

皮膚—免疫増幅サイクルの遮断によるアレルギー性皮膚炎の病態制御

愛媛大学大学院医学系研究科感染防御学講座

大森 深雪

Repeated exposures to a certain antigen onto the skin develop the pathogenesis of allergic contact dermatitis (ACD) with the itchy skin rash. For the treatment of ACD, topical steroids have commonly been used. However, the use of steroids induces a variety of adverse effects including skin thinning and atrophy, ecchymosis and impaired wound healing. Therefore, the development of any non-steroid drugs such as immunomodulatory drugs with minimized unfavorable effects have been expected to treat ACD. In this study, we have asked if any immunomodulatory drugs could have the potential to be used for the treatment of ACD.

The inflammatory responses to an allergen in ACD result in cascading events: the activation, differentiation and memory generation of antigen-specific T cells, the infiltration of inflammatory cells in the lesional skin by inflammatory cytokines and chemokines, and the disruption of epidermal structure and barrier functions. The impaired barrier of the epidermis could amplify the penetration of antigen. Since T cells play an essential role in the development of ACD, we evaluated several drugs whether each drug could have a potential to regulate functions of T cells. Consequently, we decided to focus on a Jak inhibitor in this study. The mice that received a Jak inhibitor on ACD showed milder skin symptoms, a lower number of T cells in the lesional skin and the skin-draining lymph nodes, a lower capability of inflammatory cytokine-productions in T cells, a lower number of neutrophils accumulated in the lesional skin than the control mice. In addition, differentiating T cells *in vitro* that were treated with a Jak inhibitor had lower levels of the extracellular acidification rate, the mTORC1 activity and the expression of genes that were related to glycolysis under the stimulation with recombinant IL-2. All the results suggested that a Jak inhibitor could be used for the treatment of ACD with a potential to down-regulate T cell-functions via interference of glycolysis.

1. 緒 言

職業性皮膚疾患の主たる原因であるアレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis; ACD) は、低分子の化学物質が、バリア機能の低下した皮膚へ断続的に接触することで発症する。その原因となる物質 (抗原) は、職業上限られた人のみが扱う特定の物質のみならず、社会生活で広く使用される医薬品・日用品・化粧品などに含まれるごく一般的な物質であることもある。すなわち、ACDは、社会生活を営む誰もが罹患しうる炎症性皮膚疾患である。ACDの治療にはステロイド外用薬が広く使用されてきた。しかし、ステロイド剤の長期間の使用には、皮膚の菲薄化や萎縮、紅斑、創傷治癒障害など、さまざまな副作用を伴うことから、非ステロイド剤の開発が切望されている。

ACDの発症は、バリア機能が低下した表皮に浸透した抗原が、皮膚常在型の樹状細胞に捕定されることにより始まる。抗原を分子情報化 (ペプチド化) した樹状細胞は、所属リンパ節へと移動し、その分子情報をT細胞へと提示する。抗原分子を認識したT細胞は活性化し、分化して、抗

原を特異的に排除するための機能を獲得する。機能型T細胞が惹起する一過性の炎症応答は、その後、時間とともに収束し、抗原の分子情報を記憶したメモリーT細胞が体内に待機する状態となる。再び同じ抗原が表皮に浸透した際、抗原の接触部位周辺の皮膚には、抗原の分子情報を記憶したメモリーT細胞や、T細胞に引き寄せられた炎症細胞が集積する^{1, 2)}。炎症局所のT細胞が分泌するタンパク質 (サイトカイン) は、表皮を構成するケラチノサイトの構造・機能を司るタンパク質の発現低下や表皮ケラチノサイト自体の自殺 (アポトーシス) を起こし、表皮バリアは脆弱なものとなる³⁾ (図1)。

以上のように、ACDの発症機構は基礎研究の進展とともに明らかになりつつあり、原理的には、掻痒を伴う皮膚症状は抗原への接触を取り除くことで制御することが可能であることがわかっている。しかし一方で、抗原と社会生活の密接さゆえに、ACDの背景には抗原への接触を回避することの難しさがあり、実際の病態管理では、積極的な医療の介入がしばしば必要となる。

健全な表皮では、最深の基底層にあるケラチノサイトの増殖、増殖した細胞の表層に向かう移動、バリア機能の獲得、細胞死が適切に調節されることにより、皮膚本来のバリア機能が担われているが、炎症が断続的に起こるACDの炎症局所では、表皮バリア機能の低下とメモリーT細胞の生体内での残存が『皮膚—免疫増幅サイクル』を生み出し、炎症が継続した場合には、構造的・機能的脆弱化を介して炎症が再燃・常態化しやすい微小環境が表皮で築かれ



Regulation of the pathogenesis of allergic dermatitis by the interference of amplification loop between skin and immune cells

Miyuki Omori-Miyake

Dept. of Infections and Host Defenses,
Ehime University Graduate School of
Medicine

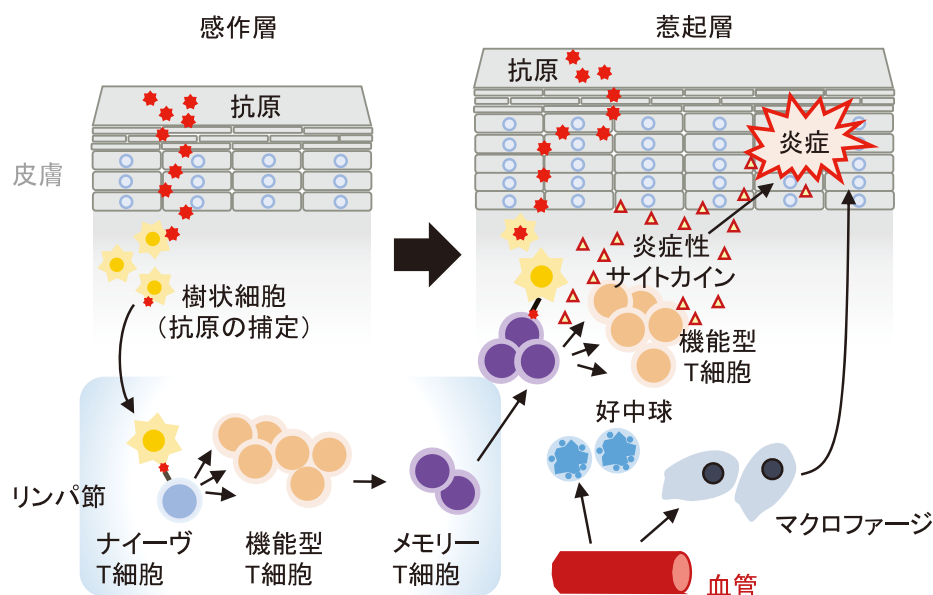


図1 ACDはT細胞を介して発症する

るものと考えられる。以上の背景から、本研究では、安全性が確認されている内服可能な既存薬剤に着目し、『皮膚—免疫増幅サイクル』の遮断を試みた。さらに、このサイクル遮断の分子機構の一端を解明することを通して、新たな仕組みを利用した病態制御の可能性を探ることを目指した。

2. 方法

2.1. ACDモデルマウスの作製と薬剤投与

実験動物には、C57BL/6 マウスを供した。ACDは、先行研究⁴⁾と同様に、麻酔したマウスの皮膚への低分子化合物 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) の反復塗布により、実験的に誘発した。実験群にはolive oil:acetone (1:3) で濃度を調整した0.15% DNFBを、対照群にはolive oil:acetone (1:3)を用いた。Day 0 (感作層)には剃毛した腹部皮膚へ100μLの溶液を塗布し、day 5, 10, 15 (惹起層)には剃毛した背部皮膚あるいは耳介皮膚へそれぞれ50μLあるいは25μL/片面を両面塗布した。惹起層に溶液を塗布する部位としては、リンパ節の解析の場合には背部皮膚、皮膚の解析の場合には耳介を用いた。

既存薬剤には、複数種の薬剤を検討した結果、慢性炎症性疾患で広く使用されているJak阻害剤を用いることとした。Jak阻害剤は、経口的(ジャカビ錠TM, ノバルティスファーマ)あるいは経皮的(コレクチム軟膏0.5%TM, 鳥居薬品)に投与した。投与量は、体重当たりの量がヒトと相当になるよう換算して用いた。皮膚の腫脹は、DNFB塗布前後の耳介厚を測定することにより、厚みの変化として評価した。

2.2. 組織学的解析

4% パラホルムアルデヒドで固定した耳介をパラフィン包埋した。薄切した切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡 (Keyence BZ-X800, キーエンス) にて形態観察した。

2.3. フローサイトメトリー

皮膚あるいはリンパ節から白血球を調整し、種々の蛍光標識モノクローナル抗体で多重染色した。細胞表面あるいは核内の分子発現を示す相対的蛍光輝度をフローサイトメーター (CytoFLEXTM, ベックマンコールター) でデータ化し、取得したデータを専用解析ソフト (FlowJoTM, 日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて解析して図表化・数値化した。白血球の各サブセットは、lineage marker (Lin) をCD3、CD19およびCD49bとして、好中球(CD45⁺ Lin⁻ TCRβ⁻ CD11b⁺ Ly6G⁺)、単球(CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE⁻ SSC-A^{lo} CD11b⁺ CD64⁺)、マクロファージ(CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE^{+/hi} CD11b^{int/hi} CD64⁺)、樹状細胞(CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE^{hi} CD11b^{int/hi} CD11c⁺ CD64⁻)、γδT細胞(CD45⁺ SSC-A^{lo} CD3⁺ γδTCR⁺)、CD4陽性T細胞(CD45⁺ SSC-A^{lo} γδTCR⁻ TCRβ⁺ CD4⁺)、CD8陽性T細胞(CD45⁺ SSC-A^{lo} γδTCR⁻ TCRβ⁺ CD8⁺)として定義し、同定した。細胞数は、各ゲートの存在頻度(%)と元々の細胞数から算出した。

2.4. ELISA

皮膚あるいはリンパ節から、細胞磁気分離装置 (Auto MACS, Miltenyi Biotec) を用いてCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞を純化し、抗T細胞受容体抗体の刺激

存在下で16時間培養した。培養上清を回収し、上清中に含まれるサイトカイン (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-13, GM-CSF) の濃度を、サンドウィッチELISA法により測定した。

2.5. 定量的RT-PCR

皮膚あるいはリンパ節から細胞時期分離装置を用いて純化したCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞を、抗T細胞受容体抗体の刺激存在下で4時間培養した。刺激した細胞を回収し、total RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを合成した。各遺伝子を実験的に検出できるプライマーおよびプローブを用いて、解糖系関連遺伝子 (*Slc2a1*, *Slc2a3*, *Hk2*, *Gapdh*, *Pgam1*, *Ldha*) の相対的発現量を測定した。内部標準とした *18S rRNA* の相対的発現量に対する比を取ることで、発現量を定量化した。

2.6. 代謝フラックス解析

細胞磁気分離装置を用いて純化したナイーブCD4陽性T細胞あるいはナイーブCD8陽性T細胞を、抗T細胞受容体抗体の刺激存在下で2日間、刺激を外してさらに2日間培養し機能型T細胞とした。その培養細胞を30分間Jak阻害剤で処置した後、リコンビナントIL-2の存在下で4時間刺激した。刺激した細胞を回収し、フラックスアナライザー (Seahorse Extracellular Flux Analyzer XFp, Agilent Technologies) を用いて、解糖活性 (細胞外酸性化速度) を測定した。

3. 結果

3.1. Jak阻害剤によるACD発症制御作用の評価

実験期間中Jak阻害剤を投与した実験群マウスと、水

を投与した対照群マウスでACDを発症させたところ、対照群に比べて、実験群では有意な腫脹の軽減が認められた。また、対照群の局所表皮では、ケラチノサイトの増殖像・肥大化、表皮の微小膿瘍が散見された。さらに局所真皮では、好中球・リンパ球・マクロファージ様の形態を持つ細胞の浸潤が実験群で多く見られた。一方、実験群では、これらの全ての病態が軽減されていた。

フローサイトメトリーを用いて、細胞表面抗原の発現でACDの局所皮膚に集積した細胞を同定し、Jak阻害剤を投与した実験群と対照群で比較したところ、実験群では、耳介に含まれる好中球およびCD8陽性T細胞の細胞数が対照群より有意に減少していた。また、皮膚所属リンパ節あたりのCD4陽性T細胞・CD8陽性T細胞の細胞数、CD4陽性T細胞で細胞あたりの炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-2, GM-CSF) 産生量が実験群で有意に減少していた。一方、CD8陽性T細胞では、細胞あたりの炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-2) 産生量はいずれも不変であった。

3.2. ACDの治療薬としてのJak阻害剤の可能性の検討

2020年6月、Jak阻害剤外用薬のアトピー性皮膚炎での使用が承認されたことを受け、Jak阻害剤外用薬をACD発症以降に経皮的に投与し、ワセリン投与した対照群マウスと、病態を比較した。その結果、DNFB塗布後の腫脹の有意な低下が認められた。また、炎症局所の組織観察では、真皮に一定の炎症細胞の浸潤を認めたものの、浮腫や表皮の膿瘍部位の減少など、病態の軽快傾向が認められた (図2)。

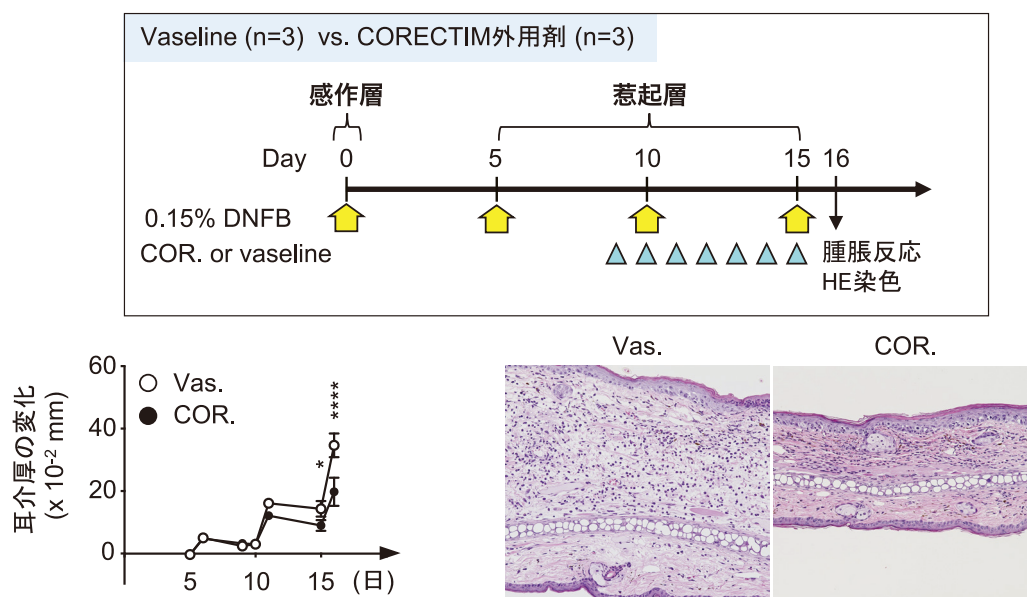


図2 Jak阻害剤外用薬のACD治療薬としての可能性

3. 3. T細胞代謝リモデリングにおける Jak 阻害剤の作用

ACDの発症はT細胞を介して起こり、なかでも、CD8陽性T細胞がACD実験モデルの主たるエフェクター細胞であるということが先行研究で報告されている⁵⁾。また、『T細胞の機能獲得・維持・記憶には代謝状態の変化(代謝リモデリング)が伴う』という現在のコンセンサスを受けて、T細胞の代謝リモデリングにおけるJak阻害剤の作用について*in vitro*培養系を用いて検討した。T細胞の機能獲得・維持・記憶には、糖、アミノ酸、脂肪酸など複数の代謝系の変化が伴うことが知られている。本研究では、T細胞の活性化・機能獲得に必須である解糖活性に着目して、Jak阻害剤の影響を検討した。その結果、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞に関わらず、Jak阻害剤処理した機能型T細胞では、IL-2刺激で上昇する解糖活性の低下が認められた。また、活性化T細胞で見られる解糖活性の上昇に伴うmTORC1の活性を、S6のリン酸化をリードアウトとして検討したところ、S6のリン酸化状態もJak阻害剤処理によりキャンセルされることがわかった。

さらにIL-2の刺激により活性化T細胞で増加する解糖関連遺伝子(*Slc2a1*, *Slc2a3*, *Hk2*, *Gapdh*, *Pgam1*, *Ldha*)の発現を解析したところ、検討した全ての遺伝子発現がJak阻害剤処理により低下していた。

4. 考察および総括

本研究では、ACDの発症が『皮膚—免疫増幅サイクル』の形成とともに起こり、このサイクルの維持が、皮膚炎症の悪化や遷延をもたらすと仮定し、『皮膚—免疫増幅サイクル』の遮断によるACDの病態制御の可能性を検証した。その結果、Jak阻害剤は、ACDの腫脹と表皮の肥厚を有意に抑えることを見出した。皮膚の炎症局所に集積した白血球を解析したところ、Jak阻害剤によるACDの皮膚病態の軽快と相関して、特に、CD8陽性T細胞および好中球の数が減少していることを見出した。皮膚常在型のメモリーCD8陽性T細胞は、DNFBを用いたACDモデルにおいて好中球をリクルートするという報告⁵⁾がある。この知見から、Jak阻害剤投与下のマウスで皮膚に浸潤したCD8陽性T細胞数の減少は、好中球数の低下と関連している可能性が推測された。また、炎症局所に集積したCD4陽性T細胞の数には変化がなかった一方で、リンパ節のCD4陽性T細胞の数はJak阻害剤投与下のマウスで有意に減少しており、マクロファージの炎症応答を促進するIFN- γ やGM-CSF、T細胞の増殖に関わるIL-2といったサイトカインの産生能も著しく低下していた。すなわち、Jak阻害剤の経口投与は、T細胞を介したACDの局所皮膚への炎症細胞の集積や、T細胞由来サイトカインの産生を抑制し、それらを介した表皮性状の変化に対しても、抑制的に作用

することが予想された。さらに、ACD発症後にJak阻害剤を経皮投与した場合でもACDの病態制御に一定の効果が認められたことから、ACDの局所皮膚へ浸潤した炎症細胞の機能制御にもJak阻害剤が作用する可能性が推測された。

最後に、近年研究が急速に進展しているT細胞の細胞内エネルギー代謝へのJak阻害剤の作用について検討した。抗原情報を認識したT細胞では、活性化に伴って解糖系代謝が活発になる⁶⁾。その活性は、抗原非依存的にエフェクター機能を発揮する場面でも見られる。ACDの発症にはT細胞が必須である⁷⁾ことから、T細胞内のエネルギー代謝にJak阻害剤が作用する可能性を想定し、検証した。想定したとおり、サイトカイン受容体シグナルにより活性化するmTORC1のリン酸化や解糖関連遺伝子の発現は、Jak阻害剤により抑えられ、解糖活性自体も低下していた。我々の研究グループの先行研究では、T細胞の解糖能の欠損は、機能分化を阻害することが示されている⁸⁾。Jak阻害剤の存在は、T細胞の解糖系代謝を阻害することにより、炎症応答を制御できる可能性が示唆された。

本研究では、Jak阻害剤のT細胞代謝の制御を介したACDの病態制御について明らかにした。しかしJak阻害剤は、T細胞以外の免疫細胞や皮膚の非血球系細胞にも作用する。ACDの治療薬としてJak阻害剤の内服や外用を考えるには、これらの細胞における作用も明らかにする必要があると考える。今後の基礎研究の進展に期待したい。

本研究により得られた成果

Michiko Okamoto*, Miyuki Omori-Miyake*, Makoto Kuwahara, Masataka Okabe, Mariko Eguchi, Masakatsu Yamashita: The inhibition of glycolysis in T cells by a Jak inhibitor ameliorates the pathogenesis of allergic contact dermatitis in mice. *J. Invest. Dermatol.* (in press).
*共同第一著者

(引用文献)

- 1) T. Honda, G. Egawa, S. Grabbe, K. Kabashima: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 303-315 (2013).
- 2) A. K. Brys, L. G. Rodriguez-Homs, J. Suwanpradid, A. R. Atwater, A. S. MacLeod: Shifting paradigms in allergic contact dermatitis: The role of innate immunity. *J. Invest. Dermatol.* 140, 21-28 (2020).
- 3) 大森深雪: アトピー性皮膚炎の表皮における構造の質的变化. *日本皮膚アレルギー学会雑誌*. 1, 35-45 (2018).
- 4) T. Inoue, M. Omori-Miyake, S. Maruyama, M. Okabe,

- M. Kuwahara, H. Honda, H. Miura, M. Yamashita: The loss of H3K27 histone demethylase Utx in T cells aggravates allergic contact dermatitis. *J. Immunol.* 207, 2223-34 (2021).
- 5) A. B. Funch, V. Mraz, A. Ø. Gadsbøll, M. H. Jee, J. F. Weber, N. Ødum, A. Woetmann, J. D. Johansen, C. Geisler, C. M. Bonefeld: CD8⁺ tissue-resident memory T cells recruit neutrophils that are essential for flare-ups in contact dermatitis. *Allergy*. 77, 513-524 (2022).
- 6) G. O. Rangel Rivera, H. M. Knochelmann, C. J. Dwyer, A. S. Smith, M. M. Wyatt, A. M. Rivera-Reyes, J. E. Thaxton, Chrystal M. Paulos: Fundamentals of T cell metabolism and strategies to enhance cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 12, 645242 (2021).
- 7) B. L. Gocinski, R.E. Tigelaar: Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121-4128 (1990).
- 8) K. Toriyama, M. Kuwahara, H. Kondoh, T. Mikawa, N. Takemori, A. Konishi, T. Yorozya, T. Yamada, T. Soga, A. Shiraishi, M. Yamashita: T cell-specific deletion of *Pgam1* reveals a critical role for glycolysis in T cell responses. *Commun. Biol.* 3, 394 (2020).