

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09773

研究課題名(和文)皮膚におけるIL-13産生T細胞の分化機構

研究課題名(英文) Differentiation of resident epidermal T cells into IL-13-producing cells in the perinatal epidermis

研究代表者

河井 一浩 (KAWAI, Kazuhiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：90242411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの表皮内に常在するT細胞は単一の T細胞レセプター(V₃TCR)を発現し、IL-13を産生する。一方、その前駆細胞であるV₃TCR陽性胎仔胸腺細胞はIFN- γ を産生するが、IL-13は産生しない。V₃TCR陽性細胞の各分化段階におけるサイトカイン産生能を解析した結果、V₃TCR陽性細胞は出生前後の表皮内でIL-13産生能を獲得することが明らかになった。表皮内においてIL-13産生細胞への分化を誘導するシグナルの候補としてTCRシグナルを同定した。

研究成果の概要(英文)：Resident epidermal T cells of the murine skin express an invariant T-cell receptor (V₃TCR) that recognizes an undetermined self ligand expressed on epidermal keratinocytes, and the TCR stimulation triggers rapid production of IL-13. In contrast, their fetal thymic precursors (V₃TCR+ fetal thymocytes) produce IFN- γ but not IL-13. Analyses of the cytokine production pattern by the V₃TCR+ cells during development revealed that V₃TCR+ cells acquire IL-13-producing capacity in the perinatal epidermis. Resident epidermal T cells in T-cell-deficient mice that express diverse TCRs but cannot recognize the self ligand on epidermal keratinocytes produced IFN- γ but not IL-13. Therefore, TCR-mediated signals might be involved in the differentiation of epidermal T cells into IL-13-producing cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：IL-13 CD27 T細胞 T細胞レセプター T細胞分化 樹枝状表皮T細胞

1. 研究開始当初の背景

樹枝状表皮 T 細胞 (dendritic epidermal T cell、DETC) として知られるマウスの表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞は、V γ 3 鎖と V δ 1 鎖の組合せからなる単一の $\gamma\delta$ T 細胞レセプター (V γ 3TCR) を発現し、表皮ケラチノサイト上の未同定の自己リガンドを認識する。DETC の前駆細胞は胎生 14-17 日の限られた期間に胸腺内で分化し、出生前に皮膚に遊走するため、生後は V γ 3TCR 陽性細胞は表皮内のみで局在する (文献)。

末梢リンパ組織内で抗原刺激により活性化される過程で機能分化する獲得免疫系の $\alpha\beta$ T 細胞とは異なり、DETC を含む上皮内 $\gamma\delta$ T 細胞は自然免疫系のリンパ球であり、胸腺内分化の過程で機能をプログラムされてから末梢組織に移住すると考えられている。DETC の前駆細胞である胎仔胸腺内の V γ 3TCR 陽性細胞は、IFN- γ 産生細胞のマーカーである CD27 を発現し、TCR 刺激により IFN- γ を産生するが、IL-13 は産生しない。一方、成熟マウスの表皮から単離した DETC は CD27 を発現せず、TCR 刺激により IL-13 を産生するが、IFN- γ は産生しない。したがって、CD27 陽性 IFN- γ 産生細胞である胎仔胸腺内の V γ 3TCR 陽性 DETC 前駆細胞は、胸腺から出た後に CD27 陰性 IL-13 産生細胞に分化すると考えられるが、このような自然免疫系リンパ球の末梢における機能分化 (リプログラミング) は皮膚以外の上皮内 T 細胞では報告されていない。しかし、皮膚における IL-13 産生 T 細胞の分化機構は不明である。

DETC は感作を必要とせずに Th2 型サイトカインである IL-13 を大量に産生するため、経皮感作による IgE 産生を介したアトピー型アレルギーの誘導において重要な役割を担っている (文献)。ヒトの皮膚には DETC のホモログは存在しないが、ヒトの表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞は DETC と同様に大量の IL-13 を産生することが報告されている (文献)。このことは、ヒト表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞が DETC の機能的ホモログであり、IL-13 産生能は表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞の最も重要な機能の一つであることを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス表皮内 $\gamma\delta$ T 細胞をモデルとして皮膚における IL-13 産生 T 細胞の分化機構を明らかにすることである。

具体的には、DETC の分化過程において CD27 陽性 IFN- γ 産生前駆細胞が CD27 陰性

IL-13 産生細胞へ分化する場と時期を明らかにし、分化に関わるシグナルを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各分化段階の V γ 3TCR 陽性 DETC 前駆細胞における CD27 の発現およびサイトカイン産生能の解析

胎生 17 日 (E17) の C57BL/6 マウスから胸腺細胞、末梢血リンパ球、真皮細胞を単離した。真皮細胞は、皮膚をディスペーゼ処理して表皮と真皮を分離後、真皮をコラゲナーゼ処理することにより単離した。新生仔および成熟 C57BL/6 マウスの皮膚からトリプシン処理により表皮細胞を単離した。

単離した細胞を抗 V γ 3TCR 抗体および抗 CD27 抗体で染色後、V γ 3TCR 陽性細胞にゲーティングして、CD27 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

胎仔胸腺細胞、新生仔および成熟マウス表皮細胞を brefeldin A 存在下で PMA+イオノマイシンで刺激し、抗 V γ 3TCR 抗体で細胞表面染色後、固定・膜透過処理し、抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-13 抗体を用いて細胞内染色を行った。V γ 3TCR 陽性細胞にゲーティングして、各サイトカインの発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 T 細胞のサイトカイン産生能の解析

成熟 C57BL/6 マウスおよび TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの皮膚からトリプシン処理により表皮細胞を単離した。

単離した表皮細胞を brefeldin A 存在下で固層化抗 CD3 抗体で刺激し、抗 V γ 3TCR 抗体、抗 $\alpha\beta$ TCR 抗体で細胞表面染色後、固定・膜透過処理し、抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-4 抗体、抗 IL-13 抗体、または抗 IL-17 抗体を用いて細胞内染色を行った。それぞれ V γ 3TCR 陽性細胞、 $\alpha\beta$ TCR 陽性細胞にゲーティングして、各サイトカインの発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

CD27 陽性 IFN- γ 産生 DETC 前駆細胞が CD27 陰性 IL-13 産生細胞へ分化する場と時期を明らかにするために、各分化段階の DETC 前駆細胞における CD27 の発現とサイトカイン産生能を解析した。その結果、DETC 前駆細胞上の CD27 は胎仔真皮に遊走した直後に陰性化することが明らかになった (図 1)。

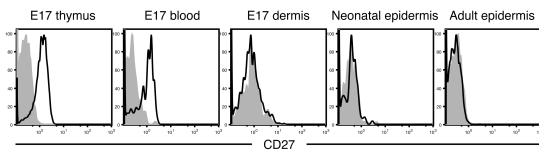


図1 各分化段階の DETC 前駆細胞における CD27 発現

一方、CD27 陰性 $V\gamma 3$ TCR 陽性細胞は出生前後の表皮内で IL-13 産生能を獲得することが明らかになった (図2)。

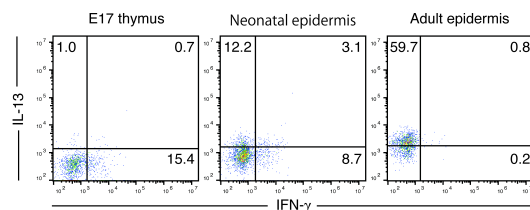


図2 各分化段階の DETC 前駆細胞におけるサイトカイン産生能

すべての $\gamma\delta$ T 細胞を欠損する TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 T 細胞は $\alpha\beta$ T 細胞によって置換されるが、TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 $\alpha\beta$ T 細胞は IL-13 ではなく IFN- γ を産生することを発見した (図3)。

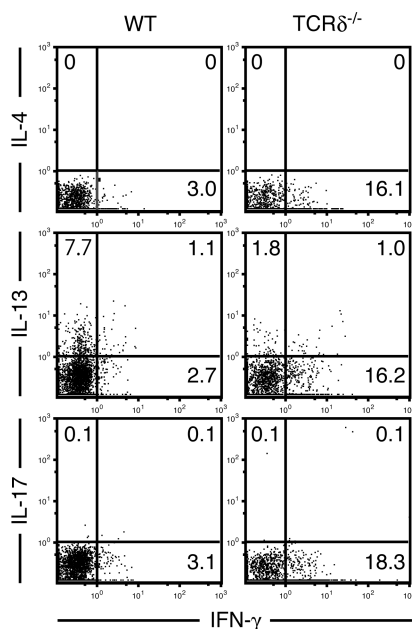


図3 TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 $\alpha\beta$ T 細胞は IL-13 ではなく IFN- γ を産生する

TCR δ 鎖遺伝子欠損マウスの表皮内 $\alpha\beta$ T 細胞は TCR を介して表皮ケラチノサイト上の自己リガンドを認識できないことが示されており (文献) この結果は、出生前後の表皮内において TCR シグナルが表皮内 T 細胞の IL-13 産生細胞への分化を誘導する可能性を示唆している。

出生前後の表皮内における $V\gamma 3$ TCR 陽性細胞の生存と増殖には TCR シグナルと IL-15 が必要であるため (文献) 新生仔 C57BL/6 マウスの表皮内 $V\gamma 3$ TCR 陽性細胞を固層化抗 TCR 抗体と IL-15 の存在下で培養したところ、IL-13 産生細胞に分化することを確認した。今後は、この in vitro 分化誘導モデルを用いて、IL-13 産生細胞への分化誘導における TCR シグナルの役割を明らかにする予定である。

<引用文献>

Kawai K. $\gamma\delta$ T cells. *Immunology of the Skin: Basic and Clinical Sciences in Skin Immune Responses*. Springer Japan, 2016;95-111.

Strid J et al. The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy. *Science* 2011;334:1293-1297.

Kim K et al. Comparative analysis of human epidermal and peripheral blood $\gamma\delta$ T cell cytokine profiles. *Ann Dermatol* 2014;26:308-313.

Jameson JM et al. A keratinocyte-responsive $\gamma\delta$ TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J Immunol* 2004;172:3573-3579.

Chodaczek G et al. Body-barrier surveillance by epidermal $\gamma\delta$ TCRs. *Nat Immunol* 2012;13:272-282.

Minagawa M et al. Homogeneous epithelial $\gamma\delta$ T cell repertoire of the skin is shaped through peripheral selection. *J Dermatol Sci* 2001;25:150-155.

Kawai K et al. Requirement of the IL-2 receptor β chain for the development of $V\gamma 3$ dendritic epidermal T cells. *J Invest Dermatol* 1998;110:961-965.

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

招待講演：河井一浩. $\gamma\delta$ T細胞の分化と機能.

新潟大学皮膚科カンファレンス.(2017年
8月2日,新潟市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河井 一浩 (KAWAI, Kazuhiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究
員

研究者番号：90242411

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

指宿 敦子 (IBUSUKI, Atsuko)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：10596109