

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17773

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における皮膚真菌叢の変化と特異的IgE抗体獲得機序の解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanism of changes in skin fungal flora and production of specific IgE antibodies in atopic dermatitis

研究代表者

森脇 昌哉(Moriwaki, Masaya)

広島大学・医系科学研究科(医)・専門研究員

研究者番号：10839286

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):汗に含有されるMGL_1304は汗アレルギーの原因物質で、MGL_1304に対する過敏性、特異的IgE抗体が特定されたが、その獲得機序は明らかとなっていない。近年IgE産生について関与が指摘されている濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)に着目し、Tfhを介した抗原特異的特異的IgE抗体の産生機序について検討を行った。

末梢血から分離した単球由来皮膚ランゲルハンス細胞をMGL_1304で活性化し、同一ドナー由来のCD4+T細胞と7日間共培養し、Tfhの分化を誘導した。TfhとB細胞の共培養を試みているが、Tfhの回収率などの問題により、抗原特異的IgE抗体の産生まで至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎(AD)では、皮膚真菌叢に対するランゲルハンス細胞の反応性がADの発症、増悪に関わっている可能性が示唆される。また、以前よりIL-21が濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)の分化・維持に関与していること、ADにおいてIL-21が有意に高値であること指摘されている。現在ADに対して真菌叢の観点から研究しているところは少なく、本研究では真菌叢が関連する獲得免疫の観点からADの病態解明を試みることで、新たな知見を発信できる可能性があり、ADの発症機構の解明のみならず、その他の炎症性皮膚疾患、アレルギー疾患の発症機構の理解にも普遍的なインパクトを与え得る極めて重要な研究であると考えている。

研究成果の概要(英文):MGL_1304 contained in sweat is a causative agent of sweat allergy, and hypersensitivity to MGL_1304 and specific IgE antibodies have been identified, but the mechanism of its acquisition has not been clarified. In this study, we focused on follicular helper T cells (Tfh), which have recently been implicated in IgE production, and investigated the mechanism of Tfh-mediated production of antigen-specific specific IgE antibodies.

In this study, monocyte-derived skin Langerhans cells isolated from peripheral blood were activated with MGL_1304 and co-cultured with CD4+ T cells from the same donor for 7 days to induce Tfh differentiation. We have not been able to produce antigen-specific IgE antibodies due to problems with Tfh recovery.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 皮膚真菌叢 Malassezia globosa MGL_1304 濾胞性ヘルパーT細胞 Tfh 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層である表皮に位置するLCは、Toll-like receptor (TLR) や C 型レクチン受容体のパターン認識レセプターを発現し、外界から侵入する細菌や真菌などの異物をスキャンする機能を果たしている。さらに LC は抗原提示能を有し、皮膚の免疫担当細胞(TおよびB細胞)の制御を行い、皮膚の炎症を調整している。このように LC は、自然免疫と獲得免疫を橋渡しし、皮膚の恒常性を保つ重要な司令塔の役割を

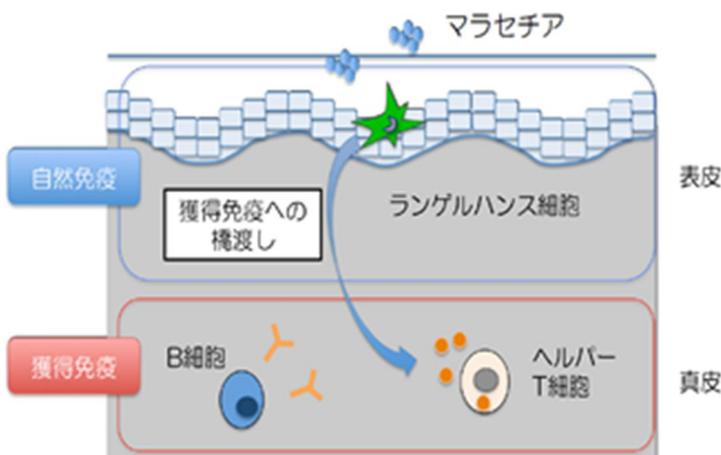


図 1

果たしている(図 1)。当教室でこれまでに、AD 患者が MGL_1304 に対する過敏性を示すこと (Hiragun T, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132(3):608-615) や、AD 患者が MGL_1304 に対する特異的 IgE 抗体を持つこと (Hiragun M, et al. *Allergol Int* 2014;63(1):83-93) を見出ししてきたが、その機序については明らかとなっていない。近年、IgE 産生について濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)の関与が指摘されており、真菌叢変化と Tfh を介した特異的 IgE 獲得機序について検討を行う。

2. 研究の目的

(1) *Malassezia* 刺激による LC の機能解析

Malassezia 刺激後の LC の活性化を測定し、その後の抗原取り込み能、抗原提示能を中心に解析を進める。特に T 細胞の分化およびサイトカイン産生は皮膚炎の発症・増悪、IgE 産生の中心的な役割を果たすため、Th サブセットおよび IgE を産生する B 細胞への影響を中心に解析を進める。

(2) *Malassezia* の菌種による免疫応答の違い

健常人と AD 患者での皮膚に存在する *Malassezia* の菌種の割合が異なることが報告されている。特に、健常人では *Malassezia restricta*、重症 AD 患者では *Malassezia globosa* が優位となるため、菌種による免疫応答の差異についても検討を行う。

3. 研究の方法

末梢血から in vitro で LC を作製し、同ドナーから CD4+T 細胞も併せて分離した。*Malassezia globosa* などの各種刺激下に培養を行い、図 2 の項目について、健常人と AD 患者を比較評価した。LC の活性化、自然免疫レセプターの発現と刺激後の変化、刺激後 LC の抗原提示および取り込み能、自然免疫活性化に伴う LC からのサイトカイン分泌能、同ドナー由来の CD4+T 細胞と刺激後 LC を共培養し、Th サブセット、サイトカイン分泌の解析、活性化した T 細胞(Tfh)の B 細胞に対する影響 (IgE 産生へのクラススイッチ) を解析した。

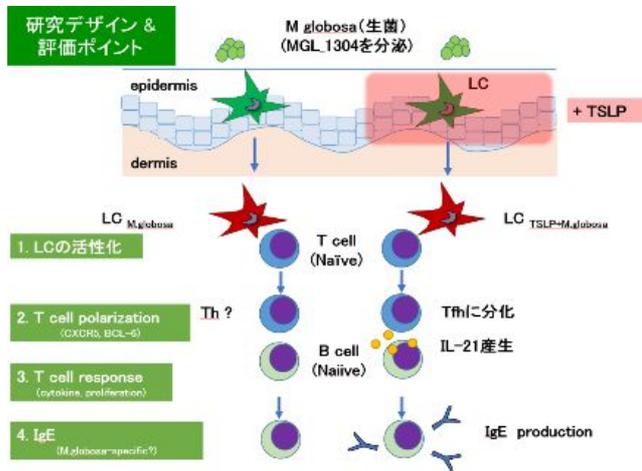


図 2

Malassezia 属の真菌学的特徴の検討

Malassezia 属による LC 活性化の検討

Malassezia 刺激 LC による Th 分化の検討

IgE 産生についての検討

(1) Malassezia属によるLC活性化の検討

上記で作製した LC を(1)*M. restricta* (健康人の皮膚で優位)、(2)*M. globosa* (重症 AD の皮膚で優位)、(3)合成 TLR2 リガンド (Pam3cys、EMC microcollection)、(4)Zymosan (C 型レクチン受容体のアゴニスト) を添加して 24 時間培養する。培養後、TLR2、LC 活性化マーカー (CD83) の発現をフローサイトメトリーおよび Real time PCR にて測定し、LC の活性化状態を比較した。すでに予備実験では、*Malassezia* により LC が活性化されることはフローサイトメトリーで確認ができています。*Malassezia* については、生菌および熱処理した死菌の 2 種類を用いて培養を行い、生菌と LC との共培養においては、*Malassezia* の細胞障害性 (apoptosis/necrosis) をフローサイトメトリーで評価した。なお、*Malassezia* が TLR2 シグナルや C 型レクチン受容体経路であることは、今後 CRISPR-Cas9 システムを用いて確認を行う。

(2) Malassezia 刺激 LC による Th 分化の検討

末梢血から単球を分離する際に、同時に CD4+ T 細胞を分離 (Miltenyi, AutoMacs) し、*Malassezia* 刺激により活性化した単球由来 LC と共培養を行った。CD4+T 細胞は凍結保存剤 (DMSO+FBS) に溶解し、LC の分化、刺激が終わるまで -80 で保存した。この共培養では、同一のドナー由来の LC と CD4+ T 細胞を使用することが特徴であり、より個々の生体の反応を正確に反映すると考えられる。培養後の T 細胞の Th サブセット関連の転写因子 (Th1: T-bet、Th2: GATA-3、Th17: ROR T、Treg: FoxP3) の発現量、培養上清中に含まれるそれぞれの Th サブセットの key サイトカイン (Th1: IFN- γ 、Th2: IL-4/5/13、Th9: IL-9、Th17: IL-17、Th22: IL-22、Treg: IL-10、TGF- β) を定量 PCR、ELISA およびフローサイトメトリーで測定し、健康人と AD 患者の差異を検討した。

(3) IgE 産生についての検討

末梢血から単球を分離する際に、同時に T 細胞と B 細胞を含む PBMC を分離 (Miltenyi, AutoMacs) し、先に述べた *Malassezia* の刺激により活性化した単球由来 LC と共培養を行った。PBMC は DMSO+FBS に溶解後、LC の分化、刺激が終わるまで -80 で保存した。この共培養では、と同様に同一のドナー由来の LC と PBMC を使用することが特徴である。培養

後の上清中の IgE 抗体や IgE の産生に關与するサイトカイン (IL-4、IL-21、IL-10) を定量 PCR、ELISA およびフローサイトメトリーで測定し、健常人と AD 患者の差異を檢討した。

4 . 研究成果

汗に含有される MGL_1304 は汗アレルギーの原因物質で、MGL_1304 に対する過敏性、特異的 IgE 抗体が特定されたが、その獲得機序は明らかとなっていない。近年 IgE 産生について關与が指摘されている濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)に着目し、Tfh を介した抗原特異的特異的 IgE 抗体の産生機序について検討を行った。

末梢血から分離した単球由来皮膚ランゲルハンス細胞を MGL_1304 で活性化し、同一ドナー由来の CD4+T 細胞と 7 日間共培養し、Tfh の分化を誘導した。Tfh と B 細胞の共培養を試みているが、Tfh の回収率などの問題により、抗原特異的 IgE 抗体の産生まで至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------