

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08670

研究課題名(和文) 白斑におけるメラノサイト超選択的レジデントT細胞の特徴と相互維持機能の解明

研究課題名(英文) Analysis for skin microenvironmental change and character of melanocyte-specific resident T cells

研究代表者

種村 篤 (Tanemura, Atsushi)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50457016

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)：白斑は全身に無秩序に発症するわけではなく、左右対称性に生じたり顔面および四肢末端のみに限局したりと極めて特異的な分布をしており、その理由は明らかでない。そこで本研究では、「なぜ、特異的な分布を示しながら限局的かつ選択的にメラノサイトが攻撃され白斑を生じ維持されるか？」メラノサイトを取り巻く局所免疫環境の側面より明らかにすることが主目的であり、皮膚に局在する免疫担当細胞の包括的な動態・機能・細胞内代謝解析、さらには皮膚に分布する神経支配との関連性を研究することで、自己免疫白斑の病態解明に迫りたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白斑が顔面・手など整容部位に生じた場合QOLに大きな支障をきたすため、病態に応じたより効率的で有効な治療開発が急務である。その病態には皮膚に局在する免疫担当細胞が関与していることが最近明らかになったが、なぜ左右対称性に生じるか？いったん色素脱失した部位に色素再生がみられないか？単細胞レベルでの解析はまだなく、本研究で「実際の白斑皮膚リンパ球がメラノサイトを攻撃すること」「ステロイド全身療法後にもメラノサイト特異的リンパ球が白斑皮膚内に残存すること」を明らかにした。これらの結果は今後のより選択的な白斑免疫調整薬の開発につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Vitiligo does not occur randomly over the entire body, but has a very specific distribution, such as symmetrical or limited to the face and extremities, and the reasons for this are not clear. In this study, we asked "why melanocytes are attacked locally and selectively with a specific distribution, resulting in vitiligo and its maintenance?" The main objective of this study is to elucidate the local immune environment surrounding melanocytes, and we would like to elucidate the pathogenesis of autoimmune vitiligo by comprehensively analyzing the dynamics, functions, and intracellular metabolism of immune cells localized in the skin, and by studying their relationship with the innervation of the skin.

研究分野：白斑

キーワード：vitiligo resident T cell

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身に汎発する白斑の機序として、遺伝子的背景をもとにメラノサイトを標的とした自己免疫が発症に重要とされている。近年その発症過程にキラーT細胞、Th17細胞、制御性T細胞(Treg)さらには自然リンパ球(ILC)など様々な免疫担当細胞が複雑に関与していることが報告され、より詳細な解析が進んでいる。一方で白斑の臨床像に目を向けると、全身に無秩序に発症するわけではなく、左右対称性に生じたり顔面および四肢末端のみに限局したりと極めて特異的な分布をしており、その理由は明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では、「なぜ、特異的な分布を示しながら限局的かつ選択的にメラノサイトが攻撃され白斑を生じ維持されるか？」メラノサイトを取り巻く局所免疫環境の側面より明らかにすることが主目的であり、皮膚に局在する免疫担当細胞の包括的な動態・機能・細胞内代謝解析することで、自己免疫白斑の病態解明に迫りたい。

### 3. 研究の方法

上記目的を達成するため、以下のクエスチョンを設定しそれぞれに回答するための研究とその方法を列記する。

#### (1) 白斑皮膚と健常皮膚に動員されるリンパ球は異なるか？

すでに、我々は正常ヒト皮膚 1cm<sup>2</sup> より約 8x10<sup>3</sup> 個の生存リンパ球および 3 x 10<sup>3</sup> 個の CD8T 細胞を単離し、CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup>の T<sub>RM</sub> 分画を同定・単離に成功している。この分画での単細胞 RNA seq を行い、白斑皮膚と健常皮膚 T<sub>RM</sub> の発現 RNA の差異を網羅的に探索し、白斑特異的 T<sub>RM</sub> の免疫向性トランスクリプト 接着関連トランスクリプト 代謝・維持関連トランスクリプトに主に注目する。

#### (2) メラノサイト選択的白斑浸潤 T 細胞はどのように免疫バランスを維持しているか？

メラノサイト特異的抗原の一つである Melan A ペプチドを用いたテトラマーアッセイにて白斑皮膚局在メラノサイト抗原強反応性 T<sub>RM</sub>CD8<sup>+</sup>細胞を同定・単離、その細胞群の単細胞 TCR seq にて T 細胞受容体の多様性を単細胞レベルで検証し、白斑病変で選択的・特異的な T 細胞群を明らかにする。また、白斑皮膚局所でのアナジー機構の破綻を検証するため、皮膚浸潤 APC, CTL, Treg を同時にソーティングし同様のアッセイを行うと同時に、リンパ球の疲弊状態を評価するため PD-1, CTLA-4 などのチェックポイント分子の発現を観察することで、白斑皮膚局所でのアナジー破綻を検証する。

#### (3) 時系列的な T 細胞機能および酸化ストレス応答に差異がみられるか？

リンパ球の single cell functional live imaging を行うことで、超微細環境におけるサイトカイン産生を中心とした免疫機能を単細胞レベルで選択的かつリアルタイムに可視化することを実現する。現在自己免疫性白斑の病態解析で Key factor とされる、CXCL9/10, IFN- $\gamma$ , IL-15 などの可溶性サイトカイン及びその受容体である CXCR3(B)の発現を直視下に観察する。

#### (4) 白斑局在 T 細胞の局在が維持されるための細胞内代謝は変化しているか？

Flux アナライザー解析により、浸潤リンパ球のミトコンドリア酸素消費量および解糖系依存度を定量的に測定、さらに白斑症例で上昇しているとされる酸化ストレス下での

OCR/ECAR 値の増減を健常者と比較することで、ミトコンドリア代謝能の変化を測定し、白斑患者皮膚浸潤リンパ球の生命維持能・増殖能を検証する。

#### 4. 研究成果

(1) メラノサイト特異的な獲得免疫を可視化するため、実際の白斑表皮を模した白斑患者細胞由来のメラノサイト入り培養表皮を作成し、同時に白斑患者由来皮膚リンパ球および抗原提示細胞と共培養することにより、世界で初めてメラノサイト傷害性ヒト白斑皮膚のライブイメージングに成功した(前項3.(3)に回答する解析)。その結果、健常部に比べ白斑部由来リンパ球でより強い細胞障害活性を証明し、英文論文として発表した。今後メラノサイトおよびT細胞を標識・可視化すると同時に、すでに樹立しているIFN- $\gamma$ 受容体シグナルを可視化するシステム(いわゆる functional imaging)を用いてより詳細な超微細単細胞障害環境の時空間的解析を行う予定である。

(2) 白斑患者末梢血でTregを介したメラノサイト特異的CTLのアナジー機構が破綻していることを証明したが、本研究期間中に前項3.(2)に対する白斑皮膚リンパ球のアナジー状態を検証出来なかった。

(3) 急速進行性白斑に対する治療は全身性の免疫抑制剤が一般的であり、その中でも糖質コルチコステロイドの全身投与が頻用されている。一方でステロイド抵抗性症例も存在し、より強力かつメラノサイト向性免疫応答を選択に制御する治療薬が必要とされている。そこで、皮膚リンパ球を単離する技術を利用し、全身ステロイド療法前後でのメラノサイト特異的免疫応答の変化をHLA-A0201拘束性チロジナーゼペンタマーアッセイにより解析した。その結果、白斑皮膚でより多くチロジナーゼ陽性CD8 T細胞が同定され、それらの細胞群でIFN- $\gamma$ , Granzyme B産生が高いことが分かった。さらに、ステロイド投与後もこれらの細胞群ではIFN- $\gamma$ , Granzyme B産生が維持されており、ステロイド抵抗性T細胞が白斑皮膚に維持されることを証明し、英文論文として発表した(前項3.(1)に回答する解析)。この細胞群の表現型を明らかにし、細胞障害活性制御の機構を明らかにする予定であったが、残念ながら解析に必要なメラノサイト特異的生リンパ球数を確保出来なかった。今後、前述のクエスチョン(前項3.(4)に対応するリンパ球の酸素消費量など)を明らかにしたいと考える。

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 Yokoi K, Watanabe R, Kume M, Yamane S, Tanaka A, Fujimoto M, Tanemura A	4. 巻 50
2. 論文標題 Melanocyte-specific CD49a+CD8+ T cells in vitiligo lesion potentiate to maintain activity during systemic steroid therapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 710-714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16680.	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yokoi K, Watanabe R, Kume M, Yamane S, Tanaka A, Fujimoto M, Tanemura A.
2. 発表標題 Melanocyte-specific CD49a+CD8+ T cells in vitiligo lesion potentiate to maintain activity during systemic steroid therapy.
3. 学会等名 The 3rd symposium for KSVPCR（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanemura A
2. 発表標題 Recent advance in vitiligo research and clinics
3. 学会等名 The 3rd symposium for KSVPCR（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------