

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08325

研究課題名（和文）マクロファージによる皮膚常在性記憶ヘルパーT細胞の生存維持機構の解明

研究課題名（英文）Maintenance of skin resident memory helper T cell survival by macrophages

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アレルギー性皮膚疾患の同一部位での再発に関わる局所免疫記憶を形成する組織常在性記憶ヘルパーT細胞（ヘルパーTRM）を除去するために、その維持に必要な生存ニッチをマウスの皮膚炎モデルを用い探索した。炎症治癒後の皮膚に形成されたヘルパーTRMの大部分が接触したまま長期間維持される細胞として、Folr2+マクロファージを見出した。しかし、マクロファージを皮膚から除去してもヘルパーTRMは減少しなかったことから、Folr2+マクロファージはヘルパーTRMの生存ニッチではないことが判明した。ヘルパーTRMは様々な免疫細胞や間質細胞にも分散して接していたため、複数の生存ニッチが存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性皮膚疾患が先進国で増え続けており、QOL（生活の質）を損なう一因となっている。寛解しても同一部位で再発を繰り返す特徴があるが、既存の対症療法では根治できない。寛解した患部に形成され、アレルゲンに対する反応性を増大させる局所免疫記憶は再発の有力な原因であるが、局所免疫記憶を長期間維持する組織常在性記憶ヘルパーT細胞（ヘルパーTRM）の生存機構は不明である。ヘルパーTRMの生存機構を解明することは、アレルギー性皮膚疾患の再発機構の理解にとどまらず、ヘルパーTRMを除去して局所免疫記憶を消去することで疾患を根治するための治療標的を見出す上でも重要となる。

研究成果の概要（英文）：To eliminate tissue resident memory helper T cells (helper TRM cells) that form a local immune memory associated with recurrence of allergic skin disease at the same site, we used mouse models of dermatitis to search for a survival niche for their maintenance. We identified Folr2+ macrophages as the cells with which the majority of helper TRM cells maintained long-term contact in the dermatitis-healed skin. However, helper TRM did not decrease when macrophages were removed from the skin, indicating that Folr2+ macrophages are not a survival niche for helper TRM. Helper TRM cells were also in contact with a variety of immune cells and stromal cells, suggesting that a variety of survival niches may exist.

研究分野：免疫学

キーワード：皮膚常在性記憶ヘルパーT細胞 局所免疫記憶 皮膚マクロファージ アレルギー性皮膚疾患 接触性皮膚炎

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。

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性皮膚疾患は同一部位で再発を繰り返す特徴があるが、その機構は不明な点が多く、再発を防止するための特異的な治療法もない。同一部位での再発の原因となり得るものとして、炎症が治癒した皮膚には長期間維持される T 細胞依存的な局所免疫記憶が形成され、同一アレルゲンに対する反応性が増大するという現象がモデル動物の研究で知られていた。近年、炎症終息後の組織に残存し続ける新たな記憶 T 細胞サブセットである組織常在性記憶 T 細胞 (Tissue resident memory T cells: TRM) が発見された。その後、2 種類の T 細胞 (キラーとヘルパー) のうち、皮膚の局所免疫記憶におけるキラー T 細胞由来の TRM (キラー TRM) の重要性が示された。しかし、ヘルパー TRM の関与、及び局所免疫記憶が長期間維持される機構は不明であった。

わたしはこれまでに、アレルゲン(ハプテン抗原)塗布によるマウスの接触過敏症(かぶれ)をモデルとして用い、1) 炎症を経験した皮膚にはキラー TRM が表皮に残存することに加え、多数のヘルパー TRM も真皮に残存すること、2) キラー TRM とヘルパー TRM のどちらか一方が存在するだけで皮膚の局所免疫記憶が形成され、アレルゲンへの反応性が増大すること、3) 炎症終息後、キラー TRM は時間経過とともに消失するのに対し、ヘルパー TRM は減少することなく 1 年以上維持され続けることを見出してきた (Murata & Hayashi, Front. Immunol., 2020)。よって、皮膚には表皮キラー TRM と真皮ヘルパー TRM が担う独立した 2 つの局所免疫記憶の機構が存在し、特にヘルパー TRM による記憶が長期間維持されアレルゲンに対して敏感な状態が局所的に持続することが、アレルギー性皮膚疾患が再発する原因であると考えている。

したがって、アレルギー性皮膚疾患を根治するためには、寛解した患部に残存するヘルパー TRM を除去し、局所免疫記憶を解除する必要があるが、標的とすべきヘルパー TRM の生存維持の機構が不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、マウスの皮膚炎モデルを用いて皮膚ヘルパー TRM の生存維持に関わる生存ニッチとなる細胞を同定することを目的として行われた。

## 3. 研究の方法

皮膚炎モデルとして、BALB/c マウス耳介へのハプテン抗原塗布による接触過敏症、及びヘルパー T 細胞受容体のトランスジェニックマウス (SMARTA マウス) の脾臓から単離した単一の抗原特異性を持つヘルパー T 細胞を野生型マウスに移植後、特異的な抗原で免疫することにより生じる遅延型過敏症を用いた。皮膚炎が 5 週間を経て終息した後、治癒した耳介皮膚を組織の免疫染色、及び酵素処理で単離した皮膚細胞のフローサイトメトリーにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 皮膚ヘルパー TRM は真皮ミエロイド細胞と接触し維持される

皮膚ヘルパー TRM の生存ニッチを同定するため、接触過敏症が治癒した皮膚組織のヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup>) が隣接する細胞系譜を解析した。治癒直後 (35 日目) の皮膚切片において、ヘルパー T 細胞の大部分は真皮に散在し、その 80% 近くは何らかの免疫細胞 (CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) に接することを見出した。また、ヘルパー T 細胞は間質細胞 (CD45<sup>+</sup> 細胞膜染色陽性) に約 50% が接し

ていたが、それらは構造や局在から血管や神経束、筋細胞、線維芽細胞など多岐にわたるとみられた。種々のマーカー分子を指標に接触する免疫細胞の種類を解析したところ、真皮ミエロイド細胞 (CD11b<sup>+</sup>) に約 70%、抗原提示細胞 (MHC-II<sup>+</sup>) に約 50%、樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>) に 20% 以下、マスト細胞 (Avidin 染色陽性) や好酸球 (Siglec-F<sup>+</sup>) に 10% 以下が接していた。真皮ミエロイド細胞は、単球や単球由来樹状細胞、マクロファージ、2 型樹状細胞など様々な細胞系譜を含むことが知られている。そこで、マクロファージのマーカー分子とされる CD68 や F4/80、MerTK を指標に評価したところ、70% 前後のヘルパー T 細胞がこれら分子の陽性細胞に接することを見出した。さらに、治癒から長期経過後 (292 日目) の真皮ヘルパー T 細胞を解析したところ、治癒直後と同様の割合で上記の各種細胞系譜に隣接することを見出した。

野生型マウスにおける接触過敏症を経験した皮膚のヘルパー T 細胞は、元々存在する循環型の記憶 T 細胞や、15% 程度の制御性 T 細胞を含む。実際の抗原特異的ヘルパー TRM の接触動態を評価するため、移植した SMARTA マウス由来の抗原特異的ヘルパー T 細胞を追跡可能な遅延型過敏症を用いた。野生型マウスの接触過敏症と同様に、遅延型過敏症が治癒した耳介皮膚に SMARTA マウス由来のヘルパー TRM が形成され、その約 70% が CD68<sup>+</sup>細胞に、15% が樹状細胞に隣接して存在していた。

以上の結果より、真皮に散在する皮膚ヘルパー TRM は主にマクロファージとみられる細胞に接触したまま長期間維持されることが示唆された。

#### ( 2 ) 皮膚ヘルパー TRM は主に Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージに接触し維持される

公開データベース上の真皮ミエロイド細胞集団に含まれる各細胞系譜 (2 型樹状細胞、単球、単球由来樹状細胞、マクロファージ) の遺伝子発現を解析すると、CD68 や F4/80、CD64、CD163、CD169、MerTK などのマクロファージのマーカー遺伝子は真皮ミエロイド細胞に広く発現していた。よって、組織切片上でこれらのマーカーによりマクロファージのみを検出することは困難であることが判明した。そこでマクロファージ分画にのみ発現する遺伝子を探索したところ、Fcrl2 (Folate receptor b) を同定した。フローサイトメトリー解析により、酵素処理で単離した皮膚細胞全体の中で真皮マクロファージ分画のみが Fcrl2 陽性であることを確認した。

接触過敏症を経験したマウスの皮膚ヘルパー T 細胞は、治癒の直後も長期経過後も約 70% が Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージ全体に、また 40% 前後ずつが抗原提示に必要な分子である MHC-II<sup>high</sup> または MHC-II<sup>low/+</sup> の Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージに接していた。よって、Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージが接触を介して大部分の皮膚ヘルパー TRM の生存維持に関与する可能性が考えられた。

#### ( 3 ) Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージは皮膚ヘルパー TRM に必要ない

Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージとの接触が皮膚ヘルパー TRM の生存に関与するかを知るために、マクロファージを除去することで皮膚 CD4<sup>+</sup> TRM が消失するかを検討した。耳介の接触過敏症を経験した BALB/c マウスに、貪食細胞を殺すクロドロン酸リポソームの耳介への皮下注射、またはマクロファージの分化・生存因子である M-CSF の受容体 (CSF1R) の阻害抗体の静脈注射により、Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージを含む皮膚マクロファージのほとんどを除去した。しかし、皮膚ヘルパー TRM は全く減少しなかったことから、Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージは皮膚ヘルパー TRM の生存維持に必要な可能性が示唆された。

#### ( 4 ) まとめ

皮膚ヘルパー TRM に広く共通する生存ニッチが存在するという仮説のもと、大部分の皮膚ヘルパー TRM が接触し続ける Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージを同定したが、それらを除去しても皮膚ヘルパー TRM の生存に影響はなかった。Fcrl2<sup>+</sup> マクロファージ以外では免疫細胞及び間質細胞の中に皮膚ヘルパー TRM が広く共通して接する細胞は検出されなかったことから、接触を介して生存因子を供給する単一の生存ニッチは存在しない可能性が考えられた。

今後、本研究で見出したマクロファージ以外の様々な細胞との相互作用、及び液性因子による遠隔からの作用の観点から皮膚ヘルパー TRM の生存機構を解明し、局所免疫記憶を除去するための治療標的を探索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akihiko Murata, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Macrophages function as survival niches for CD4+ skin-resident memory T cells
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Akihiko Murata, Momoka Wakazuki, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 CD4+ skin-resident memory T cells persist in CD68+ cellular niches
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shogo Tsuda, Harumi Sasaki, Akihiko Murata, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 In vivo predominant immunoglobulin secretion in the bone marrow IgG-secreting plasma cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Murata, Harumi Sasaki, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Isotype-specific metabolic requirements for survival of bone marrow plasma cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学生命科学科免疫学分野ニュース  
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/immunol/28939.html>  
鳥取大学医学部生命科学科免疫学分野  
<https://www.med.tottori-u.ac.jp/immunol/>

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