

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08693

研究課題名(和文) 円形脱毛症におけるAGEs(終末糖化産物)の毛包ストレス-T細胞応答への寄与と解明

研究課題名(英文) The role of AGEs in the pathogenesis of alopecia areata

研究代表者

内田 洋平(Uchida, Youhei)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：30571856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：円形脱毛症は糖尿病との関連が指摘されている。高血糖はAGEs(終末糖化産物)を蓄積し、組織ストレスや炎症反応を誘導する。本研究では、糖尿病のない円形脱毛症の患者で、健常者に比べて前期糖化産物であるHbA1c値が高く、頭部外に脱毛病変を合併する群ほど、HbA1cが上昇していることを示した。AGEsの一つであるmethylglyoxal(MG)とCML、その受容体RAGEについてELISA法を用いて解析した。患者群では、健常者に比べて血清MG値が高かった($p = 0.042$)。これらの成果は、円形脱毛症において、糖化産物の蓄積は、円形脱毛症の病態や重症度に関与している可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

円形脱毛症は糖尿病との関連が指摘されているが機序不明であり、これまでAGEsに着目した円形脱毛症の病態解明はなされていなかった。この成果は、糖尿病のない円形脱毛症の前期糖化産物(HbA1c)と終末糖化産物(AGEs)の解析により、HbA1cやAGEsのバイオマーカーとしての役割やAGEsの蓄積を介した脱毛症の発症機序の解明、将来的な円形脱毛症の治療法の確立につながる可能性を示す重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus is one of the alopecia areata(AA) comorbidities suggested by the big data analysis. AA is a T cell-mediated autoimmune disease of hair follicle(HF). T cell-mediated AA-like HF phenotype can be mimicked in human scalp HF organ culture ex vivo. However, it remains unknown what triggers an immune response leading AA lesion in vivo. Hyperglycemia increases the generation of advanced glycation end products (AGEs), which induces tissue inflammation in various diseases such as psoriasis. In this study, higher serum HbA1c level was found in nondiabetic AA patients. Universalis AA patients had significantly higher serum HbA1c level than AA patients who had no extra-scalp hair loss. AGEs include N^ε-carboxy-methyl lysine (CML) and methylglyoxal (MG). RAGE is the receptor for AGEs. Higher level of serum MG was determined by ELISA assay in AA patients than healthy subjects. These findings suggest that accumulation of AGEs might contribute to AA pathogenesis and AA severity.

研究分野：皮膚免疫、脱毛症

キーワード：円形脱毛症 AGEs(終末糖化産物) HbA1c 糖尿病 methylglyoxal (MG)

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症は毛包の immune privilege (IP) の破綻により生じた自己免疫疾患と考えられ、正常の毛包は免疫細胞に対する抗原提示能の抑制 (MHC class I の低発現)、免疫抑制分子の発現 (VIP)、自己反応性 T 細胞のアポトーシス誘導 (PD-1 の発現) などにより毛包を炎症細胞から守る IP を形成するとされる (Bertolini M, Uchida Y et al. 2016; 内田洋平 他. 2019)。MICA は NKG2D (Natural killer group 2D-positive、ストレス受容体) のリガンドであり、病変部毛包で強発現している。病変部毛包では NKG2D⁺CD8T 細胞が浸潤しており、これら自己反応性 T 細胞による毛包ストレスの認識が、円形脱毛症の病態形成において重要な一面を担うと考えられる (Gilhar A et al. 2012)。研究代表者らはこれまでに、ヒト NKG2D⁺ T 細胞が、(1)病変部毛包へ浸潤していることと、(2)ex vivo で誘導した毛包ストレスリガンドを認識して退行期毛包を誘導することを明らかにしたが (Uchida Y et al. 2020; Uchida Y et al. 2021)、in vivo での毛包ストレス誘導因子の同定には至っていない。

近年、ビッグデータ解析により円形脱毛症と糖尿病の関連が指摘され、両疾患に共通する免疫や炎症性代謝異常の存在が予想されているが、機序は不明である (Lim CP et al. 2018)。高血糖による糖化は、グルコースなどの還元糖の代謝産物に含まれるアルデヒド基が、蛋白と非酵素的に結合するメイラード反応である。糖尿病診断に応用される HbA1c は前期糖化産物であり、糖化反応の終末糖化産物 (advanced glycation end products, AGEs) に N⁻-(Carboxymethyl)lysine (CML) などがある。これら AGEs の血液中での増加や組織への蓄積は、受容体 (receptor for AGEs, RAGE) との結合を介して細胞内シグナルを活性化し、組織ストレスや炎症性サイトカインを誘導するが (Papagrigoiraki A et al. 2017)、毛包ストレスの増強や自己反応性 T 細胞応答の活性化など、円形脱毛症の発症における AGEs の寄与解明には至っていない。一方、非糖尿病患者における食後高血糖自体も AGEs の生成を誘導し (Kosmopoulos M et al. 2019)、蓄積した AGEs は長期的に影響を及ぼす。

研究代表者らは、蓄積した AGEs が脱毛の全身への拡大に関与する可能性に着目しており、上記の背景より、円形脱毛症の発症において、糖化に伴う毛包ストレスの増強や自己反応性 T 細胞応答の活性化による毛包障害の誘導が推測され、円形脱毛症の病態形成における AGEs の役割を明らかにすることを目的として本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、円形脱毛症の病態形成において、終末糖化産物 (AGEs) が脱毛の発症や全身への拡大に関与する可能性を探るものである。

次の3つの疑問の解決に取り組む。円形脱毛症における前期糖化産物 HbA1c の特異性、円形脱毛症の病変部における AGEs の組織学的な特異性、円形脱毛症における AGEs とその受容体 RAGE の特異性。

3. 研究の方法

(1). 皮膚と血液採取

倫理委員会で承認された文書を用いて説明を行い、署名同意が得られた対象者について解析する。脱毛症の病変や非病変部から皮膚生検を行い、臨床症状と組織の評価に基づき円形脱毛症を診断する。円形脱毛症 (N=17, 男性=7, 女性=10) の診断時や治療経過中に行なった採血検査データを解析する。対象者は、これまで糖尿病の診断や治療歴はなく、空腹時血糖 (FBS、基準値 109mg/dl) と HbA1c 値 (NGSP、基準値 4.9-6.0%) は、基準値内にある。また、それら患者と健常者 (N=6, 男性=4, 女性=2) の血清を分離し、ELISA による解析に用いる。

(2). 円形脱毛症の毛包や T 細胞における終末糖化産物 (AGEs) の蓄積や分布の特異性

診断時の病変部毛包や浸潤 T 細胞における AGEs の蓄積の有無や分布について、抗 AGE 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、健常者の結果と比較する。

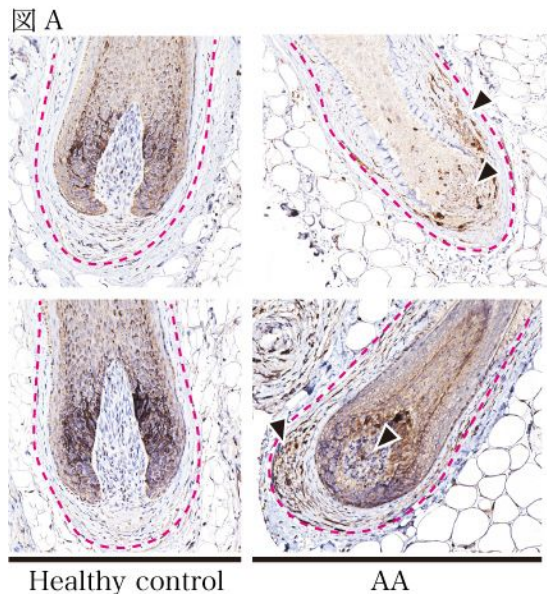
(3). 円形脱毛症の血清 CML、MG と RAGE のバイオマーカーとしての特異性

AGEs が乾癬同様に円形脱毛症のバイオマーカーであるかを調べる (Batycka-Baran A et al. 2018)。治療前の血清について、代表的な AGEs である N⁻-(Carboxymethyl)lysine (CML) 値と methylglyoxal (MG) 値について ELISA で測定する。また、血清 CML 値と methylglyoxal (MG) 値について重症度 (頭部外病変の有無) との相関関係についても解析する。同様に、AGEs の受容体 RAGE 値についても解析する。

4. 研究成果

糖化産物の蓄積が円形脱毛症の病態や重症度に関与している可能性を検討するために、糖尿病のない円形脱毛症の患者（17人）と健常者（6人）において、空腹時血糖（FBS）と前期糖化産物であるHbA1c値を解析した。患者群では健常者と比較して、HbA1cの有意な上昇が認められた（ $5.55 \pm 0.07\%$ vs. $5.10 \pm 0.17\%$ ）（平均 \pm SD, $p = 0.039$ ）。FBSは、両群間に差は認められなかった。頭部外の脱毛病変の有無を重症度の指標とした解析では、頭部外病変の合併群（N=8）では非合併群（N=9）と比較して、HbA1cの有意な上昇が認められた（ $5.73 \pm 0.07\%$ vs. $5.39 \pm 0.08\%$, $p = 0.009$ ）。

糖化産物の脱毛病変部における病態形成への関わりを検討するため、診断時の病変部毛包や浸潤T細胞における終末糖化産物（AGEs）について、抗AGE抗体を用いた免疫組織化学的染色を行ったところ、円形脱毛症（AA）では、健常者（healthy control）に比べて、毛球部のconnective tissue sheath内（図A破線）にAGEs陽性細胞（図A矢頭）が見られた。



次に、AGEsが円形脱毛症のバイオマーカーであるかどうかを探るため、治療前の血清AGEsの一つであるCMLとmethylglyoxal(MG)、その受容体RAGEについてELISA法を用いて解析した。患者群では健常者と比較して、血清MG値の有意な上昇がみられた（ $1.25 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ vs. $0.77 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ ）（ $p = 0.042$ ）。血清CML値と血清RAGE値は、患者群と健常者に差は認められなかった（各 $p = 0.649$, $p = 0.834$ ）。さらに、治療前後を解析した患者群（6人）において、治療前の血清MG値の上昇（ $1.31 \pm 0.30 \mu\text{g/ml}$ ）と治療後の低下（ $0.94 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ ）を認めた（ $p = 0.012$ ）。このことから、GMは円形脱毛症のバイオマーカーである可能性が示唆される。一方、頭部外の脱毛病変の有無を重症度の指標とした解析では、頭部外病変の有無と血清MG、CMLとRAGE値の間には統計学的な有意差は認められなかった。

これらの成果は、円形脱毛症において、糖化産物の蓄積は、円形脱毛症の病態や重症度に関与している可能性が示唆され、AGEsによるT細胞の特異的な活性化制御機構の解明は、円形脱毛症の病態メカニズムの構築と新たな治療ターゲットにつながる重要な成果であると考えられる。

<引用文献>

- M Bertolini, M Pretzlaff, M Sulk, M Bähr, J Gherardini, Y Uchida, *et al.* Vasoactive intestinal peptide, whose receptor-mediated signalling may be defective in alopecia areata, provides protection from hair follicle immune privilege collapse. *Br J Dermatol.* 2016 Sep;175(3):531-41.
- 内田洋平 他. 脱毛症の免疫学的病態. *日本皮膚免疫アレルギー学会誌* 2019 2;2; 287-94.
- Gilhar A, *et al.* Alopecia areata. *N Engl J Med.* 2012 Apr 19;366(16):1515-25.
- Uchida Y, *et al.* Pro-inflammatory V¹⁺T-cells infiltrates are present in and around the hair bulbs of non-lesional and lesional alopecia areata hair follicles. *J Dermatol Sci.* 2020 Nov;100(2):129-138.
- Uchida Y, *et al.* Resident human dermal T-cells operate as stress-sentinels: Lessons from the hair follicle. *J Autoimmun.* 2021 Nov;124:102711.

- Lim CP *et al.* Big Data Reveal Insights into Alopecia Areata Comorbidities. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2018 Jan;19(1):S57-S61.
- Kosmopoulos M, *et al.* Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019 Mar 1;1865(3):611-9.
- Papagrigroraki A *et al.* Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 20;18(11). pii: E2471.
- Batycka-Baran A, *et al.* Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products: A Novel Biomarker for Psoriasis Severity with Therapeutic Implications? *Acta Derm Venereol.* 2018 Aug 29;98(8):797-8
- Klein R, *et al.* The Relationship of Serum Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) and Carboxymethyl Lysine (CML) to the Incidence of Diabetic Nephropathy in Persons With Type1 Diabetes. *Diabetes Care* 2017 Sep;40(9):e117-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aoi Okubo, Youhei Uchida, Yuko Higashi, Takuya Sato, Youichi Ogawa, Akihiro Ryuge, Kenji Kadomatsu, Takuro Kanekura.	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 CD147 is Essential for the Development of Psoriasis via the induction of Th17 Cell Differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences.	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010177.	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 -
1. 著者名 Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Karin, Pappelbaum, Jeremy Cheret, Andreas Schulte-Mecklenbeck, Catharina C. Gross, Natasa Strbo, Amos Gilhar, Alfredo Rossi, Wolfgang Funk, Takuro Kanekura, LuisAlmeida, MartaBertolini, Ralf Paus.	4. 巻 124
2. 論文標題 Resident human dermal T-cells operate as stress-sentinels: Lessons from the hair follicle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity.	6. 最初と最後の頁 102711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaut2021.102711	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 該当する
1. 著者名 Kazuyasu Fujii, Arimura Arimura, Atsuko Ibusuki, Youhei Uchida, Takuro Kanekura.	4. 巻 101(4)
2. 論文標題 Microcystic Adnexal Carcinoma with Xanthomatous Reaction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica.	6. 最初と最後の頁 793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/00015555-3792.	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 -
1. 著者名 Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Andreas Schulte-Mecklenbeck, Majid Alam, Jeremy Cheret, Alfredo Rossi, Takuro Kanekura, Catharina C Gross, Akiko Arakawa, Amos Gilhar, Marta Bertolini, Ralf Paus.	4. 巻 100(2)
2. 論文標題 Pro-inflammatory V 1+T-cells infiltrates are present in and around the hair bulbs of non-lesional and lesional alopecia areata hair follicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science.	6. 最初と最後の頁 129-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.09.001.	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 該当する

1. 著者名 Yusuke Nomoto, Yuko Higashi, Youhei Uchida, Kazuyasu Fujii, Tadasuke Ooka, Takuro Kanekura	4. 巻 49(9)
2. 論文標題 Disseminated cutaneous sporotrichosis with intravascular granuloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e301-e302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16429.	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0件

〔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
研究分担者	金蔵 拓郎 (Kanekura Takuro) (70177509)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------