

氏名	齊藤 明允
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 8850 号
学位授与年月	平成 30年 9月 25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	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)

主査	筑波大学教授	医学博士	住田 孝之
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	臼井 丈一
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	森島 祐子
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	川崎 綾

## 論文の内容の要旨

齊藤明充氏の博士学位論文は、角化細胞死を伴う苔癬反応における CD8T 細胞由来グランザイム B の関与を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

### [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。著者は、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ことを目的として行ったものである。

### [方法]

- 1) GFP<sup>+/+</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>マウスのリンパ節より採取した OT-I 細胞 1×10<sup>6</sup>個を K14-mOVA Tg マウスに細胞移入し、体重測定及び臨床写真を撮影した。
- 2) 細胞移入後 14 日目の耳皮膚検体を用いて H-E 染色、9 日目の耳皮膚検体を用いて抗 GFP 抗体染色、TUNEL 試験を行った。
- 3) GFP<sup>+/+</sup>PRF1<sup>-/-</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>、GFP<sup>+/+</sup>GzmB<sup>-/-</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>、GFP<sup>+/+</sup>GzmA<sup>-/-</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>、GFP<sup>+/+</sup>FasL<sup>-/-</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>、及び GFP<sup>+/+</sup>OT-I<sup>+/+</sup>Rag1<sup>-/-</sup>の各マウスより採取した OT-I 細胞をそれぞれ K14-mOVA Tg マウスに細胞移入した。各群マウスの体重を測定した。
- 4) 3)と同様のマウス群において、耳皮膚検体の H-E 染色、GFP 蛍光染色、TUNEL 試験を行い、病理所見を評価した。
- 5) K14-mOVA Tg マウスに細胞移入後 2 日目の皮膚所属リンパ節細胞を採取し、T 細胞表面

活性化マーカー (CD25、CD44、CD62L、CD69) の染色、および TNF  $\alpha$ 、IFN  $\gamma$  の細胞内染色をフローサイトメトリー解析した。採取した各種 OT-I 細胞を抗原と抗原提示細胞と 48 時間共培養し、抗 CXCR3 抗体を用いてフローサイトメトリー解析した。

- 6) 耳皮膚検体の mRNA を抽出し real-time PCR で CXCL9/10 の発現を測定した。
- 7) SIINFEL、リコンビナント IL-2、IL-4 と 5 日間共培養した各種 OT-I 細胞をエフェクター細胞とし、EL-4 細胞をターゲット細胞として細胞障害活性を測定した。
- 8) 予防投与群ではリコンビナント *serpina3n* 蛋白 50  $\mu$  g を細胞移入同日に投与し、治療群では同量を細胞移入 5 日後に投与した。

## [結果]

- 1) K14-mOVA Tg マウスでは 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ていた。
- 2) 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ていた。
- 3) *GzmB*-KO または *PRF1*-KO OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg マウスでは、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。
- 4) *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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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 相体重減少も認められていなかった。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 相体重減少も軽度となっていた。

## [考察]

著者は、OT-I 細胞移入 K14-mOVA Tg 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を明らかにしている。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ることを明らかにしている。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 の発現は低下していることから、*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察している。さらに、*GzmB* 活性を阻害する *serpina3n* 投与実験では、苔癬反応を伴う皮膚粘膜症状発症を予防するのみならず、治療効果も認めることを明らかにしている。

## [結論]

著者は、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ことを結論づけている。GzmB を標的とした serpina3n は新規治療戦略となり得るものと期待することができよう。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は、角化細胞死を伴う苔癬反応の発症機序を明らかにすることを目的としたものである。OVA 特異的 TCR を発現したマウス (OT-I) 由来 T 細胞を角化細胞に特異的に OVA を発現したマウスに細胞移入した苔癬反応マウスモデル、及び、GzmB、GzmA、PRF1、FasL のノックアウト OT-I マウスを用いた。その結果、角化細胞死を伴う苔癬反応は CD8T 細胞のパーフォリン/グランザイム B (PRF1/GzmB) を介して発症すること、GzmB の抑制分子 serpina3n が苔癬反応を予防、治療することを明らかにした。本研究はユニークであり国際的にも高く評価されている。

平成 30 年 5 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。