

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20918

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎病変部における病原性T細胞の同定とその活性化機構の解明

研究課題名（英文）Identification of pathogenic T cells in atopic dermatitis lesions and their activation mechanism

研究代表者

栗原 和生（Kurihara, Kazuo）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40907961

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎（AD）病変部の表皮や真皮にレジデントメモリーT細胞（TRM）のサブセットであるCD103を発現するT細胞が多くみられた。TRMはメモリーT細胞の1分画で、いったん組織に移行した後循環することなく皮膚などの非リンパ組織に長くどまり続ける性質を持つ。そのため、TRMがAD病変の治療抵抗性や再燃に深く関わっていると考えられた。また、TRMが表皮肥厚に関連するIL-22を産生しており、IL-22産生CD103陽性CD8陽性TRMの割合と病変部の表皮肥厚と正の相関がみられ、TRMが表皮の増殖や活性化に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での研究成果によって、再発・治療抵抗性を示しやすい慢性炎症性皮膚疾患の1つであるアトピー性皮膚炎に対して、病変部に存在するレジデントメモリーT細胞（TRM）が関与している可能性を示した。このレジデントメモリーT細胞の機能や活性化機能が解明され、抑制することができれば、治療に難渋する症例の病態解明につながるだけでなく、新しい治療法へと繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：There were abundant CD103+ T cells in the epidermis and dermis in atopic dermatitis lesions. CD103 is one of the phenotypes for resident memory T cells (TRM). TRM is a non-recirculating memory T cell and remains the same nonlymphoid lesion for a while. TRM is thought to be deeply involved in the resistance and recurrence of AD lesions. And TRM is producing IL-22, which is associated with epidermal thickness, and IL-22-producing CD103+CD8+T cells are significantly correlated with epidermal thickness in AD lesions. It is suggested that TRM might be connected with epidermal thickness and activation in AD lesion.

研究分野：慢性炎症性皮膚疾患における免疫機構の解明

キーワード：T細胞 アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎(AD)は、強いかゆみを伴う紅斑が全身に広がり、日本では 10%前後が罹患している頻度の高い疾患である。AD では、インターロイキン(IL)-4/IL-13 を主体としたタイプ2サイトカインが病態形成に深く関与する。近年、それらタイプ2 サイトカインをターゲットとした治療法が開発され大きな効果を上げる一方で、治療を中止すると再燃するなど、根本的治療がない現状である。したがって、タイプ2サイトカインの産生源を同定し、その機能制御を行うことは、AD の根本的治療戦略を考える上で極めて重要である。

タイプ2サイトカインの産生には複数の細胞種が関わっているが、中でも T 細胞が重要視されており、AD と病態の近い喘息の動物モデルを用いた実験から、生体の危険信号(アラミン)によりタイプ2サイトカインを多く産生する“病原性 T 細胞サブセット”の存在が示唆されている。また、ヒト AD 病変部の single cell RNA 解析から、動物での病原性 T 細胞サブセットに近い表面マーカーをもった T 細胞の存在が近年報告された(Bangert et al, Sci Immunol, 2021)。しかし、AD 病変部に実際に病原性 T 細胞が存在するのか、存在するとすればどのような刺激で産生が誘導されるのか、など詳細な機能解析は、ほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AD 病変部における病原性 T 細胞の同定とその活性化制御機構の解明である。AD における炎症性サイトカイン(タイプ2 サイトカイン)の産生源として、自然リンパ球を初めとする自然免疫系細胞の役割が近年注目されてきた。しかし、種々の動物実験や近年の臨床サンプルの大規模網羅的解析からは、AD 病変部において、自然免疫系細胞様機能をもった T 細胞(病原性 T 細胞)の存在・その病態での意義が注目されつつある。従って本研究によりヒト AD 病態における病原性 T 細胞の詳細な機能解析が進み、そこから病原性 T 細胞の機能制御や生存維持機構の解明・制御が可能となれば、全く新しい観点からの AD 治療法開発への展開も期待される。

3. 研究の方法

a. 病原性 T 細胞候補サブセットの同定

AD 患者の皮膚生検余剰組織を用い、T 細胞を培養・増殖させる。培養は、抗 CD3/CD28 抗体、IL-2 入り cRPMI にて約 2 週間行う。培養後、フローサイトメトリーにて各種 T 細胞サブセットの割合・細胞数やタイプ2 サイトカインを中心とした、炎症性サイトカインの発現を解析する。T 細胞からのサイトカイン産生誘導刺激候補因子として、アラミン(搔破などの刺激により皮膚から産生される因子)と呼ばれる一群のサイトカイン(IL-33、TSLP など)を用いて T 細胞を刺激する。これにより、各種 T 細胞サブセットのアラミンへの反応性、サイトカイン産生能を評価し、病原性 T 細胞候補を絞り、その活性化誘導因子・条件を明らかとする。

b. 病原性 T 細胞と病勢との病理組織学的解析

病原性 T 細胞の表現系解析から得られたマーカーを用いて、それら T 細胞の免疫染色を行い AD 病変部皮膚での病原性 T 細胞の局在・数等を組織学的に検証する。さらに、組織学的病勢(表皮の肥厚程度)や、臨床的病勢(痒み、皮疹重症度スコアなど)との関連について明らかとする。

c. 病原性 T 細胞の表現系の解析

上記で明らかになった病原性 T 細胞候補サブセットについて、その代表的表面マーカーや T 細胞受容体レパトアなどをフローサイトメトリーにて解析を行う。細胞数が十分に採取できれば、セルソーターを用いて病原性 T 細胞候補サブセットを分離し、RNA sequence によって網羅的機能解析を行う。

4. 研究成果

AD 患者の皮膚組織を集積し、組織から取り出した T 細胞を培養して冷凍保存ストックを蓄えた。フローサイトメトリーにて各種 T 細胞サブセットの割合・細胞数やタイプ2 サイトカインを中心とした、炎症性サイトカインの発現を解析し、病理組織学的検査も行った。

その結果、AD 病変部の表皮や真皮にレジデントメモリーT 細胞 (T_{RM}) のサブセットである CD103 を発現する T 細胞が多くみられた(図1)。 T_{RM} はメモリーT 細胞の 1 分画で、いったん組織に移行した後循環することなく皮膚などの非リンパ組織に長くとどまり続ける性質を持つ。そのため、 T_{RM} が AD 病変の治療抵抗性や再燃に深く関わっていると考えられた。また、 T_{RM} が表皮肥厚に関与する IL-22 を産生しており、IL-22 産生 CD103 陽性 CD8 陽性 T_{RM} の割合と病変部の表皮肥厚と正の相関がみられ、 T_{RM} が表皮の増殖や活性化に関与している可能性を見出した(Kurihara K et al, J Dermatol, 2022)。

さらに、T 細胞からのサイトカイン産生誘導刺激候補因子として、アラミンと呼ばれる一群のサイトカイン(IL-33, TSLP など)を用いてT 細胞を刺激し、病原性T 細胞のアラミンへの反応性、サイトカイン産生能を評価し、これらの活性化誘導因子・条件を明らかとする実験を行った。そこでは、アラミンだけの刺激ではサイトカイン産生能は誘導されず、抗 CD3/CD28 刺激下であればアラミンを加えることによりサイトカイン産生能が上昇していることが示された。以上のことから、病変部の T 細胞は単にアラミンと呼ばれるサイトカインだけでは誘導されず、T 細胞受容体刺激下でないと誘導されないことを確認した。

このことから、AD 病変部には T_{RM} が関与していることが示唆され、また病変部 T 細胞の活性化にはアラミンと呼ばれる一群のサイトカインが必要ではあるが、T 細胞自体も活性化された状態でないと T 細胞は刺激されないことが示された。

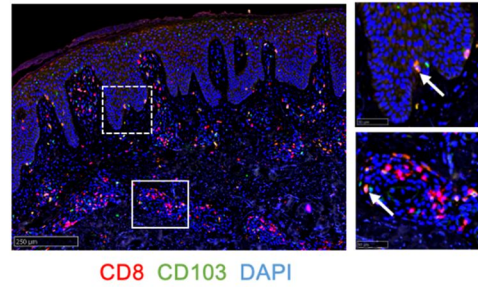


図1 AD 病変部の CD103 陽性 CD8 陽性 T_{RM}

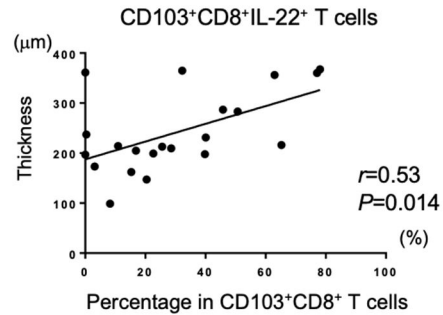


図2 IL-22 産生 CD103 陽性 CD8 陽性 T_{RM} と表皮肥厚の相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kurihara Kazuo, Fujiyama Toshiharu, Tokura Yoshiki, Honda Tetsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible involvement of interleukin 22 producing CD103+CD8+T cells in the epidermal hyperplasia of atopic dermatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16382	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kurihara K, Fujiyama T, Phadungsaksawasdi P, Tokura Y, Honda T
2. 発表標題 Possible involvement of IL-22-producing CD8+CD103+ T cells in the epidermal hyperplasia of atopic dermatitis
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurihara K, Fujiyama T, Honda T
2. 発表標題 Possible facilitating roles of alarmins in the TCR-induced activation of CRTH2+Th2 cells in the atopic dermatitis lesion
3. 学会等名 International societies for Investigative Dermatology Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------