

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10238

研究課題名(和文)毛包の免疫寛容とその破綻における免疫チェックポイントPD-1/PD-L1の関わり

研究課題名(英文)Collapse of hair follicle immune privilege and immune check points

研究代表者

伊藤 泰介 (ITO, Taisuke)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90293638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常毛周期におけるPD-L1、PD-1発現では成長期毛の外毛根鞘などにPD-L1発現があることを見出した。成長期毛包にPD-L1発現を増強することによって細胞傷害性T細胞による自己免疫反応を抑制させる可能性がある。また周囲に散在するT細胞などの免疫細胞においてPD-1発現陽性細胞がみられた。一方、円形脱毛症を発症した誘導マウスにおけるPD-1、PD-L1発現の検討では、毛包周囲に稠密に浸潤する炎症細胞においてPD-1発現が減弱し、またdystrophic anagen hairでのPD-L1発現の免疫組織科学的検討は難しいところではあるが、減弱していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

円形脱毛症の病態において毛包の免疫寛容の破綻は一つの重要な病因であり、その一つであるPD-1/PD-L1の関連を改変することは、この免疫チェックポイントを回復させることで脱毛症状の改善に結びつく可能性がある。過剰な免疫反応を抑制させるため、PD-L1発現をいかに上昇させるか、もしくは低下させない方法を見出すことが今後の治療につながっていくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In normal hair cycle, PD-L1 might be expressed on outer root sheath of anagen hair. Anagen hair has a possibility to escape from autoimmune attacking by the PD-L1 expression. Furthermore, infiltrating immune cells may downregulate the expression of PD-1 on cytotoxic T cells so that T cells is downregulate immune activity by PD-1/PD-L1 binding. On the other hand, in alopecia areata lesions, PD-1 expression was increased in and around hair bulbs. In dystrophic anagen hair, analysis of the expression of PD-L1 was difficult to measure correctly but slightly downregulated.

研究分野：皮膚科学

キーワード：円形脱毛症 免疫チェックポイント PD-1 PD-L1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎盤や眼組織、中枢神経や精巣、卵巣などの組織では、過剰な炎症が起きないように免疫反応を抑制する環境を備えており、immune privilege (IP)と称する。このIP環境は、リンパ環流の欠如、MHC class I 発現の低減、抗原提示細胞の機能不全、MHC class Ib (ヒト:HLA-G、マウス:Qa-1, Qa-2)の発現、Fas Ligand の発現、免疫抑制作用 (TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、IL-10、CGRP、 $\alpha$ -MSH、MIF) 因子の発現、トリプトファン発現の低下、細胞外マトリックス形成などによって維持されている (Ito et al. *Curr Dir Autoimmun* 2008)。毛包のIP (Hair follicle immune privilege [HF-IP])も同様であるが、とくにMHC class I は本来すべての有核細胞に発現している分子であるが、近位外毛根鞘 (毛包に近い方の毛根鞘) や毛母細胞ではその発現がかなり低下している、もしくは無発現である。我々は、さらにMHC class I 関連蛋白である transporter of antigen processing-2 (TAP-2) 発現が低下していることも報告してきた (Ito et al *Am J Pathol* 2004, Paus and Ito. *Trends Immunol* 2009)。

一方、この免疫寛容状態が何らかの原因によって破綻することで、毛包由来の自己抗原が露呈し、Effector 細胞である NKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞によって認識され (Ito et al. *J Invest Dermatol* 2008)、自己免疫反応が生じる事によって円形脱毛症が発症すると理解される (Ito T. *Clin Dev Immunol* 2013, Ito T. *J Dermatol Sci* 2010, Ito T. *J Clin Cell Immunol* 2016)。またそうした細胞が毛包周囲に密に集簇するためには病変部毛包にCXCL10 発現が亢進し、CXCR3<sup>+</sup> Th1 細胞、CXCR3<sup>+</sup> Tc1 細胞が走化するであろうことも報告してきた (Ito et al. *J Dermatol Sci* 2013)。

さらに近年、毛包組織幹細胞の存在部位である毛隆起部も、MHC class I や CD200 発現の低下、MHC class II 陽性樹状細胞数の低下などが観察され、免疫寛容環境にあることが示唆されている (Bertolini et al. *Exp Dermatol* 2013)。一方、毛隆起部のIP破綻が、癬痕性脱毛 (永久脱毛) の原因となりうる。

この毛包の免疫寛容調整とその破綻を検討することは、円形脱毛症や癬痕性脱毛症の治療薬の開発に結びつく可能性が高い。我々が従来検討してきたHF-IPの破綻に関与するIFN- $\gamma$ について、現にJAK-STAT経路阻害薬が円形脱毛症を著しく改善するという報告がなされつつある。こうしたことから、新たな治療戦略として、PD-1/PD-L1の反応系が毛包の免疫寛容とその破綻にどう関与しているのかという点について検討するに至った。

### 2. 研究の目的

近年、PD-1 (Programmed cell death 1) やそのリガンドであるPD-L1が自己免疫疾患に関与していることが示唆されている (Zamani et al. *Cell Immunol* 2016)。PD-1を欠損もしくは阻害したマウスにおいてI型糖尿病や関節リウマチ、Experimental autoimmune encephalomyelitis、SLEなどの悪化が報告されてきた (Salama et al. *J Exp Med* 2003, Lucas et al. *J Immunol* 2008, Raptopoulou et al. *Arthritis Rheum* 2010, Nishimura et al. *Immunity* 1999)。これは、PD-1/PD-L1経路を阻害することで、TCRを介したZAP70/CD3 $\zeta$ を脱リン酸化の阻害やRas、Bcl-xLの抑制による細胞増殖や生存の阻害、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt経路の阻害によるmechanistic target of rapamycin (mTOR)の抑制といった働きが阻害される事によって起きると考えられる。これらPD-1/PD-L1経路が毛包の免疫寛容環境に関与しているのではないかと考えており、その破綻が、自己免疫性の毛包障害を誘導すると想定される。

そこで、まず正常毛周期 (成長期-退行期-休止期) におけるPD-L1の発現の変化、とくに免疫寛容がもっとも維持されている成長期での毛包上皮、もしくは毛包周囲の樹状細胞におけるPD-L1発現の変化を検討する。どのような因子がPD-L1、PD-1発現に影響を与えていくのかを検討することは、毛包を正常に維持するために重要な要素である。とくに先に述べたようなHF-IPを破綻させる因子であるIFN- $\gamma$ によるPD-L1、PD-1発現への影響を検討する。過去の報告においては、IL-2やIL-7、IL-15などのサイトカインがPD-1発現を亢進させるとの報告もあるが、円形脱毛症病変部では改めて検討する必要がある。

円形脱毛症の発症モデルであるC3H/HeJマウスにおいて円形脱毛症をIL-15、IL-7、IL-2などで誘導する過程におけるPD-L1、PD-1発現の変化、そしてC3H/HeJマウスに円形脱毛症を誘導するにあたり (Wang et al. *J Invest Dermatol* 2015)、事前にPD-L1やPD-1発現を阻害することでその発症の時間的变化、重症度の変化をみる必要がある。なおBertoliniらは、円形脱毛症病変部に浸潤する肥満細胞上のPD-L1発現の低下を示唆しているが、それ以上の検討はなされていない (Bertolini et al. *PLoS One* 2014)。円形脱毛症のEffector細胞であるNKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞やそのほかの浸潤細胞について、PD-1発現をフローサイトメトリーや免疫染色による検討を行っていく。さらにC3H/HeJマウスに対して抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体を使用することで自然発症率の変化を検討していく。

またPD-1をKnockoutしたC3H/HeJマウスにおける円形脱毛症発症の状況を確認する。免疫チェックポイントPD-1/PD-L1が機能していないC3H/HeJマウスでは、自己免疫反応が起きやすい状態であると考えられる。遺伝的背景として円形脱毛症を発症しやすいC3H/HeJマウスにおいて、さらにPD-1/PD-L1系が破綻することで、その発症率や症状の程度について検討を加えていく。

### 3. 研究の方法

円形脱毛症モデルマウスであるC3H/HeJマウスを使用する。正常C3H/HeJマウスについて、抜毛処理による毛周期誘導を行いマウス毛周期によるPD-L1発現の変化を検討する。また未発症C3H/HeJに抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体を投与し脱毛症状が誘導されるかを検討する。次に円

円形脱毛症を誘導処理した C3H/HeJ マウスにおいて、PD-1、PD-L1 発現を検討する。誘導処理後、事前に PD-L1 や PD-1 発現を抗体にて阻害することで脱毛症状を発症するまでの時間的変化、面積の変化をみる。脱毛病変部や所属リンパ節に浸潤する NKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞など浸潤細胞の PD-1 発現について検討を行う。IFN- $\gamma$ 投与による PD-1、PD-L1 発現への影響を検討する。

#### 4 . 研究成果

成長期毛組織における PD-1/PD-L1 発現

→ 免疫組織科学的検討によって毛乳頭に PD-L1 発現がみとめられた。またもともと成長期毛周囲にはリンパ球浸潤があまり顕著にはみられない。あまり多数ではないが PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の浸潤がみとめられた。成長期毛包毛乳頭は PD-L1 を発現することで過剰な免疫反応の抑制をおこない HF-IP の維持に一定の役割を果たしているものと推察される。

毛周期による PD-L1/PD-1 発現の変化

→ 毛周期では初期から中期退行期において毛乳頭での PD-L1 発現の減弱がみとめられた。しかし正常毛周期では退行期や休止期であっても毛包周囲に炎症細胞の浸潤が顕著になることはないため、毛包周囲への PD-1 陽性細胞の浸潤を統計的な変化として捉えることはできなかった。

脱毛症状の誘導

→今回は Wang らの方法により C3H/HeJ マウスに円形脱毛症モデルを作成した。脱毛症誘導初期において毛乳頭における PD-L1 発現の減弱がみられたが、脱毛モデルマウスの数がすくないため、統計的な検討には至っていない。またタンパクレベルでの解析はまだもう少し時間がかかるものと予想するためここには明確には結果を提示できない。しかしもう少し研究を継続し、円形脱毛症発症における PD-1/PD-L1 発現の関係性について検討を加えていく。

IFN- $\gamma$ と PD-1/PD-L1 発現

→培養細胞における脾臓リンパ球、皮膚由来リンパ球に対する IFN- $\gamma$  刺激による PD-1 発現量への影響についてフローサイトメトリー解析を行っている。まだ結果が完全ではなくここに示すことは困難である。

PD-1 を Knockout した C3H/HeJ マウス作成

→ 今後作成予定であり、現在準備中である。

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 Ito T	4. 巻 178
2. 論文標題 . Immune checkpoint inhibitor-associated alopecia areata.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Dermatol	6. 最初と最後の頁 1444-1445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjd.15591	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 Ito T, Yoshimasu T, Furukawa F, Nakamura M, Tokura Y.	4. 巻 44
2. 論文標題 Three-microneedle device as an effective option for intralesional corticosteroid administration for the treatment of alopecia areata.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Dermal	6. 最初と最後の頁 e304-e305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ito T, Suzuki T, Nakazawa S, Funakoshi A, Fujiyama T, Tokura YKochi (Japan) 2017.12.15
2. 発表標題 CCR5 blockade exerts both prophylactic and therapeutic effects on alopecia areata.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ito T.
2. 発表標題 Who is a key player in the pathogenesis of alopecia areata?
3. 学会等名 13th Annual Meeting of the Korean Hair Research Society. 2017.5.28 Seoul (Korea) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ito T, Suzuki T, Nakazawa S, Fujiyama T, Tokura Y
2. 発表標題 CCR5 blockade shows prevention of alopecia areata development as well as improvement of alopecia areata.
3. 学会等名 47th Annual ESDR Meeting Salzburg, Austria 2017.9.27-30 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ito T.
2. 発表標題 Alopesia areata.
3. 学会等名 10th World Congresss For Hair Research. Kyoto (Japan) 2017.10.31 (国際学会)
4. 発表年 2017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