令和２年度厚生労働科学研究費補助金　難治性疾患政策研究事業
分担研究報告書

自己免疫反応後に誘導される皮膚線維化機構に関する研究

研究分担者　沖山奈緒子　　筑波大学医学医療系皮膚科　講師

研究要旨

強皮症は自己免疫疾患であり、皮膚線維化疾患であるが、自己免疫反応と線維化とのつながりは明らかでない。移植片対宿主病は、血液悪性疾患の治療で行われる骨髄移植の副作用で、ドナー骨髄細胞がレシピエント臓器組織を攻撃することで起こる、人工的な自己免疫反応であり、慢性化すると強皮症様皮膚線維化を起こす。この症状は、炎症後のリモデリング（組織の再構築）と考えられてきたが、詳細は不明である。

本研究では、慢性移植片対宿主病では、急性の場合と比べ、表皮を構成する角化細胞において、線維化を誘導するサイトカインの一つであるトランスフォーミング増殖因子β（TGFβ）が強く発現していることを見出した。移植片対宿主病様自己免疫皮膚炎モデルマウスでは、皮膚内に広がるドナー細胞傷害性T細胞が角化細胞死を誘導し、TGFβを強発現して、皮膚線維化が惹起された一方、インターフェロンγ欠損ドナーT細胞では線維化は起こらなかった。そこで、培養角化細胞に様々な形態の細胞死を誘導したところ、プログラムされた細胞死であるアポトーシスに陥った角化細胞からTGFβが最も多く産生され、この産生はIFNγ添加により増強された。

このことは、角化細胞が、アポトーシスに陥る際にインターフェロンγの刺激を受けて線維化を誘導する細胞であることを示唆している。皮膚粘膜疾患には、線維化が進むものとそうでないものがあり、本研究結果に基づくと、その違いを、角化細胞がアポトーシスに陥ることと、インターフェロンγの豊富な環境にあることの２つの条件が揃うかどうかで説明することができる。本研究成果から、皮膚線維化を起こす一群の皮膚粘膜疾患に対する特異的な治療法の開発が期待される。

A．研究目的

全身性強皮症は自己免疫を基盤とした皮膚線維化疾患の代表である。一方、移植片対宿主病は、血液悪性疾患に対する治療として行われる同種異系骨髄移植の副作用であり、ドナー骨髄細胞が、異なる主要組織適合遺伝子複合体（Major histocompatibility complex, MHC）を持つレシピエント臓器組織を非自己と認識して攻撃することで起こる、人工的な自己免疫疾患であり、その対象臓器は主に皮膚粘膜、肝臓、腸管で、急性期には皮膚粘膜では時にびらん化する丘疹・紅斑が生じ、表皮に多数のアポトーシスが観察される、苔癬反応（Interface dermatitis）と呼ばれる、自己免疫性皮膚炎に共通する病理組織像を呈する。慢性期に移行した、もしくは慢性期になってから発症した症例では、扁平苔癬様と称される、病理学的には苔癬反応を呈する角化性紅斑や口腔内びらんに加え、斑状または強皮症様びまん性の皮膚線維化が混じる症状となる。

この皮膚線維化は、炎症後のリモデリングであると一般に理解されているが、その詳細は不明である。同様に表皮・上皮に生じる炎症性皮膚粘膜疾患であっても、苔癬反応を呈さない接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎、乾癬などでは、皮膚線維化は大きな問題にならないこと、また、II 度熱傷では、表皮が欠損しても線維化を残さず治癒する現象を鑑みると、表皮傷害によるリモデリングで皮膚線維化を残す場合の機構は明確ではない。本研究では、その分子生物学的機序の解明を目的とした。

B．研究方法

慢性または急性移植片対宿主病症例の皮膚生検検体を用い、免疫組織学的染色にてトランスフォーミング増殖因子（Transforming growth factor, TGF）β 発現解析を行った。

ケラチン 14 プロモーター下卵白アルブミントランスジェニックマウス（K14-mOVA Tg マウス）へ卵白アルブミン特異的 CD8 T 細胞の OT-I 細胞を移入して惹起する、皮膚粘膜移植片対宿主病モデルマウスを解析した。

新生児マウス皮膚より単離した角化細胞培養系をを用いて、角化細胞に様々な形態の細胞死を誘導し、その培養上清中の TGF β を ELISA 法にて測定した。

（倫理面への配慮）

ヒト検体を用いた検討は、「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会で承認を受けている。

動物実験は、「動物の保護および管理に関する法律」と「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に準じて、筑波大学動物実験委員会で承認を得た。また、遺伝子組換え実験に際しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」をもとに筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会で承認を受けている。

C．研究結果

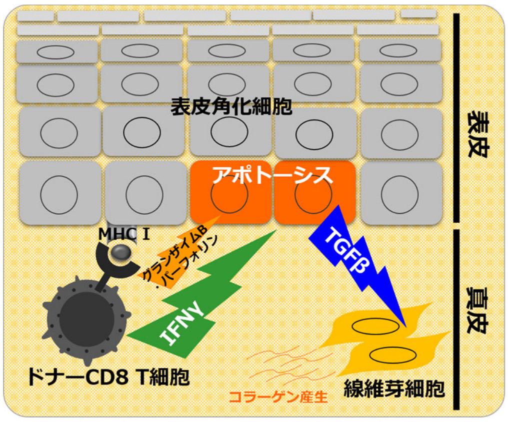
急性移植片対宿主病症例の検体と比べて、慢性移植片対宿主病症例の検体では、表皮角化細胞が、代表的な線維化誘導サイトカインである TGF β を強く発現していた。

モデルマウスでは、OT-I 細胞移入後 2 週間以内には、びらん化する急性移植片対宿主病様皮膚粘膜疾患を発症し、移植後 28 日目にはびまん性皮膚硬化により、強皮症様の慢性移植片対宿主病様皮膚線維化を呈してくることが判明した。この過程で、皮膚に浸潤する OT-I 細胞は、細胞傷害因子グランザイム B や代表的な炎症性サイトカインであるインターフェロン（interferon, IFN）γ を産生しており、一方、角化細胞は TGF β を強く発現していた。グランザイム B 欠損 OT-I 細胞移入時には、レシピエント K14-mOVA Tg マウスは急性移植片対宿主病様皮膚粘膜傷害も、そのあとの慢性移植片対宿主病様皮膚線維化も起こさず、一方、IFNγ欠損 OT-I 細胞移入時には、レシピエントマウスは急性移植片対宿主病様皮膚粘膜傷害は起こすものの、そのあとの慢性移植片対宿主病様皮膚線維化は起こさなかった。

培養角化細胞において、ネクローシス、アポトーシス、ネクロプトーシスを誘導したところ、アポトーシスとなった角化細胞が、最も多くの TGF β を産生した。またこの産生は IFNγ添加によって増強され、アポトーシス阻害薬添加によって抑制された。

D．考察

以上のことから、慢性移植片対宿主病においては、皮膚に浸潤してきた病原性 CD8 T 細胞が IFNγを産生しながら、パーフォリン-グランザイム経路を使って角化細胞をアポトーシスに陥らせると、その角化細胞が TGF β を産生し、真皮の線維芽細胞に働きかけて皮膚線維化を誘導していることが示唆された（下図）。つまり、角化細胞がアポトーシスに陥るときに、皮膚線維化を引き起こしてしまうことが、この病態における「リモデリング」の本態と考えられた。



E．結論

自己免疫的機序を基盤として皮膚線維化を呈する疾患においては、線維化進展阻止のためには IFNγやアポトーシスが治療標的となり得ると示唆される。

F．健康危険情報

特になし

G．研究発表

1．論文発表

Saito A, Ichimura Y, Kubota N, Tanaka R, Nakamura Y, Fujisawa Y, Watanabe R, Ishitsuka Y, Fujimoto M, <u>Okiyama N</u>*. Interferon-γ-stimulated apoptotic keratinocytes promote sclerodermatous changes in chronic graft-versus-host disease. J Invest Dermatol. Online ahead of print

2．学会発表

なし

H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1．特許取得

特願 2019-144490、PCT/JP2020/02655

細胞傷害アッセイ法（出願日：2019 年 8 月 6 日、出願人：国立大学法人筑波大学）

2．実用新案登録

特になし

3．その他

特になし