

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06138・19K21253

研究課題名(和文)慢性移植片対宿主病皮膚硬化マウスモデルにおける表皮角化細胞とIFN γ の役割

研究課題名(英文) Interferon gamma stimulated apoptotic keratinocytes promote sclerodermatous changes in chronic graft versus host disease

研究代表者

齊藤 明允 (Saito, Akimasa)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：70830181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：表皮角化細胞およびインターフェロン(IFN γ)が慢性移植片対宿主病(GVHD)の皮膚硬化における役割について、マウス及び、培養マウス表皮角化細胞の実験結果により、自己反応性CD8⁺T細胞の標的である表皮角化細胞がアポトーシスに陥るとともに、自己反応性CD8⁺T細胞が産生するIFN γ の刺激によりTGF- β 1を産生することで、真皮線維芽細胞が活性化し、皮膚線維化が形成されると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、慢性移植片対宿主病における皮膚硬化の新たなメカニズムを解明することができ、それにより、新しい治療起点、治療ターゲットを確立することができた。それらに対する新規治療薬の開発につながると考える。

研究成果の概要(英文)：We established a new murine model of chronic GVHD-like scleroderma followed by acute GVHD-like mucocutaneous injury in genetically modified mice transferred with keratinocyte-specific CD8⁺T cells. While transfer of granzyme B-deficient CD8⁺T cells did not result in mucocutaneous injury followed by scleroderma in recipients, interferon (IFN) γ -deficient CD8⁺T cell-recipient mice developed severe acute mucocutaneous injury, but milder scleroderma compared to wild-type CD8⁺T cell-recipients. Moreover, IFN γ -deficient CD8⁺T cell-recipient mice had lower expression of TGF β 1 in the epidermis than the control. Murine primary keratinocytes undergoing FasL-induced apoptosis and incubated with IFN γ produce TGF β 1, the production of which can be inhibited by a pan-caspase inhibitor. Collectively, our results indicate that IFN γ promotes TGF β 1 production by apoptotic keratinocytes, which mediates the development of scleroderma in keratinocyte-targeting GVHD.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：慢性移植片対宿主病 TGF β 1 皮膚硬化 皮膚線維化 IFN γ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

移植片対宿主病 (GVHD) は同種造血幹細胞移植 (HSCT) の主要で重篤な合併症である。GVHD は発症時期と症状により急性と慢性に大別され、皮膚がもっとも障害される臓器の一つである。急性 GVHD では、皮膚粘膜の傷害が生じ、病理学的に、表皮角化細胞死や表皮・真皮境界部への炎症細胞浸潤を特徴とする苔癬反応と呼ばれる所見を伴う。一方、慢性 GVHD は HSCT の約 30-50% に生じるとされ、臨床的に皮膚硬化、脱毛などを発症し、患者の QOL が大きく損なわれる (Lee SJ, Biol Blood Marrow Transplant. 2002, Socié G, et al, N Engl J Med. 1999, Arora M, et al, Biol Blood Marrow Transplant. 2016)。慢性 GVHD でみられる皮膚硬化は、膠原病の全身性強皮症と臨床上類似し、また皮膚線維化や自己免疫的疫機序などの点で病態生理にも共通点が多い (Skert C, et al, Hematologica. 2006, Gabrielli A, N Engl J Med. 2009)。それ故に、慢性 GVHD における発症機序の解明は、本疾患のみならず、他の皮膚硬化を伴う疾患のそれにもつながる。実際、慢性 GVHD のモデルマウスは全身性強皮症・皮膚硬化のモデルマウスとして広く使われている (Laura L, et al, J Immunol. 1999)。

慢性 GVHD において、ドナー細胞が病態生理の中心的役割をたしていると考えられ、数多くの研究がなされている (Socié G, Blood. 2014)。一方、ドナー細胞の標的である皮膚の主要構成細胞である表皮角化細胞は炎症性皮膚疾患で、様々なサイトカイン、ケモカインを産生し、炎症の制御や組織修復に関わるが (Wittmann M, et al, Cytokine Growth Factor Rev. 2014) これまで慢性 GVHD の皮膚病変の病態生理における表皮角化細胞の役割についてはまだ十分解明されていない。また、それを可能にするモデルマウスも存在しない。

慢性 GVHD の病態生理において、細胞同士の相互作用を理解する上ではサイトカインの働きの解明は不可欠である。慢性 GVHD 患者の硬化皮膚では、インターフェロン (IFN γ) を初めとするヘルパー T 細胞 1 型のサイトカインの mRNA 発現が上昇し、また、IFN γ 産生 CD8 T 細胞も増数していると報告されている (L. A. Ochs, et al, Bone Marrow Transplant. 1996, Broady R, et al, Blood. 2010, Bruggen MC, et al, Blood. 2013)。全身性強皮症患者の皮膚毛細血管内皮細胞を用いた研究では、IFN γ は内皮細胞の TGF β 2 やエンドセリン-1 の産生を誘導し、血管のリモデリングや皮膚線維化を促進すると報告している (Chrobak I, et al, J Cell Physiol. 2013)。このようにヒト検体を用いた研究では IFN γ は慢性 GVHD の皮膚硬化を促進すると推測されるが、モデルマウスでは十分証明されていない。一方 1990 年代では、IFN γ はプレオマイシン誘発性皮膚硬化モデルでは皮膚硬化を軽減し、*in vitro* では線維芽細胞事態に IFN γ が作用して、細胞増殖やコラーゲン産生を抑制するなど IFN γ が皮膚線維化を抑制するという数多くの研究結果がある。この結果を基にして、IFN γ 投与による全身性強皮症治療が試み

られたが、失敗している (Polisson RP, et al, J Rheumatol. 1996)。以上のように、自己免疫的機序に続発する皮膚硬化における IFN の役割については、一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

現在広く使用されている GVHD マウスモデルは、主要組織適合複合体 (MHC) 不一致同種間骨髄移植により惹起され、患者病態をよく反映する一方で臓器特異性がない。本研究は、まず表皮角化細胞が自己免疫反応の標的細胞となり、また皮膚 GVHD で病態形成の中心と考えられている CD8 T 細胞 (Saito A, et al, J Invest Dermatol, accepted) で惹起できる皮膚硬化マウスモデルを確立する。これより、表皮角化細胞の病態生理への関与の解明にフォーカスした研究を行う。特に、慢性 GVHD の皮膚硬化モデルマウスにおける IFN の役割についての基礎実験結果はほとんど存在しないため、本研究でその役割を明確に解明し、治療標的としての評価を確定する。

3. 研究の方法

角化細胞特異的に発現するケラチン 14 プロモーター下に卵白アルブミン (OVA) 遺伝子を導入して角化細胞膜上に OVA を発現させた K14-mOVA Tg マウスをレシピエントとし、OVA 特異的な T 細胞受容体を有する CD8 T 細胞である OT-I 細胞をドナー細胞として養子移入することで、苔癬反応を伴う急性 GVHD 様皮膚粘膜症状を発症するモデルマウスを用いる (Shibaki A, et al, J Invest Dermatol, 2004, Saito A, et al, J Invest Dermatol, accepted)。このモデルマウスはドナー細胞によるレシピエント細胞への免疫反応という GVHD と類似な病態生理により、移入後 14 日後に急性 GVHD 様皮膚粘膜傷害を発症するが、予備実験では、28 日後に慢性 GVHD 様皮膚硬化を発症する (図 1)。この間に既存の慢性 GVHD モデルマウスと同様に体重減少を伴う。同モデルマウスの硬化皮膚での皮膚線維化の程度について、OT-I 細胞移入 28 日目の K14-mOVA Tg マウス耳介皮膚の HE 染色検体での真皮厚、耳介皮膚検体での平滑筋アクチン (SMA) 陽性筋線維芽細胞数、耳介皮膚検体のハイドロキシプロリン含量、および耳介皮膚検体のコラーゲンの mRNA 発現量の測定により評価したところ、皮膚硬化は線維化によるものであることを見出している (図 2)。以上より、本モデルマウスは、慢性 GVHD の皮膚硬化モデルマウスとして有用と考えている。

慢性 GVHD の皮膚硬化モデルマウスにおける IFN の役割を検討するために、ドナーマウスとして、GFP を遺伝子導入した、野生型 OT-I マウス、IFN γ -KO OT-I マウスを作成する。それぞれのドナー OT-I 細胞をレシピエント K14-mOVA Tg マウスに移入し、28 日後に両群の皮膚硬化を観察し、耳介皮膚 HE 染色検体での真皮厚、耳介皮膚検体での SMA 陽性筋線維芽細胞数、耳介皮膚検体のハイドロキシプロリン含量を比較する。また、耳介皮膚のコラーゲン、SMA および線維化関連因子である形質転換増殖因子 (TGF β 1)、結合組織成長因子 (CTGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) の mRNA 発現を経時的に測定し、本モデルマウスにおける免疫反応惹起 CD8 T 細胞が産生する IFN の役割、線維化の機序を明らかにする。

表皮角化細胞の機能にも着目し、モデルマウスの表皮角化細胞を単離した上で、上述の線維化関連因子、線維芽細胞遊走因子 (CXCL4, 7)、T 細胞遊走因子 (CXCL9, 10, 11) の mRNA 発現量を測定し、機能解析する。さらに表皮角化細胞の IFN が直接表皮角化細胞に与える効果を解明するために、マウス角化細胞初代培養やヒト角化細胞セルライン HaCaT 細胞を用いて、IFN の刺激下での上記因子の発現について測定する。

4. 研究成果

本研究では野生型 OT-I 細胞移入群は移入後 28 日には強皮症様の皮膚硬化が観察され、その真皮厚や真皮 SMA 陽性細胞数、ハイドロキシプロリン含量が増多していることを確認した。IFN γ -欠損 OT-I 細胞移入群は、野生型細胞移入群と比べて移入 28 日目の皮膚硬化は有意に軽度で、真皮厚、真皮 SMA 陽性細胞数やハイドロキシプロリン含量も低下していた。また、野生型 OT-I 細胞移入群の皮膚および表皮角化細胞において TGF β 1 の mRNA 量が増加していたが、IFN γ -欠損 OT-I 細胞移入群では、その増加は有意に抑制されていた。培養表皮角化細胞は IFN γ -共培養下で経時的に TGF β 1 の mRNA 発現量 (real-time PCR) や TGF β 1 産生量 (ELISA) が増加したが、PBS と共培養したも

のでは TGF- β 1 の産生が見られなかった。さらに IFN- γ と共培養した表皮角化細胞は有意にアポトーシスを起こした。TNF- α + FasL、あるいはアポトーシス誘導物質 (AT101) と共培養した表皮角化細胞に IFN- γ を添加したものでは TGF- β 1 (ELISA) を産生したが、添加しないものは産生しなかった。一方、ネクローシス誘導物質 (ホウ酸) と共培養した表皮角化細胞は IFN- γ の添加の有無にかかわらず TGF- β 1 を産生しなかった。以上より慢性 GVHD 様皮膚硬化モデルマウスにおいて、アポトーシスに陥った表皮角化細胞が IFN- γ の刺激により TGF- β を産生することで、皮膚線維化を促進すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito A, Okiyama N, Kubota N, Nakamura Y, Fujisawa Y, Watanabe R, Ishitsuka Y, Bleackley R, Fujimoto M	4. 巻 138
2. 論文標題 Blockade of Granzyme B Remarkably Improves Mucocutaneous Diseases with Keratinocyte Death in Interface Dermatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 2079-2083
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akimasa Saito
2. 発表標題 ransforming growth factor- produced by keratinocytes undergoing apoptosis promotes skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease-like reaction
3. 学会等名 SID（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----