

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08696

研究課題名(和文) 乾癬モデルマウスにおける表皮resident memory T cellの解析

研究課題名(英文) Examining the epidermal resident memory T cell of psoriasis model mouse

研究代表者

多田 弥生 (Tada, Yayoi)

帝京大学・医学部・主任教授

研究者番号：00334409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近ヒトで、乾癬に特徴的なresident memory T cell (TRM)が治療後の寛解時においてもIL-17A産生能を持ったまま病変部の表皮に残存していることが報告され、皮疹の再燃に関与していると考えられる。今回我々は、乾癬イミキモドモデルマウスの表皮においても同じ特徴を持ったTRM (CD8+CD69+CD103+)の存在を確認した。表皮細胞との共培養により、活性化される傾向も認められた。T細胞の刺激により、サイトカインの産生促進も認められ、乾癬の増悪に関与する可能性も示唆される検討結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は慢性の炎症性皮膚疾患であるが、同じ場所に皮疹が再燃を繰り返すことが分かっており、何らかの皮疹の記憶が皮膚に残っているとされている。乾癬の表皮内に resident memory T cell (TRM)があることがわかり、これが乾癬を治療後も表皮内に残る。我々はこのヒトのTRMと同じ性質をもつ細胞をマウスのイミキモド乾癬モデルマウス皮膚にもあることを同定した。この細胞は表皮細胞との共培養やT細胞を活性化する刺激によりサイトカイン産生をすることから、乾癬の病態に関連すると考える。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that resident memory T cells (TRMs), which are characteristic of psoriasis, remain in the epidermis of lesions with the ability to produce IL-17A even in remission after treatment, and may be involved in the relapse of skin rash. In this study, we confirmed the presence of TRM (CD8+CD69+CD103+) with the same characteristics in the epidermis of psoriasis IMQ model mice. We confirmed that this TRM could be activated by epidermal cells. These cells were able to produce cytokines when stimulated. The results of this study suggest that TRMs may be involved in psoriasis exacerbation by stimulating T cells to produce cytokines.

研究分野：皮膚

キーワード：乾癬

1. 研究開始当初の背景

乾癬は皮膚の紅斑・表皮の肥厚・鱗屑を特徴とする慢性炎症疾患で、その病態には IL-17/IL-23 サイトカインネットワークが重要である。近年、マウス皮膚へのイミキモド連日塗布によって、乾癬様皮膚炎を誘導できることが判明し、乾癬モデルマウスとして広く使用されている。最近ヒトで、乾癬に特徴的な resident memory T cell (TRM) が治療後の寛解時においても IL-17A 産生能を持ったまま病変部の表皮に残存していることが報告され、皮疹の再燃に関与していると考えられる。そこで、乾癬モデルマウスの表皮においても同じ特徴を持った TRM を確認した。さらに、この細胞が乾癬の病態、特に皮疹の再燃にどのように関与しているのかを明らかにするために、細胞の性質を検討した。

2. 研究の目的

(1) Resident memory T 細胞の乾癬における役割

T 細胞には naïve T 細胞と memory T 細胞があり、抗原特異的な免疫記憶に関与する memory T 細胞が生体内の組織に分布している。Memory T 細胞はその動態、機能上の違いから、いくつかのサブタイプがあることが分かっている。その中の一つに、一旦組織に移行した後 CD69 や CD103 などの retention marker を発現し、再度循環に戻ることなく組織に留まり続ける resident memory T 細胞 (TRM) が知られている。皮膚においても TRM の存在が知られており、免疫防御に重要な役割を果たしている。また、固定薬疹、ウイルス感染、アレルギー性接触皮膚炎、白斑、皮膚 T 細胞リンパ腫などの皮膚疾患においても TRM の病態への寄与が示唆されている。乾癬においても、ヒトの病変表皮に IL-17 を産生する CD8 陽性 CD103 陽性 CD49a 陰性 TRM の存在が確認されており、病態への関与が示唆されているが、詳細な機序は未だ不明である。

(2) 乾癬の動物モデル：イミキモド誘発乾癬モデルマウス

イミキモドを皮膚に外用して作成するイミキモド誘発乾癬モデルマウスは、著明な鱗屑と浸潤を伴う紅斑を特徴とし、組織学的には表皮肥厚、真皮上層の炎症細胞浸潤を有し、乾癬患者の病態をよく反映するモデルマウスであると考えられている。また、病変部皮膚では IL-17A, IL-17F, IL-23 といった乾癬に関連する各種サイトカインの産生が亢進している。イミキモドは TLR7/8 のリガンドであり、外用により形質細胞様樹状細胞を活性化し、乾癬の病態を形成すると考えられている。イミキモド外用によって引き起こされる一連の炎症細胞活性化および表皮肥厚は、ヒト乾癬患者においても認められる現象であり、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける皮膚は乾癬と類似した免疫学的異常によることが推察される。

本研究の目的は上記の学術的な問いを検証することにある。ヒトの検体を用いた実験には限界があり、*in vitro*の実験は必ずしも*in vivo*を反映するとは限らない。今回我々は、乾癬モデルマウスの表皮においても同じ特徴を持った TRM を確認することに成功したため、この細胞が乾癬の病態にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。また、皮膚において免疫を司る細胞であるランゲルハンス細胞、樹状細胞、ケラチノサイトとの相互作用についても検討した。

3. 研究の方法

3-1) マウスの維持と繁殖

本研究では BALB/c マウスを使用する予定であり、日本 SLC より購入し、現在、帝京大学動物実験施設にて繁殖・維持している。実験には 6-8 週齢のマウスを用いた。

3-2) イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作成、TRM 及び皮膚免疫細胞の数の評価

3-2-a) イミキモド誘発乾癬モデルマウスの作成

剃毛したマウスの背部皮膚にイミキモド（商品名：ベセルナクリーム、持田製薬株式会社）を 125mg/日で、6 日間連日外用し、乾癬皮疹が誘導されることを確認した。

3-2-b) イミキモド誘発乾癬モデルにおける TRM の確認

野生型マウスにイミキモドを連日（6 日間）外用し乾癬皮疹を誘導後、外用を中止した。イミキモドの外用を中止すると皮疹は徐々に自然軽快する。外用中止直後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後の皮膚を採取し下記の方法で TRM を評価する。イミキモドを外用していない皮膚と比較した。

3-2-c) 乾癬の寛解皮膚における TRM を含む皮膚免疫細胞の免疫組織学的評価

各タイムポイントにおいて免疫組織学的に寛解皮膚の表皮に浸潤する細胞（TRM を含む T 細胞、樹状細胞、単球、好中球）の数を検討した。具体的には、背部皮膚を 6mm のトレパンを用いて採取し、液体窒素で凍結する。PBS で希釈した normal serum と室温 30 分間反応させ、非特異的な染色をブロックする。切片は次いで T 細胞のマーカー CD3、樹状細胞のマーカー CD11c、単球のマーカーのマーカー CD11b、マクロファージのマーカーで F4/80 で染色した。また TRM の検討においては、CD4、CD8、CD49a、CD69、CD103 などでも染色した。

3-3) 寛解皮膚に存在する TRM の機能の評価

寛解皮膚からディスペーゼを用いて表皮と真皮を分離した後に、表皮と真皮別々に細胞を分離し、IL-23、TNF、または抗菌ペプチドなどの投与下で培養し、TRM の IL-17、IL-22、IFN- γ などの産生をフローサイトメトリーで測定した。IL-17 産生誘導な IL-23 のソースの検索については、ラ

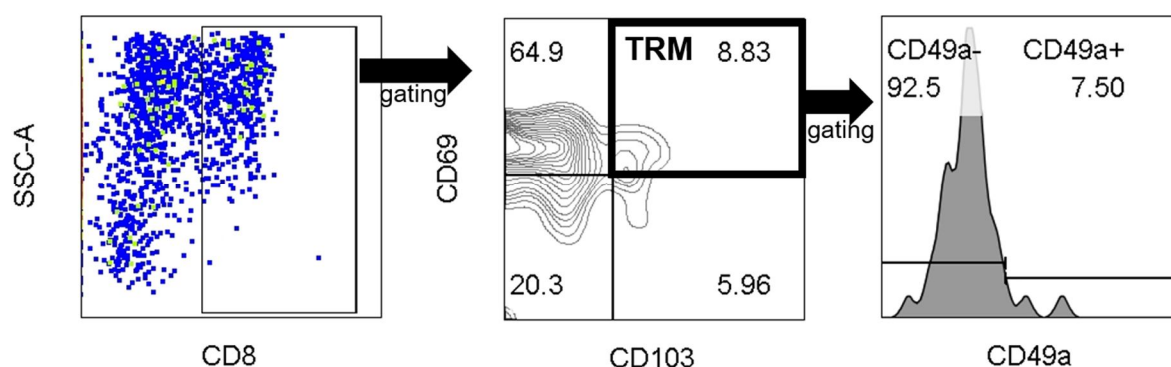
ンゲルハンス細胞、ケラチノサイト、樹状細胞を候補細胞として、フローサイトメトリーや免疫染色で検索した。

3-4) 治療が TRM に与える影響

寛解維持の時間、つまり再燃までの時間は、治療法に異なることが知られている。イミキモドで乾癬様皮疹を誘導する初めの 6 日間において、外用療法（ステロイド外用、ビタミン D 外用、配合剤外用）、内服療法（シクロスポリン、エトレチナート、アプレミラスト）、光線療法（ナローバンド UVB）、生物学的製剤（TNF 阻害薬、IL-23 阻害薬、IL-17 阻害薬）を投与し、治療を同時に行う。治療直後（day 6）、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後の皮膚を採取し、治療が TRM に与える影響について免疫染色、フローサイトメトリーなどを用いて検討することとした。

4. 研究成果

マウスイミキモドモデルにおける TRM の存在を確認している。剃毛したマウスの背中にイミキモドクリームを 6 日間連続塗布して乾癬様皮膚炎を誘導し、イミキモドクリーム塗布終了日から 4 週間後の皮膚を採取して、表皮に TRM が存在しているかどうかフローサイトメトリーを用いて解析した。イミキモドクリーム塗布終了から 4 週間後のマウスでは、臨床的に対照群と差は無かった（皮疹は中断後自然軽快）。しかしながら、IMQ 群の表皮において TRM（CD8+CD69+CD103+）の存在が確認でき、そのほとんどが CD49a-を示していた。今回我々が表皮で確認した TRM は、最近乾癬患者で報告された細胞の特徴と一致していた。



これらの細胞を単離し、表皮細胞との共培養や PMA により刺激したところ、Th17 系のサイトカインを産生する傾向が認められた。以上より、これらの細胞の乾癬の病態への関与が考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Uchida Hideaki, Kamata Masahiro, Shimizu Teruo, Egawa Shota, Ito Makoto, Takeshima Ryosuke, Mizukawa Itsumi, Watanabe Ayu, Tada Yayoi	4. 巻 104
2. 論文標題 Apremilast downregulates interleukin-17 production and induces splenic regulatory B cells and regulatory T cells in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.08.001	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 -

1. 著者名 Okura Iori, Kamata Masahiro, Asano Yoshihide, Mitsui Aya, Shimizu Teruo, Sato Shinichi, Tada Yayoi	4. 巻 102
2. 論文標題 Fingolimod ameliorates imiquimod-induced psoriasiform dermatitis by sequestering interleukin-17-producing T cells in secondary lymph nodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2021.04.004	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
---------	---------