

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08302

研究課題名(和文) 表皮内におけるIL-13産生T細胞の分化誘導シグナルの解明

研究課題名(英文) Identification of the intraepidermal signal that induces differentiation of IL-13-producing resident epidermal T cells

研究代表者

河井 一浩 (Kawai, Kazuhiro)

鹿児島大学・歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90242411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの表皮内T細胞は単一の T細胞レセプター(V₃ TCR)を発現し、ケラチノサイト上のリガンドを認識してIL-13を産生する。胎仔胸腺内のV₃T細胞はIL-13を産生せず、皮膚に遊走後に表皮内でIL-13産生細胞に分化する。各種遺伝子ノックアウトマウスの表皮内T細胞のうち、ケラチノサイト上のリガンドを認識できるTCRを発現する細胞のみがIL-13を産生した。新生仔マウス表皮内V₃T細胞をTCR刺激して*in vitro*で分化を誘導するモデルにTCR下流の各シグナル伝達経路の阻害薬を添加することにより、IL-13産生細胞への分化に特異的なシグナル伝達経路を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりTCRシグナルが表皮内におけるIL-13産生T細胞の分化誘導シグナルであることが明らかになった。TCRシグナルは抗原認識によるT細胞の増殖・活性化、メモリーT細胞の生存・維持に必須であるが、本研究の結果は表皮内にはTCR刺激によりIL-13産生細胞への分化を誘導しやすい微小環境が存在することを示している。IL-13はアレルギー性疾患のみでなく、さまざまな自己免疫疾患や創傷治癒においても重要な役割を演じており、今後、IL-13産生細胞優位な分化を誘導する表皮内微小環境の本体を明らかにすることにより、これらの皮膚疾患の新規治療戦略の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Resident epidermal T cells of the murine skin express an invariant T-cell receptor (V₃ TCR) that recognizes an undetermined self ligand expressed on epidermal keratinocytes, and produce IL-13 upon TCR stimulation. Their fetal thymic precursors do not produce IL-13 and acquire IL-13-producing capacity in the perinatal epidermis. Analyses of cytokine production by resident epidermal T cells in *Tcrd*^{-/-} and *Tcrd*^{-/-}*V1*^{-/-} mice revealed that only epidermal T cells expressing TCR that can recognize the self ligand on epidermal keratinocytes produce IL-13. We established a TCR stimulation-mediated *in vitro* differentiation model of neonatal epidermal V₃ T cells. By adding inhibitors of downstream signaling pathways of TCR, we identified a candidate signaling pathway specific for the differentiation of IL-13-producing cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：IL-13 T細胞 T細胞レセプター T細胞分化 樹枝状表皮T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹枝状表皮 T 細胞 (dendritic epidermal T cell, DETC) として知られるマウスの表皮内 T 細胞は、 $V\gamma 3$ 鎖と $V\delta 1$ 鎖の組合せからなる単一の $\gamma\delta$ T 細胞レセプター (T-cell receptor, TCR) を発現し、表皮ケラチノサイト上に発現する未同定の自己リガンドを認識する (文献)。DETC の前駆細胞は胎生 14-18 日の限られた期間に胸腺内で分化し、胎生期の中に皮膚に遊走するため、生後は $V\gamma 3$ T 細胞は表皮内のみで局在する (文献)。皮膚に遊走した $V\gamma 3$ T 細胞は表皮内でケラチノサイト上のリガンドを TCR を介して認識することにより増殖し (文献) 生後 2 週までに成熟マウスの DETC と同様の分布を示すようになる。DETC は、さまざまな刺激に反応して感作を必要とせず IL-13 を産生し、アトピー型アレルギーの誘導、皮膚バリアの維持、皮膚発癌の抑制において重要な役割を担っている (文献)。

末梢リンパ組織内で抗原刺激により活性化する過程で機能分化する $\alpha\beta$ T 細胞とは異なり、DETC を含む表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺内分化の過程で機能をプログラムされてから末梢組織に移住する (文献)。胸腺内における $\gamma\delta$ T 細胞の機能分化は TCR シグナルによって制御されており、胎仔胸腺内の $V\gamma 3$ T 細胞は、強い TCR シグナルにより IFN- γ 産生細胞に分化してから皮膚に遊走する (文献)。しかし、成熟マウスの表皮から単離した DETC は TCR 刺激により IL-13 を産生するが、IFN- γ は産生しない。我々は、 $V\gamma 3$ T 細胞は皮膚に遊走後に出生前後の表皮内で IL-13 産生細胞に分化することを明らかにしたが (図 1) 表皮内における IL-13 産生細胞への分化誘導シグナルは不明である。

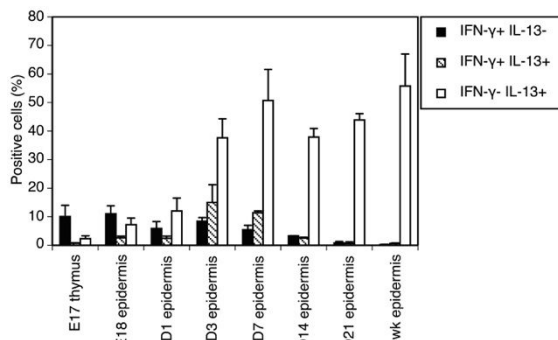


図1 各分化段階の $V\gamma 3$ T細胞におけるサイトカイン産生

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞をモデルとして表皮内における IL-13 産生 T 細胞の分化誘導シグナルを解明することである。

具体的には、表皮内における IL-13 産生細胞への分化にも TCR シグナルが関与しているという仮説に基づいて、TCR δ 鎖および $V\delta 1$ 鎖遺伝子欠損マウスにおける表皮内 T 細胞のサイトカイン産生の解析、in vitro 分化誘導モデルを用いた解析により、IL-13 産生細胞への分化誘導シグナルを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) TCR δ 鎖、TCRV $\delta 1$ 鎖遺伝子欠損マウスにおける表皮内 T 細胞のサイトカイン産生の解析

成熟 C57BL/6 マウス、TCR δ 鎖遺伝子欠損マウス、TCRV $\delta 1$ 鎖遺伝子欠損マウスの耳介からトリプシン処理により表皮細胞を単離した。

単離した表皮細胞を brefeldin A 存在下で PMA+イオノマイシンで 4 時間刺激し、抗 $V\gamma 3$ TCR 抗体、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体、抗 $V\gamma 2$ TCR 抗体で細胞表面染色後、固定・膜透過処理し、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-13 抗体、抗 IL-17A 抗体を用いて細胞内染色を行った。それぞれ TCR 陽性細胞にゲーティングして、各サイトカインの発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) 新生仔マウス表皮内 $V\gamma 3$ T 細胞の in vitro 分化誘導モデル

生後 1 日の新生仔 C57BL/6 マウスから表皮細胞を単離し、固層化抗 $V\gamma 3$ TCR 抗体と IL-2 の存在下で 5 日間培養後に回収し、IL-2 のみの存在下でさらに 2 日間培養した。回収した細胞を PMA+イオノマイシンで 4 時間刺激し、抗 $V\gamma 3$ TCR 抗体で細胞表面染色後、固定・膜透過処理し、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-13 抗体で細胞内染色を行った。 $V\gamma 3$ TCR 陽性細胞にゲーティングして、各サイトカインの発現をフローサイトメトリーで解析した。このモデルに TCR 下流の各シグナル伝達経路 (calcineurin, PKC θ , MEK1/2, p38, JNK) の阻害薬を添加して、IL-13 産生細胞への分化に与える影響を検討した。細胞傷害性 T 細胞への分化を阻害するために、このモデルに低濃度の mTOR 阻害薬、PI3 kinase 阻害薬を添加して、IL-13 産生細胞への分化に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) すべての $\gamma\delta$ T 細胞を欠損する TCR δ 鎖遺伝子欠損 ($Tcrd^{-/-}$) マウスの表皮内 T 細胞は $\alpha\beta$ T 細胞によって置換されるが、これらの表皮内 $\alpha\beta$ T 細胞は TCR を介してケラチノサイト上のリガンドを認識できない (文献)。TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 $\alpha\beta$ T 細胞は IL-13 ではなく

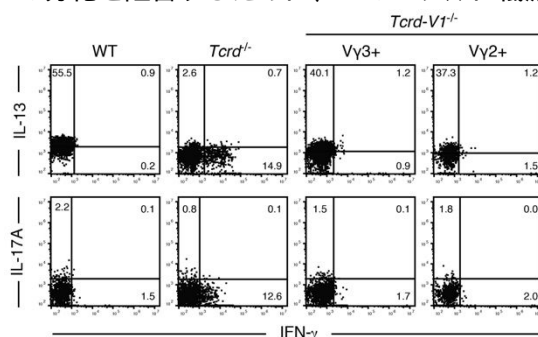


図2 各マウスの表皮内T細胞におけるサイトカイン産生

IFN- γ を産生することを確認した(図2)。一方、TCRV δ 1 鎖遺伝子欠損 (*TCRd-VI^{-/-}*) マウスの表皮内に存在する $\gamma\delta$ T 細胞はケラチノサイト上のリガンドを認識できる多様性のある $\gamma\delta$ TCR を発現する(文献)。TCRV δ 1 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 V γ 3T 細胞および V γ 2T 細胞はいずれも主に IL-13 を産生した(図2)。以上の結果は、TCR シグナルが表皮内における IL-13 産生細胞への分化誘導シグナルである可能性を支持している。

(2) 新生仔マウス表皮内 V γ 3T 細胞を TCR 刺激して *in vitro* で分化を誘導するモデルに TCR 下流の各シグナル伝達経路の阻害薬 A~E を添加したところ、阻害薬 C のみによって IL-13 産生細胞への分化が阻害され(図3) IL-13 産生細胞への分化に特異的なシグナル伝達経路の候補が同定された。しかし、このモデルでは TCR 刺激を受けた V γ 3T 細胞の多くが細胞傷害性 T 細胞に最終分化してしまうため、阻害薬を添加しない条件下(コントロール)で *in vivo* における IL-13 産生細胞優位な分化を再現できなかった(図3)。

細胞傷害性 T 細胞への分化を阻害するために、このモデルに低濃度の mTOR 阻害薬(rapamycin) を添加したところ、IL-13 産生細胞優位な分化が誘導された(図4)。なお、rapamycin は mTOR complex 1(mTORC1)のみを阻害するが、mTORC1 と mTORC2 の両者を阻害する Torin 1 および PI3 kinase 阻害薬である LY294002 の添加によっても IL-13 産生細胞優位な分化が誘導された。

$\alpha\beta$ T 細胞の増殖・機能分化には PI3 kinase-AKT-mTOR シグナルによる解糖系の増強が重要であるが(文献) 出生前後の表皮内微小環境はケラチノサイトの増殖によって低グルコース状態にあると考えられ、V γ 3T 細胞の増殖・機能分化は解糖系に非依存性である可能性がある。今後、本研究の結果に基づいて、新生仔マウス表皮内 V γ 3T 細胞における mTOR 活性およびエネルギー代謝経路を解析予定である。

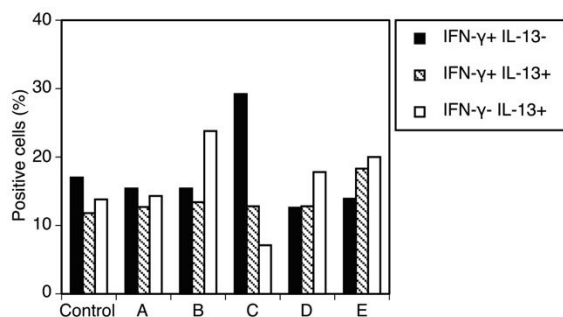


図3 新生仔表皮内V γ 3T細胞の*in vitro*分化誘導モデルにおけるシグナル伝達経路阻害薬の効果

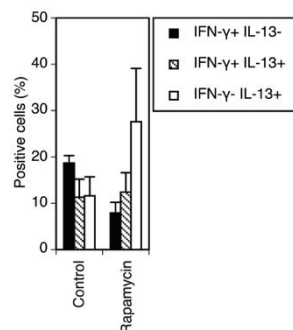


図4 新生仔表皮内V γ 3T細胞の*in vitro*分化誘導モデルにおけるmTOR阻害薬の効果

< 引用文献 >

- Thelen F, Witherden DA. Get in touch with dendritic epidermal T cells! *Front Immunol.* 2020;11:1656.
- Minagawa M, et al. Homogeneous epithelial $\gamma\delta$ T cell repertoire of the skin is shaped through peripheral selection. *J Dermatol Sci* 2001;25:150-155.
- Chodaczek G, et al. Body-barrier surveillance by epidermal $\gamma\delta$ TCRs. *Nat Immunol* 2012;13:272-282.
- Zhang B, et al. Differential requirements of TCR signaling in homeostatic maintenance and function of dendritic epidermal T cells. *J Immunol* 2015;195:4282-4291.
- Strid J, et al. The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy. *Science* 2011;334:1293-1297.
- Dallessandri T, et al. IL-13 from intraepithelial lymphocytes regulates tissue homeostasis and protects against carcinogenesis in the skin. *Nat Commun* 2016;30:12080.
- Crawford G, et al. Epithelial damage and tissue $\gamma\delta$ T cells promote a unique tumor-protective IgE response. *Nat Immunol* 2018;19:859-870.
- Fiala GJ, et al. From thymus to periphery: molecular basis of effector $\gamma\delta$ -T cell differentiation. *Immunol Rev* 2020;298:47-60.
- Jameson JM, et al. A keratinocyte-responsive $\gamma\delta$ TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J Immunol* 2004;172:3573-3579.
- Hara H, et al. Development of dendritic epidermal T cells with a skewed diversity of $\gamma\delta$ TCRs in V δ 1-deficient mice. *J Immunol* 2000;165:3695-3705.
- Klein Geltink RI, et al. Unravelling the complex interplay between T cell metabolism and function. *Annu Rev Immunol* 2018;36:461-488.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ibusuki A, Kawai K, Kanekura T
2. 発表標題 Differentiation of murine resident epidermal T cells into IL-13-producing cells in the perinatal epidermis
3. 学会等名 第32回表皮細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 指宿敦子, 河井一浩, 金蔵拓郎
2. 発表標題 マウス表皮内 T細胞は出生前後の表皮内でIL-13産生細胞に分化する
3. 学会等名 第182回日本皮膚科学会鹿児島地方会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	指宿 敦子 (Ibusuki Atsuko) (10596109)	鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教 (17701)	

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
---------	---------