

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659182

研究課題名(和文) 樹状細胞を用いた尋常性白斑の特異的治療法の開発

研究課題名(英文) Specific vitiligo vulgaris treatment with dendritic cells

研究代表者

山崎 小百合 (Yamazaki, Sayuri)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70567255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性白斑は進行性に全身に白斑が拡大する疾患で、皮膚の色素産生細胞であるメラノサイトに対する自己免疫反応が一因とされている。世界人口の約0.5-1%が罹患し、難治であり、新しい有効な治療法開発が望まれている。研究代表者は、樹状細胞で抗原特異的な制御性T細胞が増殖誘導できる事を示してきた。研究代表者がこれまでにマウスを用いて確立した方法を応用し、ヒトの細胞を使用してメラノサイト特異的制御性T細胞の増殖の方法を確立する事を目指した。ヒトの制御性T細胞、樹状細胞の採取条件を決定した。樹状細胞と制御性T細胞を培養する事で抑制能の強い制御性T細胞分画を増殖できる、というデータを得て、研究中である。

研究成果の概要(英文)：Vitiligo vulgaris is a skin disorder that develops white spots and affects about 0.5-1% of world population. Pathogenesis of vitiligo vulgaris is partly by autoimmune reaction to melanocytes. Patients often suffer systemic white spots that are not responded by treatment. We previously showed that dendritic cells can expand antigen specific regulatory T cells in mice. To develop a new therapy for vitiligo vulgaris, we have extended our previous work to human, and tried to establish a method to induce melanocyte-specific regulatory T cells using dendritic cells. We established the methods to purify dendritic cells and regulatory T cells from human peripheral blood and skin. Preliminary data showed that co-culture with dendritic cells and regulatory T cells expand a fraction of regulatory T cells with strong suppressive activity. We are further investigating these results.

研究分野：実験病理

科研費の分科・細目：細胞

キーワード：樹状細胞 制御性T細胞 尋常性白斑 皮膚 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑は進行性に全身に白斑が拡大する疾患で、皮膚の色素産生細胞であるメラノサイトに対する自己免疫反応が一因とされている。世界人口の約0.5-1%もが罹患し、大変難治であり、新しい有効な治療法開発が望まれている。

制御性細胞は、末梢の CD4<sup>+</sup>リンパ球の5-10%を占める自己免疫反応を抑制する亜集団として発見された。制御性 T 細胞は CD25(IL-2 レセプター $\alpha$ 鎖)と転写因子 Foxp3 を発現する。制御性 T 細胞が癌に対する免疫も抑制している事 (Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. *J Immunol* 1999)、制御性細胞の抑制を解除する GITR の操作にて有効な抗腫瘍免疫が誘導できる事を世界に先駆けて報告した (Shimizu J\*, Yamazaki S\* et al. *Nature Immunol* 2002. \* Equally contributed first author ; Ko K, Yamazaki S et al. *J Exp Med* 2005)。現在では、制御性 T 細胞は自己免疫と癌免疫に加え、移植免疫、感染症に対する免疫、アレルギー、動脈硬化やメタボリックシンドロームを含む慢性炎症をも抑制する事が明らかになっている。

研究代表者は、樹状細胞を発見した功績で 2011 年にノーベル医学賞を受賞した Ralph Steinman 教授とともに、樹状細胞で抗原特異的な制御性 T 細胞が増殖誘導できる事を示してきた (Yamazaki S et al. *J Exp Med* 2003)。増殖誘導した制御性 T 細胞は、マウスにおける 1 型糖尿病や GVHD を抗原特異的に抑制した(Tarbell K, Yamazaki S et al *J Exp Med* 2004; Yamazaki S et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006)。

しかし、ヒトにおいて樹状細胞が抗原特異的な制御性 T 細胞を誘導できるかどうか、は明らかでない。研究代表者がこれま

でマウスを用いて確立した方法を応用し、ヒトの細胞を使用してメラノサイト特異的制御性 T 細胞の増殖の方法を本研究で確立する事を目指した。

自己免疫疾患や移植等に使用されている免疫抑制療法は、免疫を全般に抑制してしまう。実際、既に米国で 1 型糖尿病や骨髄移植に制御性 T 細胞の投与の臨床試験が始まっている。しかし、非特異的に増殖させた制御性 T 細胞を使用しており、感染症や発癌などの合併症の可能性が否定できない。本研究が成功すれば、ヒトの樹状細胞と制御性 T 細胞にて抗原特異的な治療ができる可能性を世界で最初に示す事になる。尋常性白斑は罹患人口が多く、慢性に続き非常に難治である。有効に特異的に治療する事ができれば有意義であり世界的に多くの患者様の QOL を改善できる。

## 2. 研究の目的

ステロイド等他の免疫抑制療法が免疫反応全体を抑制するのに比し、ヒトの制御性 T 細胞を使用しメラノサイト特異的な免疫反応の抑制を目指す。”生体に有用な免疫を抑制せずに、有害な免疫のみを抑制する”事を目指す。

樹状細胞を駆使してメラノサイト特異的制御性 T 細胞を増殖する方法の開発のため、ヒトの細胞を使用し下記を行う事を目的とした。

(1) 樹状細胞によるメラノサイト抗原特異的ヒト制御性 T 細胞の試験管内増殖条件の設定

ヒトの樹状細胞、制御性 T 細胞の採取方法を確立し、抗原を提示させて培養する事で抗原特異的制御性 T 細胞の誘導を試みる事を目的とした。

(2) (1)で増殖したメラノサイト抗原特異的ヒト制御性 T 細胞の抑制能の検討

ヒトにおける樹状細胞を利用した抗原特異的制御性 T 細胞の誘導法の確立をメラノサイト抗原を使用し、尋常性白斑をターゲットとして目指した。

### 3. 研究の方法

名古屋市立大学大学院医学研究科倫理委員会による承認の上、行った。

(1) 樹状細胞によるメラノサイト抗原特異的ヒト制御性 T 細胞の試験管内増殖条件の設定

#### A. 末梢血液からの樹状細胞の誘導

樹状細胞を発見し今年ノーベル賞を受賞した Steinman 研究室のプロトコルに従い、ヒト末梢血液 CD14<sup>+</sup>細胞より樹状細胞を誘導した。MACS CD14beads を使用し CD14<sup>+</sup>細胞を分離し、recombinant IL-4 と GM-CSF にて培養した。4-5 日培養後に未熟な樹状細胞が分化しクラスターを形成した。分化樹状細胞を CD11c, CD86, HLADR, CD83 などの表面マーカーで染色し、樹状細胞である事を確認した。

さらに、末梢血液に存在する樹状細胞サブセットの解析も CD11c, HLA-DR, BDCA-1, BDCA-3 などの染色にて行った。

#### B. 末梢血液からの制御性 T 細胞の分離

末梢血液よりファイコールで PBMC を分離、CD14<sup>+</sup>分画より CD4beads を使用して、AutoMACS にて CD4<sup>+</sup>T 細胞を採取した。CD4<sup>+</sup>T 細胞を CD25, CD127 で染色し、CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> sorting または Milteny の CD127<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞分離キットを用いて CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞を制御性 T 細胞として採取した。

#### C. ヒト皮膚の樹状細胞サブセットの解析

手術サンプルより余ったヒト皮膚を 4mm またはそれ以下に裁断し、MACS gentle homogenizer を使用し、皮膚の digestion を行った。Over night 4 度や 37 度

などの条件設定を行った。回収した皮膚の digestion サンプルを flow cytometer で解析した。

#### D. メラノサイト抗原を提示する樹状細胞による制御性 T 細胞の増殖の検討

メラノサイト抗原として、メラノーマとの共通抗原 PepTivator (11 アミノ酸ずつオーバーラップする 15-mer のペプチド) の gp100/Pmel17, Melan-1, tyrosinase の mix を使用した。抗原ペプチド存在下、樹状細胞と制御性 T 細胞を共に培養し、増殖を検討した。

またメラノーマとメラノサイト共通抗原がある事に着目し、メラノーマに浸潤している制御性 T 細胞も flow cytometer で解析した。

(2) (1)で増殖したメラノサイト抗原特異的制御性 T 細胞の抑制能の検討

#### A. in vitro suppression assay における抑制能の検討

Responder T 細胞として末梢血液の CD25-CD4<sup>+</sup>T 細胞を CFSE でラベルし、制御性 T 細胞を加える事でその分裂が阻害するかを検討する、in vitro suppression assay をセットアップした。

#### B. 免疫不全マウスの生体内における抑制能の検討

免疫不全マウスにメラノサイトやヒト皮膚を移植するモデルマウスを使用する。マウスに皮膚移植をする方法を習熟し、セットアップを行った。

### 4. 研究成果

(1) 樹状細胞によるメラノサイト抗原特異的ヒト制御性 T 細胞の試験管内増殖条件の設定

正常人、及び、尋常性白斑の患者様の制御性 T 細胞、樹状細胞の分離、採取方法は設定でき、試験管内の樹状細胞の誘導方法

も設定された。

尋常性白斑の皮膚からの樹状細胞サブセットの解析も行った。CD11c, HLA-DR, CD1a, BDCA-1, BDCA-3 による染色で、各種サブセットを確認できた。しかし、細胞の数が少なく、培養には使用できなかった。

末梢血液中のある樹状細胞サブセットを使用することで、Foxp3<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞の制御性 T 細胞を増殖できるという予備データを得た。現在、この樹状細胞サブセットによる Foxp3<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖をさらに解析している。

また、メラノーマの腫瘍内に浸潤している制御性 T 細胞のフェノタイプの解析を行い、あるマーカーをもった制御性 T 細胞が特異的に免疫を抑制している可能性が示唆された。今後、症例を重ねて検討する予定である。

(2) (1)で増殖したメラノサイト抗原特異的制御性 T 細胞の抑制能の検討

ポリクローナルな刺激で制御性 T 細胞がエフェクター T 細胞の増殖を抑制する系はセットアップできた。メラノサイト抗原特異的な抑制能の検討は困難であったため、より簡易な現在アロ抗原を用いて条件検討中である。

免疫不全マウスに移植したヒトの細胞による生体内における抑制能の検討のため、皮膚移植に修練した。今後、ヒトの皮膚移植をした免疫不全マウスにアロのエフェクター T 細胞とアロ抗原特異的制御性 T 細胞を移入し抑制能力を検討する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

(英文)

1. Neubert K, Lehmann C, Heger L, Baranska A, Staedtler A, Buchholz V, Yamazaki S, Heidkamp G, Eissing N, Zebroski H, Nussenzweig M, Nimmerjahn F, Dudziak D. Antigen delivery to CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> dendritic cells induces protective immune response against experimental melanoma in mice in vivo  
*J Immunol* 2014 in press  
(査読あり) 10.4049/jimmunol.1300975
2. Yamazaki S#, Morita A. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific Natural and Induced regulatory T cells  
*Frontier Immunol* 2013; 4: article 151, 1-13. #Corresponding author  
(査読あり) 10.3389/fimmu.2013.00151.
3. Furuhashi T, Saito C, Torii T, Nishida E, Yamazaki S, Morita A. Photo(chemo)therapy reduces circulating Th17 cells and restores circulating regulatory T cells in psoriasis  
*PLoSOne* 2013;8: e54895. 1-9.  
(査読あり) 10.1371/journal.pone.0054895.
4. Yamazaki S#, Maruyama A, Okada K, Matsumoto M, Morita A, Seya T. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells upon antigen stimulation  
*PLoSOne* 2012; 7: e51665. 1-10.  
#Corresponding author  
(査読あり) 10.1371/journal.pone.0051665.

- (和文)
5. **山崎小百合、森田明理**  
自己免疫疾患と制御性 T 細胞  
接触皮膚炎  
Medical Practice 2014;臨時増刊  
号:243-245  
(査読なし、招待執筆)
  6. **山崎小百合、森田明理**  
自己免疫疾患と制御性 T 細胞  
**医学のあゆみ** 2013;246:887-892  
(査読なし、招待執筆)
  7. **山崎小百合**  
医師として研究をつづけ臨床応用  
を目指せ～ノーベル賞を受賞した  
ボスからのメッセージ  
日本皮膚科学会雑誌  
2013;123:2449-2451  
(査読なし、招待執筆)
- [学会発表](計 11 件)
1. **Yamazaki S**, Nishioka A, Kasuya S,  
Taguchi O, Morita A  
Homeostasis of thymus-derived  
Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is controlled  
by ultraviolet B exposure in the skin  
Society for Investigative Dermatology  
2014  
Albuquerque, USA May 7-10, 2014
  2. **山崎小百合**  
リンパ球の働き、特に制御性 T 細胞  
について  
第 113 回日本皮膚科学会総会  
京都 2014.5.31
  3. **山崎小百合、西岡明子、粕谷沙織、  
田口修、森田明理**  
皮膚における制御性 T 細胞のホメ  
オスタシスの研究  
第 113 回日本皮膚科学会総会  
京都 2014.5.31
  4. **Yamazaki S**, Morita A  
Antigen-presenting dendritic cells  
maintain immunological tolerance in  
the oral cavity by inducing Foxp3<sup>+</sup>  
regulatory T cells  
International Investigative  
Dermatology 2013  
Edinburgh, UK, May7-10, 2013
  5. **山崎小百合**  
医師として研究をつづけ臨床応用  
を目指せ～ノーベル賞を受賞した  
ボスからのメッセージ  
第 112 回日本皮膚科学会総会  
横浜 2013.6.14
  6. **Yamazaki S**  
The role of dendritic cells in  
regulation of antigen specific Foxp3<sup>+</sup>  
regulatory T cells  
岐阜大学大学院医学研究科皮膚科  
学セミナー  
岐阜 2013.3.12
  7. **山崎小百合**  
免疫反応の制御で皮膚疾患の治療  
を目指す～制御性 T 細胞により誘導  
された制御性 T 細胞の利用  
第 262 回日本皮膚科学会東海地方  
会平成 24 年度生涯教育講演会  
名古屋 2012.12.2
  8. **山崎小百合**  
免疫反応の制御で皮膚疾患の治療  
を目指す～制御性 T 細胞により誘導  
された制御性 T 細胞の利用  
星薬科大学 201.11.11 認定薬剤師講  
演会
  9. **Yamazaki S**

The role of dendritic cells in regulation of antigen specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.  
Master in Advance Biotechnology for Health and Life Science  
Laboratory of Immunology and Biotherapy, Department of Human Pathology, University of Messina, Italy, March 23-24, 2012

10. **Yamazaki S**

The role of dendritic cells in regulation of antigen specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells  
獨協医科大学解剖学免疫学合同第10回樹状細胞免疫学セミナー 栃木 2012.1.25

11. **Yamazaki S**

The role of dendritic cells in regulation of antigen specific Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells  
北里大学医学部免疫学第1回免疫学セミナー 相模原 2012.2.15

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/derma.dj/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 小百合 (Sayuri Yamazaki)

(名古屋市立大学大学院医学研究科加齢環境皮膚科学)

研究者番号：70567255

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし