

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893055

研究課題名(和文) ヒト皮膚居住T細胞の解析

研究課題名(英文) Analyses of human skin resident memory T cells

研究代表者

細川 玲(渡辺玲)(Hosokawa, Rei)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60463866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮膚居住T細胞はCD69、CD103を発現し、これらがヒトでどのように構成されるかを検討した。表皮細胞と線維芽細胞を循環中T細胞と共培養したところ、表皮細胞と共培養したT細胞がCD69とCD103を、線維芽細胞と共培養したT細胞がCD69を発現することが判明し、循環中T細胞が真皮にてCD69を発現し、さらに表皮に移行してCD103を発現すると推察された。また、ヒトT細胞追跡マウスモデルにおいて循環するT細胞をalemtuzumabにより除去するとCD69+CD103+ T細胞とCD69+CD103- T細胞が皮膚片に残ることが判明し、この二分画がヒト皮膚居住T細胞分画と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Expression process of CD69 and CD103, which are known as skin-resident memory T cell markers, were investigated. When circulating T cells, which do not express CD69 or CD103, were co-cultured with keratinocyte sheets or fibroblast sheet, it turned out that T cells express CD69 and CD103 when co-cultured with keratinocytes (epidermal condition) and express CD69 when co-cultured with fibroblasts (dermal condition). Thus, it was assumed that T cells express CD69 when they enter into dermis and further express CD103 after entering into epidermis. In human T-cell trafficking mouse model, when circulating T cells were eliminated by alemtuzumab, CD69+CD103+ T cells and CD69+CD103- T cells were left intact in the grafted skin. This result indicates that these two fractions function as resident memory T cells in human skin.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：皮膚T細胞 resident memory T細胞

1. 研究開始当初の背景

例えば薬疹の中では全身の皮膚に瀰慢性に紅斑を生ずる紅皮症型薬疹と、限局性に境界明瞭な皮疹を生ずる固定薬疹、あるいは皮膚 T 細胞リンパ腫では皮膚だけでなく血中やリンパ節に悪性細胞が出現し全身に紅皮症を生ずる Sezary 症候群と、限局性に境界明瞭な皮疹を生ずるのみで他組織への悪性細胞の移行が見られない紅斑期菌状息肉症のように、皮膚疾患においては、同じ範疇であっても臨床像に大きな隔たりがある疾患が多く存在する。一方、従来より、抗原暴露に続く免疫記憶において重要な役割を有する memory T 細胞は、血中、リンパ節、組織を循環する central memory T 細胞(T_{CM})と、組織特異的な移行性を有する effector memory T 細胞(T_{EM})に分類されており、さらに近年、一旦組織に移行した後循環に戻ることなく組織に留まり続け、強いエフェクター機能を呈する resident memory T 細胞(T_{RM})分画が報告され、様々なマウス疾患モデルでその機能や動態が検討されている。ヒトにおいては健常皮膚内に T 細胞はほとんど存在しないと考えられていたが、2006 年に健常皮膚に血液中を上回る数の T 細胞がプールされていることが証明され、更に申請者のグループはヒト皮膚においてもマウスで報告された T_{CM} と同様の表現型と動態を示す分画が存在すること、皮膚 T 細胞リンパ腫では皮膚 T_{CM} の悪性化が Sezary 症候群の臨床像(瀰漫性紅斑)を呈することを報告し、その検討結果からヒトにおいても皮膚 T_{RM} に合致する分画が存在すること、 T_{RM} の悪性化が菌状息肉症の臨床像(境界明瞭な局面)を呈することが示唆された。上述のように皮膚疾患には同じ疾患概念の範疇に含まれながらも全く異なる臨床像を呈する場合があります、皮膚 T 細胞リンパ腫のように、これらの皮膚疾患の臨床像の多様性がその疾患に關与する T 細胞の表現型が大きく影響

している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトにおける皮膚 T_{RM} の存在を明らかにしその機能を追究することを目的とし、本申請における研究期間内では、その中で、ヒトの皮膚 T_{RM} を研究するモデルを確立し、皮膚 T_{RM} がどのように構築されるかを解明することを旨とした。

3. 研究の方法

表皮の主要な構成細胞であるケラチノサイト、真皮の主な構成細胞である線維芽細胞の培養シートを作成し、 T_{RM} マーカー (CD69、CD103) を発現していないヒト循環中 T 細胞と共培養することで、T 細胞が T_{RM} マーカーをどのように獲得するかを *in vitro* で経時的に検討した。また、ヒト GvHD モデルとして報告されたマウスモデル(ヒト皮膚とヒト循環中 T 細胞を免疫不全マウスに移植し、移植皮膚片に生じる変化を検討するモデル)を用いて、血中から皮膚へヒト T 細胞が移行することにより、表面マーカーの発現にどのような変化が生じるかを経時的に検討することで、皮膚 T_{RM} がヒトにおいてどのように構築されるかを追求することを目的とした。

4. 研究成果

ヒト循環中 T 細胞をケラチノサイト培養シートと共培養したところ、T 細胞の CD69、CD103 発現が高まり、線維芽細胞培養シートと共培養した所、T 細胞の CD69 発現が高まった(図 1 上)。従って、T 細胞は真皮にて線維芽細胞からの影響により CD69 をまず発現し、その後表皮に移行してケラチノサイトからの影響により CD103 を発現すると考えられた。

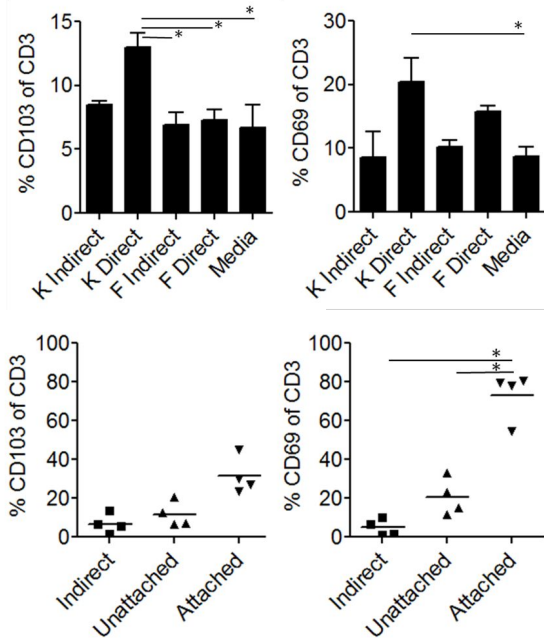


図 1 上:末梢血 T 細胞をケラチノサイト(K)あるいは線維芽細胞(F)と直接共培養(Direct)あるいは transwell を用いて間接共培養(Indirect)し、CD103、CD69 の発現率を比較した。下:ケラチノサイトと間接共培養した末梢血 T 細胞(Indirect)、直接共培養しケラチノサイトに固着しなかった T 細胞(Unattached)、固着した T 細胞(Attached)に分けて CD103、CD69 発現誘導を比較した。

また、これらの培養シートに固着した T 細胞には有意に高い CD69 発現が見られ、CD69 が細胞の組織への retention に強く関与することが考えられた(図 1 下)。実際に GvHD マウスモデルを用いた T 細胞追跡モデルでは、循環 T 細胞はヒト移植皮膚片に移行してまず CD69 を発現し、CD69 発現後に CD103 を獲得することが分かったことも、上記の仮説を支持すると考えられた。さらに、この T 細胞追跡モデルに循環 T 細胞を除去する alemtuzumab を投与したところ、移植皮膚片内に存在した CCR7 陽性 CD62L 陽性 T_{CM} が消失した(図 2 下)。これはヒトにおいても Sezary 症候群に対し alemtuzumab で治療を受けた症例の皮膚から、治療前に存在した T_{CM} 分画が消失したこと(図 2 上)と合致する結果であり、このマウスモデルにおいても実際のヒトにおいても T_{CM} が皮膚から循環に戻りそ

こで alemtuzumab による細胞除去を受けると考えられた。

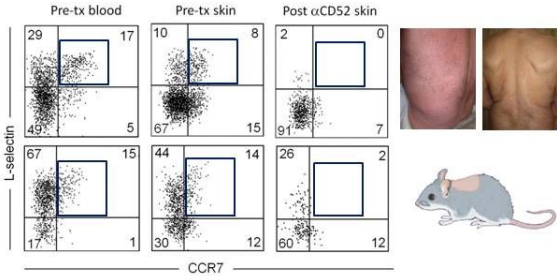


図 2 上:Sezary 症候群症例において、治療前の血中(左の dot plot)と皮膚中(中央の dot plot)に CCR7 陽性 CD62L 陽性 T 細胞(T_{CM})が確認されるが alemtuzumab 治療後の皮膚中(右の dot plot)からは消失している。下:T 細胞追跡マウスモデルにおいても、alemtuzumab 投与前の血中(左の dot plot)と移植皮膚片中(中央の dot plot)に T_{CM} が確認されるが、alemtuzumab 投与後の移植皮膚片中(右の dot plot)からは消失している。

そして、T_{RM} マーカーに関しては CD69 陰性 T 細胞が消失した移植皮膚片内には CD69 陽性 CD103 陽性 T 細胞と CD69 陽性 CD103 陰性 T 細胞の二分画が残り、実際のヒトにおいても、同様に alemtuzumab 投与後の Sezary 症候群症例の皮膚において、CD69 陰性 T 細胞が消失し、CD69 陽性 CD103 陽性 T 細胞と CD69 陽性 CD103 陰性 T 細胞の二分画が残っていた(図 3)。従ってこの二分画がヒトにおける T_{RM} とみなすことが出来ると考えられた。

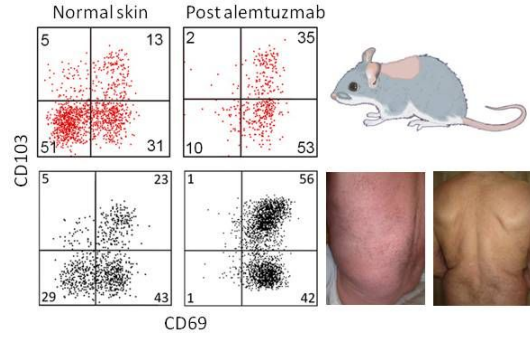


図 3 上:T 細胞追跡マウスモデルにおいて、alemtuzumab 投与前の移植皮膚片中(左の dot plot)に CD69 陰性 T 細胞、CD69 陽性 CD103 陽性 T 細胞、CD69 陽性 CD103 陰性 T 細胞が確認されるが、alemtuzumab 投与後の移植皮膚片中(右の dot plot)からは CD69 陰性 T 細胞が消失している。

図 3 下：実際のヒトでも Sezary 症候群症例において、alemtuzumab 治療前の皮膚（左の dot plot）では CD69 陰性 T 細胞、CD69 陽性 CD103 陽性 T 細胞、CD69 陽性 CD103 陰性 T 細胞が確認されるが、alemtuzumab 治療後の皮膚（右の dot plot）からは CD69 陰性細胞が消失し、CD69 陽性 CD103 陽性 T 細胞、CD69 陽性 CD103 陰性 T 細胞が残存している。

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 3 件)

1. Watanabe R, et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. The Society for Investigative Dermatology (SID) annual meeting 2015 年 5 月 9 日 Atlanta, GA, USA.
2. 渡辺玲 粘膜免疫と皮膚免疫 ヒトにおける皮膚 T 細胞. 第 42 回日本臨床免疫学会総会 2014 年 9 月 26 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
3. Watanabe R, et al. A novel population of T_{RM} with potent effector functions and a high proliferative capacity exists in human peripheral tissues. The Society for Investigative Dermatology (SID) annual meeting 2014 年 5 月 10 日 Albuquerque, NM, USA.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川 玲 (渡辺 玲) (Hosokawa,

Rei)(Watanabe, Rei)

(東京大学・医学部附属病院・助教)

研究者番号:60463866

(2)研究分担者:なし

(3)連携研究者:なし