平成30年度 海外留学補助金による研究経過・成果報告書 アトピー性皮膚炎における新しい共刺激分子の特徴と役割

Laboratory for Investigative Dermatology, The Rockefeller University 山村 和彦

■研究の背景と目的

著者は治療で十分な改善が得られない "難治性炎症性皮膚疾患"をターゲットに、皮膚免疫の側面から病態の解明と創薬標的の創出に取り組んできた。炎症性皮膚疾患とは皮膚へ多彩な免疫細胞が浸潤し炎症を起こす疾患の総称である。アトピー性皮膚炎は代表的な難治性炎症性皮膚疾患であり、広範囲の皮疹と激しい痒みは患者の QOL(生活の質)を著しく損なう。アトピー性皮膚炎は免疫学的異常を伴うことが知られており、同じ炎症性皮膚疾患である乾癬と比較して、アトピー性皮膚炎は Th2、乾癬は Th17 へのヘルパーT 細胞サブセットの偏りがあることが明らかとなっている [1]。

OX40 は TNF 受容体スーパーファミリーの分子で主に活性化した T 細胞に発現し、樹 状細胞をはじめとした抗原提示細胞上の **OX40** Ligand (OX 40L)と結合することで特に Th2 細胞の活性化やサイトカイン産生反応の増加に寄与する共刺激分子として知られている[2]。興味深いことに近年 OX40 抗体を用いた初期臨床試験でアトピー性皮膚炎の臨床的な改善を示す結果が得られつつあり、OX40 はアトピー性皮膚炎の病因に深く関わっていると推察される。

しかしながら、アトピー性皮膚炎免疫細胞における OX40 の発現はまだ十分に探求されておらず、OX40 抗体が症状を改善させる機序もまだ十分には解明されていない。そこで著者はアトピー性皮膚炎患者皮膚及び血球免疫細胞における OX40/OX40L の発現とその機能を検証することとした。

■研究経過

アトピー性皮膚炎患者血球免疫細胞における OX40/OX40L 発現

まず、高次フローサイトメーターを用いてアトピー性皮膚炎患者血球細胞における OX40/OX40L 発現を特徴づける為、19 種類のバイオマーカーからなるマルチカラーフローサイトメトリーパネルを作成した(Table 1)。OX40/OX40L 陽性細胞集団の境界の決定には、全ての蛍光色素から境界を決定したい蛍光色素だけを抜き、代わりに同じアイソタイプのコントロール抗体と置換した Fluorescence Minus One (FMO) Isotype Control を用いた (Supple. Fig. 1)。

T/B/NK/NKT 細胞、単球、樹状細胞における OX40/OX40L 発現をアトピー性皮膚炎患者と比較対象となる健常人で比較したところ、制御性 T 細胞における OX40 発現のみアトピー性皮膚炎患者で優位に上昇していた(Fig. 1a,b)。 さらにヘルパーT 細胞及び制御性 T 細胞について、ナイーブ/メモリーサブセット、Th2 極性 T 細胞サブセット、活性化 T 細胞サブセット (ICOS+, HLA-DR+)、皮膚ホーミング (CLA+) サブセットに着目して詳細な解析を行ったところ、特に活性化 T 細胞サブセットにおいてアトピー皮膚炎患者でOX40 発現が上昇する傾向にあることがわかった(Fig. 2a,b)。

アトピー性皮膚炎患者皮膚における OX40/OX40L 発現

比較対象を健常人と乾癬患者皮膚とし、免疫組織学的染色を用いてアトピー性皮膚炎患者皮膚を染色したところ、CD3/CD11c/FcERI は乾癬と比較してアトピー性皮膚炎で増加を認めないにも関わらず、OX40/OX40L 発現はアトピー性皮膚炎で優位に増加していた。また、皮膚 T 細胞活性化の指標の一つである CD103 を染色したが、アトピー性皮膚炎と乾癬の間に優位な差は認められなかった(Fig. 3)。血球細胞を用いたフローサイトメトリーの結果を踏まえ、皮膚への制御性 T 細胞の浸潤の有無を FoxP3 で染色し確認したところ、アトピー性皮膚炎及び乾癬患者皮膚において著明な FoxP3 陽性細胞の浸潤が確認された (Supple. Fig. 2)。

■考察

患者皮膚検体を用いた実験からアトピー性皮膚炎患者皮膚では OX40/OX40L 発現が同じ炎症性皮膚疾患である乾癬と比較しても著名に亢進していることがわかり、血球細胞を用いたフローサイトメトリーによる実験から、アトピー性皮膚炎患者では制御性 T 細胞と活性化ヘルパーT 細胞で特に OX40 発現が亢進していることがわかった。これらのことから、OX40/OX40L シグナルはアトピー性皮膚炎患者皮膚 OX40L 発現の亢進を起点として制御性 T 細胞と活性化ヘルパーT 細胞 OX40 発現の誘導し、Th2 細胞の活性化やサイトカイン産生反応に寄与していることが推察される。よって今後は OX40/OX40L の発現が亢進していたそれぞれの細胞に焦点を絞り、皮膚における OX40L 発現誘導の機序とアトピー性皮膚炎患者 CD4+T 細胞と制御性 T 細胞における OX40 発現がアトピー性皮膚炎サイトカインプロファイルに及ぼす影響を検証していく。

■現在進行中の研究

アトピー性皮膚炎患者制御性 T 細胞とヘルパーT 細胞の OX40 の役割と相互作用

アトピー性皮膚炎患者及び比較対象の健常人血球細胞より、磁気細胞分離(MACS)を用いてヘルパーT 細胞(CD4+ CD25-)と制御性 T 細胞(CD4+ CD25+)を分離し、(Purity 80%以上, Data not shown)実験に用いている。ヘルパーT 細胞と制御性 T 細胞を共培養した場合と単独培養した場合それぞれについて、T 細胞受容体/OX40L 刺激を行い、OX40 中和抗体を用いて各細胞から産生されるアトピー性皮膚炎関連サイトカインの変化を測定し、OX40 の役割を検証している。

アトピー性皮膚炎患者皮膚 OX40 陽性細胞の性質の探索

患者皮膚検体を用いた免疫組織学的多重染色を行うことによりアトピー性皮膚炎患者 皮膚における OX40 陽性細胞の種類の特定と性質の探索を行っている。

皮膚 OX40L 発現誘導のメカニズムの探索

正常ヒト表皮細胞を用い、既出のアトピー性皮膚炎患者皮膚における遺伝子発現変化を参照し[3]、in vitro で OX40L が誘導される鍵となる分子の探索を行っている。

参考文献

- [1] Guttman-Yassky E, Krueger JG, Curr Opin Immunol 2017
- [2] Kazuo S et al, Nat Rev 2004
- [3] Esaki H,..., Guttman-Yassky E, Krueger JG, J Allergy Clin Immunol 2015

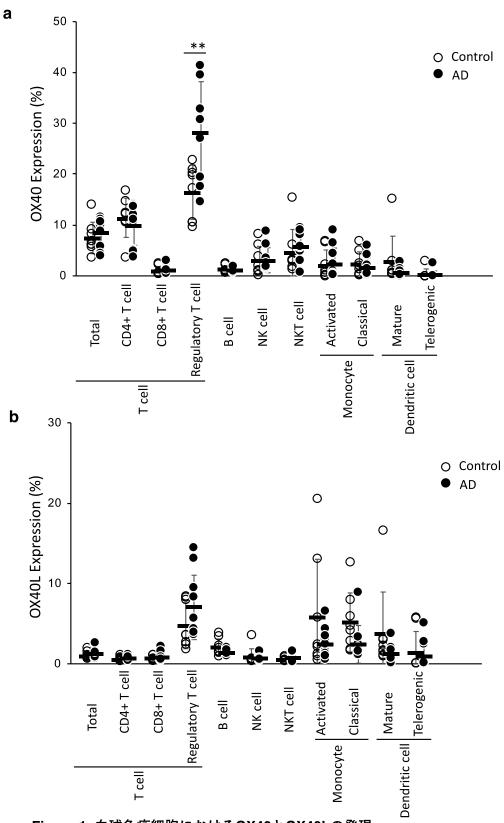


Figure 1. 血球免疫細胞におけるOX40とOX40Lの発現 (a)血球各細胞におけるOX40の発現, (b)血球各細胞におけるOX40Lの発現. コントロール(Control; n=8), アトピー性皮膚炎(AD; n=10). Data are expressed as mean \pm s.d. ** P<0.01 (two-tailed Student's t-test).

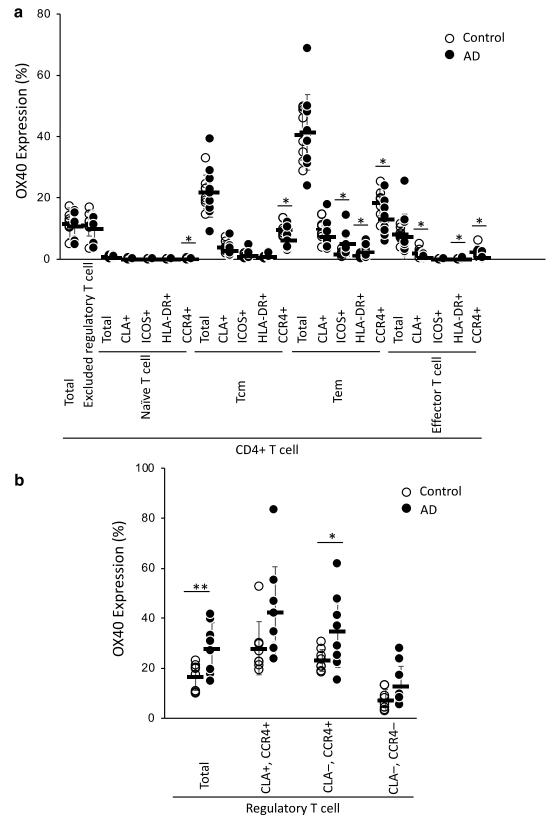


Figure 2. ヘルパーT細胞及び制御性T細胞各サブセットにおけるOX40の発現 (a) ヘルパーT細胞各サブセットにおけるOX40の発現, (b) 制御性T細胞各サブセットにおけるOX40の発現. コントロール(Control; n=8), アトピー性皮膚炎(AD; n=10). Data are expressed as mean ± s.d. *P<0.05, * *P<0.01 (two-tailed Student's t-test).

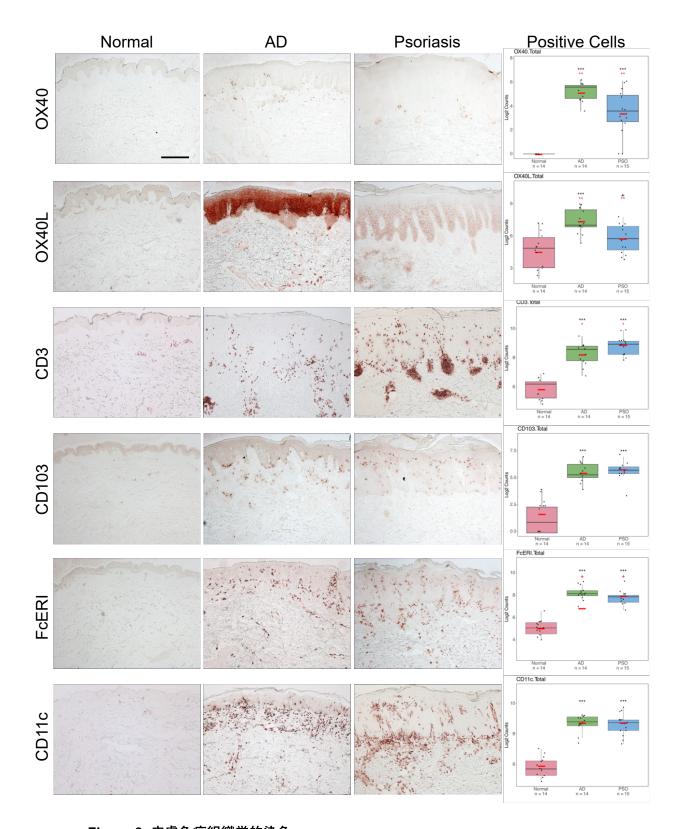
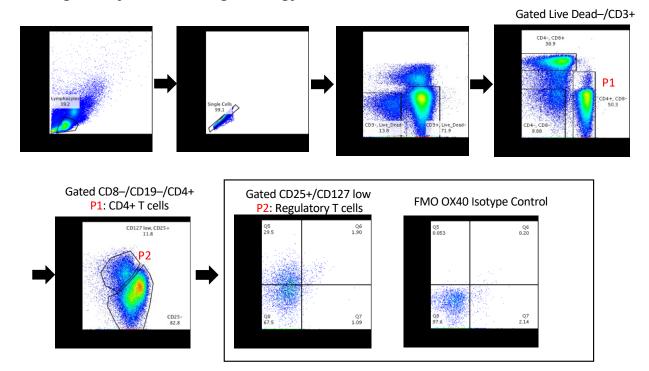


Figure 3. 皮膚免疫組織学的染色 コントロール(Normal; n=14), アトピー性皮膚炎(AD; n=14), 乾癬(Psoriasis/Pso; n=15). Bar 500μm, data are expressed as mean ± s.d. *P<0.05, * *P<0.01, * * *P<0.001

Table 1. Biomarkers and Fluorophore for OX40/OX40L Panel

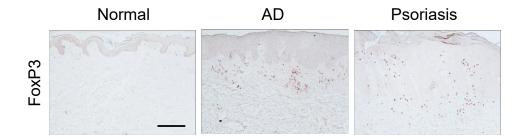
Biomarkers	Fluorophore	Clone
CD3	BUV395	SP34-2
CD4	BUV805	SK3
CD8	BV500	RPA-T8
ICOS	BV785	C398.4A
CD45RO	BV605	UCHL1
CCR7	AF700	150503
CD14	BB700	M0Pg
CD16	PE-TR	3G8
CD19	BV500	HIB1q
CD25	PE-Cy7	M-A251
CD56	PE-TR	MEM-188
CD127	BV650	A019D5
HLA-DR	APC-H7	12F1 (L243)
BDCA1	BV711	LS161
BDCA3	BV605	M80
CLA	FITC	HECA-452
CCR4	BV421	1G1
OX40	AF647	Ber-ACT35
OX40L	PE	11C3.1

Regulatory T cell Gating Strategy



Supplementary Figure 1. FMO Isotype Controlによる境界の決定

アトピー性皮膚炎患者血球細胞を用いた制御性T細胞のGating Strategyと 陰性コントロールとしてのFMO OX40 Isotype Controlの結果を示す



Supplementary Figure 2. 皮膚免疫組織学的染色 コントロール(Normal), アトピー性皮膚炎(AD), 乾癬(Psoriasis)の代表的な例, Bar 500μm.