

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09757

研究課題名(和文)皮膚苔癬反応におけるランゲルハンス細胞によるCD8 T細胞抑制機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Langerhans cells inhibiting CD8 T cells in cutaneous interface dermatitis

研究代表者

沖山 奈緒子 (Okiyama, Naoko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10581308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性CD8 T細胞が制御する苔癬反応モデルマウスにて、免疫反応標的となっている表皮に常在するランゲルハンス細胞を、遺伝子組換え手法を用いて除去したところ、苔癬反応は増強し、皮膚組織に浸潤する自己反応性CD8 T細胞数が増加していた。抗原刺激したCD8 T細胞培養系にランゲルハンス細胞を共培養すると、CD8 T細胞のアポトーシスが増加し、増殖反応も抑えられていた。このことより、ランゲルハンス細胞は、活性化CD8 T細胞数を抑制することで、疾患制御に働いていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Langerhans cells spontaneously exist in the epidermis, which is the target of autoaggressive CD8 T cells in a murine model of interface dermatitis. Depletion of Langerhans cells induced severe dermatitis accompanied by increased number of infiltrating CD8 T cells in this model. Apoptosis of specific antigen-stimulated CD8 T cells were induced and their proliferations were inhibited when co-cultured with Langerhans cells in vitro. In conclusion, Langerhans cells regulate autoimmune interface dermatitis via inhibitory effects on autoaggressive CD8 T cells.

研究分野：皮膚科

キーワード：ランゲルハンス細胞 自己免疫 苔癬反応 皮膚炎 CD8 T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄移植後の合併症である移植片対宿主病 (GVHD) では、移植したドナー白血球が、レシピエントの主に皮膚・肝臓・腸管を異物と判断して攻撃する、人工的な自己免疫反応であり、急性期の皮膚症状は、水疱・びらんを伴う紅斑を特徴とする (Farrara JL, *et al.*, Lancet 373, 2009)。その皮膚症状は、病理組織学的には、リンパ球の浸潤とともに表皮基底層角化細胞のアポトーシスによる液状変性や、個細胞角化を伴う苔癬反応が起こっている。苔癬反応を呈する皮膚疾患は他に、全身性エリテマトーデス、重症薬疹の Stevens-Johnson 症候群・中毒性皮膚壊死、扁平苔癬があり、一群の皮膚疾患を Interface dermatitis と呼ぶ (Sontheimer RD., J Invest Dermatol 129(5), 2009)。顕著な表皮障害のために重症化し、時に致死的である。苔癬反応の病態生理はいまだ不明であるが、病理組織学的検討で、CD8 T 細胞が病原性を持ち、角化細胞死を誘導するという報告が複数あり (Miyauchi H, *et al.*, Arch Dermatol 127, 1991, Correia O, *et al.*, Arch Dermatol 129, 1993, Nassif A, *et al.*, J Allergy Clin Immunol 114, 2004, Iwai S, *et al.*, J Dermatol 39, 2012)、コンセンサスが得られている。SLE や扁平苔癬でも、同様である (Grassi M, *et al.*, Clin Exp Dermatol 34, 2009, Iijima W, *et al.*, Am J Pathol 163, 2003, Ammar M, *et al.*, J Cutan Pathol 35, 2008)。急性 GVHD は CD4 T 細胞誘導性だとされる (Palathumpat V, *et al.*, Transplantation 60, 1995, Chen X, *et al.*, Blood 110, 2007, Yi T, *et al.*, Blood 112, 2008)にも関わらず、皮膚症状では、水疱内に CD8 T 細胞が優位に検出され (Correia O, *et al.*, Dermatology 203, 2001)、CD8 T 細胞除去が GVHD を予防したとも報告されている (Maraninchi D, *et al.*, Transpl

Int 1, 1988)。以上、Interface dermatitis の特徴であり重症度を決定づける表皮角化細胞のアポトーシスは、細胞傷害性 CD8 T 細胞が引き起こしている。

病態解明や治療法開発には動物モデルが有用であることは論を待たない。CD8 T 細胞誘導性 Interface dermatitis のマウスモデルには、角化細胞に卵白アルブミン (OVA) を強制発現したマウスに、OVA 特異的 CD8 T 細胞 (OT-I 細胞) を移入するモデルがある (Azukizawa H, *et al.*, Eur J Immunol 33, 2003, Shibaki A, *et al.*, J Invest Dermatol 123, 2004)。申請者は、後者の Keratin14 プロモーター下 OVA トランスジェニック (K14-mOVA Tg) マウスでの GVHD 様苔癬反応モデルを用いた研究を行ってきた。CD8 T 細胞の細胞傷害性が、このモデルの苔癬反応の主体である。

本モデルでは、角化細胞自身が免疫制御系 Ligand の PD-L1 を発現し、PD-1 を発現する活性化 OT-I 細胞からの障害を阻止している (Okiyama N and Katz SI, J Autoimmun, 2014, *online*) が、ランゲルハンス細胞の働きは不明である。ハプテン誘導性接触皮膚炎のマウスモデルである Contact hypersensitivity では、ランゲルハンス細胞による外来抗原特異的 T 細胞制御作用は、制御性 T 細胞の活性化を介するとされている (Gomez de Agüero M, *et al.*, J Clin Invest 2012)。また、皮膚の自己免疫反応モデルを用いた検討では、ランゲルハンス細胞は、二回目に養子移入された自己抗原特異的 CD8 T 細胞に対して刺激を行わないとされたが (Mayerova D, *et al.*, J Immunol. 2006)、積極的に制御しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

上述の自己反応性 CD8 T 細胞誘導性の GVHD 様苔癬反応マウスモデルにおいて、ex vivo

での解析・機能実験や、ジフテリア毒素受容体 (DTR) 遺伝子導入マウス手法などを用い、

1) ランゲルハンス細胞の疾患への関与は疾患促進性か抑制性か、

2) 1) の機構は、PD-1/PD-Ls 機構などの、ランゲルハンス細胞の補助分子を介し直接に自己免疫性 CD8 T 細胞を制御するのか、もしくは制御性 CD4 T 細胞など他の細胞を誘導することで発揮されているのかを解明する。

### 3 . 研究の方法

ヒト Keratin14 プロモーター下に OVA cDNA を連結した遺伝子断片を挿入した Tg マウスは、表皮角化細胞に OVA を発現する (K14-mOVA Tg マウス)。K14-mOVA Tg マウスをレシピエントとし、OT-I マウスをドナーとして OVA 特異的 T 細胞受容体 (TCR)-Tg CD8 T 細胞である OT-I 細胞を  $1 \times 10^6$  個、経静脈的に移入すると、4 日後より GVHD 様に体重減少とびらんを伴う皮膚粘膜疾患を発症し、病理組織学的には液状変性を伴う苔癬反応を認める。そこで、ランゲルハンス細胞のマーカーである Langerin に DTR を組み込んだマウスと、K14-mOVA Tg マウスを掛け合わせたレシピエントに、DT を投与してランゲルハンス細胞を除去した後に OT-I 細胞移入を行い、その皮膚炎の重症度をスキンスコアや病理組織学的に評価する。また、耳介皮膚のフローサイトメトリーにて、浸潤 OT-I 細胞数や活性化状況を解析する。

In vitro の実験として、OT-I 細胞を特異的抗原 (CD8 エピトープである SIINFEKL) で *in vitro* にて刺激する際に、K14-mOVA Tg マウス表皮より採取したランゲルハンス細胞を加えて共培養し、その際の OT-I 細胞増殖数や細胞死をフローサイトメトリーにて解析する。コントロールは K14-mOVA Tg マウスリンパ節より採取した樹状細胞を用いる。

### 4 . 研究成果

Langerin-DTR K14-mOVA- ダブル Tg マウスレシピエントに対し、DT を投与してランゲルハンス細胞を除去した後に OT-I 細胞移入を行ったところ、苔癬反応は増強し、皮膚組織に浸潤する自己反応性 CD8 T 細胞 (OT-I 細胞) 数が増加していた。本モデルマウスは、CD4 除去抗体を用いて CD4 T 細胞をすべて除去しても、疾患は増悪も軽快もせず、制御性 CD4 T 細胞の関与は限定的と考えられた。

次に、*in vitro* の系では、ランゲルハンス細胞を加えて共培養すると、OT-I 細胞のアポトーシスが増加し、増殖反応も抑えられていることを見出した。この作用は、コントロール樹状細胞よりも大きく、ランゲルハンス細胞の特徴と考えられた。その制御機構には、PD-L1 などの補助刺激分子ファミリーが関与している。

以上より、ランゲルハンス細胞は、自己反応性 CD8 T 細胞による苔癬反応において、CD8 T 細胞の標的である表皮に常在し、浸潤してくる活性化 CD8 T 細胞にアポトーシスを誘導し、増殖反応も抑制することで、疾患を制御する働きがあると考えられた。

### 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 2 件)

1. Saito A, Okiyama N, Kubota N, Nakamura Y, Fujisawa Y, Watanabe R, Ishitsuka Y, Bleackley RC, Fujimoto M. Blockade of granzyme B remarkably improves mucocutaneous diseases with keratinocyte death in interface dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2018 Mar 22. [Epub ahead of print]
2. Okiyama N and Fujimoto M, Clinical perspectives and murine models of

lichenoid tissue  
reaction/interfacial dermatitis. J  
Dermatol Sci. 2015 Jun;78(3):167-72.

6 . 研究組織  
(1) 研究代表者  
沖山 奈緒子 (Okiyama Naoko)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：10581308

[学会発表](計 4 件)

1. Okiyama N and Fujimoto M, Immunization of dermatomyositis-specific autoantigen transcriptional intermediary factor (TIF1)- $\gamma$  induces myositis in mice, The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017
2. Saito A, Okiyama N, Kubota N, Fujimoto M, Interferon- $\gamma$  deficiency attenuates skin fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease-like scleroderma. The 47<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society for Investigative Dermatology, 2017
3. Kubota N, Okiyama N, Saito A, Ishitsuka Y, Watanabe R, Clausen BE, Fujimoto M, Langerhans cells regulate autoimmune CD8 T cell-mediated interface dermatitis, The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016
4. Saito A, Okiyama N, Kubota N, Ishitsuka Y, Watanabe R, Fujimoto M, Blockade of perforin prevents mucocutaneous injury in a murine model of interface dermatitis, The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016