

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19708

研究課題名(和文) 円形脱毛症に対する局所免疫療法におけるT細胞と皮膚樹状細胞の役割

研究課題名(英文) Investigation of the roles of T cells and dermal dendritic cells in topical immunotherapy for alopecia areata

研究代表者

夏秋 洋平 (NATSUAKI, Yohei)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40389309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：円形脱毛症に対する局所免疫療法により、ヒトの皮膚に三次リンパ構造であるiSALT(inducible skin-associated lymphoid tissue)が誘導されることを明らかにした。iSALTの形成と治療効果との相関を検証した結果、毛隆起部に浸潤する制御性T細胞数と治療効果との相関はなく、また浸潤するCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、制御性T細胞の比率においても相関はみられなかったが、治療予後良好例ではiSALT内に浸潤するCD20陽性B細胞数ならびに誘導された高内皮細静脈数が有意に多かったことから、これらは局所免疫療法の治療予後予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified that in topical immunotherapy for alopecia areata, repetitive stimulation by hapten induces tertiary lymphoid organ-like structures "iSALT (induced skin-associated lymphoid tissue)" in human skin. We examined the correlation between profile of infiltrating cells and the efficacy of topical immunotherapy, but there was no correlation between the degree of Treg infiltration around the hair follicle isthmus and the therapeutic effect. There was also no correlation between the ratio of CD4 to CD8 and the ratio of Treg to CD4 and the therapeutic effect. However, there were significant differences in CD20 positive B cells infiltration and HEVs (high endothelial venules) induction around hair follicle isthmus between effective case and ineffective cases, suggesting that iSALT is involved in hair follicle regeneration mechanism by topical immunotherapy. Thus, by analyzing iSALT induced by topical immunotherapy it might be possible to predict the therapeutic effect.

研究分野：皮膚科、免疫学、アレルギー

キーワード：円形脱毛症 局所免疫療法 免疫組織化学染色 皮膚樹状細胞 iSALT

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症 (Alopecia areata; AA) は日常診療で最も多く遭遇する後天性脱毛症であり、その発症メカニズムについては様々な病因論が論じられ、未だその詳細は不明な部分が多いが、1998年に Gilhar らが毛包組織に対する自己免疫反応が発症機序の一端を担っていることを発見し (Gilhar A et al: J Clin Invest 1998) 現在では AA は自己免疫性疾患と捉えられるようになった。

脱毛症治療ガイドラインにおいては、推奨度の高い治療として局所免疫療法が記載されているが、その詳細な作用機序については未だ一定の見解を得ない。

局所免疫療法で誘導されるかぶれ反応については、我々の研究の結果、ハプテンで感作・惹起を行うと、ハプテンを塗付した皮膚では真皮樹状細胞と effector memory T 細胞が真皮内に集簇し iSALT (inducible skin associated lymphoid tissue) を形成することで IFN- γ を産生し、かぶれ反応が惹起されるというメカニズムが明らかになったことから (Natsuaki Y et al: Nat Immunol 2014) SADBE 塗布後の iSALT 形成を介した IFN- γ 産生や、それに続く炎症収束応答などが脱毛の抑制あるいは発毛促進に関与している可能性が考えられる。しかしながら、Ito らによると IFN- γ はむしろ毛周期を強力に退行期へ移行させる誘導因子である (Ito T et al: Br J Dermatol 2005) という研究報告もあり、局所免疫療法の作用機序については議論の余地が多く残されている。

2. 研究の目的

かぶれ反応において抗原提示細胞として中心的役割を担う樹状細胞が、局所免疫療法の作用機序においても重要な役割を果たしていると仮定・検証する。

(1) 局所免疫療法実施患者の皮膚とマウスの皮膚を用いて T 細胞ならびに真皮樹状細胞の免疫染色を行い、ヒトとマウスにおける局所免疫反応の相同性の有無について検証する。

(2) 樹状細胞が蛍光標識されたマウスに SADBE ならびに DPCP で接触過敏反応を感作・惹起し、二光子励起顕微鏡を用いて皮膚樹状細胞の生体内ライブイメージングを行うことで、皮膚樹状細胞の細胞動態を観察する。次に、蛍光色素で標識した SADBE / DPCP を塗布し 1、12、24、48 時間後の皮膚ならびに所属リンパ節を回収し、細胞懸濁液を作成後、フローサイトメトリーを用いて蛍光色素陽性細胞のプロファイリングを行うことで、局所免疫療法における免疫反応に関与している抗原提示細胞を同定する。同時に、局所に浸潤する T 細胞サブセットについてもプロファイルを行い、qPCR にて各種炎症性/抑制性サイトカイン発現について解析を行うことで、局所免疫療法の作用機序を探る。

3. 研究の方法

(1) 円形脱毛症患者の生体試料の渉猟

当院を受診した円形脱毛症患者の正常部皮膚、脱毛部皮膚、局所免疫療法実施部皮膚を渉猟する。

(2) ヒトとマウスにおける局所免疫療法に対する T 細胞と皮膚樹状細胞の細胞動態についての検証

で渉猟した患者皮膚を用いて H&E 染色を行い、詳細な病理組織学的検討を行う。さらに CD3、CD11c、CD208 (DC-LAMP)、CD1a などの抗体を用いた免疫化学染色を行い、局所に浸潤する T 細胞、皮膚樹状細胞につき評価し、ならびに局所免疫療法実施部位における iSALT 形成の有無について検討する。また、円形脱毛症モデルマウスである C3H/HeJ マウスを用いて、同様に H&E 染色による病理組織学的検討を行い、加えてチオシアン酸アンモニウム処理によりマウス皮膚から表皮シートと真皮シートを作成し、CD3、class II で免疫化学染色することで局所に浸潤する T 細胞、皮膚樹状細胞、ならびに SADBE あるいは DPCP による局所免疫療法実施部位における iSALT 形成の有無について検討を行う。

4. 研究成果

(1) 円形脱毛症患者の生体試料の渉猟については、平成 27 ~ 29 年度に当院脱毛外来を受診した円形脱毛症患者のうち、局所免疫療法を実施した患者 9 例に対し、治療開始時と治療開始数ヵ月後の 2 点で皮膚生検を実施した。

(2) ヒトとマウスにおける局所免疫療法に対する T 細胞と皮膚樹状細胞の細胞動態についての検証においては、時間的、人的制約のため実験動物を導入することができなかった。一方、(1) で渉猟したヒト試料に対して、H&E 染色にて病理組織学的検討を行った結果、治療開始時および治療開始数ヵ月後のいずれの検体においても、真皮浅層から中層にかけて、血管周囲性ならびに毛包周囲の炎症細胞浸潤が見られたが、特に治療開始数ヵ月後の検体では毛包峡部周囲により稠密な炎症細胞浸潤が見られた。

これに対し CD3、CD4、CD8、FoxP3、CD20、CD11c、CD163、Bcl-6、CXCL13、CCL21、MECA79 の抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、治療開始時の検体に見られる血管周囲性の炎症細胞浸潤の主体は T 細胞であり、MECA79 陽性の高内皮細静脈 (HEV) はほぼ見られないのに対し、治療開始数ヵ月後の検体に見られる毛包峡部周囲の細胞集簇は、T 細胞、B 細胞、真皮樹状細胞、M2 タイプマクロファージ、胚中心 B 細胞から構成されており、HEV が有意に発達していた。これは構造的に三次リンパ組織の特徴を満たしており、局所免疫療法によりヒトの皮膚にリンパ様構造である iSALT が誘導されていることが明らかにな

った。この毛包峽部周囲に誘導された細胞集簇のプロファイルは、急性期円形脱毛症患者に見られる毛球部周囲の炎症細胞浸潤とは明らかに異なっていた。

そこで、iSALTの形成と治療効果との相関の有無を検証した。その結果、治療予後が悪かった症例ではCD20陽性B細胞の浸潤細胞数ならびに誘導されたHEV数が有意に多かった。このことから、治療開始数ヵ月後に組織学的にB細胞浸潤ならびにHEV数を検証することで局所免疫療法の予後予測ができる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

- 1) Yohei Natsuaki, Akihiko Kawahara, Yoshiki Naito, Jun Akiba, Kenji Kabashima, Takekuni Nakama. Inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT) is detected in the scalp treated with topical immunotherapy for alopecia areata. Society for Investigative Dermatology 76th Annual Meeting, Portland, USA (Apr 2017)
- 2) Yohei Natsuaki, Akihiko Kawahara, Yoshiki Naito, Jun Akiba, Kenji Kabashima, Takekuni Nakama. Hapten-induced tertiary lymphoid organ-like structures in the scalp treated with topical immunotherapy for alopecia areata. 47th Annual Meeting of the ESDR, Salzburg, Austria (Sep 2017)
- 3) Yohei Natsuaki, Akihiko Kawahara, Yoshiki Naito, Jun Akiba, Kenji Kabashima, Takekuni Nakama. Hapten-induced skin associated lymphoid tissue in the scalp treated with topical immunotherapy for alopecia areata. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 高知 (Dec 2017)

- 4) Yohei Natsuaki, Akihiko Kawahara, Yoshiki Naito, Jun Akiba, Kenji Kabashima, Takekuni Nakama. Hapten-induced skin associated lymphoid tissue in the scalp treated with topical immunotherapy for alopecia areata. 3rd Singapore International Conference on Skin Research + 9th Pan Asian Pacific Skin Barrier Research Symposium, Singapore (March 2018)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏秋 洋平 (NATSUAKI, Yohei)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：40389309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

桜島 健治 (KABASHIMA, Kenji)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：00362484

(4) 研究協力者

名嘉真 武国 (NAKAMA, Takekuni)
久留米大学・医学部・教授

古村 南夫 (FURUMURA, Minao)
元久留米大学・医学部・准教授

大畑 千佳 (OHATA, Chika)
久留米大学・医学部・准教授

辛島 正志 (KARASHIMA, Masashi)
久留米大学・医学部・講師

石井 文人 (ISHII, Norito)
久留米大学・医学部・准教授

大山 文悟 (OHYAMA, Bungo)
久留米大学・医学部・講師