害すると CD4+TRM 細胞の皮膚駐在が抑制されて、抗原再曝露時の再燃反応が減弱することが示された。

本研究成果から、アレルギー性皮膚炎における CD4+TRM 細胞の皮膚駐在機構として、CXCR6/CXCL16 軸を介した真皮樹状細胞との相互作用を明らかにした。また、病原性 TRM 細胞サブセットとして CXCR6 陽性 CD4+TRM 細胞を新たに同定し、アトピー性皮膚炎の再燃機序の一端が明らかになった。今後は、CD4+TRM 細胞の駐在制御に基づいたアトピー性皮膚炎に対する新規寛解維持療法の開発、並びに他の炎症性皮膚疾患 (アレルギー性接触皮膚炎、乾癬および蕁麻疹など) への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ryota Asahina, Fuuka Minami, Gyohei Egawa, Satoshi Nakamizo, Kenji Kabashima
2. 発表標題 Newly identification of a CXCR6+ pathogenic skin-resident CD4+ T cell subset in a mouse model of allergic dermatitis that requires CXCL16 for its maintenance
3. 学会等名 International Societies for Investigative Dermatology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朝比奈良太, 南風花, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 Maintenance of pathogenic CD4+ tissue-resident memory T cells by CD301b+ dendritic cells via CXCL16 in a mouse model of allergic dermatitis
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第47回年次学術大会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝比奈良太, 南風花, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 アレルギー性皮膚炎におけるCD4+組織常在性記憶T細胞の皮膚駐在機構の解明
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝比奈良太, 南風花, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 病原性CD4+組織常在性記憶T細胞の駐在制御に基づくアレルギー性皮膚疾患に対する新規治療戦略
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝比奈良太, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 アレルギー性皮膚炎におけるCD4陽性レジデントメモリーT細胞の皮膚駐在機構の解明
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝比奈良太, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 Retention of CD4+ tissue-resident memory T cells by interacting with CD301b+ dermal dendritic cells via CXCL16 in a murine delayed-type hypersensitivity model
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Asahina, Gyohei Egawa, Satoshi Nakamizo, Kenji Kabashima
2. 発表標題 Maintenance of CD4+ tissue-resident memory T cells via perivascular clusters with CD301b+ dermal dendritic cells in a mouse model of allergic dermatitis
3. 学会等名 50th Annual European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝比奈良太, 江川形平, 中溝聡, 椛島健治
2. 発表標題 CD4+ resident memory T cells colocalize with conventional DC subset 2 in lymphocyte clusters in a murine delayed-type hypersensitivity model
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回年次学術大会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryota Asahina, Gyohei Egawa, Satoshi Nakamizo, Kenji Kabashima
2. 発表標題 CD4+ resident memory T cells colocalize with CD301b+ dendritic cells in perifollicular lymphocyte clusters in a murine delayed-type hypersensitivity model
3. 学会等名 48th Annual European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈良太, 江川形平, 中溝聡, 梶島健治
2. 発表標題 Retention of CD4+ resident memory T cells through colocalization with CD301b+ dendritic cells in a murine DTH model
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第44回年次学術大会・総会
4. 発表年 2019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
---------	---------