論　文　概　要

論文題目：Granzyme B derived from autoaggressive CD8 T cell is crucial for the induction of interface dermatitis with keratinocyte death（自己反応性 CD8 T 細胞由来のグランザイム B は角化細胞死を伴う苔癬反応の誘導に重要である）

指導教員　藤本学

筑波大学人間総合科学研究科疾患制御医学専攻皮膚科教授

（所属）筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

（氏名）齊藤明允

目的：
苔癬反応は、急性移植片対宿主病（GVHD）やループスエリテマトーデス、スティーブンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死症などで見られる皮膚病理学的所見で、表皮真皮境界部への炎症細胞浸潤と表皮角化細胞死を特徴とする。ヒト検体を用いた研究では、細胞傷害性 T 細胞のパーフォリン/グランザイム経路及び Fas/Fas リガンド経路が、苔癬反応における角化細胞死の誘導に関与していると推測されている。本研究では、苔癬反応マウスモデルを用いて、パーフォリン/グランザイム（PRF1/Gzm）経路及び Fas/FasL 経路の病態への役割を明らかにする。
方法：
角化細胞特異的に卵白アルブミン（OVA）遺伝子を導入した K14-mOVA Tg マウスをレシピエントとし、OVA 特異的な T 細胞受容体を有する CD8 T 細胞である OT-I 細胞をドナー細胞として養子移入することで、急性 GVHD 様の苔癬反応を伴う皮膚粘膜症状を発症するマウスモデルを用いた。局在追跡目的に GFP を遺伝子導入した、野生型 OT-I マウス、GzmB-KO OT-I マウス、GzmA-KO OT-I マウス、PRF1-KO OT-I マウス、および FasL-KO OT-I マウスをドナーとし、それぞれの K14-mOVA Tg レシピエントマウスの皮膚粘膜症状を比較した。
結果：
K14-mOVA Tg マウスは OT-I 細胞移入後 5 日に認められ、14 日目に最重症となる急性 GVHD 様皮膚粘膜症状を発症し、この間 2 相性の体重減少を呈した。また、移入後 14 日の耳介皮膚組織 HE 染色標本では、苔癬反応を呈し、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色で GFP 陽性 OT-I 細胞が真皮及び表皮内に浸潤し、TUNEL assay にて細胞死に陥った TUNEL 陽性角化細胞が多数認められた。GzmB-KO または PRF1-KO OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスは、皮膚粘膜症状と第 2 相体重減少を呈さず、GzmA-KO OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスは軽度の発症であった。GzmB-KO、PRF1-KO OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスの耳介皮膚組織標本では苔癬反応は認められず、OT-I 細胞浸潤も軽度で真皮に限局しており、TUNEL 陽性角化細胞を認めなかった。一方、FasL-KO OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスは、野生型 OT-I 細胞移入マウスと同等の皮膚粘膜症状を発症した。K14-mOVA Tg マウス移入後 OT-I 細胞のフローサイトメトリー解析では、GzmB-KO、PRF1-KO、GzmA-KO OT-I 細胞は野生型 OT-I 細胞と同等に活性化し、同等の増殖能、サイトカイン産生能、ケモカイン受容体 CXCR3 発現能を示した。表皮 mRNA リアルタイム PCR では、GzmB-KO または PRF1-KO OT-I 細胞を移入したレシピエントマウスにおいて、ケモカイン CXCL9/10 発現が低下していた。細胞傷害リリースアッセイでは、GzmB-KO OT-I 細胞と PRF1-KO OT-I 細胞は完全に、GzmA-KO OT-I 細胞は部分的に、

細胞傷害活性が障害されていた。
K14-mOVA Tg マウスに対し、OT-I 細胞移入前に serpina3n を投与した予防投与群では、移入後 14 日までに皮膚粘膜症状を発症せず、第 2 相体重減少も認めなかった。OT-I 細胞移入 5 日後に serpina3n を投与した治療群では、発症していた皮膚粘膜症状は著明に改善し、第 2 相体重減少も軽度であった。

考察：

OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスは、病理学的にも角化細胞死を伴う苔癬反応を呈する皮膚粘膜疾患モデルマウスである。本モデルマウスの解析により、苔癬反応は、細胞傷害性 CD8 T 細胞依存性であり、Fas/FasL 経路ではなく、GzmB/PRF1 経路を介した細胞傷害活性により誘導されることが判明した。
CD8 T 細胞において、GzmB や PRF1 が欠損していても、増殖や活性化には影響がなく、細胞傷害活性のみが障害されていた。一方、角化細胞死の減少に伴い、CD8 T 細胞遊走ケモカイン CXCL9/10 の発現は低下しており、GzmB-KO または PRF1-KO OT-I 細胞の皮膚組織への浸潤減少を説明するものと考えられた。一方、GzmA の介在する細胞傷害活性は部分的であった。GzmB 活性を阻害する serpina3n 投与では、苔癬反応を伴う皮膚粘膜症状発症抑制のみならず、治療効果も有していた。

結論：

角化細胞死を伴う苔癬反応型伴う皮膚粘膜疾患では、CD8 T 細胞の GzmB/PRF1 経路が病態の主体である。急性 GVHD を始めとして、現在は、ステロイドなどの非特異的免疫抑制薬にて治療されているが、GzmB 標的療法は有望な治療戦略と考えられ、生理活性物質である serpina3n は新規生物学的製剤の候補となり得る。