様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号：３２６１０
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１６０３９

研究課題名（和文）免疫学的特権破綻の観点からみた汗腺を標的とする自己免疫性疾患の病態解明

研究課題名（英文）Digital immunohistological analyses of immune privilege collapse in syringotropic autoimmune diseases

研究代表者
下田　由莉江（Shimoda, Yurie）

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：５０７７４２０４

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）：本研究では、ヒト皮膚組織を用いた免疫組織学的手法及び画像解析を組み合わせることにより、汗腺・汗管において、自己の免疫応答から保護されている状態、すなわち免疫学的特権が存在する可能性を見いだした。正常組織と汗腺を標的とする自己免疫性疾患における免疫特権関連分子の発現の比較とヒト皮膚器官培養により、汗腺・汗管における免疫学的特権の破綻が、汗腺向性の炎症性変化に関与する可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
汗腺を標的とする自己免疫性疾患の患者は、発汗障害による症状のため日常生活に支障を生じる場合がある。しかし、その病態は明らかではなく、確立した治療方法もないため、その病態解明は学術的、社会的に重要である。本研究は従来注目されていなかった免疫学的特権という観点から向汗腺性自己免疫応答の病態に迫った。本研究で得られた知見は、向汗腺性自己免疫性疾患の病態解明及び、治療開発の技術的基盤の一助になると考えた。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of syringotropic autoimmune diseases remains elusive. In this study, the distribution of immune privilege (IP)-related molecules within sweat glands (SwG) in healthy and affected individuals were investigated by a quantitative immunohistochemical approach adopting digital image analysis. In the normal SwG, MHC class I expression was decreased, while macrophage migration inhibitory factor (MIF) and α melanocytic stimulating hormone (αMSH) was up-regulated in SwG. In Sjogren syndrome (SjS), lupus erythematosus (LE) and scleroderma (Scl), differential expression of these molecules were noted in SwG. CD200 expression decreased in atrophic stage of Scl. In human skin organ culture, intratissue injection of INF-γ, up-regulated MHC class I besides down-regulating MIF and αMSH. These findings demonstrated dysregulated expression patterns of individual IP-related molecules may account for their distinct inflammatory changes in syringotropic autoimmune disorders.

研究分野：皮膚科学

キーワード：自己免疫性疾患　汗腺　免疫学的特権　画像解析　免疫組織化学

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

（１）汗腺を標的とする自己免疫性疾患の病態解明の必要性

シェーグレン症候群(SjS)、エリテマトーデス(LE)、特発性後天性全身性無汗症(AIGA)などの自己免疫性疾患では、炎症が高度になると機能障害を生じ患者は高熱から日常生活を送れなくなることもある。このような疾患では、汗腺・汗管周囲性の炎症細胞浸潤が病理組織学的特徴であるが、なぜ汗腺・汗管を標的とした自己免疫応答が生じるのか、その機序はほとんど解明されておらず、治療の観点からもその病態の解明は重要である。

（２）毛包における免疫組織学的特権の概念の汗腺への応用

汗腺と同じ皮膚付属器である毛包では、毛球部で MHC class I などの自己抗原の発現が低下し、さらに免疫抑制分子である macrophage migration inhibitory factor （MIF）などの発現が増強し、これら免疫調節分子の発現制御により免疫学的特権を享受している。

また、その破綻により円形脱毛症などの脱毛症が生じることが知られる。これまでの汗腺・汗管を標的とした自己免疫疾患の研究では、AIGA などにおいて汗腺のムスカリン性アセチルコリンレセプターの発現が病変部で低下しており発汗刺激レセプターに結合できなかったアセチルコリンが間接的に炎症を惹起する可能性（Nakamizo S, et.al. Clin Exp Dermatol. 2011）などが報告されてはいるものの、汗腺・汗管細胞自体に備わる恒常性維持機構の障害という観点から病態に切り込むという視点からの先行研究はない。申請者は付属器でも汗腺も免疫学的特権を享受するのではないか、また汗腺を標的とする自己免疫性疾患において免疫学的特権破綻が生じるのではないかと問うた。

２．研究の目的

本研究の目的は汗腺･汗管において免疫学的特権が存在するのかを検証し､その破綻が SjS, LE､強皮症(Scl)などの汗腺を標的とする自己免疫性疾患の病態に関連するか否かを検討した｡本研究ではヒト皮膚組織を用いた免疫組織化学的検索と定量的デジタル画像解析を組み合わせ、疾患における免疫制御分子のヒト汗腺での発現様式を検討する。さらに、ヒト皮膚器官培養系を用いて炎症と免疫学的特権の破綻の関連性を明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

（１）デジタル画像解析を用いたヒト正常汗腺における免疫学的特権関連分子の発現の検討

免疫組織化学的手法とデジタル画像解析を組み合わせた定量的なアプローチを用いてヒトの正常汗腺・汗管が免疫学的特権を有するか否かについて検討した。毛包で免疫学的特権に関連するとされる MHC class I, MIF、CD200、α-melanocyte stimulating hormone (MSH)などの分子を主たる解析対象として、病変部周囲の余剰皮膚の組織切片を利用して前述分子の発現様式、強度を免疫組織化学的に検討した。画像解析は Image J software を使用し、数値化した輝度として Brightness index (BI)の平均値を算出し解析対象分子の部位ごとの発現強度を比較した。

（２）向汗腺性自己免疫性疾患における免疫学的特権関連分子発現の変化の検討

（１）の結果をもとに、MHC class I、MIF、α-MSH について、健常コントロールと SjS、LE、Scl における部位別の関連分子の発現の差異を、上記手法を用いて検討した。

（３）正常コントロールと向汗腺性自己免疫性疾患の汗腺における CD200 の発現の比較

ヒトの毛包バルジ幹細胞領域で発現している免疫抑制分子である CD200 について、汗腺における発現を免疫組織化学的に検証した。筋上皮細胞における発現を確認するため、CD200 染色及び alpha smooth muscle actin (αSMA)との二重染色を行った。

（４）器官培養を用いた炎症性サイトカイン添加の免疫学的特権への影響の検討

ヒト皮膚検体を用いて器官培養を行い､炎症性サイトカインである INF-γ を投与することで､免疫学的特権に関連する分子の発現に変化があるかどうかを検討した。器官培養の方法は、AS Payne らの手法 J Clin Invest. 2005 を参考に申請者らの３次元培養皮膚のプラットフォームを用いて行った｡器官培養した皮膚に INF-γ を皮下注射し､コントロールとして PBS を用いて､

免疫学的特権に関与する因子の汗腺における発現に変化があるか検討した。

４．研究成果

（１）デジタル画像解析を用いたヒト正常汗腺における免疫学的特権関連分子の発現の検討

ヒト皮膚組織を用いて MHC class I、MIF、α-MSH、CD200 の免疫組織化学染色を行った後、染色したサンプルを光学顕微鏡で撮影した。Image J software を用いて表皮、汗管、汗腺の部位毎の染色輝度を測定・数値化し、発現度を定量的に比較した。表皮と比べて、汗管・汗腺では MHC class I の発現が低下し（図 1a,b,c)、MIF,α-MSH の発現は亢進していた（図 1c)。つまり、ヒト汗管・汗腺は毛包同様に免疫学的特権を享受している可能性が示唆された。

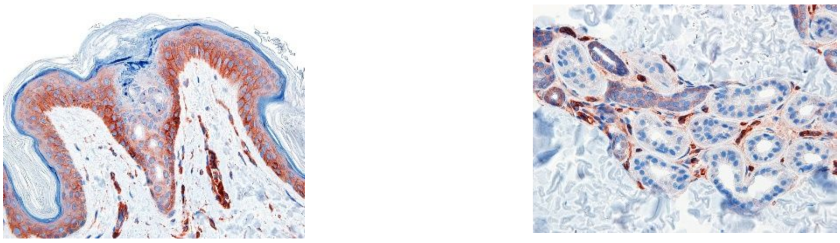
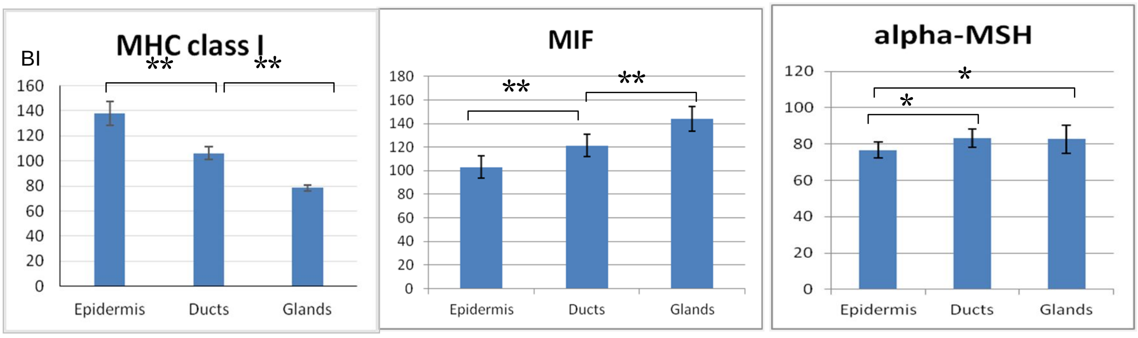


図 1(a)ヒト表皮における MHC class I の発現(b)ヒト汗腺における MHC class I の発現



(c)　ヒト汗腺・汗管における各種分子の発現　(*p<0.05, **p<0.01)

（２）向汗腺性自己免疫性疾患における免疫学的特権関連分子発現の変化の検討

正常ヒト汗腺において発現が確認された MHC class I、MIF、α-MSH について、SjS,LE,Scl のサンプルを用いて免疫組織化学染色を行った。

LE の汗管、LE、SjS、Scl の汗腺において MHC class I の発現が亢進し(図 2a)、LE、SjS の汗管 LE、Scl の汗腺において MIF 発現が低下(図 2b)、LE の汗管・汗腺で α-MSH の発現が低下していた(図 2c)。これらの結果から、SjS、LE、Scl では汗管または汗腺の免疫学的特権の破綻が示唆され、その破綻が向汗腺性の炎症に関与している可能性が考えられた。

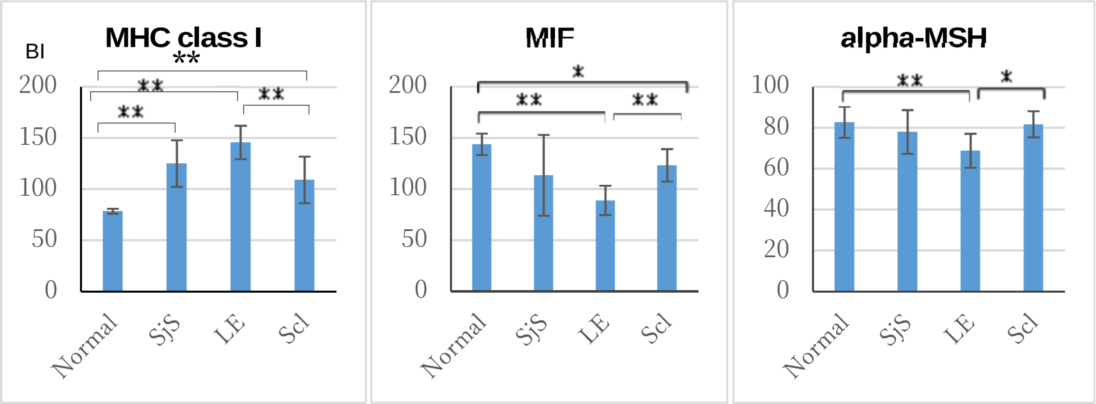


図 2　正常コントロールと自己免疫性疾患の汗腺における IP 関連分子発現の比較

（3）正常コントロールと向汗腺性自己免疫性疾患の汗腺における CD200 の発現の比較

正常コントロールでは、CD200 とαSMA の二重染色を行ったところ、汗腺における両者の発現は一致した（図３a)。また LE、SjS の汗腺の萎縮を伴わない状態では CD200 の発現は保たれていたが、Scl の汗腺が萎縮した時期では CD200 の発現が正常汗腺と比べて低下していた(図３b,c)。これらの結果から、CD200 は汗腺の前駆細胞としての働きを持つ筋上皮細胞を保護する役割を持っているため最後まで残存する可能性を考えた。

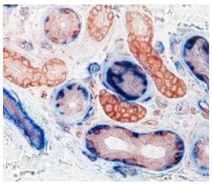
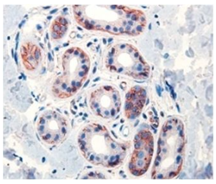
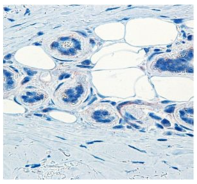


図 3（a）正常汗腺における CD200（茶色)、αSMA（青色）の発現



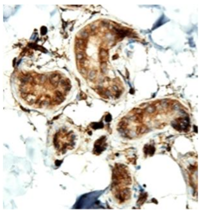


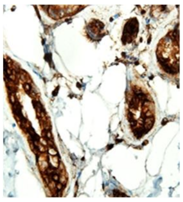
（b）正常汗腺における CD200 の発現　（c)Scl における CD200 の発現

（4）器官培養を用いた炎症性サイトカイン添加の免疫学的特権への影響の検討

マトリゲルを用いてヒト皮膚検体の器官培養を行い、炎症性サイトカインである IFN-γ を皮下注射し各分子発現に変化があるかを検討した。皮下注射から 24 時間後に検体を採取し免疫組織学的染色を施行した。

PBS 投与群よりも IFN-γ 投与群では、汗腺における MHC class I の発現が亢進し(図４)、MIF と α-MSH の発現は低下した。IFN-γ が汗腺における免疫学的特権に影響する可能性が示された。





(図４)(a)PBS 投与後の MHC class I の発現　(b)IFN-γ 投与後の MHC class I の発現

研究結果の解釈

ヒト皮膚検体を用いた実験系では、十分な検体量を得ることが困難であったが、IFN-γ が汗腺における免疫学的特権関連分子に影響を与える可能性を示すことができた。

本研究で得られた知見は、向汗腺性炎症を伴う自己免疫性疾患の病態解明と治療の確立の技術的基盤の一助になると考える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 下田由莉江、水川良子、山﨑好美、大山学
２．発表標題 円形脱毛症を合併した特発性後天性全身性無汗症の１例
３．学会等名 第70回日本皮膚科学会西部支部学術大会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Ｙｕｒｉｅ　Ｓｈｉｍｏｄａ，Ｙｏｓｈｉｍｉ　Ｙａｍａｚａｋｉ，Ｍａｎａｂｕ　Ｏｈｙａｍａ
２．発表標題 Immunohistochemical insight into the association between the collapse of immune privilege in the sweat gland and syringotropic immune cell infiltrates in collagen diseases
３．学会等名 ４９ｔｈ　Ａｎｎｕａｌ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｆｏｒ　Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｍｅｅｔｉｎｇ（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Ｙｕｒｉｅ　Ｓｈｉｍｏｄａ，Ｙｏｓｈｉｍｉ　Ｙａｍａｚａｋｉ，Ｍｏｍｏｋｏ　Ｋｉｍｉｓｈｉｍａ，Ｍａｎａｂｕ　Ｏｈｙａｍａ
２．発表標題 Digital-immunohistologic dissection of immune privilege collapse in syringotropic autoimmune diseases: an implication for the pathogenesis
３．学会等名 Ｔｈｅ 44th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology
４．発表年 2019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