

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17360

研究課題名（和文）免疫抑制作用薬がヒト汗腺に与える影響の解析：なぜステロイドは無汗症に有効なのか？

研究課題名（英文）Analysis of the influence of immunosuppressive drugs on human sweat glands: a search for a reason why corticosteroid is effective for anhidrosis?

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、ヒト汗腺細胞の継代培養法を確立し、ステロイドなどの免疫抑制作用薬が培養細胞に与える直接的影響を検討した。ヒト皮膚から単離したヒト汗腺から得た培養細胞にステロイドを作らせると、アクアポリン5など汗腺のマーカーの発現が亢進した。そこで網羅的遺伝子解析を行い、ステロイド添加にて外的刺激やストレスに対する反応などに関わる遺伝子発現が亢進することを明らかにした。並行して、発汗テスト、病理組織学的所見の定量的デジタル画像解析技術を改良し汗腺マーカー発現との相関解析に備えた。本研究では、免疫抑制作用薬がヒト汗腺細胞に与える影響という臨床的問題解明の一助となる方法論を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無汗症には経験的にステロイドの全身投与が有効な場合もあるが、その病態や薬剤の作用機序などについては未だ明らかではない。本研究では、ヒト汗腺から部分的ではあるが特性を維持した培養細胞を継代培養する技術を確立し、ステロイドなどの免疫抑制剤が汗腺に与える影響についてマイクロアレイをはじめとする網羅的遺伝子解析技術を用いて検討しうることを示すとともに、こうした基礎医学的手法を用いて得た定量的な知見を臨床所見、臨床検体を用いた解析の結果と橋渡しするための方法論を確立した。本研究で得られた知見は、その希少性などから困難とされてきた無汗症の病態解明及び治療開発に向けた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 aim of this study is to elucidate the influence of immunosuppressive drugs, represented by corticosteroid using in vitro expanded human sweat gland cells. Isolated human sweat gland explants successfully gave rise to culture cell which could be propagated and passaged, while partially maintaining sweat gland marker expression levels. Using these cells, global gene expression analysis was conducted by microarrays to find that corticosteroid up-regulated genes involved in the responses to external stimuli and stress in the cells examined. In parallel with these analysis, digital image analyses for quantitative evaluation of the outcomes of sweat test and immunohistochemical assessment of human sweat gland were invented to conduct a correlation analysis to link clinical effectiveness of corticosteroid for anhidrosis and changes in microarray analyses. The current study set the basis for in-depth dissection of mode-of-action of immunosuppressive drugs for the treatment of anhidrosis.

研究分野：発汗障害

キーワード：汗腺 細胞培養 無汗症

1. 研究開始当初の背景

1) 無汗症に対する治療薬の作用機序解明の必要性

特発性後天性全身性無汗症(AIGA)など発汗低下を伴う炎症性疾患では、高度な発汗障害が生じた場合に熱中症などにより生命維持が困難になることがある。自己免疫疾患的な要素があることが推察されており、治療には経験的に副腎皮質ステロイドの全身投与が行われ、一定の効果が得られる場合があるが、その作用機序に対する定説はない¹⁻³⁾。特に、AIGA では汗腺周囲に細胞浸潤が認めらなくとも薬剤が奏功する症例もあり^{4,5)}、免疫抑制作用以外に薬剤の汗腺への直接的な作用機序も想定される。このような難治性汗腺疾患に対する薬剤の作用機序を解明することは、治療法確立の観点からも重要である。そこでステロイドなど免疫抑制作用をもつ薬剤が汗腺を構成する細胞自体に何らかの直接的作用を有するのではないか？という「問い」をもつにいった。

2) ヒト汗腺細胞培養系確立の必要性

これまでの発汗障害を特徴とする疾患の研究では、専ら患者の病理標本を使用した免疫組織化学的検討が主体であった。不死化したヒト汗腺細胞株、NCL-SG3 を用いた培養系を用いた研究報告はあるが⁶⁾、この細胞が *in vivo* でのヒト汗腺細胞の特性をどの程度維持しているかについて検討は不十分である。マウスでは汗腺は掌蹠のみに限局し、精神性発汗が主体であるため、ヒトでみられる温熱性発汗の検討はマウス汗腺細胞では困難である。限られたヒト皮膚検体から効率的にヒト汗腺組織を単離し汗腺細胞を安定して培養する方法論を確立することは、薬剤の汗腺に対する作用を検証するうえで重要である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト皮膚組織由来汗腺細胞培養系を用いて、申請者らがこれまでに確立した汗腺細胞の解析技術⁷⁾を用いてステロイドをはじめとする免疫抑制作用を有する薬剤の汗腺細胞に対する直接的影響を、免疫学的特権 (immune privilege, IP) 関連分子の発現変化、アセチルコリンレセプターなどの神経伝達関連分子の発現変化、発汗機能の定量的解析をリードアウトとして用いて明らかにすることを目指す。次いで AIGA など免疫機序が関与すると想定されている発汗障害性疾患に対する薬剤の作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) ヒト汗腺細胞培養系の確立

まず薬剤添加がヒト汗腺細胞に与える影響を評価する実験系に必要な細胞数を確保する細胞培養系の確立を試みた。ヒト皮膚からマイクロセクション法で単離した汗腺を、ケラチノサイト培養培地とコラーゲンコートディッシュを用いたフィーダーフリーの培養系と、ヒト線維芽細胞をフィーダーとして用いた条件で培養した。

2) 培養操作による培養ヒト汗腺細胞の特性維持の検証

1) で得られた培養ヒト汗腺細胞が、継代培養を経た後も汗腺の特性を維持しているか否かを検証するため、CEACAM5、aquaporin 5(AQP5) や cholinergic receptor muscarinic 3(CHRM3)などの、いくつかの汗腺に関連する遺伝子発現を、リアルタイムPCR法を用いて検討した。

3) ステロイド添加による培養ヒト汗腺細胞への影響の検証

得られたフィーダーフリーの培養ヒト汗腺細胞が約 8 割程度のコンフルエントの状態

となった時点で副腎皮質ステロイド（以下ステロイド）を作用させた。添加 48 時間後に、CHRM3、AQP5 などの遺伝子の発現を、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。発現が変化した遺伝子をより網羅的に解析するため、同じくフィーダーフリーの条件下で、ステロイド添加ある・なしでヒト汗腺細胞を培養し total RNA を回収しマイクロアレイを作成し遺伝子発現プロファイルを検討した。

4) デジタル画像解析による免疫組織学的検査所見および発汗量の定量的測定の試み

実臨床において無汗症患者でのステロイドの発汗に対する作用を評価するには、ミノール法などヨードデンプン反応を用いるが、本法では定量的評価が困難である。培養系で得られた所見と臨床効果との相関を明確化するためには組織レベルでの汗腺関連分子の発現の変化と機能評価ツールとしての発汗量の定量的評価が重要となる。そこで、申請者らが行ってきた免疫組織学的手法とデジタル画像解析を改良し、特発性後天性全身性無汗症での汗腺・汗管における免疫学的特権因子を含めた汗腺関連分子の定量的発現解析を行うとともに、発汗試験の臨床写真のデジタル画像解析技術を用いた治療効果の定量的判定法を確立した。

4. 研究成果

1) ヒト汗腺細胞培養系の比較

フィーダー細胞のある・なしでヒト汗腺細胞の初代培養の確立の効率を比較検討した。初代培養の成功率はフリーの培養系では 42.9%であったが、フィーダー細胞を用いた培養系では 66.7%と高い確率で初回培養の確立が可能であった。また、後者では約 50%以上のラインで 5 継代程度まで汗腺細胞は高い増殖能を維持し、約 20%のラインで 10 継代まで増殖能を損なうことなく培養することが出来た。

しかし、フィーダー細胞を用いた培養系では、ヒト汗腺細胞とフィーダー細胞の分離が困難であった。そこで、線維芽細胞の細胞表面マーカーを用いてフィーダー細胞の分離を試みた。フローサイトメトリーによる解析では線維芽細胞マーカーなどを用いても二つの細胞群を明確に分離できなかった。

そこで、ケラチノサイト培養培地とコラーゲンコートディッシュを用いた培養法の改良に努め複数のフィーダーフリー培養ヒト汗腺細胞を得た。

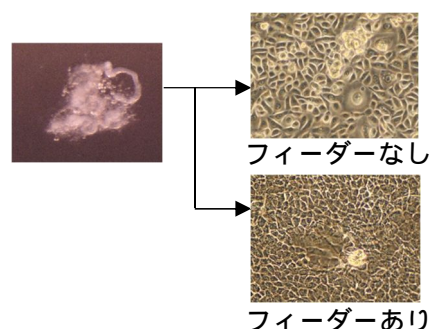


図1 ヒト汗腺細胞の単離、培養

2) 培養操作による培養ヒト汗腺細胞の特性維持の検証

リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、汗腺のバイオマーカーである AQP5 や CHRM3 は継代を重ねるにつれ発現が低下したが、CEACAM5 の発現は比較的保たれていた。

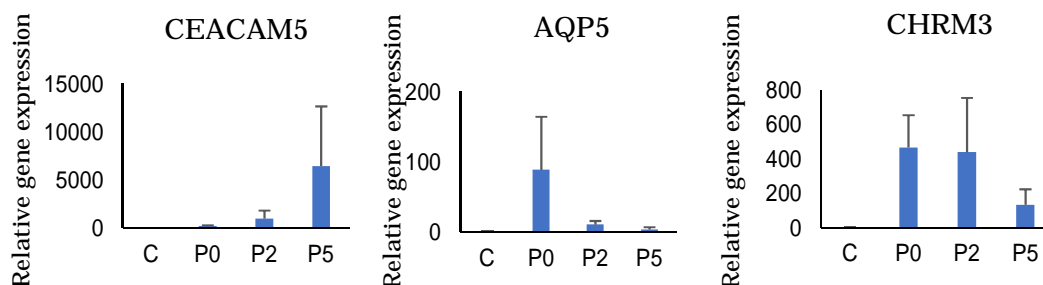


図2 リアルタイム PCR 法による培養ヒト汗腺細胞の継代による遺伝子発現変化の検証
フィーダー細胞ありの培養系での検討結果を示す。(C: control [keratinocyte])

3) ステロイド添加が与える培養ヒト汗腺細胞への影響の検討

得られたフィーダーフリー培養ヒト汗腺細胞にステロイドを試行的に作用させたところ AQP5 の発現が亢進し、CHRM3 の発現が低下したことより、本培養系にて薬剤がヒト汗腺細胞に与える影響を評価できる可能性が示唆された。

さらにステロイド添加あり・なしそれぞれの条件のヒト汗腺培養細胞からマイクロアレイ (Clariom S assay human, Applied Biosystems) を作成し遺伝子発現プロファイルを検討した。ステロイド添加により2倍以上発現が増強した遺伝子は55個同定され(図3) これらの遺伝子リストを用いた Gene ontology 解析では、ステロイド添加にて外的刺激やストレスに対する反応、刺激に対する細胞応答の多細胞個体のプロセスなどに関わる遺伝子の発現が亢進することが明らかとなり、免疫抑制作用薬がヒト汗腺の機能に直接的に影響する可能性が示唆された。

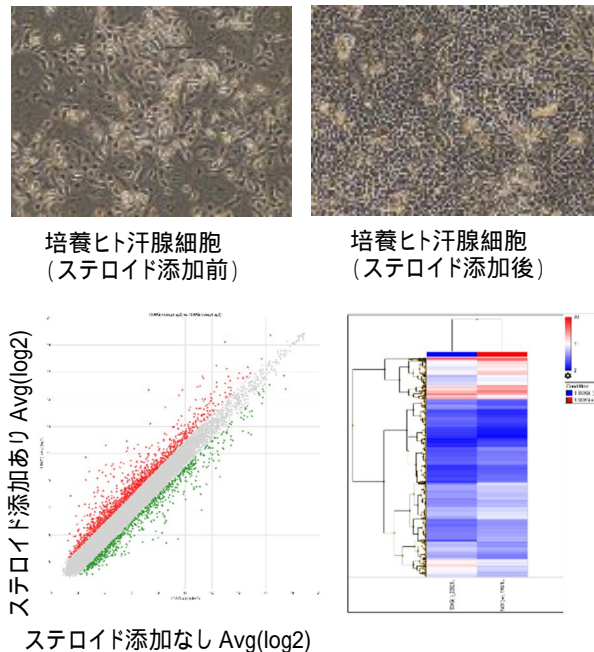


図3 ステロイド添加あり・なしの条件下における遺伝子発現の変化

4) デジタル画像解析による免疫組織学的検査所見および発汗量の定量的測定の試み

AIGA 患者と健常者の汗腺組織における汗腺関連マーカーの発現の定量的解析を確立するため、まず、申請者がこれまで確立してきた MHC class I や免疫抑制分子である macrophage migrating inhibitory hormone (MIF), alpha-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) などの IP 関連分子の発現様式を病理診断の残余ブロックを用いて免疫組織学的染色を行った後、image J を用いて染色の明度の数値化を試みた。温熱負荷後に汗管周囲性に炎症性細胞浸潤が明らかとなる inflammatory type の AIGA (infAIGA) 患者では、汗管における MHC class I の発現が upregulate され、反対に MIF, α-MSH の発現は downregulate されていることが示され、本手法を用いてマーカー発現の観点から汗腺組織の生物学的特性を把握できる可能性が示された。

さらに、発汗試験の臨床写真を image J を用いて 8bit-gray scale に変換し、二値化した後に、黒色に変化した面積と測定部位の平均明度を算出し、これらの積を sweating index と定義した。治療前後における sweating index の比をとることで、治療により変化した発汗量を improvement index として数値化することを試みた。その結果、AIGA 患者においては温熱負荷後の汗管周囲性の炎症の程度と sweating index が相関することを示すことができた。

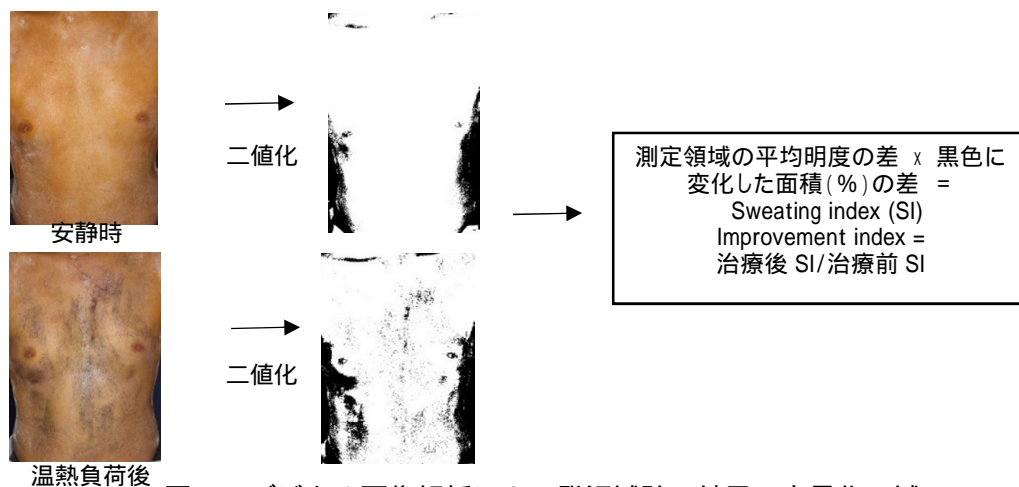


図4 デジタル画像解析による発汗試験の結果の定量化の試み

さらに、AIGA 症例において治療前後でこれらの分子発現が変化しているか否かを免疫組織学的染色により検討した。今回検討した infAIGA の症例では治療前と比較して MIF の発現の軽度増強がみられたが、他の因子の発現様式に変化はなかった。治療後も炎症反応がみられており、それが影響している可能性を考えた。

5 . 研究結果の解釈

ヒト皮膚検体を用いた実験系を用いて、副腎皮質ステロイドが汗腺に発現するケモカインやチャネル分子などの発現様式に影響を与えることを示すことができた。本研究では免疫抑制作用薬がヒト汗腺細胞に与える影響という臨床的に重要な問題の解明の一助となる方法論を培養細胞系と分子生物学的手法を用いて確立することができた。

参考文献：

- 1) T. Munetsugu, T. Fujimoto, Y. Oshima, K. Sano, H. Murota, T. Satoh, et al. Revised guideline for the diagnosis and treatment of acquired idiopathic generalized anhidrosis in Japan, J Dermatol 44 (2017) 394-400.
- 2) T. Satoh, Clinical Analysis and Management of Acquired Idiopathic Generalized Anhidrosis, Curr Probl Dermatol 51 (2016) 75-79.
- 3) Y. Ohshima, T. Yanagishita, K. Ito, Y. Tamada, N. Nishimura, Y. Inukai, et al. Treatment of patients with acquired idiopathic generalized anhidrosis, Br J Dermatol 168 (2013) 430-432.
- [4] Y. Ando, S. Fujii, N. Sakashita, M. Uchino, M. Ando, Acquired idiopathic generalized anhidrosis: clinical manifestations and histochemical studies, J Neurol Sci 132 (1995) 80-83.
- [5] K. Fujita, K. Hatta, Acquired generalized anhidrosis: review of the literature and report of a case with lymphocytic hidradenitis and sialadenitis successfully treated with cyclosporine, Dermatology 227 (2013) 270-277.
- [6] P Klaka, S Grudl, Banowski B, et al., A novel organotypic 3D sweat gland model with physiological functionality. PLoS One 12 (2017) e0182752
- [7] Y. Shimoda-Komatsu, Y. Yamazaki, A. Tsukashima, et al. Digital immunohistopathological dissection of immune privilege collapse in syngeneic autoimmune diseases: Implication for the pathogenesis: J Dermatol Sci 101 (2021) 30-39.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shimoda-Komatsu Yurie, Yamazaki Yoshimi, Tsukashima Aki, Kimishima Momoko, Ohyama Manabu	4. 巻 101
2. 論文標題 Digital immunohistological dissection of immune privilege collapse in syringotropic autoimmune diseases: Implication for the pathogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 30～39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.10.015	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 Shimoda-Komatsu Yurie, Yamazaki Yoshimi, Kimishima Momoko, Mizukawa Yoshiko, Ohyama Manabu	4. 巻 108
2. 論文標題 Clinicopathological digital image analyses before and after thermal stimulation subdivide acquired idiopathic generalized anhidrosis into inflammatory and non-inflammatory type	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 12～21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2022.10.001.	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 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yurie Shimoda, Yoshimi Yamazaki, Yoshiko Mizukawa, Manabu Ohyama
2. 発表標題 Inflammatory type of acquired idiopathic generalized anhidrosis is characterized by dysregulation of sweat gland immune privilege
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福山雅大, 下田由莉江, 塚島明希, 君島桃子, 山崎好美, 大山学
2. 発表標題 ヒト汗腺細胞の長期培養法確立の試み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022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
---------	---------