

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591642

研究課題名(和文)円形脱毛症に対するケモカイン、ケモカイン受容体阻害を介する新規治療戦略

研究課題名(英文)Strategy for the development of novel treatment for alopecia areata via chemokine and chemokine receptors

研究代表者

伊藤 泰介 (ITO, TAISUKE)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90293638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：円形脱毛症病変部の毛包周囲には著明なリンパ球浸潤が観察される。今回の実験を通して、その機序がTh1細胞、Tc1細胞の集合を誘引させるケモカインであるCXCL10が毛包周囲に強く発現し、また円形脱毛症ではそれに対する細胞走化性が亢進していることが明らかになった。急性期のみならず慢性期でもCD8陽性Tc1細胞が持続的に浸潤していた。この走化性を阻害することが治療につながると考えられるが、治療ガイドラインにて推奨されている抗ヒスタミン薬にその阻害効果がみられることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Prominent accumulation of lymphocytes is seen in the lesion of alopecia areata. These infiltrated cells are composed by Th1 and Tc1 cells. Th1 and Tc1 chemokine, such as CXCL10, is prominently expressed in hair bulbs of alopecia areata, and Th1 and Tc1 cells accumulate toward CXCL10 positive hair bulbs. The accumulation of CD8+ T cells is found not only acute phase of alopecia areata but also chronic phase of alopecia areata lesions. Inhibition of chemotaxis against CXCL10 can be new candidate of the treatment of alopecia areata. The Japanese guideline of alopecia areata suggests anti histaminic drugs. In this study, we reported that anti-histaminic drugs possess anti-chemotactic effects.

研究分野：医歯薬類

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症の病態として、毛包由来の自己抗原に対する細胞障害性 T 細胞 (CTL) の自己免疫反応により、アポトーシスが誘導され、脱毛症状がおきる。病理学的には毛包周囲に著明な細胞浸潤が観察され、いわゆる *swarm of bees* を称されている。なぜ円形脱毛症の病変部毛包周囲に細胞浸潤がおきるのか詳しい理由は不明であった。

2. 研究の目的

円形脱毛症病変部の毛包周囲への細胞浸潤を抑制することによって治療的な効果を上げることが示唆される。そのため、この細胞浸潤の機序について細胞走化性の面から検討することとした。また走化性を阻害するものについても検討することで、将来の治療開発につながるものと考えた。

3. 研究の方法

(1) 検体：

7名の健常ボランティア、7名の急性期円形脱毛症患者、7名の慢性期円形脱毛症患者

(2) ヒト末梢血単核球の分離：

Ficoll 分離液を用いてヒト末梢血より単核球を分離採取した。

(3) ヒト頭皮組織

3名の急性期、3名の慢性期円形脱毛

症患者、健常者から皮膚組織を採取した。

(4) 皮膚浸潤細胞の採取：

得られた皮膚検体から浸潤リンパ球を採取するため、3mm パンチバイオプシーで採取した組織を4分割し IL-2、抗 CD3/CD28 抗体がコートしたマイクロビーズで7日間培養した。8日目に細胞を採取し、フローサイトメーターにて解析した。

(5) フローサイトメーター解析：

分離したリンパ球の表面抗原を解析した。

(6) 免疫組織化学的検討：

頭皮切片にて CXCL10、CCL17、TARC、CXCR3、CCR4、CD4、CD8、CXCR3、CCR4 について染色を行った。最後に AEC にて発色した。

(7) RT-PCR、real-time RT-PCR
CXCL10 の発現量を確認

(8) リアルタイム細胞走化性検討

リアルタイムに細胞走化性を観察するため、EZ-Taxiscan を利用した。

(9) F-actin 重合の検討

末梢血リンパ球について Cytotfix/Cytoperm 処理で穴をあけ、FITC 標識 Phalloidin の細胞内染色を行った。

(10) オロパタジン塩酸塩の細胞走化性に対する影響の検討

末梢血リンパ球をオロパタジンと8

時間、共培養を行い、採取した後、CXCL10、CCL17 に対する細胞走化性について検討した。

(11) オロパタジン塩酸塩の CXCR3 発現への影響の検討

オロパタジン塩酸塩と共培養した末梢血リンパ球とコントロール群での CXCR3 発現の変化について検討した。

(12) オロパタジン塩酸塩の細胞内 Ca 濃度への影響の検討

(13) F-actin 重合への影響

オロパタジン塩酸塩で共培養したときの細胞内 phalloidin 発現についてフローサイトメーターで検討し、その発現の変化についてコントロール群と比較検討した。

4. 研究成果

(1) CXCR3+CD4+ 細胞、CXCR3+CD8+細胞は円形脱毛症急性期において高頻度である。

(2) Mean intensity
CXCR3、CCR4 の発現における Mean intensity について検討した所、急性期円形脱毛症では CXCR3、CCR4 の M.I.が慢性期や健常比較群と比較して有意に高値であった。

(3) 急性期では Th1、Tc1 細胞が毛包周囲へ著明に浸潤していた。慢性期においても Tc1 は持続的に浸潤していた。比較群では毛包周囲への細胞浸潤は極めて稀であった。

図3 毛包周囲への細胞浸潤比較

(4) 組織浸潤細胞の CXCR3、CCR4 発現の検討

急性期皮膚病変部から採取した細胞では CXCR3+CD4+ 細胞、CXCR3+CD8+ が、同じ患者の PBMCs と比較してより高頻度であった。CCR4+CD4+細胞、CCR4+CD8+細胞はPBMCsと比較しても増加はみられなかった。

(5) 病変部での CXCL10 発現

円形脱毛症では CXCL10 が免疫組織化学的検討や mRNA 発現において、健常皮膚と比較して有意に高発現していた。

(6) 急性期円形脱毛症の PBMCs は CXCL10 に対する走化性が亢進している。

EZ-TAXIScan により CXCL10、CCL17 に対する走化性について検討した所、急性期 PBMCs は CXCL10 に対して、健常比較群と比較してより早く直線的に遊走することが観察された。

(7) オロパタジン塩酸塩による走化性阻害効果

オロパタジン塩酸塩で共培養した CD4 陽性の PBMCs は CXCL10 に対する遊走性について抑制効果を示した。

(8) オロパタジン塩酸塩による CXCR3 発現の抑制

オロパタジン塩酸塩と共培養した

PBMCs では CXCR3 発現が有意に抑制されていた。

(9) アクチン重合抑制

オロパタジン塩酸塩と共培養した PBMCs における細胞内 Phalloidin 発現は、健常比較群と比較して抑制されていた。

(10) 細胞内 Ca 濃度の変化

オロパタジンではその上昇が抑制されていた。

5. 主な論文発表等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ito T, Recent advances in the pathogenesis of autoimmune hair loss disease alopecia areata, Clin Dev Immunol, 査読有, 2013, 2013, 348546. doi: 10.1155/2013/348546.
- ② Ito T, Bertolini M, Funakoshi A, Ito N, Takayama T, Biro T, Paus R, Tokura Y, Birth, life, and death of the MAGE3 hypothesis of alopecia areata pathobiology, J Dermatol Sci, 査読有, 2013, 72, 327-330, DOI:10.1016/j.jdermsci.2013.07.014.
- ③ Ito T, Shimada S, Mori T, Tokura Y. Alopecia areata possibly induced by autoimmune reaction in a patient with human T-cell lymphotropic virus-1-associated myelopathy, J Dermatol, 再読有, 2013, 40, 399-401, DOI:

10.1111/1346-8138.12128.

- ④ Ito T, Fujiyama T, Hashizume H, Tokura Y, Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CXCL10 by reducing CXCR3 expression, F-actin polymerization and calcium influx in patients with alopecia areata, J Dermatol Sci, 査読有, 2013, 72, 68-71, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.029
 - ⑤ Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y, CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase, J Dermatol Sci, 査読有, 2013, 69, 140-147, DOI:
 - ⑥ Ito T, Tokura Y. Alopecia areata triggered or exacerbated by swine flu virus infection. J Dermatol, 再読有, 2012, 39, 863-864, DOI: 10.1111/j.1346-8138.2011.01437.x. 10.1016/j.jdermsci.2012.12.003.
 - ⑦ Ito T, Advances in the management of alopecia areata, J Dermatol, 査読有, 2012, 39, 11-17, doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01476.x.
- [学会発表] (計 14 件)

- ① Ito T, Hashizume H, Takigawa M, Tokura Y. Analysis of antigen-specific CTL to melanin-associated protein in the patients with recalcitrant alopecia areata. The 75th Annual meeting of Society for Investigative Dermatology, Phenix, Arizona USA. May 4-7, 2011 Poster presentation
- ② Ito T, Sakabe J, Hirakawa S, Tokura Y. Semaphorin 3A modified murine hair cycle via mast cell infiltration/activation. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Dec. 9-10, 2011 Oral presentation 2011.9.7-10
- ③ 伊藤泰介：円形脱毛症診療ガイドライン2010の見方
AGA EXPERT MEETING 2011.
2011.11.12-13 東京 招待講演
- ④ 伊藤泰介：Trichoimmunology. 第5回宮城皮膚疾患懇話会.
2011.6.30 仙台市 招待講演
- ⑤ 伊藤泰介：円形脱毛症の病態
第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会 2011.2.11 東京 招待講演
- ⑥ 伊藤泰介、平川聡史、戸倉新樹.
円形脱毛症のTリンパ球細胞走化性に対するオロパタジン塩酸塩の影響. 毛髪科学研究会.
2011. 11. 26 東京
- ⑦ 第111回日本皮膚科学会総会
2012. 6. 2 京都市 教育講演18
円形脱毛症診療ガイドラインの見方と今後の発展
- ⑧ 第11回皮膚科EBMフォーラム
平成24年7月7日 ルネッサンス札幌ホテルB1F ボールルーム
リンパ球走化性に対する抗アレルギー薬の影響
- ⑨ 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
2012年7月15日 シンポジウム
2 円形脱毛症の新規治療法
軽井沢プリンスホテルウエスト
- ⑩ AGA Expert Meeting in 東海
AGA/円形脱毛症ガイドライン
2010の見方 2012. 9. 1 キャッスルプラザホテル4階 山吹(名古屋市)
- ⑪ 静岡県保険医協会西部支部研究会
会脱毛症 基礎と臨床 upto date 2012. 9. 11 アクトシティ
浜松研修交流センター6階 62
研修交流室
- ⑫ The 10th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology The Pacific Harbor and Hotel Clement A case of trichorhinophalangeal syndrome.
Taisuke Ito, Tomomi Yokomatsu, Yutaka Shimomura, Yoshiki Tokura

Dec. 7, 2012

- ⑬ CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase. Taisuke Ito, Hideo Hashizume, Natsuho Ito, Atsuko Funakoshi, Takatoshi Shimauchi, Satoshi Hirakawa, and Yoshiki Tokura European Society for Dermatological Science 2012.9.19-22 Venetia, Italy

- ⑭ 2013.5.25 Korean Hair Research Society ソウル、韓国 Recent advances in the pathogenesis of alopecia areata 招待講演

図書[計7件]

- ① 伊藤泰介 皮膚科臨床アセット 脱毛症治療の新戦略6 坪井良治 編集 13 円形脱毛症の病態 2011.8
- ② 伊藤泰介. 毛の構造と機能 毛に関する基本用語を解説してください。皮膚臨床 臨時増刊号 53:1481-1484, 2011
- ③ 伊藤泰介. 毛の異常 連珠毛など毛の形態異常について臨床症状と原因を教えてください。皮膚臨床 臨時増刊号 53:1503-1507, 2011

- ④ 伊藤泰介. 脱毛症 円形脱毛症において甲状腺の検査は必要ですか? 円形脱毛症の病態について現在の考え方を教えてください。皮膚臨床 臨時増刊号 53:1524-1528, 2011

- ⑤ 伊藤泰介. 円形脱毛症で白毛が残るわけ. p100 WHAT'S NEW in 皮膚科学2012-2013 宮地良樹編 2012. 2. メディカルレビュー社 (東京)

- ⑥ 伊藤泰介 円形脱毛症と思うが? p 8 Common disease から入る皮膚疾患 土田哲也編 2012. 2 文光堂 (東京)

- ⑦ 伊藤泰介 脱毛症研究の新知見 円形脱毛症. P 19-24 Derma update-最新知見と臨床の実際 編 大山 学 2012. 3

[産業財産権]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 泰介 (ITO Taisuke)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90293638

(2) 研究分担者

なし