

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08668

研究課題名（和文）NKG2D、NKG2D ligand発現制御による円形脱毛症の新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for alopecia areata by regulating NKG2D and NKG2D ligand expression

研究代表者

伊藤 泰介 (Ito, Taisuke)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90293638

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では様々な円形脱毛症（AA）の病期、病型における血中可溶性NKG2D ligand濃度を測定することでバイオマーカーとして利用可能かどうかを検討した。浸潤するT細胞はNKG2D陽性細胞をみとめ、また病変部では毛包上皮を中心にH60（NKG2Dリガンド）発現を認めた。マウス可溶性NKG2D ligandは、培養CD8陽性T細胞のNKG2D発現を抑制させる傾向であることが判明した。PD-1発現とNKG2D発現はともに相反する発現量である可能性が高い。すなわち可溶性NKG2D ligandは円形脱毛症の病勢を抑制する方向に働く可能性があり、脱毛範囲と反比例する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

円形脱毛症の治療は、JAK阻害薬などが上梓されてきているが、いまだにアンメットニーズな領域である。そもそも円形脱毛症の病勢をみるマーカーもまだ不確定である。今回の結果は、可溶性MICAがTリンパ球上のNKG2D発現を抑制するということから、治療選択しとなりえる。また可溶性MICAは、病変部において、毛包上皮細胞に発現しているMICAが、上皮から離れて血中に流れ出ているものであり、病勢との関連性が期待できる。今後、治療薬として成立し得るかを引き続き動物モデルを使用して検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the possibility of using soluble NKG2D ligand as a biomarker by measuring its concentration in blood at various stages and types of alopecia areata (AA). Infiltrating T cells were found to be NKG2D-positive, and H60 (NKG2D ligand) expression was observed in lesions, mainly in the follicular epithelium. Mouse soluble NKG2D ligand tended to suppress NKG2D expression in cultured CD8-positive T cells, suggesting that PD-1 expression and NKG2D expression may both be at opposite levels. In other words, soluble NKG2D ligand may work in the direction of suppressing alopecia areata disease and may be inversely proportional to the extent of alopecia.

研究分野：皮膚科学

キーワード：円形脱毛症 NKG2D MICA NKG2Dリガンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症は広範囲に及ぶと難治性、治療抵抗性を示す疾患である。また再発を繰り返す症例も多く見られ、皮膚科疾患の中で頻度の多い割には治療がなかなか進まない領域となっている。近年 JAK 阻害薬の開発などが進む中で、円形脱毛症のバイオマーカーを見いだすことが今後の患者予後を予測し治療選択を考える中で必要となるものと考えられる。

円形脱毛症は細胞性免疫を主体とした組織特異的な自己免疫疾患であり、チロシナーゼやチロシナーゼ関連タンパク、トリコヒアリンなどが自己抗原と推測されている。これら自己抗原を活性化した NKG2D⁺CD8⁺T 細胞が認識するものと考えられる。一方、毛包はもともと免疫寛容によって保護されているが、円形脱毛症病変部では寛容環境が破綻し、NKG2D ligand の発現が亢進している。NKG2D ligand は可溶性 NKG2D ligand が存在しており、血中の可溶性 NKG2D ligand を測定することで円形脱毛症の病勢を推定することが可能と考えられる。本研究では様々な円形脱毛症の病期、病型における血中可溶性 NKG2D ligand 濃度を測定することでバイオマーカーとして利用可能かどうかを検討する。また円形脱毛症における NKG2D、NKG2D ligand 発現の制御による新規治療法の開発もめざす。

円形脱毛症の病態は以下のポイントがある。

- 1、円形脱毛症は、成長期毛包の免疫寛容 immune privilege が破綻している。
- 2、円形脱毛症は、成長期毛包の自己抗原 (tyrosinase や tyrosinase related protein、トリコヒアリン) に対する自己免疫反応が生じている。
- 3、急性期病変部では IFN- γ や IL-15 の発現が亢進している。
- 4、急性期病変部では毛包周囲に著明な炎症細胞浸潤がみられる。
- 5、NKG2D 陽性 CD8 陽性 T 細胞が病態に深く関わっている。
- 6、病変部毛包では NKG2D ligand 発現が亢進している。

成長期毛包は免疫寛容な環境にあり、hair follicle immune privilege (HF-IP)といわれる(Ito T et al. Am J Pathol 2004;164:623-34)。円形脱毛症病変部ではこのHF-IPが破綻し、自己抗原が毛包上皮のMHC class IIに提示され、自己反応性細胞傷害性T細胞であるNKG2D⁺CD8⁺T細胞のCD8分子との間で認識される (Ito et al. J Invest Dermatol 2008;128:1196-206)。また活性化分子であるNKG2Dは、そのリガンドであるMICAと反応して毛包組織を傷害し成長期毛包をアポトーシスに陥れることで脱毛症状に繋がっていく。この反応では、NKG2D⁺CD8⁺T細胞からのIFN- γ や毛包上皮からのIL-15がサイトカインループを形成して病態を形成している (Ito T. Clin Dev Immunol 348546, 2013., Ito T, Tokura Y. Exp Dermatol 23:787-91,2014)。このような病態をなす上で遺伝的背景が推測され、いくつかの免疫関連の遺伝子のSNPやHLAの傾向が報告されている。遺伝的背景をもつ患者においては、再発性、重症化、難治性を停止しやすいと考えられる。その中で患者の病勢を推測するバイオマーカーは今までに報告がなく、場当たりの治療にならざるを得ない側面がある。そこで円形脱毛症の汎発化、難治化を推測するバイオマーカーを検討することは、治療選択、予後推測において極めて重要であると考えられる。さらに、NKG2Dを治療ターゲットとして捉えていくことも重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は円形脱毛症のバイオマーカーを探索し、また可溶性NKG2D ligandによるNKG2D発現の制御を検討し、円形脱毛症治療への可能性を検討することである。バイオマーカーを見いだすことで治療効果の推測、予後の事前推測、難治化を検討するための指標となり得る。円形脱毛症のバイオマーカーを検討することは従来なされておらず、学術的独自性が高く、また患者の治療選択や継続の有用性を検討するにあたり、バイオマーカーを検討することは研究を患者に対して還元するにあたり極めて有用性が高いものと考えている。バイオマーカーとなり得るものは病態に即した分子を選択することが重要であり、現在、円形脱毛症のeffector細胞として考えられているNKG2D⁺CD8⁺T細胞における活性化因子であるNKG2Dのリガンドである毛包上皮上のNKG2D ligand発現の有無は病勢を考える上で重要な分子とみられる。またNKG2D分子は円形脱毛症の病態の中心として考えられているものの、これを治療対象とする研究はなされていない。すでにクローン病領域では抗NKG2D抗体の効果についての臨床試験がなされており、注目を浴びつつある。円形脱毛症はクローン病など炎症性腸疾患を含めた自己免疫疾患の合併も多いことから、円形脱毛症においてもNKG2D-リガンド系の制御による有効性が十分に期待できるところである。NKG2DはCD8陽性T細胞やNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞にDAP10とともに発現しており、がん細胞などターゲット細胞に発現している主要組織適合複合体(MHC)クラスI関連A鎖およびB鎖タンパク質 MICAやMICBやULBP1-6(ヒト)、H60(マウス)をリガンドとして活性化する。その結果、ターゲット細胞はアポトーシスに陥る。我々の検討では、IFN- γ によってヒト毛包におけるMICA発現が亢進することがわかっている。つまりIFN- γ は細胞傷害性T細胞を活性化するとともにターゲット組織のMICA発現を亢進させ、NKG2D分子による認識を高めると考えられる。

腫瘍免疫の研究において、宿主のNKG2Dにたいして、腫瘍はその発現を抑制する可溶性のMICAを分泌して免疫応答を回避し、抗腫瘍応答を減少させることが報告されている。MIC⁺腫瘍をもつ癌患者由来の血清および可溶性の組換えMICA分子が、末梢血から単離したCD8⁺T細胞表面および 黒色腫抗原特異的CD8⁺T細胞クローン表面のNKG2Dの発現を抑制する。つまり膜型 MICA を切断、デコイとして細胞傷害性T細胞を攪乱する可溶性 MICA を産生する。そこで本研究では、円形脱毛症の病態において、NKG2Dリガンドの毛包組織での発現と可溶性NKG2D ligandによるNKG2D発現の制御が円形脱毛症の病勢に関わるものと考え、またさらにその制御が円形脱毛症の治療につながる可能性があると考え検討する。

3. 研究の方法

1) 円形脱毛症を発症した C3H/HeJ マウスの鼠径、腋窩リンパ節よりリンパ球を採取し、30IU/ml IL-2、IL-7 (25 ng/ml)、IL-15 (50 ng/ml)、Dynabeads T-Activator CD3/CD28 (500 μ l)とともに5日間培養後、8週齢の未発症マウスに皮内注射することで、円形脱毛症を誘導する(Wang et al. J Invest Dermatol 2015)。通常、皮内注射の約1ヶ月後に90%以上の確率で誘導可能である。

2) 活性化リンパ球をC3H/HeJマウスに皮内注射後、円形脱毛症発症前後について、継時的に背部皮膚を採取し、毛包周囲に浸潤するリンパ球、毛包上皮のH60発現について、免疫組織科学的検討、mRNAの計測、血清中の可溶性H60濃度をELISA法にて計測する。比較として活性化リンパ球を皮内注射していないC3H/HeJマウスの皮膚を用いる。

3) リンパ節細胞における IFN- γ による NKG2D 発現の誘導に対する H60 の影響の検討
H60 による NKG2D 発現への影響を検討するため、脾臓やリンパ節からリンパ球を採取し、100IU/ml IFN- γ で 24 時間培養する際に、H60 との共培養の有無による NKG2D 発現の強度の違いを検討する。

4) 活性化リンパ球誘導円形脱毛症に対する可溶性 H60 の発症に対する影響の検討
活性化リンパ球を皮内注射したマウスに対して、H60 を同時に腹腔内もしくは静注投与することで円形脱毛症の発症率の変化を検討する。

5) 抗 NKG2D 抗体による円形脱毛症の発症抑制効果
活性化リンパ球を皮内注射したマウスに対して、定期的に抗マウス NKG2D 抗体を皮内注射もしくは腹腔投与した群と PBS を投与した比較群の間において、発症率に有意な差があるかを検討する。

6) 抗 NKG2D 抗体による円形脱毛症の治療効果
活性化リンパ球皮内投与によって発症誘導した C3H/HeJ マウスに対して、抗マウス NKG2D 抗体を皮内投与し、病変部の改善がみられるかを検討する。同病変部から皮膚を採取し、NKG2D 陽性細胞の分布、H60 発現量、IFN- γ や IL-15 の発現量について、免疫組織科学的、mRNA レベルでの検討を行う。

4 . 研究成果

本研究では様々な円形脱毛症 (AA)の病期、病型における血中可溶性 NKG2D ligand 濃度を測定することでバイオマーカーとして利用可能かどうかを検討した。浸潤する T 細胞は NKG2D 陽性細胞をみとめ、また病変部では毛包上皮を中心に H60(NKG2D リガンド)発現を認めた。可溶性 NKG2D ligand は、培養 CD8 陽性 T 細胞の NKG2D 発現を抑制させる傾向であることが判明した。一方で PD-1 発現と NKG2D 発現はともに相反する発現量である可能性が高い。すなわち可溶性 NKG2D ligand は円形脱毛症の病勢を抑制する方向に働く可能性があり、脱毛範囲と反比例する可能性がある。今後は円形脱毛症に対して可溶性 NKG2D リガンドを投与することにより、脱毛症状の改善が可能かどうかの展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kageyama R, Ito T, Hanai S, Morishita N, Nakazawa S, Fujiyama T, Honda T, Tokura Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunological Properties of Atopic Dermatitis-Associated Alopecia Areata.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052618	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 -

1. 著者名 1.Kageyama R, Ito T, Hanai S, Morishita N, Nakazawa S, Fujiyama T, Honda T, Tokura Y	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunological Properties of Atopic Dermatitis-Associated Alopecia Areata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2618-2629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052618.	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 -

1. 著者名 Ito T, Kageyama R, Nakazawa S, Honda T	4. 巻 29
2. 論文標題 Understanding the significance of cytokines and chemokines in the pathogenesis of alopecia areata	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Dermatol	6. 最初と最後の頁 726-732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.14129.	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 Ito T, Suzuki T, Funakoshi A, Fujiyama T, Tokura Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 CCR5 is a novel target for the treatment of experimental alopecia areata.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cutan Immunol Allerg	6. 最初と最後の頁 24-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cia2.12092	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------