

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23014

研究課題名(和文) 活性型ビタミンD3による制御性T細胞の増強と治療への応用

研究課題名(英文) A novel strategy to expand regulatory T cells by topical application of active vitamin D3

研究代表者

田中 志典 (Tanaka, Yukinori)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60637958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：制御性 T 細胞 (Treg) は過剰な免疫応答を抑制する働きをもち、Treg を増強する治療戦略は自己免疫疾患や炎症性疾患に有効である。本研究は、皮膚に活性型ビタミン D3 を塗布することにより全身性に Treg を増殖させる手法について、その Treg 増殖機構の解明を目指した。皮膚への活性型ビタミン D3 塗布は TSLP と呼ばれるサイトカインを産生誘導するが、TSLP は皮膚の特定の樹状細胞サブセットを刺激し、皮膚所属リンパ節で Treg 増殖を促進するという機序が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Treg 増殖を促進し過剰な免疫応答を抑制する治療法としては、慢性移植片対宿主病 (GVHD) に対する低用量 IL-2 療法が代表的である。皮膚への活性型ビタミン D3 塗布による Treg 増殖誘導法は、皮膚を利用して全身の免疫バランスを調節するという新しい発想に基づいており、低用量 IL-2 ほど強力ではないものの、簡便かつ安価である。本研究はその臨床応用に向け、マウスモデルで Treg 増殖機構を明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) function to suppress excessive immune responses, and therapeutic strategies to augment Tregs are promising for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. In this study, we aimed to elucidate the mechanism underlying systemic Treg proliferation by topical application of active vitamin D3 to establish this method as a new Treg-based therapy. We found that topical application of active vitamin D3 stimulates skin dendritic cells in a TSLP-dependent manner and they promote Treg proliferation in the skin-draining lymph nodes.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性 T 細胞 樹状細胞 活性型ビタミン D3 皮膚免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞 (Treg) は自己に対する免疫応答や、常在細菌叢などの無害な非自己に対する過剰な免疫応答を抑制する重要な働きをもつ。そのため、Treg の機能障害は自己免疫疾患や、外界とのバリア面である皮膚や腸管粘膜の炎症を引き起こす。他方、Treg を増強する治療戦略は自己免疫疾患や炎症性疾患に有効である。

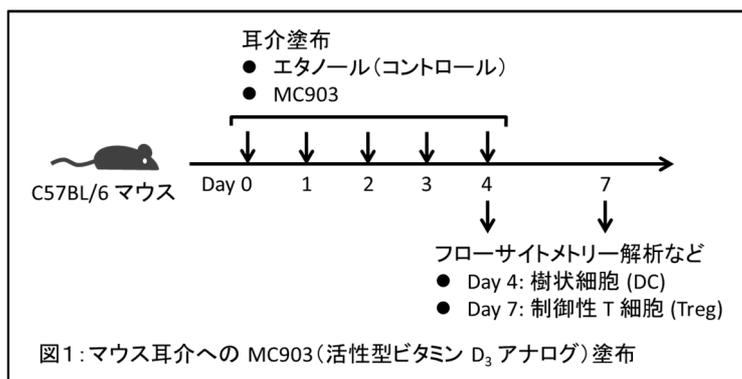
代表者らは、カルシウム代謝への影響が少ない活性型ビタミン D<sub>3</sub> アナログである MC903 を皮膚に塗布することで全身性に Treg 数が約 2 倍まで増加し、自己免疫疾患の治療に有効であることをマウスモデルにより示した (*J Autoimmun* 79: 39-52, 2017)。この作用は MC903 刺激を受けた皮膚の角化細胞が産生する胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP) と呼ばれるサイトカインに依存し、TSLP は樹状細胞への刺激を介して全身の Treg 増強をもたらす。TSLP はアトピー性皮膚炎や喘息などの Th2 型炎症を誘導するサイトカインとして注目されており、抗 TSLP 抗体薬によるその阻害が有望な治療戦略として試みられている。したがって、TSLP を産生誘導する目的で皮膚に MC903 を塗布し、Treg による免疫抑制を強化する試みは独自性が高いと言える。しかし、皮膚への MC903 塗布による Treg 増殖の詳細なメカニズムは不明であり、臨床応用に向けてさらなる研究が必要であった。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、MC903 刺激を受けた角化細胞は TSLP を産生し、TSLP は樹状細胞による Treg 増殖を促進することが分かった。TSLP は血中で上昇するため、全身の樹状細胞に作用し得る。しかし、どの組織に存在するどの樹状細胞サブセットが Treg 増強に関与するかなど Treg 増殖の動態や分子機構は不明であった。そこで本研究では、皮膚への MC903 塗布後の全身性 Treg 増殖を担う樹状細胞サブセットを解析し、臨床応用に向けての基盤形成を進めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス耳介皮膚に MC903 を 5 日間 (day 0~4) 塗布後、全身のリンパ節や脾臓を採取し、フローサイトメトリーにより樹状細胞の遊走動態や共刺激分子発現、Treg の増殖動態や細胞移動に関わるケモカイン受容体発現を解析した (図 1)。樹状細胞の活性化は Treg 増殖に先行するため、樹状細胞の解析は day 4 に行い、Treg の解析は day 7 に行った。また、樹状細胞を全身のリンパ節や脾臓から磁気ビーズ法やセルソーティングにより精製し、ex vivo で IL-2 の存在下で蛍光色素 CellTrace Violet (CTV) 標識 Treg と 5 日間共培養し、CTV 希釈を Treg 細胞分裂の指標とし、樹状細胞の Treg 増殖促進能を評価した。



### 4. 研究成果

マウスの耳介皮膚に MC903 を塗布後、全身のリンパ節および脾臓の樹状細胞を磁気ビーズ法により精製し、ex vivo で Treg 増殖促進能を検討したところ、耳介皮膚の所属リンパ節である耳リンパ節だけでなく、遠隔の皮膚所属リンパ節である腋窩リンパ節や鼠径リンパ節から得られた樹状細胞においても Treg 増殖促進能が向上することが分かった。他方、脾臓や腸管の所属リンパ節である腸管膜リンパ節から得られた樹状細胞の Treg 増殖促進能に変化は見られなかった。また、TSLP 受容体欠損マウスを用いた解析から、皮膚所属リンパ節樹状細胞における Treg 増殖促進能の向上は TSLP 受容体シグナルを介することが示された。

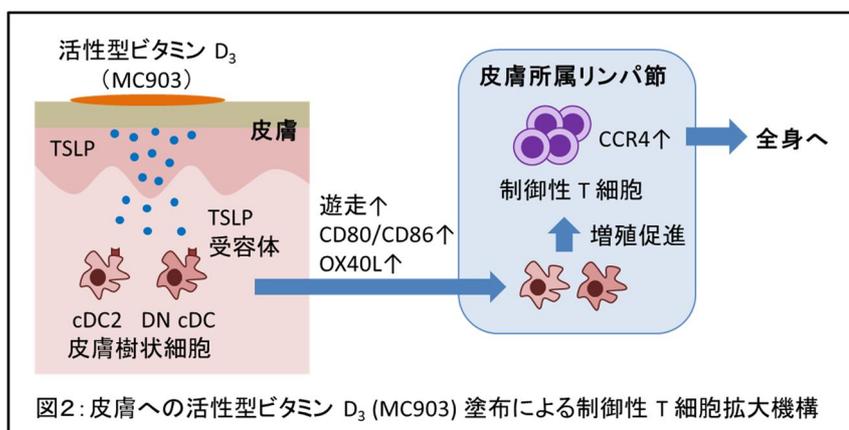
次に、耳介に MC903 を塗布後、リンパ節や脾臓における樹状細胞の数や活性化状態をフローサイトメトリーで解析したところ、皮膚所属リンパ節において遊走性樹状細胞数が増加し、またこれらの樹状細胞で T 細胞を活性化する際に必須となる補助シグナルを与える共刺激分子 CD80 および CD86 の発現が増加することが明らかとなった。各リンパ節や脾臓の常在性樹状細胞、また腸管膜リンパ節の遊走性樹状細胞においては数の増加や CD80/CD86 の発現増加は見られなかった。

そこで、MC903 耳介塗布後の皮膚所属リンパ節樹状細胞における Treg 増殖促進能の向上が、共刺激分子の発現増加によるものであるかどうか検討した。樹状細胞上の CD80/CD86 と T 細胞上の CD28 の相互作用を阻害する CTLA4-Ig と、樹状細胞上の別の共刺激分子 OX40L と T 細胞上の OX40 の相互作用を阻害する抗 OX40L 抗体を組み合わせることで、MC903 耳介塗布後の皮膚所属リンパ節樹状細胞による Treg 増殖促進が強く抑制された。したがって、MC903 耳介塗布は皮膚所属リンパ節樹状細胞の共刺激分子発現を増加されることにより、その Treg 増殖促進能を向上させることが分かった。

皮膚所属リンパ節の遊走性樹状細胞画分にはランゲルハンス細胞 (LC)、1 型と 2 型の古典的樹状細胞 (cDC1, cDC2)、1 型と 2 型のマーカーを発現しない二重陰性古典的樹状細胞 (DN cDC) が含まれる。これらのうちの樹状細胞が MC903 耳介塗布後に高い Treg 増殖促進能を獲得するかを検討するために、MC903 耳介塗布後の皮膚所属リンパ節から各樹状細胞サブセットをセルソーティングにより分取し、*ex vivo* 実験に用いた。その結果、遊走性 cDC2 および DN cDC が、MC903 耳介塗布後、高い Treg 増殖促進能を示した。さらに、遊走性 cDC2 および DN cDC で OX40L mRNA 発現が上昇することを定量 PCR により確認した。

最後に、MC903 耳介塗布後の Treg の増殖動態や、ケモカイン受容体発現について検討した。リンパ球の移動を阻害する FTY720 を用いて Treg の増殖場所を検討したところ、Treg は主に皮膚所属リンパ節で増殖することが示唆された。さらに、MC903 耳介塗布後に全身性に増殖した Treg ではケモカイン受容体 CCR4 の発現が増加していることが分かった。CCR4 は皮膚への移動に関与することが知られるケモカイン受容体である。増殖した Treg の皮膚やその他の非リンパ組織への移動機構については今後の検討課題である。

以上から、皮膚への MC903 塗布による全身性 Treg 増殖には皮膚の遊走性樹状細胞が重要な役割を担い、皮膚所属リンパ節で Treg 増殖が誘導されることが明らかとなった (図 2)。増殖した Treg では CCR4 の発現が増加しており、皮膚での炎症抑制に関与する可能性が示唆された。最近、TSLP が皮脂分泌を促進するなど、TSLP が炎症誘導作用だけでなく、皮膚の恒常性維持に寄与することが明らかになりつつある (*Science* 373: eabd2893, 2021)。本研究結果もこの考えを支持するものであり、皮膚免疫における TSLP の機能のさらなる解明と、その知見の臨床応用が期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hung Li-Yin, Tanaka Yukinori, Herbine Karl, Pastore Christopher, Singh Brenal, Ferguson Annabel, Vora Nisha, Douglas Bonnie, Zullo Kelly, Behrens Edward M., Li Hui Tan Tiffany, Kohanski Michael A., Bryce Paul, Lin Cailu, Kambayashi Taku, Reed Danielle R., Brown Breann L., Cohen Noam A., Herbert De' Broski R.	4. 巻 5
2. 論文標題 Cellular context of IL-33 expression dictates impact on anti-helminth immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabc6259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abc6259	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 該当する

1. 著者名 Bando Kanan, Kuroishi Toshinobu, Tada Hiroyuki, Oizumi Takefumi, Tanaka Yukinori, Takahashi Tetsu, Mizoguchi Itaru, Sugawara Shunji, Endo Yasuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Nitrogen containing bisphosphonates and lipopolysaccharide mutually augment inflammation via adenosine triphosphate (ATP) mediated and interleukin 1 (IL 1 ) mediated production of neutrophil extracellular traps (NETs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1866 ~ 1878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4384	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 Lu Lu, Kuroishi Toshinobu, Tanaka Yukinori, Furukawa Mutsumi, Nochi Tomonori, Sugawara Shunji	4. 巻 12
2. 論文標題 Differential expression of CD11c defines two types of tissue-resident macrophages with different origins in steady-state salivary glands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-04941-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Pramusita Adya, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Kinjo Ria, Ma Jinghan, Kanou Kayoko, Tanaka Yukinori, Mizoguchi Itaru	4. 巻 10
2. 論文標題 Salt-Sensitive Hypertension Induces Osteoclastogenesis and Bone Resorption via Upregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 816764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.816764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中志典、水田健太郎
2. 発表標題 ヒスチジン脱炭酸酵素レポーターマウスを用いた新規ヒスタミン産生細胞の同定
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	上林 拓  (Kabayashi Taku)		
研究協力者	横山 雄一  (Yokoyama Yuichi)		
研究協力者	水田 健太郎  (Mizuta Kentaro)		
研究協力者	菅原 俊二  (Sugawara Shunji)		

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			
米国	University of Pennsylvania			