

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08297

研究課題名(和文) 組織常在性記憶T細胞によるアトピー性皮膚炎の再発機構の解明

研究課題名(英文) How do tissue resident memory T cells induce the local recurrence of atopic dermatitis

研究代表者

村田 暁彦 (MURATA, Akihiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90624221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性皮膚疾患が同じ部位で再発・寛解を繰り返す原因について、マウスの皮膚炎モデルを用い研究を行った。炎症が治癒した皮膚には、これまでに知られていたキラーT細胞に加え、大量のヘルパーT細胞が記憶T細胞として真皮に残存することを見出した。これらの記憶T細胞は各々単独で「皮膚局所の免疫記憶」を形成し、アレルゲンへの反応性を局所的に増加させた。さらに、記憶キラーT細胞は1年以内に炎症を経験した皮膚から消失したのに対し、記憶ヘルパーT細胞は維持され続けた。よって、炎症を経験した皮膚に留まり続ける記憶ヘルパーT細胞が、皮膚疾患の再発の原因の一つである可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、炎症を経験した皮膚に形成される局所の免疫記憶は、皮膚に留まり続ける記憶ヘルパーT細胞が長期間維持することが分かった。よって、炎症性皮膚疾患の再発を根治するためには、患部から記憶ヘルパーT細胞を除去することで皮膚局所の免疫記憶を解消する必要があると示唆された。ステロイド剤の塗布等による治療では、症状が改善しても塗布を中止するとしばしば同じ部位で再発することから、既存の方法では皮膚局所の免疫記憶は除去できないと考えられる。今後、本研究の成果を元に、皮膚で記憶ヘルパーT細胞が維持される仕組みが明らかになり、その分子機構を標的とした皮膚疾患再発の根本治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of repeated relapses and remissions of allergic skin diseases such as atopic dermatitis in the same area using a mouse model of dermatitis. We found that in addition to killer T cells, a large number of helper T cells remained in the dermis as memory T cells in the inflammation-healed skin. Each of these memory T cells formed 'local skin immune memory' and locally increased reactivity to allergens of the skin. Moreover, while memory killer T cells disappeared from the inflammation-experienced skin within 1 year after healing, memory helper T cells continued to be maintained during this period. Thus, these results indicate that helper memory T cells, which remain in the inflammation-experienced skin, are one of the cause of the recurrence of inflammatory skin diseases.

研究分野：免疫学

キーワード：組織常在性記憶T細胞 ヘルパーT細胞 アトピー性皮膚炎 接触性皮膚炎 皮膚局所の免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

接触性皮膚炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚疾患は、同じ部位で再発・寛解を繰り返す特徴がある。ステロイド剤などによる対症療法で症状が改善しても、塗布を中止するとしばしば同じ部位で再発することから、炎症を経験した皮膚には従来の治療では取り除くことができない恒久的な変化が生じていると考えられる。

皮膚炎が局所で繰り返す原因の説明になり得るものとして、炎症を経験し治癒した皮膚に局所的な免疫記憶が形成され、抗原に対する感受性・反応性が増大するという現象が、ハプテン抗原の塗布によるげっ歯類を用いた接触過敏症(かぶれ)で古くから報告されている。BALB/c マウスでは、皮膚局所の免疫記憶は炎症の治癒後1年以上の長期にわたり維持されることが分かっている。近年、C57BL/6 マウスの研究から、炎症を経験し治癒した皮膚に残存するキラーT細胞であるCD8⁺ 組織常在性記憶T細胞(Tissue resident memory T cells: TRM)が皮膚局所の免疫記憶を担うことが示された。TRMは、活性化T細胞から炎症組織内で分化し、炎症終息後も組織に残存する記憶T細胞の一種である。

しかし、C57BL/6 マウスの炎症終息後の皮膚で形成されるCD8⁺ TRMは、時間経過とともに消失するため、皮膚局所の免疫記憶が長期間維持される仕組みは不明であった。さらに、ヒトの接触性皮膚炎が治癒した皮膚では、CD4⁺ ヘルパーT細胞が残存する主なT細胞であることが示されているが、この細胞が局所の免疫記憶の形成と抗原の再曝露時の皮膚炎再発に關与するかもまた不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、マウスの接触過敏症をモデルとして、皮膚局所の免疫記憶におけるCD4⁺ ヘルパーT細胞の關与と、この記憶が長期間維持される機構を解明することを目的に行われた。

3. 研究の方法

BALB/c マウスの耳介へのハプテン抗原塗布による接触過敏症をモデルに使用した。抗原の感作+チャレンジによる最初の右耳の皮膚炎が5週間を経て終息した後、未感作の左耳と治癒した右耳の皮膚に残存する細胞の数や遺伝子・タンパク質の発現の動態を皮膚切片やフローサイトメトリー、PCR解析などで比較することで、炎症の経験により皮膚に集積した細胞を検出し機能を評価した。また炎症の治癒後、両耳にハプテン抗原を再曝露した際の耳介の腫れを計測することで、皮膚局所の免疫記憶による抗原への感受性・反応性の増加を評価した。

皮膚局所の免疫記憶におけるCD8⁺/CD4⁺ TRM 各々単独の關与については、磁気ビーズを用いて純化した野生型CD4⁺またはCD8⁺ T細胞をT/B細胞を欠損するSCIDマウスやDO11.10マウス(大部分のT細胞が卵白アルブミン蛋白断片に反応するCD4⁺ T細胞になっているT細胞受容体トランスジェニックマウス)に養子移植する系や、BALB/c マウスへの抗原チャレンジの前後に各々のT細胞を抗体の投与により除去することで検討した。

4. 研究成果

(1) 皮膚局所の免疫記憶の性質の検討

ハプテン抗原(TNCB)による接触過敏症における、皮膚局所の免疫記憶の反応を検討した。接触過敏症は、ハプテン抗原の塗布により感作された個体が、一週間程度後に二度目の抗原塗布(チャレンジ)を受けた部位で生じる、T細胞依存性の皮膚炎である。右耳への感作+チャレンジで生じた接触過敏症が自然治癒した後、両耳にTNCBを再塗布すると未感作の左耳に比べ、炎症を経験した右耳の方が大きく腫れた(図1)。さらに、未感作の左耳がほとんど反応しない低濃度(0.01%)のTNCBに再曝露したときでさえ、炎症を経験した皮膚は激しい炎症反応を生じた。よって、TNCBによる最初の接触過敏症により皮膚局所の免疫記憶が形成され、炎症を経験した部位の抗原感受性と反応性が局所的に増加していることが確認できた。抗原の再曝露時に、炎症を経験した皮膚には未感作の皮膚に比べ大量の好中球が浸潤し、特に毛包内に集積する様子が観察された。

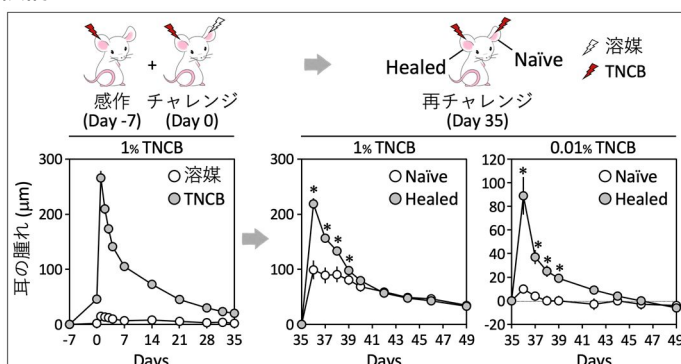


図1 TNCBによる皮膚局所の免疫記憶の反応
ハプテン抗原(TNCB)の感作+チャレンジによる右耳の接触過敏症と、Day 35の両耳への再チャレンジ後の耳介皮膚の腫れの推移。

したがって、炎症を経験した皮膚は激しい炎症反応を生じた。よって、TNCBによる最初の接触過敏症により皮膚局所の免疫記憶が形成され、炎症を経験した部位の抗原感受性と反応性が局所的に増加していることが確認できた。抗原の再曝露時に、炎症を経験した皮膚には未感作の皮膚に比べ大量の好中球が浸潤し、特に毛包内に集積する様子が観察された。

TNCBに対して形成された皮膚局所の免疫記憶は、他のハプテン抗原(FITCやOxazolone)の塗

布に対しては反応性を高めることはなく、抗原特異的な記憶であることが確認された。さらに、FITC や Oxazolone による炎症を経験した後も、TNCB に対する反応性の増大は維持されていたことから、異なる抗原による炎症を経験しても過去の皮膚局所の免疫記憶は維持され続けることが分かった。

(2) 炎症が治癒した皮膚には CD8⁺ TRM に加え CD4⁺ TRM が多く残存する

皮膚局所の免疫記憶の責任細胞を同定するため、炎症終息後の皮膚に残存する T 細胞を解析した。これまでの C57BL/6 マウスの報告通り、抗原チャレンジから 5 週間を経て炎症が治癒したばかりの皮膚では未感作の皮膚に比べ、炎症により増加した CD8⁺ T 細胞が残存しており、その約 70% が表皮に局在していた。それに加え、真皮ではより多数の CD4⁺ T 細胞が残存することを新たに見出した。これらの皮膚に残存する T 細胞はほとんどが TRM のマーカーである CD69 と CD103 を発現し、Thy1 や CD4 などの分子に対する抗体の投与による T 細胞除去に耐性であるという TRM の特徴を示したことから、TRM であると確認された。また、皮膚に存在する $\gamma\delta$ T 細胞は、炎症の経験により増加は見られなかった。

(3) CD8⁺/CD4⁺ TRM は各々単独で皮膚局所の免疫記憶を形成する

皮膚に残存する CD4⁺ TRM が皮膚局所の免疫記憶の形成に關与するかを検討するため、炎症を経験し治癒した皮膚に CD4⁺ または CD8⁺ TRM のどちらか片方しか存在しないという状況を作出した。これは、正常な T 細胞を欠損し皮膚局所の免疫記憶も形成されない SCID マウスや DO11.10 マウスに、野生型の CD8⁺ または CD4⁺ T 細胞を養子移入してから皮膚炎を生じさせる系、もしくは野生型マウスに CD4 または CD8 に対する抗体を投与し、各々の T 細胞を除去してから皮膚炎を生じさせる系を用いることで実現できた。各々の TRM のみを含む炎症が治癒した皮膚と、対側の未感作の皮膚に抗原を再曝露したところ、いずれの場合においても、CD4⁺/CD8⁺ TRM が両方皮膚に存在する場合と同様に、炎症経験のある皮膚で炎症反応の増大が観察された。よって、CD8⁺/CD4⁺ TRM は皮膚局所の免疫記憶を各々単独で形成できることが示唆された。

CD8⁺/CD4⁺ TRM がどのように炎症反応の増大を生じさせるのかを知るため、抗原の再曝露後、経時的に皮膚の mRNA 発現を解析した。すると曝露後 3 時間以内に、炎症経験のある皮膚では Interferon γ (IFN γ)、Tumor necrosis factor (TNF)、Interleukin (IL)-4、IL-13 の mRNA 発現が、未感作の皮膚に比べ亢進した。再曝露後 3 時間以降では IL-1 β 、IL-9、IL-22 等に加え、好中球の集積に重要なケモカイン Cxcl1 と Cxcl2 の mRNA 発現が亢進した。フローサイトメトリー解析で、抗原再曝露後 7 時間で炎症経験のある皮膚の CD4⁺ と CD8⁺ TRM の中に、IFN γ と TNF の両方またはいずれか一方を産生するものが検出された。一方、IL-4 はどちらの TRM も産生しなかった。また、未感作の皮膚の T 細胞はこれらのサイトカインを産生しなかった。よって、抗原の再曝露により活性化された CD8⁺/CD4⁺ TRM が、どちらも迅速に IFN γ と TNF を放出し、下流のサイトカインやケモカインの発現を誘導することで炎症反応が増大することが示唆された。

(4) 皮膚局所の免疫記憶は CD4⁺ TRM により長期間維持される

CD4⁺/CD8⁺ TRM のどちらが皮膚局所の免疫記憶を長期間維持するか明らかにするために炎症終息後の皮膚を経時的に解析した(図2)。すると、CD8⁺ TRM の数は時間経過とともに徐々に減少し、治癒後 1 年以内にほぼ消失して未感作の皮膚と同程度の数になった。一方、CD4⁺ TRM の数はこの間減少することなく維持され続けた。炎症経験のある皮膚では、治癒してから 1 年後に抗原を再曝露されたときで

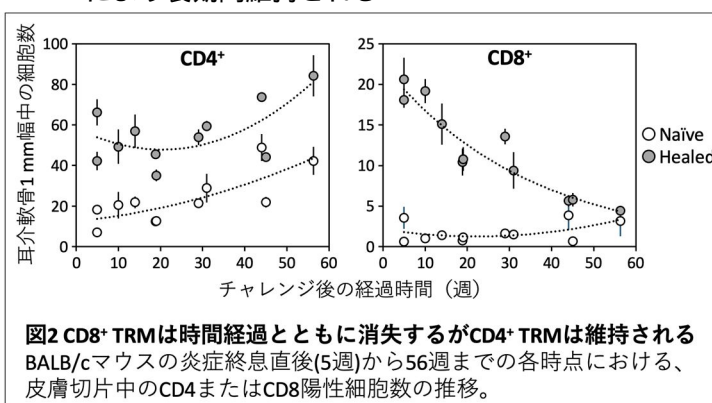


図2 CD8⁺ TRM は時間経過とともに消失するが CD4⁺ TRM は維持される BALB/c マウスの炎症終息直後(5週)から56週までの各時点における、皮膚切片中の CD4 または CD8 陽性細胞数の推移。

さえ、皮膚局所の免疫記憶による炎症反応の増大を生じた。よって皮膚局所の免疫記憶は、炎症の終息直後には CD4⁺ と CD8⁺ TRM の両方により担われるが、徐々に CD4⁺ TRM 媒介性のものにシフトし、最終的には CD4⁺ TRM のみで長期間維持されることが示唆された。

以上の結果から、アレルギー性皮膚疾患を経験した皮膚には CD8⁺ TRM と CD4⁺ TRM に支配される独立した 2 つの局所の免疫記憶の機構が存在すること、局所で再発を繰り返してしまう原因の一つは、治療による寛解後も特に CD4⁺ TRM が長期間残存し続けることにより皮膚局所の免疫記憶が維持され、抗原に対して敏感な状態が続くためではないかと示唆された (Murata A. and Hayashi S.I., Frontiers in Immunology, 2020) (図3)。よって、アレルギー性皮膚疾患の再発・寛解のサイクルを止めるためには、炎症を経験した皮膚から CD8⁺ TRM に加え、CD4⁺ TRM も除去することで皮膚局所の免疫記憶を解消し、増大した抗原感受性と反応性を元の状態に戻す

必要があると示唆された。

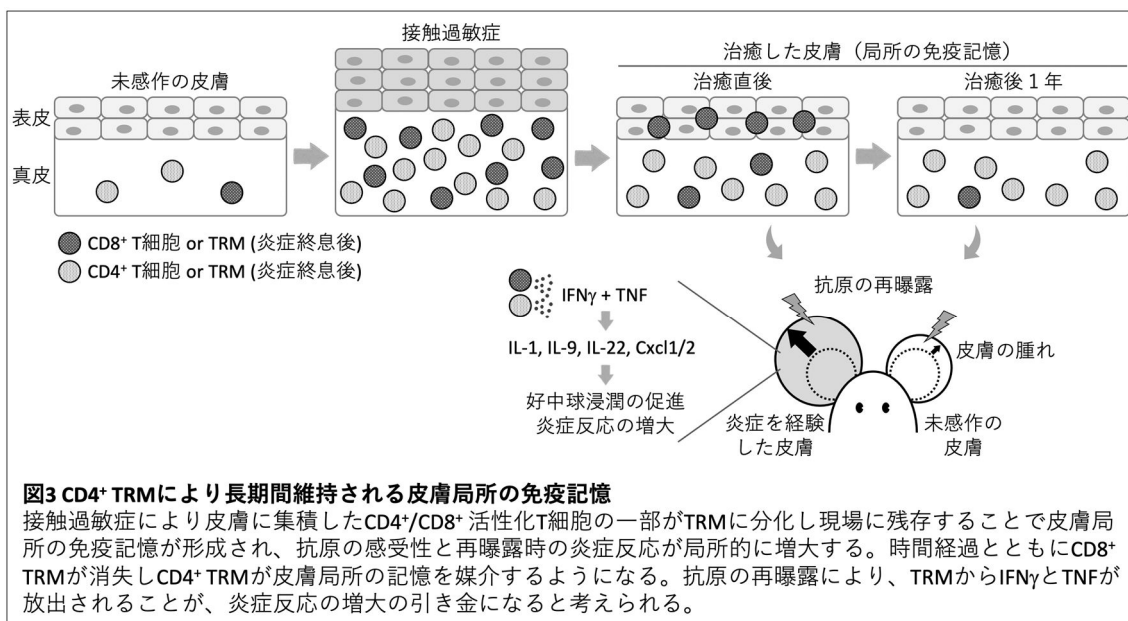


図3 CD4+ TRMにより長期間維持される皮膚局所の免疫記憶

接触過敏症により皮膚に集積したCD4+/CD8+ 活性化T細胞の一部がTRMに分化し現場に残存することで皮膚局所の免疫記憶が形成され、抗原の感受性と再曝露時の炎症反応が局所的に増大する。時間経過とともにCD8+ TRMが消失しCD4+ TRMが皮膚局所の記憶を媒介するようになる。抗原の再曝露により、TRMからIFN γ とTNFが放出されることが、炎症反応の増大の引き金になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 村田暁彦	4. 巻 75
2. 論文標題 常在生記憶ヘルパーT細胞が担う皮膚の局所的な長期免疫記憶	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 292-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuichi Iida, Rintaro Yoshikawa, Akihiko Murata, Hitoshi Kotani, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, Yumi Matsuzaki, Mamoru Harada	4. 巻 8
2. 論文標題 Local injection of CCL19-expressing mesenchymal stem cells augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 antibody by promoting infiltration of immune cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e000582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/ jitc-2020-000582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryutaro Kotaki, Masaharu Kawashima, Asuka Yamaguchi, Naoto Suzuki, Ryo Koyama Nasu, Daisuke Ogiya, Kazuki Okuyama, Yuichiro Yamamoto, Masako Takamatsu, Natsumi Kurosaki, Kiyoshi Ando, Akihiko Murata, Masato Ohtsuka, So Nakagawa, Koko Katagiri, Ai Kotani	4. 巻 10
2. 論文標題 Overexpression of miR 669m inhibits erythroblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70442-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintaro Hojyo, Damon Tumes, Akihiko Murata, Koji Tokoyoda	4. 巻 32
2. 論文標題 Multiple developmental pathways lead to the generation of CD4 T-cell memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 589-595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Murata, Shin-Ichi Hayashi	4. 巻 11
2. 論文標題 CD4+ resident memory T cells mediate long-term local skin immune memory of contact hypersensitivity in BALB/c mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 村田暁彦, 林真一	4. 巻 71
2. 論文標題 Notchによるマスト細胞の接着	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 576-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Murata, Mari Hikosaka, Miya Yoshino, Lan Zhou, Shin-Ichi Hayashi	4. 巻 31
2. 論文標題 Kit-independent mast cell adhesion mediated by Notch	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 69-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy067.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 村田暁彦, 林真一	4. 巻 70
2. 論文標題 接触過敏症における皮膚局所の免疫記憶	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 367-372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Murata A, Yoshino M, Hayashi SI
2. 発表標題 CD4+ and CD8+ resident memory T cells redundantly mediate local skin memory response in contact dermatitis.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino M, Murata A, Hayashi SI
2. 発表標題 Influence of immune activation on the transport of skin self-antigens to regional lymph nodes.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iida Y, Yoshikawa R, Murata A, Kotani H, Harada M
2. 発表標題 Local deliver of CCL19-expressing mesenchymal stromal cells augments the therapeutic efficacy by anti-PD-L1 blockade antibody via promoting infiltration of immune cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Murata, Miya Yoshino, Shin-Ichi Hayashi
2. 発表標題 Local skin memory response is mediated by tissue resident memory T cells
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazune Tanigawa, Akihito Murata, Miya Yoshino, Shin-Ichi Hayashi
2. 発表標題 Distinct effect of LPS stimulation on TLR3 expression in macrophage subsets
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miya Yoshino, Kazune Tanigawa, Akihiko Murata, Shin-Ichi Hayashi
2. 発表標題 Analysis of the transport of self-antigens from the skin to regional LNs under inflammatory conditions
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Iida, Rintaro Yoshikawa, Akihiko Murata, Yumi Matsuzaki, Mamoru Harada
2. 発表標題 Local delivery of CCL19-expressing mesenchymal stromal cells suppresses the tumor growth via promoting infiltration of immune cells
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鳥取大学医学部生命科学科 論文掲載情報 https://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/lifesciences/life-science.html</p> <p>鳥取大学医学部プレスリリース 皮膚炎の免疫記憶細胞を同定 https://www.med.tottori-u.ac.jp/files/42351.pdf</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------