

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17343

研究課題名（和文）Precision Medicineを目指すアトピー性皮膚炎モデルシステムの確立

研究課題名（英文）Establishment of model system for precision medicine of atopic dermatitis

研究代表者

林 良太（HAYASHI, RYOTA）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10649213

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）：アトピー性皮膚炎患者検体を用いた3Dスキンモデルの作製にはまだ時間がかかると思われるが、健常人細胞を用いた3Dスキンモデルの作製は確立することが出来た。また、3Dスキンモデルを用いずにアトピー性皮膚炎患者血清を用いた網羅的なサイトカインの探索を行い、IL-4やIL-13などのサイトカインの上昇はみられたものの、現段階では、各々の患者の治療法の選択に有用であるとは言い難かった。一方で、先天性魚鱗癬の1種である表皮融解性魚鱗癬患者ではIL-18が著明な上昇をしていた。アトピー性皮膚炎においてもIL-18が関与することが知られているが、アトピー性皮膚炎よりも表皮融解性魚鱗癬の治療になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎は多数の患者があり、近年新たな治療薬が多く発売されている。一方で、現段階で最も患者に適した治療法を選択する手段はなく、治療法の選択には医師と患者の判断に託されている。本研究は最大の目的は、治療前に最適な治療法を選択するモデルシステムを構築することであったが、現段階では実現していない。一方で、申請者は健常人細胞を用いた3Dスキンモデルの作製には成功しており、患者検体を用いずに種々の化合物、サイトカインを添加することにより培養細胞実験よりも視覚的に判断できるモデルを確立することは今後可能である。このモデルにより新規治療法の効果について検証できると考えている。

研究成果の概要（英文）：We established 3D skin model using epidermal cells and fibroblasts of normal individuals. While we could not establish 3D skin model for atopic dermatitis, and to establish it may take a long time. We also analyzed many cytokines of the patients with atopic dermatitis and congenital ichthyosis, and normal individuals to use their serum. Although IL-4 and IL-13 were mild elevated in the patients with atopic dermatitis, to select best treatment of atopic dermatitis is difficult only analyzing patient's serum. While IL-18 which was related with atopic dermatitis was prominent upregulated in the patients with epidermolytic ichthyosis. Therefore anti IL-18 might be effective treatment for epidermolytic ichthyosis rather than atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科

キーワード：アトピー性皮膚炎 3Dスキン precision medicine

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(AD)は国内に多数の患者がおり、抗体製剤など薬剤費の高い治療が必要な重症患者も多く存在する。今後も新しい抗体製剤が発売されることが想定されるが、AD患者の細胞を用いた *in vitro* モデルシステムにより患者ごとに適切な治療を選択することで医療費の削減および、安全性が改善する。ADの治療の主体はステロイド外用だが、重症患者にはIL-4/13受容体モノクローナル抗体を使用する。今後、抗IL-31抗体等の抗体製剤が使用できる可能性が高いが、薬価が高く保険医療を圧迫する懸念や重篤な副作用が生じることがある等の問題も抱えている。

皮膚疾患における3Dスキンコンストラクト(3DSC)を用いた *in vitro* モデルシステムは先天性表皮水疱症などの遺伝性皮膚疾患の分野で行われており、申請者も作製法を習得している。海外では尋常性乾癬などの炎症性皮膚疾患における3DSCの研究もおこなわれているが実用化には至っておらず、ADでも同様である。

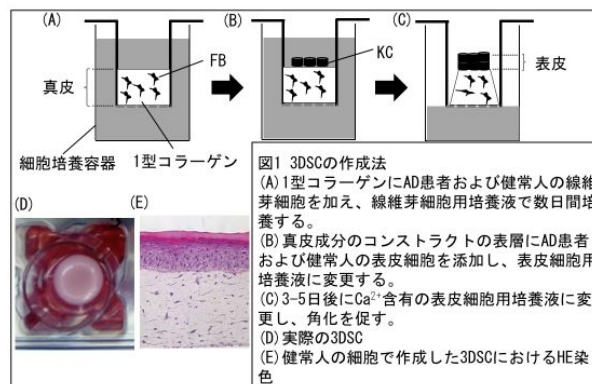
2. 研究の目的

AD患者間には *FLG* 遺伝子の変異の有無、患者のアレルギー既往歴等のメカニズムの違いがあり、最適な治療法も異なる。また、抗体製剤は重篤な副作用を生じることがあり、実際に患者に投与する前に効果を判定できる手法が必要である。よって、本研究の最大の目的はAD患者のiPS細胞(iPSC)由来の表皮細胞(iKC)、末梢血単核細胞(PBMC)およびダニ抗原などのアレルゲンを用いたAD患者の皮膚病変に類似する3DSCを作製することである。また、作製した3DSCは個々の患者特有の性質を持つことが想定され、様々な薬剤を添加することにより個々のAD患者に最も適した薬剤を選択でき、ADにおけるPrecision Medicineの実現化を目指す。

3. 研究の方法

1) 正常患者細胞を用いた3DSCの作製

AD患者細胞を用いた3DSC作成の前段階として、健康人の表皮細胞、線維芽細胞を用いた3DSCの作製を行う(図1)。



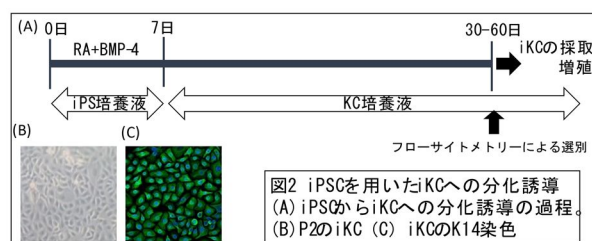
2) サイトカインの網羅的探索

ADでは前述の通り、IL-4、IL-13等のサイトカインの上昇がみられるが、各患者間において関与しているサイトカインが異なっている。そこで、ADおよびADと同様に先天的にバリア機能の異常を有する先天性魚鱗癬患者の血清を用いた網羅的なサイトカインの検索を行った。方法はBio-Plex Pro ヒトサイトカインスクリーニングパネルのプロトコル通りを行う。

3) AD患者のiPS細胞の作製

integrationフリーなエピゾーマルベクターまたはセンダイウイルスを用いてiPSCを作製する。

4) iPSCからiKCへの分化誘導(図2)：レチノイン酸(RA)、BMP-4を用いてiKCへの分化誘導を行う。その際に、最適な誘導効率を明らかにするため、各種抗体を用いたフローサイトメトリーを行う。



5) iKCを用いた3DSCの作製：皮膚真皮

の主要な構成成分である1型コラーゲンにAD患者のFBを加え、患者由来の真皮を作成後、iKCを添加して3DSCを作製する。

6) AD患者由来のPBMCの添加：AD患者の3DSCは遺伝性皮膚疾患と違い、単純に線維芽細胞、iKCを添加するのみでは免疫状態の再現が難しいため3DSCの表皮が角化した段階で患者のPBMCを培養液に添加する。また、同時に表皮側表面にダニ抗原などのアレルゲンを添加することでAD特有のアレルギー反応を惹起させる。PBMCは真皮作成時、iKC添加時など様々なタイミングで加えることで最適な条件を探索する。作製した3DSCは、ホルマリン標本および凍結標本によりADの組織像を呈しているか確認する。

7) AD治療薬および治療候補化合物の投与：3DSCを作製後、培養液に抗IL-4/13、抗IL-31な

どの他、治療薬になり得る化合物を添加する。

8) 治療薬添加後の培養液の評価：各治療薬投与後の培養液を抽出し、AD の活動性の指標である TARC や IL-4/13 などのサイトカインについて ELISA 法を用いて評価する。

9) 3DSC 標本による治療薬の効果判定：作製した 3DSC の病理像を確認し、薬剤投与による治療効果を判定する。3DSC は免疫不全マウスへ移植することにより更に優れた標本が作製出来る。よって、免疫不全マウスへの移植 2-4 週後に移植片を採取し、病理像を評価する。

4. 研究成果

1) 健常人の表皮細胞および線維芽細胞を用いた 3DSC の確立 (図 3)

健常人の表皮細胞および線維芽細胞および iPSC 由来の iKC を用いた 3DSC の作製においては、予定通り作製に成功し、表皮角化マーカーでありロリクリン、フィラグリン、表皮有棘層に発現するケラチン 1、表皮基底膜部に発現する 7 型コラーゲンの発現を確認することが出来た。以上の結果から、健常人細胞を用いた 3DSC は各種研究に応用できることを確認した。

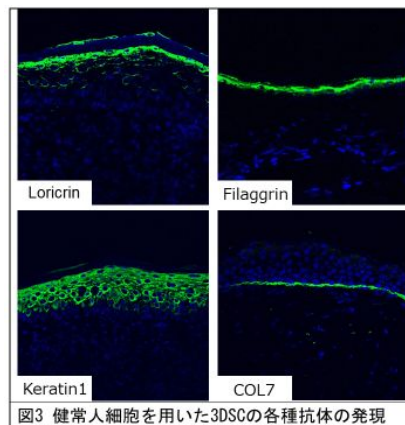


図3 健常人細胞を用いた3DSCの各種抗体の発現

2) 表皮細胞から iKC への分化誘導

表皮細胞から iKC への分化誘導を行う際に、最終的に確保出来る細胞の中には線維芽細胞様の細胞も多く含まれる。よって、pure な iKC を取得するために各種フローサイトメ

トリー法を用いた誘導効率の上昇を目指した。結果としては、元来使用しているインテグリン 6 抗体を用いた separation が最も誘導効率が高いことを確認した。

3) AD、健常人および先天性魚鱗癬患者の網羅的サイトカイン探索

本研究の最大の目的は個々の AD 患者に最も適した薬剤を選択でき、AD における Precision Medicine の実現化であり、3DSC を用いる以外に各患者の血清中のサイトカインを検索することにより、各々の患者において病原性に関わるサイトカインを明らかにすることが出来、治療法の選択に生かせるのではないかと推測した。よって、申請者が保有する AD 患者、健常人、先天性魚鱗癬の患者の検体を用いて網羅的なサイトカインの探索を行った。AD 患者では IL-4、IL-13 の他、IL-17 等のサイトカインの上昇がみられたが、健常人と有意差を持った上昇がみられる頻度は低かった。一方で、IL-17 有意に上昇をしている患者もあり、想定通り患者間において上昇しているサイトカインには違いがみられた。一方で、上昇しているものの軽度の上昇であるものも多く、血清中のサイトカインを測定することのみで AD 患者に最も適した薬剤を選択することは難しいと思われた。

一方、先天的に何らかの遺伝子変異によりバリア機能異常を呈する先天性魚鱗癬患者の検体を用いて、先天性魚鱗癬と同様にバリア機能異常を呈する AD 患者との比較検討を行った。興味深いことに、先天性魚鱗癬患者の中で特に *KRT1* 遺伝子に変異を有する表皮融解性魚鱗癬の患者では IL-18 が健常人、AD 患者と比し有意な上昇がみられていることが明らかになった。IL-18 はインフラマソームに関わるサイトカインであり、AD や尋常性乾癬などの炎症性皮膚疾患患者に関わることが知られていた。AD 患者の治療標的になることも推測していたが、AD 患者よりも表皮融解性魚鱗癬患者で著明な上昇がみられたことから、むしろ表皮融解性魚鱗癬の治療ターゲットになる可能性があると考えられる。

4) AD 患者の表皮細胞および線維芽細胞を用いた 3DSC の確立

AD 患者の線維芽細胞および表皮細胞を用いた 3DSC の作製は健常人と同様のプロトコールで行った(図 1)。AD を反映した 3DSC では表皮の肥厚を呈することが理想ではあるが、健常人と比し、著明な表皮肥厚を有する検体を作成することが難しかった。時折、表皮の肥厚はみられるものの、同時期に施行した健常人細胞を用いた検体においても表皮の肥厚が軽度みられることがあり、再現性をもって AD を反映した表皮肥厚を有しているとは判断出来なかった。過去の報告では AD に関連する IL-4 や IL-13 を添加することにより表皮肥厚がみられたとするモデルがあり、健常人 3DSC に IL-4、IL-13 を添加することでわずかに表皮肥厚がみられた。しかし、IL-4、IL-13 以外を添加した際にも同様に表皮肥厚がみられたこともあり、特異的なサイトカインを添加したことにより表皮肥厚を呈したか、外的要因による反応性に表皮肥厚を呈したかに関しては現時点で確定したことがいえず、少なくとも現段階では申請者の作製する 3DSC が AD の病態を反映しているとは言い難い。

本研究で目的としていた 3DSC を用いた AD における Precision Medicine の実現化のためには AD 患者細胞を用いた 3DSC において表皮の肥厚を呈するプロトコールを実現することが必要である。

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
---------	---------