

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16034

研究課題名(和文)末梢血TCRV $\gamma$ 1+ T細胞のCD107a発現に着目した円形脱毛症の病態解明

研究課題名(英文)A role of CD107a on TCRVdelta1+gammadelta T cells in the pathogenesis of alopecia areata

研究代表者

内田 洋平(Uchida, Youhei)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：30571856

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 円形脱毛症はT細胞を介した自己免疫疾患である。本研究では、重症例でヒト末梢血PD1-CD107a $\gamma$ 1+ T細胞が増加することや、治療前で血清substance P(ストレス関連神経性ペプチド)が高く、治療で低下することを示した。In vitroで、substance PはV $\gamma$ 1 T細胞のCD107a(活性化・脱顆粒マーカー、E-selectinリガンド)発現とIFN- $\gamma$ 産生を誘導したが、granzyme B産生は誘導しなかった。これらの成果は、自己反応性の末梢血V $\gamma$ 1 T細胞は、substance Pによる特異的活性化・IFN- $\gamma$ 産生や遊走を介した毛包障害により脱毛形成に関わる可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この成果は、これまでストレスとの関連が指摘されていた円形脱毛症において、神経ペプチドであるsubstance Pに対するV $\gamma$ 1 T細胞の反応性の解析により、V $\gamma$ 1 T細胞におけるCD107a発現のバイオマーカーとしての役割やIFN- $\gamma$ 産生増強や遊走を介した脱毛症の発症機序の解明、既存の治療薬を含めた将来的な円形脱毛症の治療法の確立につながる可能性を示す重要なものである。

研究成果の概要(英文): Alopecia areata (AA) is a T cell-mediated autoimmune disease. In this study, increased number of human peripheral blood PD1-CD107a $\gamma$ 1+ T cells was found in severe type of AA. Higher level of serum substance P was determined by ELISA assay in untreated AA patients than healthy subjects. Psychosocial stress has been reported to play a role of AA onset. Substance P is a stress-associated neuropeptide. The level of serum substance P was reduced after treatment. In vitro, substance P induced the increased expression of CD107a and IFN- $\gamma$  but not granzyme B in V $\gamma$ 1 T cells. CD107a is not only a marker for cell-activation and degranulation of cytotoxic molecule but also a ligand for E-selectin, endothelial-leukocyte adhesion molecule. These findings suggest that substance P might contribute to AA pathogenesis through T-cell activation, IFN- $\gamma$  production and migration capability to the skin in peripheral blood V $\gamma$ 1 T cells.

研究分野：皮膚免疫、脱毛症

キーワード：V $\gamma$ 1 T細胞 円形脱毛症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症は毛包の immune privilege の破綻により生じた自己免疫疾患と考えられ、正常の毛包は免疫細胞に対する抗原提示能の抑制 (MHC class I の低発現、Ito T, *et al.* 2004)、免疫抑制分子の発現 (CD200 の発現)、自己反応性の T 細胞のアポトーシス誘導 (PD-L1 の発現) などにより毛包を炎症細胞から守る immune privilege を形成するとされている。円形脱毛症の病変部毛包内・周囲では NKG2D<sup>+</sup>T 細胞 (CD8T 細胞、NK 細胞や NKT 細胞) が浸潤しており、これらの自己反応性 T 細胞が円形脱毛症の " 局所の病態形成 " において重要な役割を持つとして注目されているが (Gilhar A *et al.* 2012)、脱毛が " 全身に拡大する機序 " の解明には至っていない。CD107a (別名: LAMP- 1, lysosome-associated membrane protein 1) は細胞内のリソソーム膜上に存在し、標的細胞に対して T 細胞 (Uchida Y *et al.* 2011) や CD8T 細胞 (Huang RY *et al.* 2015) などがパーフォリンやグランザイム B などのリソソーム酵素を放出する際に細胞膜表面に発現する。研究代表者等は、NKG2D<sup>+</sup>TCRV 1<sup>+</sup> T 細胞 (V 1T 細胞) の病変部毛包内・周囲への増加と、脱毛症患者の末梢血液中の V 1T 細胞が CD107a を過剰発現していることから、患者血液中の異常 T 細胞が脱毛の全身への拡大に関与する可能性に着目している。本研究では、円形脱毛症における V 1T 細胞の特異的活性化と CD107a 過剰発現の機序を明らかにする。これらが解明されれば、円形脱毛症の新たな病態メカニズムの構築、病勢・治療評価と T 細胞をターゲットにした新規治療法の開発につながると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、円形脱毛症における V 1T 細胞活性化と CD107a の発現異常をきたす機序を見出し、V 1T 細胞が脱毛の全身への拡大に関与する可能性を探るものである。

次の 3 つの疑問の解決に取り組む。重症度からみた V 1T 細胞の表面マーカーの特異性、円形脱毛症における血清 substance P の特異性、円形脱毛症における CD107a<sup>+</sup>V 1T 細胞機能への substance P の特異性。

### 3. 研究の方法

申請者らは、円形脱毛症における V 1T 細胞の特異的な活性化機序を明らかにするために、治療前後の比較、各種採血データの比較、健常者の V 1T 細胞との比較、各種刺激因子に対する反応性の解析を計画した。本研究は、鹿児島大学臨床研究倫理委員会の承認を得ており (承認番号:28-208)、十分に関係法令に配慮して行われた。

#### (1). 血液採取

円形脱毛症 (N=7) の患者と健常者 (N=5) の末梢血から比重遠心法で末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析に用いる。また、治療前後 (N=7) の血清を分離し、ELISA による解析に用いる。

#### (2). 末梢血 CD107a<sup>+</sup>V 1T 細胞の細胞内・表面マーカーの解析

診断時の採血で分離した末梢血単核球細胞を用いて、フローサイトメトリーで CD3<sup>+</sup>TCRV 1<sup>+</sup>細胞 (V 1T 細胞) における活性化マーカー (CD25, CD69)、活性化・脱顆粒のマーカー (CD107a)、ケモカインレセプター (CXCR3 および CXCR4) そして、転写因子 (Foxp3 や ROR  $\gamma$ ) の発現について解析する。また、毛包に発現する (immune privilege の形成に重要な) 抑制性分子 CD200 と PD-L1 (Gilhar A *et al.* 2012; Wang X *et al.* 2014) の V 1T 細胞における受容体 (CD200R と PD-1) の発現を解析し、円形脱毛症における V 1T 細胞の抑制機構に異常がみられるかどうかを検討する。さらに、これらの発現パターンと重症度 (頭部外病変の有無) との関連性について解析する。

#### (3). 血清 substance P の解析

円形脱毛症と精神的ストレスとの関連が指摘されてきた。Substance P はストレス関連神経性ペプチドであり、substance P が、円形脱毛症の病態に関与するとして報告がある (Siebenhaar *et al.*, 2007)。研究代表らが、*in vitro* で、健常者の末梢血単核球細胞を用いた各種刺激による刺激実験を行った結果 (N=3)、substance P による刺激が上述した円形脱毛症患者でみられた T 細胞の表現型 (CD107a の発現増強) を再現した。そこで、治療前後の採血で分離した各血清を用いて、円形脱毛症で substance P の増加が見られるかどうか ELISA 法で解析する。

#### (4). 末梢血 T 細胞の substance P に対する反応性の比較

Substance P の存在下における V 1T 細胞の表面分子の発現パターンを解析し、CD107a の役割や円形脱毛症の病態に関与する可能性を検討する。

#### 4 . 研究成果

これまでの研究で、円形脱毛症の患者において、末梢血 V $\beta$ 1T 細胞は健常者と比較して、CD107a の発現増強のほか、PD-1 の発現減弱が認められた。これらの結果から、V $\beta$ 1T 細胞は病変部の毛包周囲だけではなく、末梢血液中においても V $\beta$ 1T 細胞特異的に活性化し、自己反応性が増大している可能性が示唆された。また、円形脱毛症の治療後に、V $\beta$ 1T 細胞における CD107a の発現は健常者のレベルまで発現が減弱していたが、PD-1 の発現減弱は持続していた。そこで、円形脱毛症の重症度を頭部外病変あり (N=3) なし (N=4) の 2 群に分け、V $\beta$ 1T 細胞における各発現について解析したところ、頭部外病変のある群において、CD107a は発現増強 ( $p=0.0329$ ) と PD-1 の発現減弱 ( $p=0.0382$ ) を認めた。

次に、円形脱毛症の治療前の採血で分離した各血清を用いて、substance P の増加が見られるかどうか ELISA 法で解析し、治療後と比較した。円形脱毛症の血清で、治療前の substance P 値の上昇 ( $48.64 \pm 15.12$  pg/ml) と治療後の低下 ( $36.30 \pm 10.98$  pg/ml) (平均  $\pm$  SD,  $p=0.0256$ ) を認めた。また、末梢血 V $\beta$ 1T 細胞は NK1R (substance P 受容体) を発現していた。

*In vitro* で、健常者の末梢血単核球細胞を用いて末梢血 V $\beta$ 1T 細胞の substance P に対する反応性の比較の結果、substance P は V $\beta$ 1T 細胞の CD107a (活性化・脱顆粒マーカー、E-selectin リガンド) 発現と IFN- $\gamma$  産生を誘導したが、granzyme B 産生は誘導しなかった。

これらの成果は、自己反応性の末梢血 V $\beta$ 1T 細胞は、substance P による特異的活性化・IFN- $\gamma$  産生や遊走を介した毛包障害により脱毛形成に関わる可能性を示し、CD107a 発現のバイオマーカーとした病勢評価や substance P をターゲットとしての既存の治療薬を含めた将来的な円形脱毛症の治療法の確立につながる重要なものである。

#### < 引用文献 >

Ito T, et al. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am J Pathol.* 2004;164(2):623-34. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63151-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63151-3)

Gilhar, A., A. Etzioni, and R. Paus. 2012. Alopecia areata. *The New England journal of medicine* 366:1515-1525. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1103442>

Wang, X., A.K. Marr, T. Breitkopf, G. Leung, J. Hao, E. Wang, N. Kwong, N. Akhoundsadegh, L. Chen, A. Mui, N. Carr, G.L. Warnock, J. Shapiro, and K.J. McElwee. 2014. Hair follicle mesenchyme-associated PD-L1 regulates T-cell activation induced apoptosis: a potential mechanism of immune privilege. *The Journal of investigative dermatology* 134:736-745. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.368>

Uchida Y, et al. Role for E-cadherin as an inhibitory receptor on epidermal  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol.* 2011;186(12):6945-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003853>.

Huang RY, et al. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. *Oncotarget.* 2015;6(29):27359-77 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4751>.

Siebenhaar, F., A.A. Sharov, E.M. Peters, T.Y. Sharova, W. Syska, A.N. Mardaryev, P. Freyschmidt-Paul, J.P. Sundberg, M. Maurer, and V.A. Botchkarev. 2007. Substance P as an immunomodulatory neuropeptide in a mouse model for autoimmune hair loss (alopecia areata). *The Journal of investigative dermatology* 127:1489-1497. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700704>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arimura Akiko, Fujii Kazuyasu, Uchida Youhei, Higashi Yuko, Arima Naosuke, Yoshimitsu Makoto, Ishitsuka Kenji, Kanekura Takuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Septic vasculitis induces cutaneous involvement of adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International 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/ijd.14860	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 -
1. 著者名 Inatsu Eri, Fujii Kazuyasu, Hatanaka Miho, Okubo Aoi, Uchida Youhei, Higashi Yuko, Hiraki Tsubasa, Tanimoto Akihideo, Kanekura Takuro	4. 巻 47
2. 論文標題 Epstein-Barr virus positive mucocutaneous ulcer in a patient with untreated chronic lymphocytic leukemia and hypogammaglobulinemia	5. 発行年 2020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) 10.1111/1346-8138.15304	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 -
1. 著者名 Gherardini Jennifer, Uchida Youhei, Hardman Jonathan A., Ch?ret J?r?my, Mace Kimberly, Bertolini Marta, Paus Ralf	4. 巻 15
2. 論文標題 Tissue-resident macrophages can be generated de novo in adult human skin from resident progenitor cells during substance P-mediated neurogenic inflammation ex vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida Youhei, Okubo Aoi, Hayashida Maiko, Inoue Hirosaka, Tamura Hiroko, Fujii Kazuyasu, Ishitsuka Kenji, Kanekura Takuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Type D lymphomatoid papulosis associated with chemotherapy/chemoradiotherapy induced severe chronic lymphocytopenia	5. 発行年 2019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) 10.1111/1346-8138.15019	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 -

1. 著者名 Fujii Kazuyasu, Uchida Youhei, Hatanaka Miho, Jimura Nozomi, Okubo Aoi, Sakanoue Masanao, Higashi Yuko, Kawabata Hisashi, Kanekura Takuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Numbers of forkhead box P3 positive cells and programmed cell death 1 positive cells were associated with spontaneous regression in a patient with primary cutaneous diffuse large B cell lymphoma with multiple lesions	5. 発行年 2019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) 10.1111/1346-8138.14948	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 -

1. 著者名 内田洋平、金蔵拓郎	4. 巻 2(2)
2. 論文標題 円形脱毛症の免疫学的機序	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本皮膚免疫アレルギー学会雑誌	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 内田洋平、金蔵拓郎	4. 巻 804
2. 論文標題 円形脱毛症の病態形成における T細胞の役割と、新規治療ターゲットとしての可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 鹿児島県医師会報	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 1件)

1. 発表者名 Uchida Y, Kanekura T.
2. 発表標題 Orchestrated cytotoxic and skin migratory ability lacking self-tolerance: circulating T-cells may promote alopecia areata.
3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田洋平、金蔵拓郎
2. 発表標題 円形脱毛症における抹消血 T細胞の解析
3. 学会等名 第32回日本ひび免疫アレルギー学会総会学術大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----