

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19705

研究課題名(和文) ヒト皮膚resident memory T細胞と皮膚疾患の関わりに関する解析

研究課題名(英文) The roles of human skin resident memory T cells in skin diseases

研究代表者

細川 玲(渡辺玲)(Hosokawa, Rei)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60463866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は乾癬、固定薬疹、円板状エリテマトーデスより皮膚T細胞を単離し、その表現型をflow cytometryにて検討した。その結果、乾癬においては、病変部だけでなく非病変部にもIL-17産生傾向を有するCD103陽性CD8 resident memory T細胞(TRM)が多く分布していることが分かり、この細胞群が皮疹準備段階を構築していると考えられた。また、固定薬疹、円板状エリテマトーデスにおいては、境界明瞭な皮疹であっても浸潤細胞にcentral memory T細胞が豊富であることが判明した。これはT細胞の可塑性の可能性をうかがわせる結果であり、今後経時的な変化を追いたい。

研究成果の概要(英文)：The investigator isolated skin T cells from psoriasis, fixed drug eruption, discoid lupus erythematosus, systemic sclerosis patients and normal control, and compared the phenotype of skin T cells by flow cytometry analysis. In psoriasis, CD103 positive CD8 resident memory T cells were found enriched both in lesion and nonlesion. These T cells, even in nonlesional sites, turned out to already possess a potential of IL-17A and are considered to construct a "ready to go" condition in nonlesional skin. In discoid lupus erythematosus and fixed drug eruption, the investigator assumed the strong relation of resident memory T cells. However, the isolated T cells turned out to possess central memory phenotype. This result supports the idea that central memory T cells can also survey the peripheral tissues and can be converted to resident memory T cells once they enter into peripheral tissues. The investigator will track the change of the same clones to determine the change of T cell phenotype.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚T細胞 resident memory T細胞 皮膚免疫

## 1. 研究開始当初の背景

マウスにおいて、循環中・リンパ節・組織を行き来する central memory T 細胞 ( $T_{CM}$ ) や皮膚に分布した後再度循環に戻らず定着し続ける皮膚 resident memory T 細胞 ( $T_{RM}$ ) の解析が進められてきた。ヒトにおいても、マウスと同様に循環する  $T_{CM}$ 、末梢組織に留まる  $T_{RM}$  が存在することが示され、皮膚 T 細胞リンパ腫において、びまん性紅斑を呈し血中やリンパ節中に悪性 T 細胞が蓄積するセザリ-症候群では悪性 T 細胞が  $T_{CM}$  の表現型を有し、境界明瞭な皮疹を形成する菌状息肉症では悪性 T 細胞が  $T_{RM}$  の表現型を有することが分かった。このように、皮膚 T 細胞が疾患の表現型と密接に関与する可能性が考えられたものの、皮膚 T 細胞リンパ腫以外の皮膚疾患、ひいては健常な皮膚自体において、皮膚 T 細胞の十分な解析がなされていないのが現状である。近年の研究により、皮膚が血中と異なる独自の T 細胞叢を有することが分かってきており、皮膚疾患への T 細胞の関与や健常皮膚の免疫恒常性における T 細胞の役割を論じる際に、血液中 T 細胞の解析結果をそのまま皮膚に流用して推測することは難しいと考えられる。よって、皮膚疾患解析の上では皮膚自体に分布する T 細胞を直接解析することが必要である。

## 2. 研究の目的

研究代表者は自身が報告したヒト皮膚  $T_{RM}$  分画の構成過程に着目し、末梢血 T 細胞の中で  $T_{RM}$  に移行しやすい細胞分画の同定を進めたいと考えた。さらに臨床的に  $T_{RM}$  の症状発現への関与が示唆される皮膚疾患において  $T_{RM}$  の構成やサイトカイン産生能の相違の観点から末梢血中・皮膚中の T 細胞のプロファイルを健常人と比較検討し、実際の皮膚疾患発現における  $T_{RM}$  の構成異常や機能異常を探りた

いと考えた。本研究の最終目的は、ヒト皮膚疾患における皮膚  $T_{RM}$  の機能異常を追究すること、さらには皮膚  $T_{RM}$  をターゲットとし科学的根拠に基づいた新しい疾患治療法を確立することにある。 $T_{RM}$  は皮膚のみでなく多くの末梢組織に分布することが近年の報告で分かりつつある。これら  $T_{RM}$  は、腸管・肺・生殖器上皮などのバリア組織のみでなく、脳神経系、肝臓、腎臓など、非バリア組織にも分布しており、皮膚以外の臓器においても臓器特異的疾患の発現に関与している可能性がある。皮膚で得られた知見が他の臓器特異的疾患に応用され、他臓器における免疫恒常性への  $T_{RM}$  の役割についても考察を進めることが可能になると期待される。

## 3. 研究の方法

まず、皮膚  $T_{RM}$  の構築過程を検討するうえで、血中 T 細胞のどの分画から  $T_{RM}$  が構築されやすいかを検討する必要がある。申請者がヒト  $T_{RM}$  の分画を同定する目的で用いたヒト T 細胞追跡マウスモデルを用いて、手術で余剰となった皮膚が入手された際に免疫不全マウスである NOD/SCID/IL-2R chain KO マウス (NSG マウス) に移植する。また allogeneic なヒト血中 T 細胞を naïve T 細胞、 $T_{CM}$ 、effector memory T 細胞を cell sorting により単離し、皮膚移植より 6 週経過した時点で皮膚移植マウスに sort した細胞群を静注する。この血中 T 細胞は、ヒト皮膚に選択的に進入することが既に示されており、血中 T 細胞のどの分画を静注した場合に皮膚へ移行する T 細胞が増えるか、また、皮膚へ移行した細胞の中で  $T_{CM}$  に形質を転換した細胞がどの程度の割合存在するかを比較検討した。また、皮膚疾患のうち、乾癬、円板状エリテマトーデス、固定薬疹、強皮症において、皮膚から T 細胞を単離し、その表

現型を健常皮膚 T 細胞と比較検討した。

#### 4. 研究成果

T 細胞追跡マウスモデルでは、 $T_{CM}$ 、effector memory T 細胞を移入した群で  $T_{RM}$  の構築がみられたが、皮膚片浸潤 T 細胞数は  $T_{CM}$  を移入した群で有意に高まっていることが分かった。この結果は、memory T 細胞の可塑性を示し、皮膚疾患における皮膚 T 細胞の構築を考えるうえで非常に重要な結果と考えた。

皮膚疾患において、乾癬では、当初病変部に非病変部と異なる  $T_{RM}$  の変化がみられることを想定していたが、予想外に、病変部・非病変部とも健常皮膚と比較して CD103 陽性 CD8  $T_{RM}$  の増数が認められ（図 1）この細胞分画は病変部・非病変部共に特に表皮に多く分布することが免疫染色で明らかとなった（図 2）これらは一見正常に見える非病変部においても、既に細胞刺激にて IL-17A を産生するポテンシャルを有していることが示された（図 3）。この結果は、健常皮膚においてすでに病変を構築する準備段階が整っていることを示唆し、この分画が治療対象となる可能性、また、生物学的製剤投与後にどのタイミングで治療休止を図るかなどの治療効果指標となる可能性が考えられた。

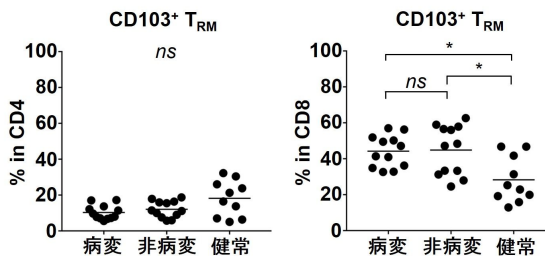


図 1: 乾癬では、病変部、非病変部ともに健常皮膚と比較して CD103 陽性 CD8  $T_{RM}$  の割合が高まっていた。CD4 T 細胞ではこの傾向は見られなかった。

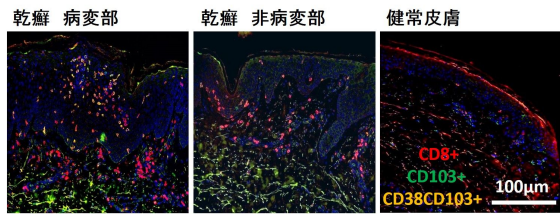


図 2: 乾癬皮膚を CD8 (赤)、CD103 (緑) で免疫染色したところ、病変部、非病変部ともに健常皮膚と比較して表皮内に CD103 陽性 CD8  $T_{RM}$  が多く分布していることが判明した。

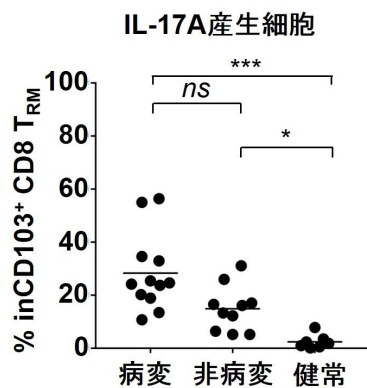
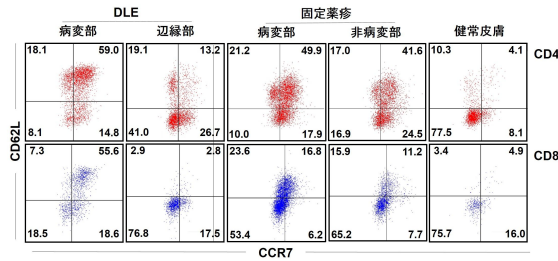


図 3: CD103 陽性 CD8  $T_{RM}$  は、病変部、非病変部（それまで病変を生じたことのない部位）いずれにおいても IL-17A を産生するポテンシャルを有する。

円板状エリテマトーデス、固定薬疹においては、申請者は当初、皮疹の形状から病態形成に関与する T 細胞は  $T_{RM}$  と考えていた。しかし、実際に皮膚単離 T 細胞の多くが  $T_{CM}$  の表現型を有していることが判明した（図 4）。この結果は、T 細胞追跡マウスモデルで得られた結果と連動し、皮膚に進入した  $T_{CM}$  が  $T_{RM}$  の構築につながる T 細胞の可塑性から説明が可能であると考えている。

図 4: 円板状エリテマトーデス、固定薬疹の皮膚 T 細胞の多くが、CD4、CD8 ともに T<sub>CM</sub> の表現型を有する。



強皮症においては、同一面積当たりの皮膚 T 細胞が健常皮膚と比較して著明に減少していることが判明した。中でも CD4 における CD103 陽性 T<sub>RM</sub> の分画が減少していた (図 5)。このように皮膚 T 細胞が減っていることは皮膚免疫染色でも示され (図 6) 強皮症皮膚では特に表皮 T 細胞がほとんど存在しないことが判明した。

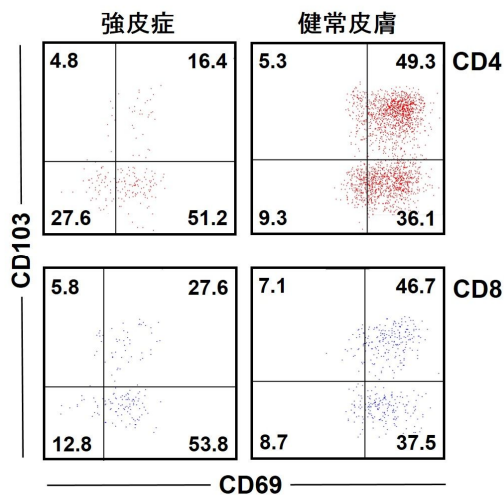


図 5: 強皮症皮膚から単離される T 細胞は総数として減少しており、中でも CD103 陽性 CD4 T<sub>RM</sub> の割合が健常と比較して減少していた。

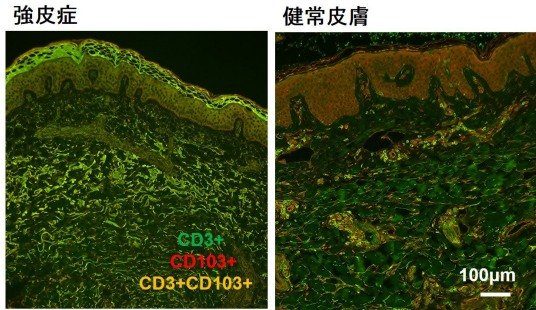
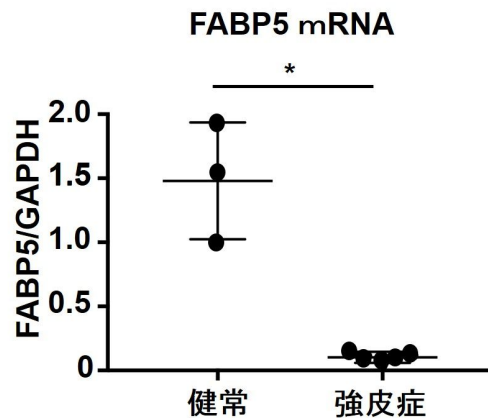


図 6: 強皮症皮膚を CD3(緑)、CD103(赤) で免疫染色したところ、特に表皮にほとんど T 細胞を認めないことが判明した。

近年、皮膚 T<sub>CM</sub> の長期生存に脂質代謝が必要であり、細胞内 fatty acid binding protein4/5 (FABP4/5) の発現亢進が T<sub>RM</sub> で確認されているが、強皮症皮膚においては、特に FABP5 の発現が健常皮膚と比較して有意に減弱していることが分かった (図 7)。このことから、強皮症皮膚には、FABP5 発現を抑制し皮膚 T<sub>RM</sub> の長期生存を阻害する周辺環境が整っている可能性が示唆され、強皮症皮膚と健常皮膚の脂質組成の相違を検討することで、健常における皮膚 T<sub>RM</sub> の構築に必要な要素が明らかになることが期待される。

図 7: 強皮症皮膚、健常人皮膚から抽出した mRNA から、FABP5 mRNA 発現量を rtPCR で測定したところ、強皮症皮膚において FABP5 発現の有意な減弱を認めた。



このように皮膚疾患を皮膚 T 細胞の観点から解析を行うことで、疾患特異的な機能異常を明確にし、健常皮膚の免疫機構への理解にもつなげていきたい。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Koguchi-Yoshioka H, Watanabe R, Fujisawa Y, Ishitsuka Y, Nakamura Y, Okiyama N, Clark RA, Fujimoto M. T cells in the skin of older individuals are diverse and highly functional. International Investigative Dermatology (IID) Meeting, poster presentation, 2018/05 Orlando, FL, USA

Vo S, Watanabe R, Matsumura Y, Fujimoto M. CD69+CD103+ CD8 resident memory T cells with the potential of producing interleukin-17 are enriched in both lesional and non-lesional skin of psoriasis patients. 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (SID), poster presentation, 2017/05 Portland, OR, USA

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 ( 渡辺 ) 玲

( HOSOKAWA ( WATANABE ), Rei )

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 60463866