

かゆみを引き起こす pathogenic code の同定と治療基盤の開発

かずさDNA研究所オミックス医学研究室

遠藤 裕介

Atopic dermatitis is thought to affect more than one million people in Japan. In particular, 80% of patients are under the age of 44 in the active stage of the disease, and it is a serious problem that chronically impairs quality of life. In clinical practice, in addition to existing immunosuppressive agents including steroids and other drugs, anti-IL-4/IL-13 receptor antibodies are used as biological agents for treatment. However, a major problem with these current treatments is the long-term administration of expensive antibody preparations increases the burden on the medical economy itself. In addition, existing treatments only suppress symptoms and do not prevent or cure the disease.

On the other hand, recent advances in science and technology have made it possible to perform trans-omics analysis, in which RNA, proteins, and metabolites are comprehensively analyzed and their parameters are linked to each other. These tools can be very powerful to capture events occurring at the molecular level in disease lesions and identify new therapeutic targets. However, due to the complexity of the system and experimental limitations, trans-omics analysis using immune cells is still lagging behind, and there is a strong requirement for such efforts in terms of therapeutic applications. Against this background, the applicant was the first to construct a system that combines RNA-seq and proteome analysis using the same samples and combines each parameter. Furthermore, we have identified pathogenic Th2 cells (Tpath2) that cause allergic disease. In addition to these achievements, we have recently identified cutaneous T cells that specifically produce IL-3 and IL-31. Therefore, we have conceived this research proposal to identify pathogenic codes that cause atopic dermatitis and itch and to develop new therapeutic targets and platforms by utilizing the applicant's trans-omics analysis system and CRISPR tools that can be applied *in vivo* to cutaneous T cells.

1. 緒言

アトピー性皮膚炎患者は本邦では百万人以上にも及ぶと考えられている。特に44歳以下の活動期での患者割合が80%を占め、QOLを慢性的に損ねる深刻な問題となっている。臨床の現場ではステロイドを含む既存の免疫抑制剤などに加え、生物学的製剤として、抗IL-4/IL-13受容体抗体が治療として使用されている。しかし、このような現状の治療は、副作用リスクに加え、高額な抗体製剤の長期間の投与という医療経済そのものへの負担増を招くことが大きな問題である。また、既存の治療はあくまで症状を抑制するに留まり、疾患の予防や治癒を達成するものではない。

一方、近年の科学技術の進歩により、RNA・タンパク・代謝物を網羅的に分析し、相互にパラメーターをリンクさせるトランスオミクス解析が可能となってきた。これらのツールは、疾患の病変部で起きている事象を分子レベルで捉え新たな治療標的を同定するための非常に強力な武器となり得る。しかし、解析システムの複雑さや実験的制約から免疫細胞を用いたトランスオミクス解析は依然として遅

れており、治療応用の観点からもその取り組みが強く求められている。このような背景の下、申請者は同一サンプルを用いてRNA-seq・プロテオーム解析を行い、各パラメーターをコンバインするシステムをいちやく構築した¹⁾。また、これまでにアレルギー疾患を引き起こす病原性Th2細胞(Tpath2)を同定し、免疫-アレルギー研究を世界的にリードしている²⁻⁴⁾。これらの実績に加え、最近我々はIL-3やIL-31を特異的に産生する皮膚T細胞を同定している。そこで、皮膚T細胞について、申請者が有するトランスオミクス解析システムや*in vivo*でも適用可能なCRISPRツールを活用し、アトピー性皮膚炎やかゆみを引き起こすpathogenic codeを同定し、新たな治療標的・治療基盤を開発する本研究案を着想した。本研究ではアトピー性皮膚炎の経時的な病態シークエンスについて、皮膚に浸潤している免疫細胞のRNA・タンパクのトランスオミクス解析を行い、病態を制御するpathogenic codeの候補因子を抽出することを第一目標とする。特に、皮膚炎症を引き起こすIL-3やIL-33、およびかゆみを引き起こすIL-31をクラスタリング解析の指標とする。また、最近我々は脂質代謝がアレルギー炎症病態を増悪化させる病原性T細胞の誘導⁵⁾に深く関与していることを発見しているため、脂質の関与についてはリポドミクス解析を用いて検証する。抽出された因子については、生体内CRISPRツールを用いてさらに絞り込む。最終的に、同定されたpathogenic codeに対する分子標的薬や関連ノックアウトマウスを用いることで、アトピー性皮膚炎の治療への有効性を評価する。



Identification of pathogenic code causing itch and development of therapeutic basis

Yusuke Endo

Laboratory of Medical Omics Research,
Kazusa DNA Research Institute

2. 方法

アトピー性皮膚炎の炎症早期から病態収束に到る経時的な免疫応答シークエンスについて、疾患を引き起こす Tpath2 細胞および病態を抑制する免疫制御細胞の RNA・タンパク・代謝物のトランスオミックス解析を行い、病態を制御する pathogenic code の同定を目指し研究を推進した。また、*in vitro*、*in vivo* の解析から pathogenic code をコントロールし、新規アレルギー分子標的としての有効性について検証を進めた。

アトピー性皮膚炎については、ビタミン D3 誘導体 MC903 を用いて再現性よく病態が誘導される。このマウスモデルを用いて、病態進行に伴う Tpath2 サブセットのキネティクスについてはじめに検討を行った。また、その際の一連の病態スコア、組織病理像についても解析を行った。さらに、Tpath2 サブセットがもっとも機能的であるタイミングを中心に組織や Tpath2 サブセットを回収し、RNA・タンパク・代謝物を高精度に測定できるオミックス解析を行った。病態スコアや組織病理像との相関解析を行い、各病態における pathogenic code の同定を目指して研究を推進した。

3. 結果

3.1. イムノオミックス解析によるアトピー性皮膚炎病態を誘導する pathogenic code の同定

これまでの研究から、アトピー性皮膚炎の重症化には、アレルゲンを記憶し、かゆみや炎症を誘導する病原性記憶 T 細胞が関わるということがわかっている。中でも 2 型の病原性記憶 T 細胞が、炎症を起こした組織で増えており、これが IL-3 や IL-31 といったサイトカインを放出して、炎症性白血球である好塩基球が組織に浸潤するのを誘導する。2 型病原性記憶 T 細胞 Tpath2 による顆粒球の誘導は、喘息など他の慢性アレルギー疾患でもみられることがわかっている^{6,7)}。そこで本研究ではアトピー病態進行に伴う Tpath2 サブセットのキネティクスについてはじめに検討を行った。

炎症皮膚病変に浸潤する細胞を単離して、フローサイトメトリー解析を行い、各種免疫細胞について調べたところ、炎症誘導の早期 (Early) と比較して、慢性期 (Late) の方がより多くの炎症細胞が浸潤していることが示された。特に、 $CD4^+CD44^+$ の活性化 T 細胞が顕著に Late phase で増加していることを見出している。また、その際のサイトカイン産生についても同様にフローサイトメトリーを用いて解析したところ、 $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞は炎症が悪化するに従い増加することが認められた (図 1 上段)。その他にも、IL-5 などの Th2 サイトカインも病態がより悪化した Late phase において多く産生されていることを確認

している。

次に、これらの病態タイムコースサンプルを用いて、トランスオミックス解析を行った。各フェーズにおいて、T 細胞サブセットを回収し、RNA-seq/プロテオーム解析を実施した。解析データについては、これまでの研究で得られている統合解析手法を用いてそれぞれのデータをコンバインして解析を行った。得られたデータセットについては未処置のコントロール群をサブトラクトする形式で各因子やパスウェイを抽出した。Gene Ontology 解析で特定のパスウェイの濃縮が認められるか検討したところ、Tpath2 サブセットがより多く認められた Late phase において、サイトカインシグナルやサイトカイン受容体に加え、脂質代謝や糖タンパクといった経路が上昇していることが認められた (図 1 下段 左)。これらについてより詳細に検証するべく Gene Set Enrichment 解析 (GSEA) を行ったところ、脂質代謝経路の中でも特に脂肪酸代謝に関わる因子が Late phase でより多く集積していることがわかった (図 1 下段 右)。実際に、定量的 PCR を用いて、脂肪酸代謝に関わる遺伝・酵素の発現を解析したところ、今回解析した脂肪酸代謝やステロール代謝に重要な全ての因子がコントロール-Early-Late と進行するに従い、発現の亢進が認められた (図 1 下段 右)。

3.2. 皮膚病原性 T 細胞における脂肪酸代謝の重要性検証

次に、上記の結果を受けて脂質代謝や脂肪酸代謝が皮膚のかゆみや炎症を誘導する T 細胞の機能分化に重要な役割を果たしているのではないかと考え、その影響について検証を行った。はじめに *in vitro* で炎症皮膚病変の Late phase で浸潤してくるような $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞の誘導条件について検討を行った。いくつかのサイトカイン条件 (Th0/Th1/Th2/Th9/Th17)、およびタイムコースを追って検討をしたところ Th2 細胞分化条件 (IL-2/IL-4/anti-IFN γ) で通常の培養期間よりも長く培養した条件でより多くの $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞を得ることができた。

次にこの分化条件において、脂質代謝酵素 X および脂質トランスポーター Y を用いた $CD4^+$ T 細胞や脂質フリーの培養下で $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞の分化誘導能を検証した。脂質代謝酵素 X 欠損細胞では IL-3 は 1/5 程度に、IL-31 は 1/2 程度に、IL-13 は 2/3 程度にそれぞれ低下することが示された。また、脂質トランスポーター Y 欠損細胞では、IL-3 は 1/3 程度に、IL-31 は 1/3 程度に、IL-13 は 1/2 程度にそれぞれ低下することが示された。さらに、脂質フリーの培養条件下では、IL-3 は 1/10 程度に、IL-31 は 1/5 程度に、IL-13 は 1/2 程度にそれぞれ低下することが示された。これらの結果は、 $IL-3_{IL-31/IL-13}$

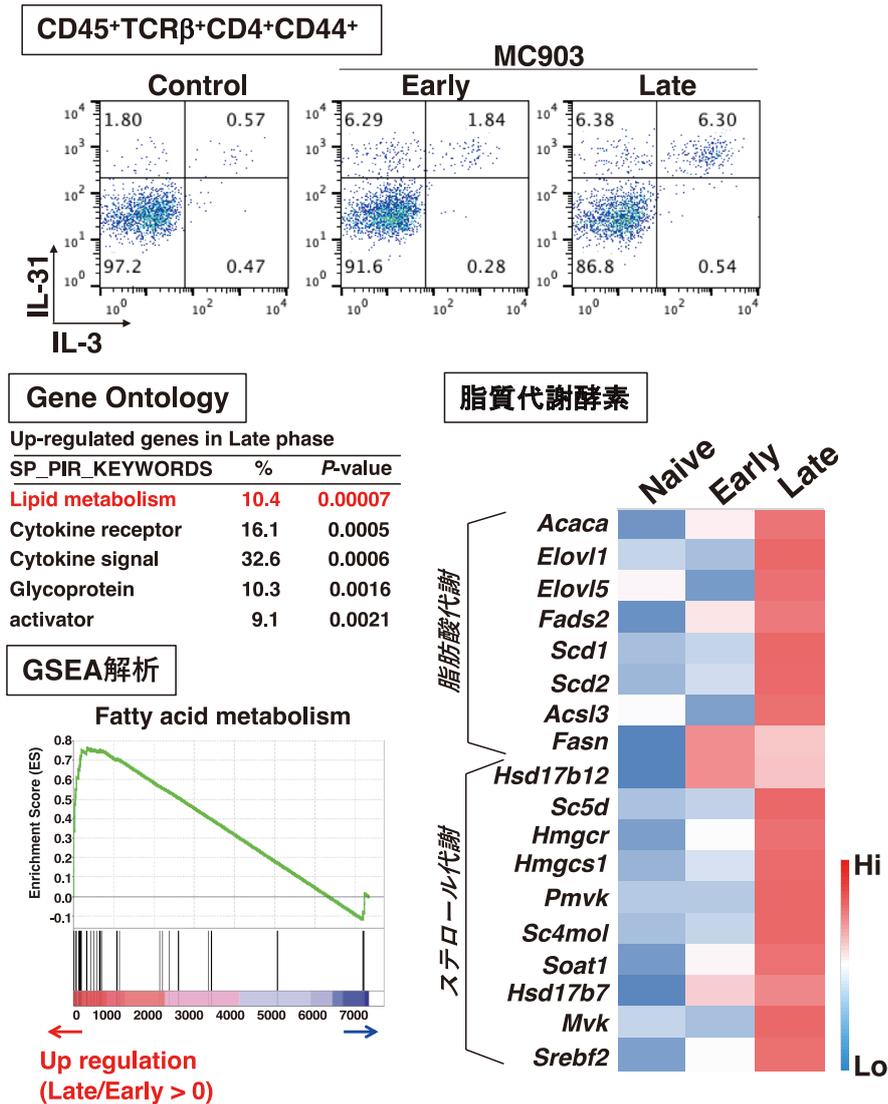


図1 炎症皮膚病変に浸潤する病原性 Th2 細胞のマルチオミクス解析

を共産生する皮膚病原性 T 細胞は細胞内と細胞外の脂質代謝に非常に強く依存していることを示唆している (図2)。

4. 考察および総括

本研究は、アトピーの炎症早期から病態重症化に到る経時的な免疫応答シーケンスについて、疾患を引き起こす病原性 Th2 細胞 T_{path2} の RNA・タンパクのトランスオミクス解析を行い、病態を制御する pathogenic code の同定を目指し研究を推進した。その成果として、免疫細胞の脂質代謝がこれらの細胞集団やアレルギー病態に極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。現状ではいったいどの特性を持った脂質が皮膚 T_{path2} 細胞の誘導に必須であるかは不明なため、今後高精度リピドミクス解析を駆使することで明らかにしたい。また、これらの脂質代謝経路を標的とすることで、これまで有効な治療法が見つかっていないアレルギー疾患に対して、従来とは異なる革新

的な治療法開発につながると考えている。事実、これまでのアレルギー疾患に対する治療法は、主に免疫応答を広範に制御するステロイド・免疫抑制剤に関するものが中心で、疾患を誘導する細胞だけにアプローチすることは難しいと考えられてきた。しかし、最新の知見によって、脂質合成の亢進と T 細胞の病原性がリンクすることが示唆されており、病原性 T 細胞集団の脂質代謝を標的として病態を制御できる可能性が見えてきている。こうした研究により疾患の原因となる細胞を標的とすることは、副反応を極力抑えつつより効果の高い治療へとつながる非常に意義深い課題であると考えている。今後、免疫細胞自身の *De novo* 脂質代謝の作用と、生体環境から免疫細胞へと働きかける脂質代謝物の生理作用を双方向から精査していくことが疾患治療を評価する上で重要であると考えている。どの代謝物、どの代謝経路を制御すれば、より効率的に疾患治療へと応用できるのか、疾患ごとの代謝物・免疫細胞のリンクについて

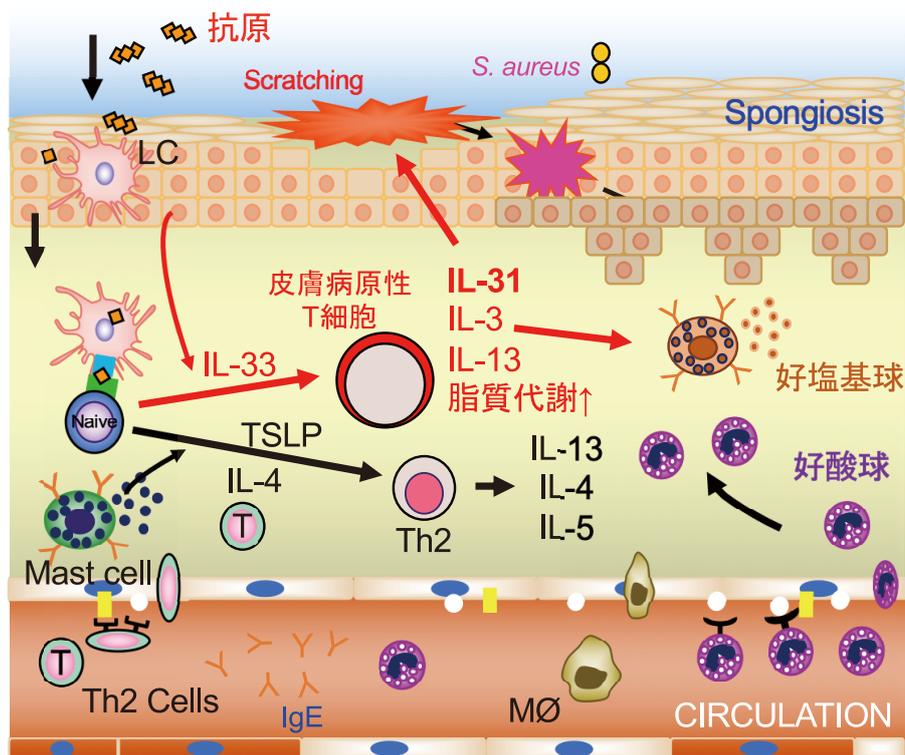


図2 アトピー性皮膚炎における病原性 Th2 細胞と脂質代謝

研究を進め、「代謝で免疫を制御する」ことを目指していきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りましたコーセーコスメトロジー研究財団に心より深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kanno T., Nakajima T., Kawashima Y., Yokoyama S., Asou HK., Sasamoto S., Hayashizaki K., Kinjo Y., Ohara O., Nakayama T., and Endo Y.* Acsbg1 dependent mitochondrial fitness is a metabolic checkpoint for tissue T_{reg} cell homeostasis. *Cell Rep.* 37 (6):109921 (2021).
- 2) Endo Y, Iwamura C, Kuwahara M, Suzuki A, Sugaya K, Tumes DJ, Tokoyoda K, Hosokawa H, Yamashita M, and Nakayama T. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity.* 35:733-745 (2011).
- 3) Endo Y, Hirahara K, Inuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, and Nakayama T. The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 42:294-308 (2015).
- 4) Yamamoto T, Endo Y, Onodera A, Hirahara K, Asou HK, Nakajima T, Kanno T, Ouchi Y, Uematsu S, Nishimasu H, Nureki O, Damon DJ, Shimojo N, and Nakayama T. DUSP10 constrains innate IL-33-mediated cytokine production in ST2hi memory-type pathogenic Th2 cells. *Nat. Commun.* 9:4231 (2018).
- 5) Nakajima T., Kanno T., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou HK., Damon J. T., Ohara O., Nakayama T., and Endo Y.* ACC1-expressing pathogenic T helper 2 cell populations facilitate lung and skin inflammation. *J. Exp. Med.* 218 (12): e20210639 (2021).
- 6) Endo Y, Hirahara K, Yagi R, Tumes DJ, and Nakayama T. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol.* 35: 69-78 (2014).
- 7) Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, Tumes DJ, Okamoto Y. Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol.* 35: 53-84 (2017).