

## 自己免疫反応を基盤とした皮膚線維化機構に関する研究

研究分担者 沖山 奈緒子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学 教授

### 研究要旨

全身性強皮症や限局性強皮症は自己免疫的機序を基盤として線維化を起こしてくる疾患と考えられている。移植片対宿主病は、血液悪性疾患の治療で行われる同種異系幹細胞移植の副作用であり、ドナー由来免疫担当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してくることから、強皮症のモデルとして捉えられている。

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 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 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、慢性化すると皮膚硬化を来すが、インターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 欠損ドナー細胞傷害性T細胞を移入した際には、皮膚炎は起こるものの、引き続く皮膚硬化は軽減した。培養角化細胞に種々の細胞死誘導化合物やIFN $\gamma$ を添加したところ、アポトーシスに陥った角化細胞にIFN $\gamma$ が添加されたとき、角化細胞はTGF $\beta$ が最も多く産生した。

皮膚における自己免疫反応では、活性化したT細胞がIFN $\gamma$ を産生して組織マクロファージを刺激し、TGF $\beta$ 産生を誘導することにより、線維化を来してくることが分かっていたが、本研究により、T細胞産生IFN $\gamma$ は、自己免疫反応によりアポトーシスに陥る角化細胞も、線維化誘導のためのTGF $\beta$ のソースであることを示した。本研究成果から、IFN $\gamma$ もしくはアポトーシスを標的とした、皮膚線維化を起こす自己免疫疾患の新規治療ストラテジーが提案される。

### A. 研究目的

全身性強皮症や限局性強皮症は、患者血清より自己抗体が検出されることなどから、自己免疫反応を基盤として線維化を起こしてくる疾患と考えられているが、その機構にはいまだ不明な点が多い。皮膚や肺においては、線維化機構の一つとして、組織マクロファージが、T細胞の産生するインターフェロン (IFN)  $\gamma$  の刺激を受けて、線維化サイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (TGF)  $\beta$  を産生し、線維芽細胞を刺激してコラーゲン産生を促進することで、線維化に寄与することが示唆されている。

一方、血液疾患の治療として行われる幹細胞移植後副作用である移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) は、同種異系幹細胞由来のドナー由来免疫担当細胞が、レシピエントの臓器細胞を異物と見なして攻撃する、人工的な自己免疫反応とも言える疾患であり、3徴の一つが皮膚炎である。苔癬反応を呈する皮膚炎後、慢性皮膚GVHDでは、全身性強皮症もしくは限局性強皮症の皮膚線維化病変を形成する。このため、GVHDマウスモデルは強皮症のモデルマウスとしても広く使われている。

本研究では、自己免疫反応を基盤とした皮膚線維化機構について、皮膚組織を形成する角化細胞の関与を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

ヒト皮膚急性もしくは慢性GVHD患者の皮膚生検検体を用いて、TGF $\beta$ の免疫組織染色を行った。

動物実験では、ケラチン14プロモーター下に卵白アルブミンを遺伝子発現させたマウス (Keratin 14-promotor membrane-binding ovalbumin transgenic マウス、K14-mOVA Tg マウス) に、OVA 特異的T細胞受容体を組み込んだCD8 T細胞であるOT-I細胞を移入して発症させる、皮膚GVHDモデルマウスを解析した。OT-I細胞は蛍光色素GFPを発現させたRag-1ノックアウトマウスにOT-I遺伝子発現させたGFP<sup>+</sup>OT-I<sup>+</sup>Rag1<sup>-</sup>マウスリンパ節より回収して使用する。病原性T細胞が産生するIFN $\gamma$ の役割を同定するために、IFN $\gamma$ 欠損GFP<sup>+</sup>OT-I<sup>+</sup>Rag1<sup>-</sup>マウスからのOT-I細胞も使用した。また、マウス皮膚においてもTGF $\beta$ の免疫組織染色を行った。

角化細胞のTGF $\beta$ 産生能の解析のため、新生児マウス皮膚よりコラーゲナーゼを用いて個細胞化して回収した角化細胞をin vitro実験に使用し、IFN $\gamma$ リコンビナント蛋白や、各種細胞死誘導化合物を角化細胞培養条件に加えて、培養上清中のTGF $\beta$ 量をELISA法にて測定した。

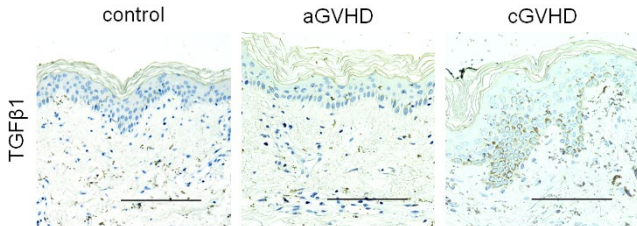
#### (倫理面への配慮)

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、機関の臨床研究倫理審査委員会で承認を受けた。

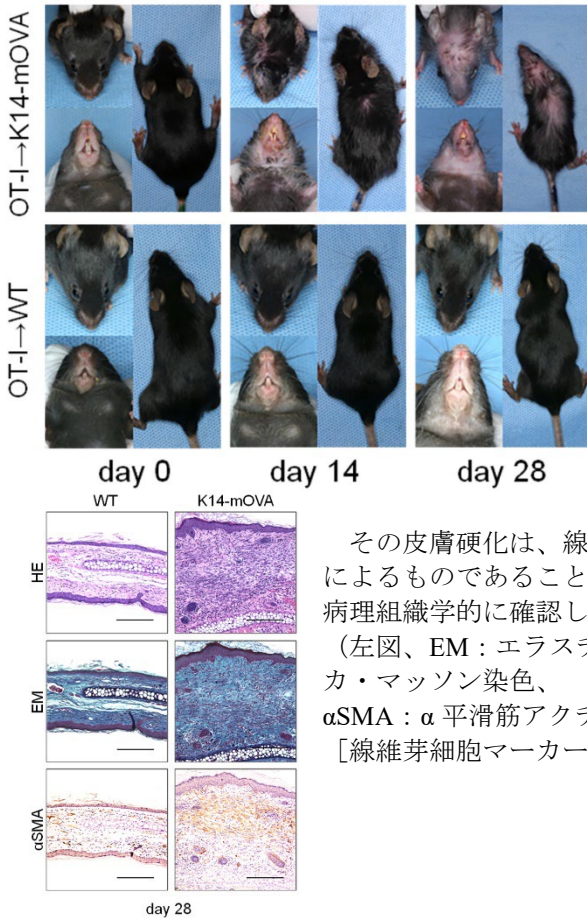
動物実験は、「動物の保護および管理に関する法律」と「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に準じて、機関の動物実験委員会で承認を得て行った。また、遺伝子組換え実験に際しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」をもとに、機関の遺伝子組換え実験安全委員会で承認を受けた。

### C. 研究結果

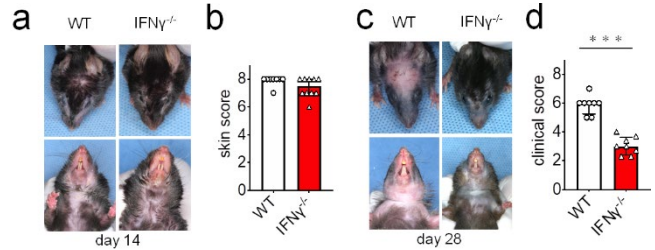
皮膚慢性 GVHD 患者の皮膚では、角化細胞が TGF $\beta$  を発現しており、皮膚急性 GVHD 患者の皮膚ではその所見は認められなかった（下図）。



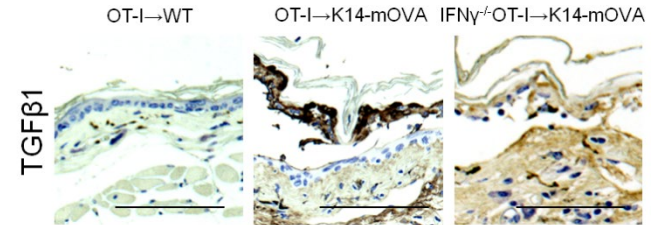
皮膚 GVHD モデルマウスは、OT-I 細胞移入 14 日目には急性 GVHD 様びらん性皮膚炎を呈するが、さらに OT-I 細胞移入 28 日目まで観察すると、野生型 (WT) マウスと比べて、慢性 GVHD 様皮膚硬化を呈して来ることを見出した（下図）。



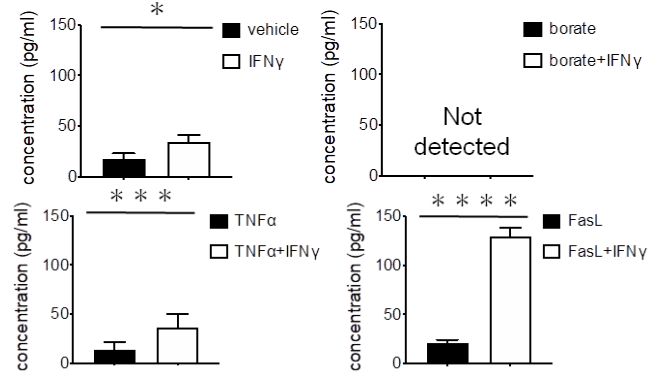
IFN $\gamma$  欠損 OT-I 細胞を移入した際には、急性 GVHD 様皮膚炎は WT OT-I 細胞を移入した時と同様に発症するが、慢性 GVHD 様皮膚硬化は軽減することも見出した（下図 a-d）。



免疫組織染色にて、慢性皮膚 GVHD マウス皮膚組織では、表皮角化細胞が TGF $\beta$  を発現していることが観察されたが、IFN $\gamma$  欠損 OT-I 細胞を移入 K14-mOVA Tg マウス皮膚の角化細胞の TGF $\beta$  発現は減弱していた（下図）。



そこで角化細胞培養系にネクロシス誘導剤 borate、ネクロトーシス誘導剤 TNF $\alpha$ 、アポトーシス誘導剤 FasL、かつ IFN $\gamma$  を加え、角化細胞産生 TGF $\beta$  量を測定したところ、IFN $\gamma$  刺激のみで TGF $\beta$  産生量は増加し、それは FasL でアポトーシスを誘導した時に特に顕著となった（下図）。

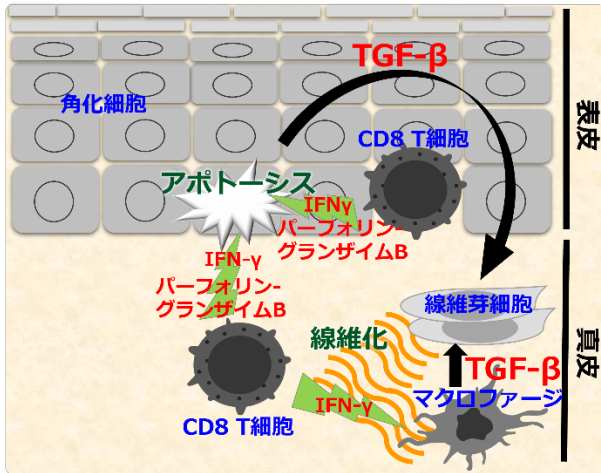


この FasL+IFN $\gamma$  刺激で誘導された角化細胞の TGF $\beta$  産生促進は、アポトーシス抑制剤 zVAD 添加にてキャンセルされ、一方ネクロシス抑制剤 Nec-1 添加では抑制されなかった。

### D. 考察

自己免疫性皮膚炎においては、獲得免疫系である T 細胞が活性化して IFN $\gamma$  を産生し、角化細胞にも作用して、線維化サイトカイン TGF $\beta$  を産生させることで、引き続き皮膚線維化に寄与することが分かった。

さらに、角化細胞はアポトーシスに陥るときに特に TGFβ を産生すると考えられた（下図）。



## E. 結論

自己免疫反応を基盤とする皮膚線維化疾患である、全身性または限局性強皮症や慢性皮膚 GVHD においては、IFNγ もしくは角化細胞アポトーシスを標的とした新規治療戦略が成立することが示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## 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, Okiyama N\*. IFN-γ-Stimulated Apoptotic Keratinocytes Promote Sclerodermatous Changes in Chronic Graft-Versus-Host Disease. **J Invest Dermatol.** 141(6):1473-1481, 2021

### 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

なし

### 3. その他

なし