

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461689

研究課題名(和文)円形脱毛症におけるpDCを中心とした新たな病態メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of plasmacutoid dendritic cells in the pathogenesis of alopecia areata

研究代表者

伊藤 泰介 (Ito, Taisuke)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90293638

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)：円形脱毛症モデルマウスであるC3H/HeJ mouseを用いて解析した。まず円形脱毛症を発症したマウスのリンパ節よりリンパ球を採取し、IL-2, IL-7, IL-15で刺激したうえで、6～8週令のメスC3H/HeJマウスに皮内注射をした。1ヶ月程度で発症してくるため、そのマウスについて解析を行った。病変部ではpDCの数は多くないが、その周辺ではpDCsの頻度が高かった。また、とくにIFN- $\alpha$ を発現しているpDCsの数が有意に多かった。またpDCsの走化性因子であるケメリン発現もみられた。脾臓からのpDCsでも円形脱毛症を誘導できた。

研究成果の概要(英文)：Alopecia areata (AA) model mouse, C3H/HeJ mouse was employed in this study. Lymphonode cells from C3H/HeJ mouse with AA were activated with IL-2, IL-7 and IL-15 for 5 days. Then, these activated LN cells were intracutaneously injected into healthy C3H/HeJ mouse. The frequency of pDCs were significantly higher in non lesional skin in AA mouse. Furthermore, pDCs from spleen cells induced alopecia lesions in healthy C3H/HeJ mouse. PDCs might be important initiator of AA in C3H/HeJ mouse.

研究分野：皮膚科学

キーワード：形質細胞様樹状細胞 IFN- $\alpha$  Siglech 円形脱毛症 Chemerin

### 1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症の誘因として代表的なものの一つはインフルエンザなどウイルス感染症である。ウイルス感染によって自己免疫疾患が悪化することは知られており、その一つの原因としてIFN- $\alpha$ 産生の増加が考えられている。

### 2. 研究の目的

「円形脱毛症における pDC を中心とした新たな病態メカニズムの解明」についての検討を行う。円形脱毛症は何等かの毛包由来自己抗原に対する組織特異的自己免疫疾患と捉えられている。毛包組織周囲には密な単核球浸潤がみられ、細胞障害性 T 細胞が自己抗原を認識していると考えられる。そこには IFN- $\gamma$  や IFN- $\alpha$  の過剰産生によって毛包組織の免疫寛容環境の破綻がみられるとされるが、破綻のきっかけの一つとしてウイルス感染と pDC の関与が考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1)円形脱毛症モデルマウスの作成

もとより円形脱毛症を自然発症する傾向のある C3H/HeJ マウスに対して、すでに脱毛症状のある同マウスの鼠径や腋窩リンパ節を採取し、IL-2、IL-7、IL-15、CD3/CD28 ビーズで 6 日間培養刺激したのち、健常な 8 週齢マウスに皮内注射すると約 1 ヶ月後に脱毛症状を発症する。

#### (2)形質細胞様樹状細胞の分布の検討

発症マウスの病変部、非病変部、健常マウス皮膚、高齢マウスから皮膚を採取し、SiglecH 染色を行なった。

#### (3)C3H/HeJ マウスの脱毛病変部での IFN- $\alpha$ 発現の検討

病変部における IFN- $\alpha$  産生について、組織染色と Real-time PCR による検討を行った。

#### (4)形質細胞様樹状細胞のフローサイトメトリーによる検討

病変部皮膚、非病変部皮膚を採取し、脂肪組織を除去した上でトリプシン処理を行い表皮細胞と皮下組織をわけると。さらに RPMILiberase TL Research Orade(Roche)で表皮を溶かし、えられた細胞を FACS 検討した。

#### (5)マウス脾臓からの pDCs の選択

健常 C3H/HeJ マウスの脾臓組織をホモジナイズしたのち、Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit II を用いて pDCs を negative selection して採取した。得られた pDCs を健常 C3H/HeJ マウスに皮内注射し、脱毛症状を誘導を試みた。

#### (6)IFN- $\alpha$ による培養マウス髭毛の成長阻害の検討

以前より IFN- $\gamma$  が円形脱毛症を発症させる重要なサイトカインであることが知られてきた。しかし I 型インターフェロンについての検討はあまりない。pDCs からはウイルス感染の際に大量の IFN- $\alpha$  が産生されることから、それによる毛包への影響について、培養髭毛を用いて検討を行った。

#### (7)イミキモドによる脱毛症状の検討

pDCs を刺激するイミキモドを C3H/HeJ マウスに外用して脱毛症状を誘導し、pDCs の浸潤と IFN- $\alpha$  の産生、毛周期の変化について検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)脱毛病変の誘導と形質細胞様樹状細胞の分布の検討

pDC は C3H/HeJ マウスにおいて 3 ヶ月齢未発症マウスと比較して 12 ヶ月未発症マウスではより pDC の浸潤が多く見られた。また発症マウスにおいては、未発症健常皮膚よりも病変部、さらには発症マウスの病変部以外の部位においてより多くの浸潤がみられた。



#### (2) C3H/HeJ マウスの脱毛病変部での IFN- $\alpha$ 発現の検討

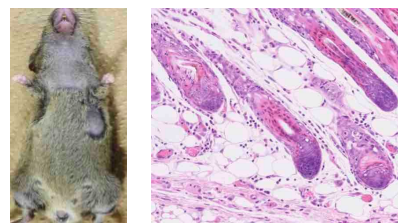
病変部では IFN- $\alpha$  陽性 pDC が分布しているが、発症マウスでの未発症皮膚においてより多くの浸潤がみられた。これは病変部の維持よりも発症誘導に pDC が関わっていることを示唆するものと理解される。これらの結果は Real-time PCR でも同様であった。

#### (3)形質細胞様樹状細胞のフローサイトメトリーによる検討

皮膚に浸潤する細胞における FACS 解析では、B220<sup>+</sup>PDCA<sup>+</sup>細胞が発症マウスの非病変部でより多く見られた。

#### (4)pDCs による円形脱毛症の誘導

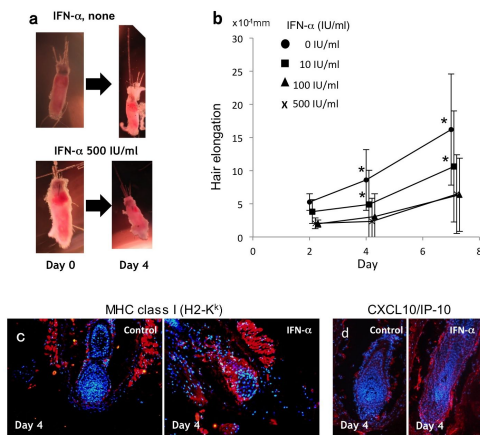
脾臓から採取した pDCs によって円形脱毛症を誘導することに成功した。またこのマウスは組織的にも円形脱毛症と同様であり、pDCs も浸潤していた。



(5)イミキモドによる円形脱毛症の誘導  
pDCを刺激してIFN- $\alpha$ を産生させるイミキモドを外用することで、円形脱毛症類似の病変部を誘導した。



(6)IFN-aによる培養髭毛の退縮、成長障害  
C3H/HeJマウスの髭毛を培養し、IFN- $\alpha$ を添加すると、毛成長の阻害とMHC class I発現の増加がみられ、IFN- $\gamma$ による場合と同様の变化をみた。



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 2 件)

Distinctive downmodulation of plasmacytoid dendritic cell functions by vitamin D3 analogue calcipotriol.

Suzuki T, Tatsuno K, Ito T, Sakabe JI, Funakoshi A, Tokura Y.  
J Dermatol Sci. 2016 Oct;84(1):71-79.

Similarities of dermoscopic findings in alopecia areata between human and C3H/HeJ mouse.

Suzuki T, Tokura Y, Ito T.  
J Dermatol Sci. 2016 Aug;83(2):154-7.

〔学会発表〕(計 4 件)

Ito T, Suzuki T, Sakabe JI, Funakoshi A, Tokura Y. Plasmacytoid dendritic cells as a possible key player in the initiation phase of alopecia areata in the C3H/HeJ mouse. 45th Annual ESDR Meeting. European Society for Investigative Dermatology. 9-12 September

2015 Rotterdam, the Netherlands

Ito T, Suzuki T, Sakabe JI, Funakoshi A, Tokura Y: Plasmacytoid dendritic cells as a possible key player in the pathogenesis of alopecia areata. 44th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Copenhagen, Denmark, 2014.9.10.

Ito T, Suzuki T, Sakabe JI, Funakoshi A, Tokura Y: Plasmacytoid dendritic cells as a possible key player in the pathogenesis of alopecia areata. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2016.12.9-11

Ito T. Autoimmune hair loss alopecia areata and chemokines/cytokines for mediator of inflammation. 8th World Congress for Hair Research (WCHR2014). International Convention Center Jeju, Jeju Island, Korea, 2014.5.16

〔図書〕(計 2 件)

伊藤泰介 円形脱毛症最前線 What's new in 皮膚科学 2016-2017 pp.124-125 メディカルレビュー社 編)宮地良樹、鶴田大輔

伊藤泰介 こどもとおとなが期待するこれからの脱毛症診療 ここまでわかる、ここまでのできる！こどもとおとなの脱毛症診療 N0.252 編)大山 学 Derma 2017

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤泰介 (ITO, Taisuke)

浜松医科大学医学部附属病院・講師

研究者番号 90293638