

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860761

研究課題名(和文) 表皮 T細胞の機能解明に向けた解析ツールの開発

研究課題名(英文) Development of analytical tools for elucidating functions of epidermal gd T cells

研究代表者

志村 絵理 (SHIMURA, Eri)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30586342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：表皮に存在する T細胞であるDETC (dendritic epidermal T cell)はこれまで創傷治癒、皮膚癌、接触性皮膚炎といった皮膚疾患において重要な役割を担っている可能性が示されてきた。しかしながら、皮膚免疫応答におけるDETCの役割は依然として不明瞭なままである。その背景にDETCの解析に特化した利便性のあるツールが依然として存在しないことが考えられた。本研究では、DETCの機能解明に向けた解析方法の構築を目的として、DETCのマーカーとなる分子をコードする遺伝子をスクリーニングし、4遺伝子まで絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：DETC (dendritic epidermal T cell), a T cell present in the epidermis, has been shown to have an important role in skin diseases such as wound healing, skin cancer and contact dermatitis. However, the role of DETC in the skin immune response remains unclear. In the background it seemed that there was still no useful tool specialized for DETC analysis. In this research, for the purpose of constructing analysis method for elucidating the function of DETC, we screened 4 genes that code for molecules expressed on DETC.

研究分野：免疫学

キーワード：表皮gdT細胞 皮膚免疫 gdT細胞 アレルギー 接触性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

これまで、複数の遺伝子改変マウスを用いた解析により、皮膚組織における免疫応答の理解が進んできた。特に、免疫細胞と多くの皮膚疾患においては、ランゲルハンス細胞 (Langerhans cell : LC) を始めとする種々の樹状細胞に着目し、説明される場合が多く見受けられる。その背景として、これら樹状細胞の解析に特化した CD11c-DTR (Immunity.2002;17:211-220)、Langerin-DTR (Immunity.2005;22:643-654, J Cell Biol.2005;169:569-576)、Langerin-DTA (Immunity.2005;23:611-620) といった遺伝子改変マウスの構築とその解析が大きく寄与している。

定常状態のマウスの表皮では、LC と同様の形態で表皮 gdT 細胞 (Dendritic Epidermal T Cells : DETC) も存在している。これまでに、この DETC についても皮膚疾患との関連性が議論されてきており、創傷治癒、接触性皮膚炎、皮膚癌、移植片対宿主反応に伴う皮膚炎症において重要な役割を担っている可能性が議論されてきている (J.Exp.Med.1996;183,1483-1489, Science.2002;274:747-749, J Immunol.2004;172,3573-3579, Science.2001;294,605-609, J Invest Dermatol.2002;119,137-142, J Exp Med.2002;195,855-867)。これらの報告から、DETC の機能の明確化が皮膚組織を介した全身的な免疫応答の分子機構の理解において重要であると思われ、先に触れた樹状細胞のように、DETC に特化した解析を進めることで、皮膚疾患の病態や発症メカニズムについてさらなる理解を得られることも期待された。しかしながら、DETC については皮膚免疫応答における役割は殆ど解明されていないといっても過言ではない状況である。その理由として、大きく以下の2点が考えられた。

(1) 利便性のある DETC 解析ツールが存在しない。 樹状細胞については先に触れた複数の解析ツールが存在する一方、DETC の解析に有用なツールが存在しない。既報において、DETC の特徴である TCRg 鎖 (Vg5) の欠損が行われたことがあったが、Vg5 に代わる g 鎖が発現するようになり、DETC の欠損はできないという結果がある。その一方で、d 鎖を欠損するマウスは樹立されており、全身の gdT 細胞を欠損できることが報告されている。既報における DETC の理解は、この全身で gdT 細胞を欠損させたマウスを用いた解析により進められ、議論されてきたものが多い。しかしながら、実際は組織ごとに存在する gdT 細胞の種類は異なるため、d 鎖欠損マウスから一定の理解は得られるものの DETC に限定した解析はなされていない状況である。

DETC の細胞形態や動態の観察はある程度可能である。Vg5 特異的な抗体が入手

可能であることから、表皮シートやフローサイトメーターを用いて DETC の検出が可能である。ただし、活性化した DETC は gdTCR の発現が低下することから、これら検出方法は定常状態の DETC において有用であるが、何らかの炎症を誘導した場合には DETC の解析が十分に行える系とは考え難い。

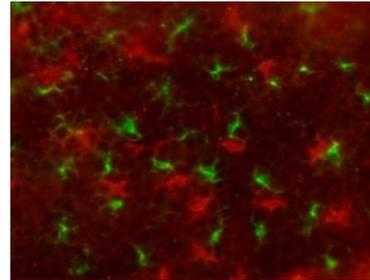


図1：表皮におけるランゲルハンス細胞 (緑) 及び DETC (赤) (表皮シートを CD3e 及び MHC class II の抗体を用いて染色)

(2) ヒトの皮膚組織において DETC に相当する細胞の有無が明確になっていない。

DETC の特徴である Vg5 鎖を発現する細胞はヒトの皮膚組織において発見されていないことから、現在、DETC はマウスの表皮のみに存在する gdT 細胞と考えられている。したがって、DETC の解析が仮に進んだとしても、ヒトにおける皮膚免疫応答の理解や皮膚疾患の診断や治療に貢献できるかどうか見通しが立たない。我々が既報を調べる限りでは、DETC に相当する細胞がヒトにいないという明確な証明はなされていない。

これら2点について、問題を払拭するためには、新規 DETC マーカーの特定が必要と考えた。つまり、DETC 特異的に発現する遺伝子を特定することで、(1)については DETC の解析に特化した遺伝子改変マウスの構築を可能にし、(2)については同定した遺伝子がヒトの皮膚組織において発現しているかどうか調べることで、TCR 以外の観点から DETC に相当する細胞の有無を考えるとできると思われた。

研究代表者はこれまでに DETC が表皮からリンパ節へ移行することで皮膚免疫応答に関わる可能性をみいだしてきた (Int Immunol.2010;22(4),329-40)。接触性皮膚炎を誘導した表皮において DETC の割合が減少することも確認しているが(未発表)、先に述べた(1)の点によりリンパ節へ移行した DETC を細胞レベルで検出することが困難であった。

一方、DETC の解析に特化した遺伝子改変マウスが無いことから、野生型マウスの脾臓細胞を RAG2 欠損マウスへ移入し、DETC が

表皮に存在しない状況を構築した。このマウスへ DNFB による接触性皮膚炎を誘導し、耳翼の厚さにより炎症を評価したところ、野生型マウスに比べて優位に腫れが抑制される結果を得ている(未発表)。この結果は TCRd 遺伝子欠損マウスにて接触性皮膚炎が悪化するという既報(J.Exp.Med.2001,195,855-867)とは異なる。これら状況も踏まえると、やはり DETC の機能を理解するためには、DETC のみを欠損するマウスや、レポーターマウスといった DETC に特化した解析ツールの構築の必要性が浮き彫りとなってくる。

そこで、研究代表者は DETC に発現する特徴的な分子を特定することで DETC の解析がし易い系の構築を試みるため、DETC 特異的に発現する遺伝子の探索を進めてきている。

これまでに、マイクロアレイ解析により、脾臓、腸管、皮膚の各 gdT 細胞およびランゲルハンス細胞の遺伝子情報を取得し、サブトラクションによって DETC のみの発現する候補として 500 遺伝子を抽出した。さらに、表皮ケラチノサイトから調製した mRNA を用いて RT-PCR を実施することで、非特異的に検出された遺伝子を候補遺伝子から除き、123 遺伝子まで絞り込んできた。これら候補遺伝子は皮膚組織や細胞骨格の形成に関わるものや、サイトカイン、ケモカイン、細胞膜表面受容体、転写因子等様々であったが、興味深いことに、細胞膜表面受容体や転写因子に関しては、脳で発現するとされる遺伝子が多いことが明らかとなった。本研究では、DETC の機能解明を目指し、解析ツールを構築すべく更なる遺伝子の絞り込みを進めている。

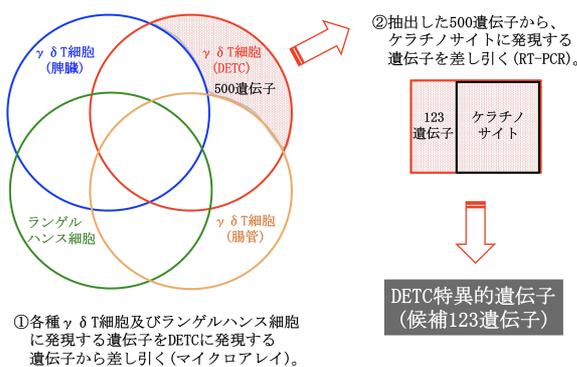


図 2 : DETC 特異的遺伝子スクリーニングの概略

2 . 研究の目的

DETC の解析に特化した解析ツールや手法を構築すべく、DETC に発現する遺伝子についてこれまで以上に絞り込みを行うことで、DETC のマーカーとなる遺伝子を同定することが第一の目的である。一方で、同定した遺伝子を発現する細胞の有無をヒトの皮膚組織で検討することで、DETC に相当する細胞がヒトの皮膚組織に存在するのか評価

する。

DETC 特異的遺伝子の絞り込みが仮にうまくいかなかった場合は、これまでに DETC が発現する分子として報告の無いものについて着目し、DETC における機能を解析することも視野に入れて研究を進める。

3 . 研究の方法

これまでの解析から、DETC 特異的遺伝子として、123 遺伝子を絞り込んできた。これら遺伝子について、RT-PCR を用いて以下の順序でさらなる候補遺伝子の絞り込みを行った。

(1) Reference RNA を用いた遺伝子スクリーニング

123 の候補遺伝子は、これまでの解析から、ケラチノサイトに発現していないか、PCR が上手く反応していないためバンドが検出できなかったかのいずれかである可能性が考えられた。そこで、Reference RNA を用いて再度 123 遺伝子について RT-PCR を実施した。バンドが検出された場合、ケラチノサイトではその遺伝子は発現していないと考え、DETC 特異的遺伝子の候補とした。

(2) E14.5 マウスの胸腺細胞を用いた遺伝子スクリーニング

DETC は成体マウスでは作られず、E14.5 付近の胎児胸腺で分化した後、皮膚組織へ分布するとされている。そこで、E14.5 の胎児胸腺細胞から抽出した RNA を用いて、絞り込んだ遺伝子について RT-PCR を行った。この実験によってバンドが検出された場合、その遺伝子を DETC 特異的に発現する遺伝子とすることとした。

4 . 研究成果

まず、研究の方法(1)によって、Reference RNA でバンドが検出できてケラチノサイトではバンドが検出されない遺伝子の抽出を進めた。時折、Reference RNA サンプルでバンドが検出されない遺伝子がいくつか見受けられた。これらに関しては、再度 primer を設計仕直し、Reference RNA でバンドが検出できるように条件を見直す作業を実施した。さらに、このように PCR の条件を見直した遺伝子については、これまでのスクリーニング手順(図 2)で行ったように、ケラチノサイトのサンプルでバンド有無を確認する過程に戻って解析を行った。これら操作によって、34 遺伝子が DETC 特異的遺伝子として残った。

続いて、研究の方法(2)によりさらなる遺伝子の絞り込み作業を行った。妊娠マウス 1 匹に含まれる E14.5 の胎児から胸腺細胞を採取し、RNA の抽出及び cDNA 合成を行った。このサンプルを用いて、(1)にて絞り込んだ 34 遺伝子の発現が認められるか、PCR を実施した。結果、4 遺伝子についてバンドが検出された。

皮膚では検討されていないが、これら 4 遺伝

子はヒトの組織にて検出されていることが判っている。

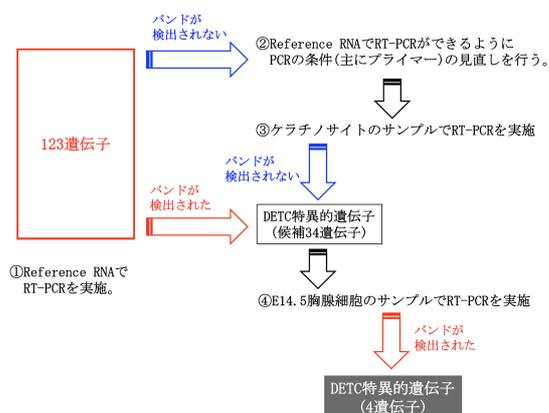


図3 : DETC 特異的遺伝子スクリーニングの概略_2

現在もこれら4遺伝子については解析を進めている最中の為、具体的な遺伝子名は伏せるが、遺伝子A、遺伝子B、遺伝子C、遺伝子Dとすると、それぞれ以下の特色を持つものであった。

- ・ 遺伝子A
イムノグロブリンスーパーファミリーメンバーの細胞接着タンパク質をコードする。骨格筋やニューロン、グリア細胞で発現が認められる。一方、活性化状態にある一部の免疫細胞においても発現が認められる。
- ・ 遺伝子B
受容体型チロシンキナーゼファミリーに属するタンパク質をコードする。そのリガンドは皮膚組織における創傷治癒やアレルギーとの関与が報告されている。
- ・ 遺伝子C
転写抑制因子として機能することが知られており、初期のB細胞分化やリンパ腫の発症に関与することが報告されている。
- ・ 遺伝子D
中胚葉の形成や脂肪細胞の増大に関与することが報告されている。

結果として、これら遺伝子は DETC 特異的に発現する遺伝子ではなかった。ただ、皮膚組織に存在する細胞や免疫細胞での発現について報告がなされていない遺伝子もある。特に遺伝子Bについては、そのリガンドが皮膚組織におけるアレルギーの病態に関与するとの報告があることから、現在 DETC の機能との関連性を解析している。

これら遺伝子A,B,C,Dは成体マウスの表皮及びE14.5の胎児胸腺のDETCいずれにおいても発現する遺伝子として抽出してきている。つまり、表皮のDETCと胎児胸腺のDETCとで共通しない遺伝子もある可能性が考え

られる。研究の方法(1)にて絞り込んだ遺伝子から今回最終的に抽出した遺伝子A,B,C,Dを指し引いた30遺伝子については、表皮のDETCに発現する遺伝子である可能性が高い。興味深いことに、これら遺伝子については、神経細胞の恒常性に関わる分子をコードする遺伝子が多く見受けられることから、今後具体的に個々の遺伝子に着目して解析を進めることで、DETCを介した新しい皮膚免疫応答のメカニズムの発見に繋がることが期待される。

一方、目的において触れた、ヒトの皮膚組織においてDETCに相当する細胞の存在を評価する件に関しては、現在サンプルの入手準備や解析手法を検討している最中である。着目する遺伝子については、今回最終的に絞り込んだ遺伝子A,B,C,DはDETC特異的に発現している遺伝子ではなかったことを考慮し、研究の方法で絞り込んだ34遺伝子の中からの選定を進めている。

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4件)

Suto H, Nambu A, Morita H, Yamaguchi S, Numata T, Yoshizaki T, Shimura E, Arai K, Asada Y, Motomura K, Kaneko M, Abe T, Matsuda A, Iwakura Y, Okumura K, Saito H, Matsumoto K, Sudo K, Nakae S., IL-25 enhances TH17 cell-mediated contact dermatitis by promoting IL-1 production by dermal dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.*, 査読有り, 2018 Mar 6. pii: S0091-6749(18)30326-9. doi: 10.1016/j.jaci.2017.12.1007.

Waseda M, Arimura S, Shimura E, Nakae S, Yamanashi Y., Loss of Dok-1 and Dok-2 in mice causes severe experimental colitis accompanied by reduced expression of IL-17A and IL-22., *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有り, 2016 Sep 9; 478(1):135-142. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.079. Epub 2016 Jul 20.

Shibui A, Takamori A, Tolba MEM, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Sanjoba C, Suto H, Sudo K, Okumura K, Sugano S, Morita H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S., IL-25, IL-33 and TSLP receptor are not critical for development of experimental murine malaria., *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有り, 2015 Dec 14; 5:191-195. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.007. eCollection 2016 Mar.

Shimura E, Shibui A, Narushima S, Nambu A, Yamaguchi S, Akitsu A, Leonard WJ, Iwakura Y, Matsumoto K, Suto H, Okumura K, Sudo K, Nakae S., Potential role of myeloid cell/eosinophil-derived IL-17

in LPS-induced endotoxin shock.,
Biochem Biophys Res Commun., 査読有り,
2014 Oct 10;453(1):1-6. doi:
10.1016/j.bbrc.2014.09.004. Epub 2014
Sep 6.

〔学会発表〕(計1件)

Eri SHIMURA, Influence of IL-21 signaling
on skin dendritic cells, 第46回日本免疫
学会学術集会,2017年12月13日,仙台国際セ
ンター(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 絵理 (SHIMURA, Eri)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30586342

(2)研究協力者

中江 進 (NAKAE, Susumu)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409