

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 29 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790475

研究課題名（和文）TSLP と Th2 細胞の協調的な働きによるアトピー性皮膚炎の病態形成機構

研究課題名（英文）Effects of interactions of TSLP and Th2 cells on development of symptoms of atopic dermatitis.

研究代表者

大森 深雪 (OMORI-MIYAKE MIYUKI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30462667

研究成果の概要（和文）：

本研究では、アトピー性皮膚炎患者の病変表皮で高発現を呈するサイトカイン TSLP によって分化誘導されたヘルパーT (Th) 細胞の機能分化が、表皮恒常性の破綻に果たす役割について研究を行った。成果として、TSLP の作用を受けた Th 細胞により産生されるサイトカインが、表皮の主たる構成細胞であるケラチノサイトの分化途上で発現する構造分子の発現を抑制していることを機序と共に明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

TSLP has been observed in the skin lesion of atopic-dermatitis patients. We have investigated roles of Th2 differentiation in instability of the epidermis under a high level of TSLP expression in keratinocytes. The results demonstrate that Th2-mediated cytokines IL-4 or IL-13 are capable of down-regulating the expression of structural molecules of differentiating keratinocytes through STAT6 and/or ERK-MAPK signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー

### 1. 研究開始当初の背景

申請者が着目してきたTSLPは、アトピー性皮膚炎（AD）や喘息などアレルギー疾患患者の上皮細胞において高発現するサイトカインである。TSLPの高発現は、ヘルパーT (Th) 細胞の2型分化を間接的あるいは直接的に誘導し、Th2サイトカインの産生を亢進させる。アレルギー疾患患者は、家族歴・既往歴あるいはIgE抗体を産生しやすい体質、つまりTh2サ

イトカイン（IL-4, IL-13, IL-5）優位な体内環境を素因として有し、それらの産生はマスト細胞や好酸球の集積・活性化を伴う局部炎症に深く関与する。しかし、局所である上皮細胞におけるTh2サイトカインの影響については未知な点が多くあった。AD患者では表皮の肥厚や易感染性が認められるが、表皮のターンオーバーの異常の末に起こる保湿成分の減少、易感染性は、表皮の主たる構成細胞で

あるケラチノサイトに対するTh2サイトカインの作用によって起こることが示唆されている。ケラチノサイトは深層から表層へと分化しながら移動し、顆粒層で保湿成分や抗菌成分を放出した後死に至り角質層となるが、既知の報告はいずれも分化の最終段階のイベントに着目したもので、分化途上におけるイベントに関しては未知であった。また、TSLPの高発現が、病変皮膚でどのように発現維持あるいは制御されているのかについても不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1) TSLPにより分化したTh2細胞 (TSLP-Th2細胞) が呈する性状を把握し、TSLP-Th2細胞が (2) ケラチノサイトにおけるTSLP発現の維持・抑制に果たす役割、(3) 表皮のターンオーバー (増殖・分化・細胞死) に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

一連の研究を通して、TSLPの高発現に起因するTh2細胞分化がもたらす表皮のターンオーバーの異常が起こる成り立ちの解明と、その人為的制御の可能性の探索を目指した。

## 3. 研究の方法

以下の3項目の検討を通して、表皮の生理機能の異常を惹起、維持、制御する機構についてTSLP反応性Th2細胞 (TSLP-Th2細胞) を中心に研究した。

(1) TSLPにより機能分化したTSLP-Th2細胞におけるサイトカイン発現の網羅的プロファイリング: TSLP-Th2細胞、IL-4により機能分化した通常のTh2 (IL-4-Th2)細胞、分化誘導を行わないTh (Th0)細胞で性状の相違点と共通点を比較する。

(2) AD皮膚病態悪化因子TSLPの発現の増減におけるTSLP-Th2細胞の関与と役割: (1)で検出されたTSLP-Th2細胞が産生するサイトカインあるいは細胞そのものの存在下で初代培養ケラチノサイトを培養し、TSLP発現の増減を比較する。

(3) 表皮のターンオーバー (増殖、分化、細胞死)におけるTSLP-Th2細胞の関与とその役割: (2)と同様の培養下での、表皮のターンオーバー関連分子の発現を比較する。

## 4. 研究成果

(1) TSLP-Th2細胞とIL-4-Th2細胞のサイトカイン産生プロファイルの共通点として、IL-4, IL-13, IL-5の産生亢進を誘導することが確認できた (図1)。しかし、実験系の一時的な不具合の影響で、網羅的プロファイ

リングにより両者の相違を比較するには至らなかった。実験進行の円滑化を図る策として、TSLP-Th2細胞とIL-4-Th2細胞が共通に産生する既知のサイトカインに焦点をしばって以降の実験を行うこととした。

Anti-CD3/28 stim.

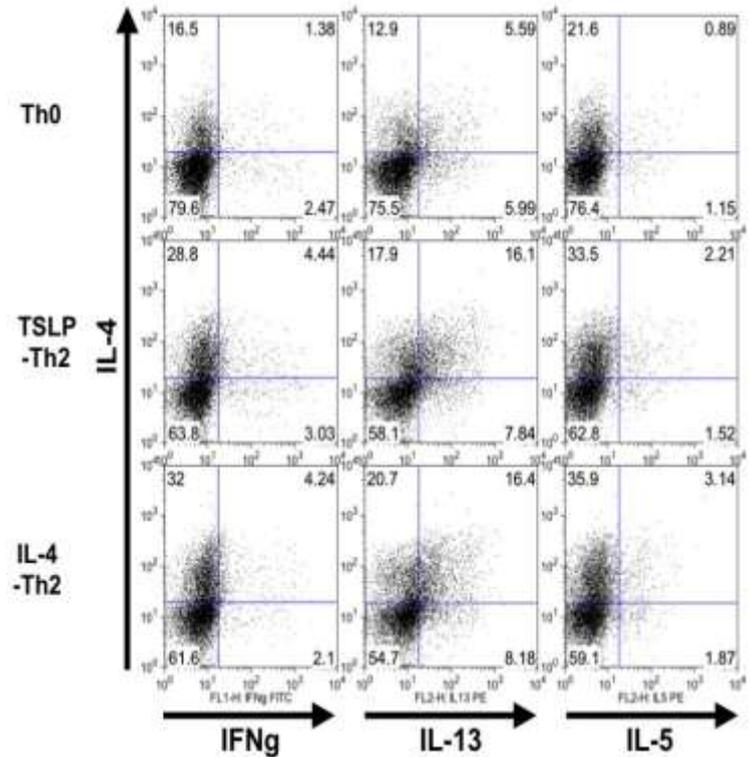
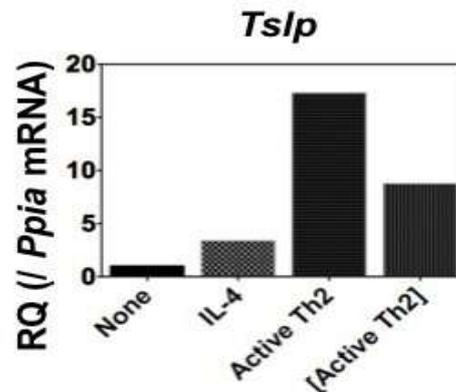


図1. TSLP-Th2細胞、IL-4-Th2細胞、分化誘導を行わないTh0細胞におけるサイトカイン産生プロファイル

TSLP-Th2細胞とIL-4-Th2細胞ではIL-4, IL-13, IL-5の産生亢進が起こることが確認された。

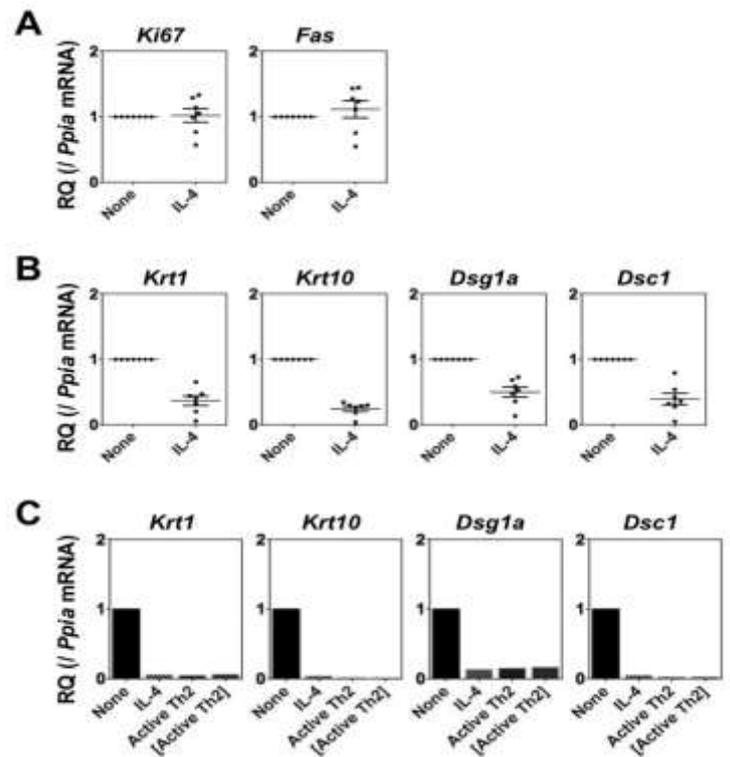
(2) TSLP発現の調節にTh2細胞と表皮のクロストークが関与しているのかという可能性については、細胞同士の接触ではなく、Th2細胞由来の液性因子が重要との結果が得られた (図2)。



## 図2. ケラチノサイトと活性化Th2細胞のトランスウェルを用いた共培養

*Ts1p*の発現は活性化Th2細胞により誘導される(Active Th2)。トランスウェルを用いて細胞間接触を阻害した共培養 ([Active Th2])においても*Ts1p*発現が誘導されることから、*Ts1p*発現には活性化Th2細胞由来の液性因子が重要であることが示唆された。

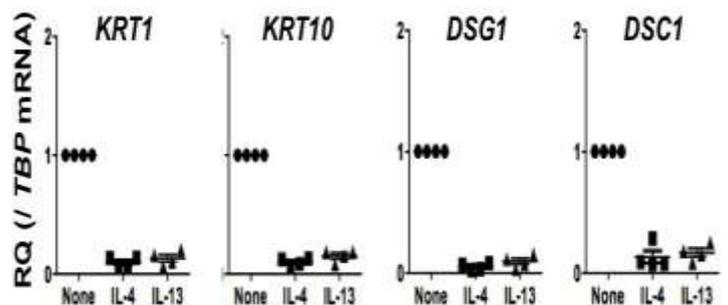
(3) マウス初代培養ケラチノサイトは細胞増殖の速度が遅いため、増殖に関する事項についてはより増殖の早い細胞を用いた別の実験系で更なる検討が必要であるが、本実験系においては、IL-4存在下の*Ki67*発現に変化が認められなかったことから、Th2サイトカインは増殖には無関係であると結論づけた。細胞死に関してはアポトーシス関与分子*Fas*の発現を指標に検討したが、Th2サイトカインの作用はないようであった(図3A)。分化に関しては、分化の途中段階(有棘層)で発現する構造分子*Krt1*, *Krt10*, *Dsg1*, *Dsc1*の発現がTh2サイトカインの存在により減少することを明らかにした(図3B)。IL-4受容体alphaをIL-4と共有するIL-13の存在下においても同様の結果が得られた。これらの減少はIL-4受容体alpha欠損あるいはSTAT6欠損ケラチノサイトでは起こらないことから、IL-4受容体-STAT6シグナル依存的に起こることが示唆された。また、MEKインヒビターU0126の処置後にはこれらの減少が見られないことから、MEK-ERK-MAPKシグナルにも依存していることが示唆された。最も未分化な基底層で発現する構造分子の発現にはTh2サイトカインの影響は認められなかった。ケラチノサイトの性状に対するIL-4あるいはIL-13の影響は分化の最終段階で検討されたのみであったため、本研究で得られた結果は、より早い分化段階のケラチノサイトにもIL-4あるいはIL-13が作用して、細胞の分化や性状を変えうという新しい概念を提唱するものとなった。トランスウェルを用いてケラチノサイトと活性化Th2細胞のクロストークの可能性についても検討したが、活性化Th2細胞との接触の有無に関わらず、ケラチノサイトにおける対象遺伝子の発現減少を認めたことから、今回発見した現象については活性化Th2細胞由来の液性因子が作用した結果であると結論づけた(図3C)。



## 図3. ケラチノサイトの増殖・細胞死・分化における活性化Th2細胞作用

(A) IL-4による増殖(*Ki67*)・細胞死(*Fas*)への影響はないと結論づけた。(B) 有棘層ケラチノサイトの構造分子の発現はIL-4によって制御されていた。(C) トランスウェルを用いて、ケラチノサイトと活性化Th2細胞の細胞間接触の影響を検証したところ、接触の有無(それぞれ“Active Th2”、“[Active Th2]”)に関わらずIL-4存在下と同様の減少が見られたことから、細胞間の接触ではなく活性化Th2細胞由来の液性因子が重要であることが示唆された。

最後に、予定した研究計画に追加して同様の現象がヒトでも起こりうるのかについて検討を行ったところ、少なくともヒト細胞株では起こることが確認できた(図4)。



#### 図4. ヒトケラチノサイト細胞株の有棘層ケラチノサイトの構造分子の発現におけるTh2サイトカインの影響

ヒトケラチノサイト細胞株で分化誘導を行い、IL-4あるいはIL-13存在下で有棘層ケラチノサイトの構造分子の発現を確認したところ、ヒトでもマウスと同様の現象が確認できた。

一部検討できなかった項目が残り申請当時の仮説と異なる結果が得られた項目もあったが、本研究では、TSLPによって分化したTh2細胞由来のサイトカインが分化途上のケラチノサイトに作用し、細胞内や細胞間の構造を支える分子の発現をSTAT6およびMEK-ERK-MAPKシグナルを介して減少させることが示唆された。成果を総括的に考慮すると、本研究から今後の発展的研究の糸口を複数見いだすことが出来た。ケラチノサイトで起こる特異的な現象に着目して、表皮ターンオーバーの正常化が制御可能となれば、AD表皮の構造的脆弱性や肥厚、易感染性に対する解決策が見いだせる可能性があるため、さらなる詳細な研究を今後も引き続き続ける予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Miyuki Omori-Miyake and Steven F Ziegler. Mouse models of allergic diseases: TSLP and its functional roles. *Allergol. Int.* (2012) 61(1):27-34.

[学会発表] (計3件)

① Miyuki Omori-Miyake, Masakatsu Yamashita and Junji Yagi, (標題) IL-4- or IL-13-mediated modification of structural molecules in murine and human epidermal keratinocyte. The American Association of Immunologists, 100th Annual Meeting, 2013. 5. 3-7 (米国ハワイ州)

② 大森深雪, 山下政克, 八木淳二, (標題) Possible mechanisms of epidermal fragility in atopic dermatitis caused by IL-4 and IL-13. 第41回日本免疫学会総会学術総会, 2012. 12. 5-7 (兵庫県神戸市)

③ 大森深雪, 山下政克, 八木淳二, (標題) IL-4 and IL-13 modulate intermediate stage of epidermal keratinocyte differentiation. 第40回日本免疫学会総会学術総会. 2011年11月27-29日 (千葉県千葉市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大森 深雪 (OMORI-MIYAKE MIYUKI)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30462667

##### (2) 協力研究者

山下 政克 (YAMASHITA MASAKATSU)  
愛媛大学・医学部・教授  
研究者番号：00311605