

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10154

研究課題名(和文)自己免疫性白斑に於けるT細胞アナジー破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis for melanocyte-specific T cells anergy system in autoimmune vitiligo

研究代表者

種村 篤(Tanemura, Atsushi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50457016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は自己免疫性白斑症例末梢血に於ける、メラノサイト特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の増加に加えその機能解析の一つとして、制御性T細胞機能の破綻を証明するため、上記2細胞分画を単離し共培養を行い細胞分裂の程度を解析した。その結果、健康人に比べ有意に白斑患者末梢血でCD8<sup>+</sup>T細胞の分裂が維持されており、制御性T細胞の抑制機能が白斑症例で破綻していることを証明した。一方、制御性T細胞を含めた各種T細胞分画の比率・数は変化していなかった。現在白斑皮膚からIFN- $\gamma$ 産生CTLの単離に成功しており、その単細胞網羅解析にて表現型の同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白斑の病態は未だ完全に解明されておらず、本研究によりメラノサイトに対する自己免疫応答をキーワードとした病態の一端を実際の白斑症例を用いた実験で証明した。本研究のようにメラノサイト障害性T細胞を制御する制御性T細胞の機能に着目した研究はこれまで数少なく、今後白斑の新規創薬ターゲットになる可能性を示したことは、学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the T cell anergy status of melanocytes by focusing on the impaired equivalence of peripheral melanocyte-specific cytotoxic T cells and functional Tregs in patients with progressive vitiligo. The functional Tregs fraction and Melan-A-specific CD8<sup>+</sup>T cells were simultaneously purified and co-cultured each other. The number of Melan-A-specific CD8<sup>+</sup>T cells was then counted by FACS. As results, we demonstrated a reduced suppressive function of activated Tregs on Melan-A-specific CTLs in the circulating cells of vitiligo patients compared with healthy controls. This result suggests that T cell anergy with Tregs dysfunction may participate in the immune response to melanocytes in vitiligo patients. In contrast, there was no significant difference of the number and T cells subsets proportion between vitiligo and healthy circulating cells, therefore, we attempt to examine the specific phenotype of IFN- $\gamma$  producing CTLs in vitiligo skin lesion.

研究分野：白斑

キーワード：白斑 自己免疫 メラノサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑は何らかの原因でメラノサイト(色素細胞)が減少・消失し、全身至る部位に脱色素斑を生じる後天性色素異常皮膚疾患であり、人種に左右されず約1%が侵される疾患である。白斑の中でも全身に多発する汎発型尋常性白斑の発症機序は未だ解明されていない。これまで提唱されている白斑の病因論として、遺伝学的背景をもとに大きく2つ影響因子が考えられており、一つは白斑患者でのメラノサイト自身が脆弱であり酸化ストレスなどの内因性・外因性ストレスにより自己消失する機序である。もう一つは、メラノサイトを標的とした自己免疫応答を生じ、メラノサイトが破壊される免疫応答を介した機序である。これら2つの柱が複合的に関連し発症することが考えられている。本研究では、メラノサイトに対する極めてユニークな自己免疫応答の解明に注力した。

### 2. 研究の目的

汎発性白斑症例に於ける免疫担当細胞の末梢血と病変皮膚局所での細胞性・液性免疫応答を網羅的に解析したい。特に、制御性T細胞を分画化し、メラノサイト特異的細胞傷害性免疫に対する抑制状態を経時的に明らかにする。同時に、免疫チェックポイント分子群の発現と機能の関連を評価する。その結果を白斑症例の病勢・重症度と照合させ相関をみる。白斑治療による免疫バランスの変化・是正効果を評価することにより、最終的に現在の白斑治療ガイドラインに科学的な裏付けとなるエビデンスを提供する目的である。

### 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。

#### クエスチョン1：メラノサイト特異的CD8T細胞のアナジーが白斑で破綻しているか

メラノサイト特異的CD8T細胞を同定し、健常人と比較する：HLA-A02もしくは24拘束性メラノソーム蛋白の一つであるMelanAペプチドに対するテトラマー法にて同定する。

これにより色素細胞への細胞傷害性を定量化出来る。

さらに、以下フローサイトメトリーで展開し、T細胞活性機能を評価する。

- ・CCR4/CD45RA(エフェクター表現型)
- ・TNF- $\alpha$ /IL-2/IFN- $\gamma$ (サイトカイン産生能)
- ・Granzyme A.B/perforin(細胞傷害能)

これらの細胞数および細胞機能評価を、特に活動性の高い白斑患者及び健常コントロールの末梢血に加え、白斑病変皮膚検体両面に於いて検討する。

#### クエスチョン2：制御性T細胞が自己メラノサイトに対する免疫応答の調節に如何に関わっているのか？

次に、制御性T細胞がメラノサイト特異的自己免疫寛容にどのように作用影響しているか？十分機能しているか？を以下の方法で評価し回答を導く。

Tregの単離およびヒト制御性T細胞の機能分画化を行い、特に分画2(activated Treg, Foxp3(hi)CD45RA(low))での抑制機能を解析する。

- ・TGF- $\beta$ , IL-10, Ki67(サイトカイン産生能・分裂能)
- ・MelanA特異的CD8細胞とTregを共培養し、抑制活性を測定する(CFSE, サイトカイン定量)

さらに、末梢血だけでなく病変皮膚浸潤リンパ球 (Skin infiltrating lymphocyte) でも病理組織学的に観察する。Gentle MACS/Auto MACS を用いた組み合わせソーティングにより、少数の浸潤炎症細胞を生きた状態で単離し機能アッセイに繋げる。

クエスチョン3：エフェクターT細胞（クエスチョン1で解析したT細胞）・制御性T細胞、両細胞群での免疫チェックポイント分子の発現が機能面で関与しているか？エフェクターT細胞での受容体レパトア発現との相関が白斑でどのように変容しているか？

クエスチョン1で単離した MelanA 特異的 T 細胞をエフェクター表現型により分離後、各分画に於ける CTLA-4, PD-1, LAG3, Tim3 など様々な免疫チェックポイント分子の発現をフローサイトメトリーにて解析する。また、T 細胞受容体レパトアの網羅的解析と上述の免疫チェックポイント分子の発現解析を同時採取した末梢血を用いて行うことで、それぞれの相関を検証する。

#### 4．研究成果

- ・汎発型尋常性白斑症例より末梢血を採取し、メラノサイト抗原の一つである MelanA に対する特異的 CD8 T 細胞を分離する技術を習熟した。

- ・分離した MelanA 特異的 CD8 T 細胞での免疫チェックポイント分子 (PD-1, CTLA-4, LAG-3 など) および CCR7/CD45RO 発現を解析し、白斑症例の末梢血でメラノサイトに対する障害性細胞の活性化状態が更新していることを明らかにした。また、アナジーに陥った CCR7<sup>+</sup> CTLA-4<sup>+</sup> MelanA 特異的 T 細胞が白斑症例の末梢血で減少しており、T 細胞免疫アナジーが破綻していることが示唆された。

- ・同時に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 制御性 T 細胞も同時に単離後、これらを *in vitro* 共培養するシステムを構築し、健常者に比べ CD8 T 細胞の増殖抑制効果が低下していることを明らかにした。つまり、機能的にも抗原特異的 T 細胞免疫の抑制出来ないことを実証した。

- ・さらに末梢血解析の一環として、健常人 (n=7) と進行性白斑症例 (n=7) の末梢血を採取し CyTOF 法を用いて網羅的にリンパ球プロファイルの差異を調べた。その結果、エフェクター・メモリー・ナイーブ T 細胞、制御性 T 細胞など多岐に渡るリンパ球数に有意な差がみられなかった。このことより、白斑皮膚に局在するリンパ球での病的意義を探る必要性が示唆された。

- ・次に、生細胞として皮膚局在 T 細胞 (レジデント T 細胞) に注目し、最近自己免疫性白斑に機能しているといわれる CD49a<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8 T 細胞の単離を試み、現在 5x10<sup>3</sup> 細胞の単離に成功している。今後この単離細胞の表現型を単細胞レベルで解析し、メラノサイト向性を免疫学的に証明する予定である。

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 1件）

1. 著者名 Tanemura A, Yang L, Katayama I	4. 巻 8
2. 論文標題 Dysregulation of circular antigen-specific T cells anergy in autoimmune vitiligo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cosmetics Dermatological Sciences and Applications	6. 最初と最後の頁 133-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Lingli Yang, Atsushi Tanemura, Kenichi Kato, Ichiro Katayama, Takayoshi Morita, Tomoka Iida, Atsushi Tanaka, Shimon Sakaguchi
2. 発表標題 Dysregulation of circulating T cells anergy might be involved in autoimmune disorder of vitiligo
3. 学会等名 Vitiligo International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2016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
---------------------------	-----------------------	----