

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	橋本 恵以
論文題目	Studies on the pathological mechanism of alopecia areata in C3H/HeJ mouse model (C3H/HeJモデルマウスを用いた円形脱毛症の病態メカニズムに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>円形脱毛症 (alopecia areata; AA) は後天性に脱毛斑を生じる非瘢痕性脱毛症であり、皮膚疾患の中でも特にQOLが著しく低下する疾患である。AAの最も一般的な病型は脱毛斑が1つ生じる単発型であるが、複数の脱毛斑が生じる多発型、頭髮全てが脱落する全頭型、全身で脱毛が生じる汎発型に移行する例も少なくない。治療法はステロイド局所注射、ステロイド外用及び局所免疫療法が中心であるが、脱毛範囲が大きく罹患期間が長いほど治療抵抗性が高く、さらに副作用の懸念もあることから、治療満足度は高くない。そのため、病型及び病期に応じた有効性及び安全性の高い新規治療薬の開発が強く望まれている。</p> <p>AAは、遺伝的な背景に加えてウイルス感染などのストレスがトリガーとなり、毛包の免疫特権が破綻することで発症する自己免疫疾患である。急性期の脱毛部では、リンパ球等が毛包周囲に密に浸潤し、抗原提示に関わる major histocompatibility complex (MHC) class I/IIの発現が増加している。標的となる自己抗原の候補として、メラニン合成又は爪関連タンパク質が報告されているものの、不明な点も多い。</p> <p>治療薬の開発には臨床の病態を反映した動物モデルが有用な手段となる。AAのモデルマウスとして、C3H/HeJ系統のAA発症マウスの皮膚所属リンパ節から単離した細胞を拡大培養しナイーブマウスに移植することで作製するリンパ節細胞移植モデルマウスが報告されている。臨床所見と類似した特徴がみられ、病態を良く反映しているため、本モデルマウスはAAの研究に汎用されている。本論文では、本C3H/HeJモデルマウスの病態解析を通して新たな治療標的を明らかにしている。さらに、本モデルマウスをより簡便に作製する新しい方法を構築している。</p> <p>第一章では、C3H/HeJモデルマウスを用いて病期による病態の違いと標的自己抗原について報告されている。ナイーブ、未発症、発症後の急性期及び慢性期について、末梢血単核細胞 (PBMC)、皮膚所属リンパ節及び皮膚における免疫細胞のポピュレーションを解析した。急性期には、腋窩リンパ節及びPBMCにおいてCD8⁺ effector memory T細胞 (T_{EM}) 及びCD8⁺ central memory T細胞 (T_{CM}) の割合が増加した。慢性期には、腋窩リンパ節及び皮膚でCD8⁺ T_{EM}及びCD8⁺ resident memory T細胞 (T_{RM}) の割合がさらに増加した一方、PBMCでは慢性期にCD8⁺ T_{EM}の割合が低下し、CD8⁺ T_{CM}の割合が増加した。この結果から、急性期にはCD8⁺ memory T細胞が全身で増加し、慢性期にはT_{EM}は局所に、T_{CM}は循環に留まることが示唆された。一方、CD4⁺ T_{EM}の割合は腋窩リンパ節及びPBMCにおいて未発症で増加し、CD8⁺ T_{EM}と比較して増加率が大きかったことから、CD4⁺ T_{EM}はCD8⁺ T_{EM}に先んじて増加し、発症前後にリンパ節においてCD4⁺ T_{EM}が抗原提示を受けている可能性が示唆された。また、発症後の皮膚</p>			

ではMHC class I/IIの発現が異所性に増加し、CD11c⁺樹状細胞が毛包周囲に浸潤していたことから、発症後には皮膚においても抗原提示が行われている可能性が示唆された。さらに、AA患者の標的抗原の候補であるtyrosinase-related protein 2及びtyrosinaseの関与について検証した結果、tyrosinase特異的CD8⁺ T細胞の割合及びtyrosinaseに対する血清抗体価が発症前後に増加した。以上の結果から、病態形成に関わる細胞ポピュレーションとその分布及び免疫関連因子の発現が病期によって異なること、また、本モデルマウスにおいてもAA患者と同様にtyrosinaseが標的抗原の一つであることを明らかにした。

第二章では、凍結細胞を用いたC3H/HeJモデルマウスの作製法について報告されている。AA発症マウスのリンパ節細胞を培養した後に凍結保存し、解凍して移植する方法（手法①）、リンパ節細胞を単離後すぐに凍結保存し、解凍後に培養して移植する方法（手法②）と凍結保存しない従来法についてAAの発症率を検討した。その結果、手法①では発症率が著しく低下したが、手法②は従来法と同程度の発症率を示した。手法②で作製したモデルマウスは従来法で作製したモデルマウスと同様に、脱毛の所見、毛包周囲への炎症性細胞の浸潤、皮膚中サイトカイン等の発現上昇が見られ、臨床の病態とも類似していた。また、発症率の低かった移植細胞と比較して、高い発症率を示した移植細胞ではCD4⁺ T_{EM}、CD8⁺ T_{EM}、CD8⁺ T_{CM}及びCD11c⁺樹状細胞の割合が大きく、これらのポピュレーションの移植が発症に重要であることが示唆された。結論として、凍結細胞を用いてより効率的に、臨床の病態を良く反映したAAモデルマウスを作製する方法を構築した。

第三章では、自然免疫の関与と新規治療薬の候補について報告されている。病期ごとの皮膚におけるNOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasomeの活性化について検討した結果、interleukin (IL) -1 β は未発症及び発症後の皮膚で、IL-18は発症後の皮膚で増加していた。発症後の皮膚ではNLRP3 inflammasomeの構成因子であるNLRP3、apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain及びcaspase-1の発現も増加していたことから、NLRP3 inflammasomeの増加及び活性化がAAの発症及び増悪に関与していることが示唆された。また、C3H/HeJモデルマウスにNLRP3阻害剤であるMCC950を週3回、6週間、皮下投与したところ、投与開始7日後から発毛ポイントが増加し、その後も経日的に増加した。投与開始7日後の皮膚では、毛包周囲への好中球及びリンパ球の浸潤が減少し、サイトカインやNLRP3 inflammasomeの構成要素の発現が低下していた。以上の結果から、NLRP3 inflammasomeがAAの病態形成に関与していること、また、NLRP3阻害剤がAAの有望な新規治療薬候補になりうることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

円形脱毛症は、皮膚疾患の中でも特にQOLが低い疾患である。ステロイド局所注射及び局所免疫療法等が推奨されているものの、有効性の低さや副作用の懸念から治療満足度が低い現状にあり、高い有効性と安全性を兼ね備えた新規治療薬の開発が望まれている。特に、重症度や病期によって病態が異なり、治療反応性も異なることから、病態生理に合わせた治療法の開発が必須となる。近年、C3H/HeJ系統の円形脱毛症モデルマウスを用いた病態解析が進められているものの、実臨床で見られるような病期による病態の違いについて詳細な解析はなされていない。また、獲得免疫の側面での研究は進んでいるものの、自然免疫の関与については不明な点が多い。

本論文では、C3H/HeJモデルマウスの病態解析を通して治療標的を解明することを目的とした一連の研究をまとめている。評価すべき主要な点は以下のように要約される。

1. 病態形成に関わる細胞集団の分布及び免疫関連因子等の発現が病期によって異なること、標的抗原を含む病態病理が患者と類似していることを明らかにした。
2. 凍結細胞を用いることで簡便かつ効率的にC3H/HeJモデルマウスを作製する方法を構築し、作製したモデルマウスが臨床病態を良く反映していることを示した。
3. 円形脱毛症の発症及び増悪にNLRP3 inflammasomeが関与すること、さらに、NLRP3阻害剤が治療効果を示すことを明らかにした。

以上のように、本論文は、円形脱毛症の病態をマウスにおいて的確に再現できること、また、モデルマウスにおいて病期により治療標的とその分布が異なること、ならびにNLRP3阻害薬が有望な治療薬の候補となることを明らかにしたものであり、免疫生化学、皮膚科学及び健康科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和4年5月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）