

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02940

研究課題名(和文)皮膚resident memory T細胞の人為的制御および皮膚疾患予防への応用

研究課題名(英文)Artificial regulation of cutaneous resident memory T cells and their application to skin disease prevention

研究代表者

川村 龍吉(Kawamura, Tatsuyoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：70262657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで末梢組織に存在する抗原特異的resident memory T細胞(TRM)の発生、維持、増殖機構は明らかとなっていない。我々は、抗原特異的"皮膚"TRMの発生、維持、増殖に真皮樹状細胞が強く関与すること、また表皮ランゲルハンス細胞、真皮肥満細胞も一部関与することを明らかにした。これら抗原特異的TRMの発生、維持、増殖には抗原提示細胞-T細胞間のOX40シグナルが関与することも明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原特異的resident memory T細胞(TRM)は生体防御の観点において有益であるが、一方で過剰な免疫反応は有害でもある。本研究では皮膚の抗原特異的TRMの発生、維持、増殖に真皮や表皮に存在する様々な抗原提示細胞が異なる割合で関与することを明らかとし、その中でOX40シグナルが重要であることを見出した。このことはOX40シグナルを人為的に増強あるいは阻害することで抗原特異的TRMの数や機能を制御できることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying the development, maintenance, and proliferation of antigen-specific resident memory T cells (TRMs) in peripheral tissues have not been elucidated. We have shown that dermal dendritic cells are strongly involved in the development, maintenance, and proliferation of antigen-specific "cutaneous" TRMs, and that epidermal Langerhans cells and dermal mast cells are also partially involved. OX40 signaling between antigen-presenting cells and T cells is partially involved in the development, maintenance, and proliferation of these antigen-specific TRMs.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：resident memory T細胞 抗原提示細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで memory T 細胞は、central memory T 細胞・effector memory T 細胞の 2 種に分類されてきたが、近年の研究により、マウス・ヒトともに resident memory T 細胞 (TRM) という第 3 の memory T 細胞の存在が同定された。抗原特異的 TRM は末梢組織に長期間にわたり定住し、ウイルスなどの病原体の再感染時にそれらを速やかにクリアランスすることで生体防御に極めて重要である一方、炎症性皮膚疾患においては寛解部での皮膚炎症再燃などに関与していると考えられる。

TRM の origin となる memory T 細胞は所属リンパ節で抗原提示細胞から抗原提示を受け発生する。その後、末梢組織に到達した effector memory T 細胞の一部が TRM に分化すると思われるが、その発生・分化メカニズムは明らかにされていない。

皮膚抗原特異的 TRM および regulatory TRM の発生・維持・増殖におけるそれぞれの責任抗原提示細胞、責任分子を同定することで人為的に TRM、あるいは regulatory TRM を制御することが可能になれば、前者ではヒトにおける再発性ヘルペス予防・悪性腫瘍治療、後者では炎症性皮膚疾患などの予防、治療にトランスレーションできることが期待される。

### 2. 研究の目的

1 つ目の目的は“皮膚”抗原特異的 TRM、regulatory TRM それぞれの発生、生存、増殖を促進する抗原提示細胞の同定である。本研究で抗原として使用した herpes simplex virus (HSV) の皮膚・粘膜感染時の所属リンパ節での HSV 特異的 T 細胞の誘導は真皮に存在する樹状細胞 (DC) が担っている。ランゲルハンス細胞 (LC) は HSV に速やかに感染することでアポトーシスに陥り、抗原保有細胞となる。したがって、LC が直接的に TRM の誘導に関与することはないと思われたが、マウスでの検討では regulatory T cells (Treg) の分化・維持に LC が必要とされており、HSV 特異的 regulatory TRM 誘導後の維持に関与している可能性がある。IFN $\gamma$  は肥満細胞 (MC) 上の MHCII 発現を増強し、また DC は MHCII/抗原複合体を MC へ transfer することが報告されており、これらのメカニズムにより MC は抗原提示細胞として機能し、抗原特異的 CD4+T 細胞を誘導する。一方で、MC は外来抗原を crosspresentation することにより、抗原特異的 CD8+T 細胞を誘導することも報告されている。さらに、マウス皮膚 MC は皮膚炎症下で皮膚所属リンパ節へ migration する。これら DC, LC, MC の皮膚抗原特異的 TRM、regulatory TRM の発生、生存、機能への関与を検討した。

2 つ目の目的は皮膚抗原特異的 TRM の発生、分化に寄与する抗原提示細胞と T 細胞間のシグナルを同定することである。これにより、人為的に皮膚内の TRM/regulatory TRM バランスを変調することで疾患を予防、治療可能かを検討する。具体的には、本研究では HSV 特異的 CD8 陽性 TRM を増殖、regulatory TRM を減少させることで再発性 HSV 感染を抑制できるか検討する。

### 3. 研究の方法

#### 使用ウイルス

HSV-1 KOS 株

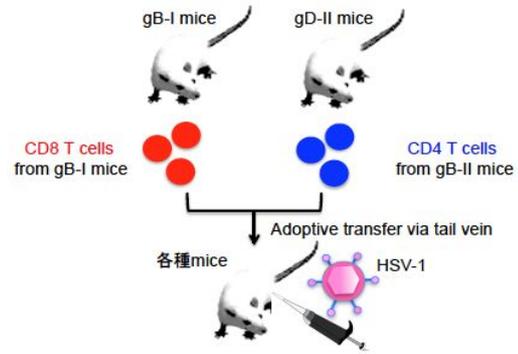
#### 使用マウス

EGFP gB-I mice: MHCI 拘束性に HSV gB peptide を認識する TCR を transgenic されたマウス  
CD45.1 gD-II mice: MHCII 拘束性に HSV gD peptide を認識する TCR を transgenic された  
マウス

B6 mice、 CD11c-DTR mice、 Langerin  
-DTR mice、 Kit W-sh/W-sh mice (以下、 Sash  
mice): 肥満細胞欠損マウス

\* の mice はジフテリア毒素 (DT)を投与  
することで、一時的に CD11c 陽性細胞、LC を  
除去することが可能である。

#### 基本的な実験スケジュール



1. gB-I mice, gD-II mice のリンパ節・脾臓より naive CD8 T 細胞、 naive CD4 T 細胞を単離。
2. 上記 - の mice の tail vein から移入。
3. 2. の mice の腹部を剃毛後、23G 針で表皮のみを乱切りし、 $1 \times 10^6$  PFU HSV-1 KOS を滴下。

#### 4. 研究成果

(1) 各種抗原提示細胞欠損マウス腹部皮膚に HSV-1 を接種し、1日・7日・30日・100日に HSV-1 特異的 TRM/制御性 TRM の数を所属リンパ節、脾臓、HSV-1 接種皮膚で確認した。CD11c-DTR マウスでは HSV-1 特異的 TRM が表皮・真皮の双方で著明に減少し、樹状細胞の TRM の発生、維持、増殖における重要性が示された Langerin-DTR では表皮 CD8 陽性 TRM の数が著明に減少した。これはランゲルハンス細胞の欠損により表皮 CD8 陽性 TRM の発生、あるいは維持に異常が生じることを意味する。興味深いことに Sash マウスでも CD11c-DTR マウスに比較すると程度は軽いものの HSV-1 特異的 TRM の減少が認められた。このことは真皮に存在する肥満細胞も抗原提示細胞として機能しかつ抗原特異的 TRM の発生、維持に関与することが示された。

(2) 抗原特異的 TRM 発生、維持、増殖に抗原提示細胞-T 細胞間のいずれのシグナルが重要であるか検討するために、野生型マウスおよび各種抗原提示細胞欠損マウスに HSV-1 を接種後、皮膚と所属リンパ節を採取し、CD3-MHCII+細胞を単離し TRM 発生時期に発現が増強する共刺激分子を microarray にて検討したところ、OX40 ligand (OX40L)が候補シグナルとなった。それぞれの抗原提示細胞特異的に OX40L を欠損するマウスを作成し(1)と同様の検討を行ったところ、樹状細胞・ランゲルハンス細胞・肥満細胞のいずれにおいても約 50% 抗原特異的 TRM 細胞の減少が認められた。このことは、抗原提示細胞上の OX40 ligand と T 細胞上の OX40 の結合が TRM の発生、維持、増殖に寄与することを示唆する。

(3) 次に抗原提示細胞上の OX40L 発現を増強させる分子を網羅的に検索した。その結果、TSLP や toll-like receptor (TLR) 2 ligand の静脈投与で皮膚および所属リンパ節における抗原提示細胞の有意な OX40L 発現を増強した。

(4) 現在、HSV-1 を接種され HSV-1 特異的 TRM が誘導された野生型マウスに HSV-1 を再接種し、TLR2 ligand (抗原特異的 TRM 増強系)あるいは OX40 ligand 抗体 (抗原特異的 TRM 減弱系)を投与することで HSV 感染重症度を観察している。また、HSV 接種腹部皮膚の HSV clearance を腹部皮膚の lysate を用いて plaque assay を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiokawa I, Sato T, Ogawa Y, Nagasaka Y, Ishikawa A, Shimada S, Kawamura T, Momosawa A.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Tissue Expander-associated T Cells: Relevance to Breast Implant-associated Anaplastic Large-cell Lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg Glob Open.	6. 最初と最後の頁 e4148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/GOX.0000000000004148.	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 Sato T, Ogawa Y, Ishikawa A, Nagasaka Y, Kinoshita M, Shiokawa I, Shimada S, Momosawa A, Kawamura T	4. 巻 2(4)
2. 論文標題 Revisiting the Experimental Methods for Human Skin T-Cell Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JID Innov.	6. 最初と最後の頁 10012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjidi.2022.100125.	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 Sato T, Ogawa Y, Yokoi K, Nagasaka Y, Ishikawa A, Shiokawa I, Kinoshita M, Watanabe R, Shimada S, Tanaka A, Momosawa A, Kawamura T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of human epithelial resident memory regulatory T cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 962167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.962167.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takuya Sato, Youichi Ogawa, Shinji Shimada, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Optimal methods for human skin T-cell analysis
3. 学会等名 米国研究皮膚科学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Sato, Youichi Ogawa, Shinji Shimada, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Human epidermal CD8+ resident memory T cells express TLR5
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Youichi Ogawa, Takuya Sato, Shinji Shimada, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 CD101 defines human epidermal, but not dermal, resident memory regulatory T cells
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Youichi Ogawa, Takuya Sato, Shinji Shimada, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 CD101 Expression Defines Resident Memory Regulatory T Cells and IFN- $\gamma$ -Producing CD8+ Resident Memory T Cells in Human Epidermis
3. 学会等名 国際研究皮膚科学会 (国際学会)
4. 発表年 2023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 分担者	小川 陽一  (Ogawa Youichi)  (20377542)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	岡本 崇  (Okamoto Takashi)  (30402043)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	
研究分担者	三井 広  (Mitsui Hiroshi)  (60372504)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	

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