

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19702

研究課題名(和文)皮膚在住B細胞の生理学的機能解明

研究課題名(英文)Physiological Analysis of Skin-Resident B cells

研究代表者

足立 剛也 (Adachi, Takeya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問助教

研究者番号：30573258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚を含む体表面のバリア臓器には様々な免疫細胞が存在し外的因子に対する宿主防御を司る。過剰な反応の抑制等、免疫恒常性の維持にはこれら皮膚在住白血球を制御する緻密なメカニズムが存在するはずだが、十分に解明されていなかった。本研究では、皮膚常在メモリーT細胞が悪性化した際の表皮向性に毛嚢上皮細胞由来のサイトカインが重要であることを解明するとともに、皮膚在住B細胞についてもその特徴等解析を行った。これら病的状態および定常状態における皮膚在住メモリー型リンパ球の理解は、複雑に絡み合った皮膚免疫機構の解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Barrier tissues including skin harbors a variety of resident leukocyte subsets to exert immune responses against external stimuli. They must be tightly regulated to maintain immunological homeostasis, which mechanisms have not been elucidated. In this study, we established a murine model recapitulating the cutaneous T cell lymphoma epidermotropism, which depended on the presence of hair follicle-derived cytokine. These results in pathological-state as well as the characterization of skin-resident memory B cells in steady-state, would contribute to the fundamental recognition of complex immune systems in skin.

研究分野：皮膚免疫学・アレルギー学

キーワード：皮膚在住メモリーT細胞 皮膚在住メモリーB細胞 毛嚢 皮膚T細胞リンパ腫 菌状息肉症

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体最外層の臓器として、物理的バリアだけでなく免疫学的バリアを提供し、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞などの皮膚在住白血球が中心的役割を担う (Heath et al. Nature Immunol 2013)。近年定常状態の皮膚には、血中の2倍にも及ぶメモリー型 T 細胞が存在し、外界とのインターフェイスにおける迅速かつ活発な免疫応答を担うことが明らかになってきた (Clark et al. J Immunol 2006, Gebhardt et al. Nature 2011, Jiang et al. Nature 2012)。申請者らは毛囊上皮細胞が産生するケモカイン (CCL2, 8, 20) に着目し、皮膚樹状細胞のトラフィック制御機構 (Nagao et al. Nature Immunol 2012) を明らかにした (図 1)。

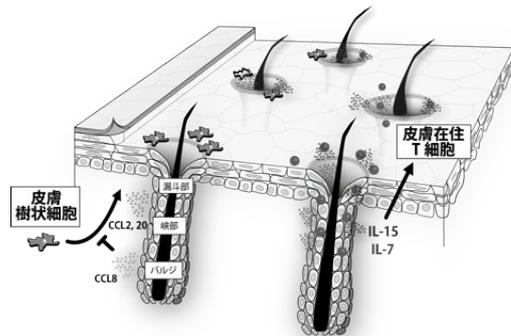


図 1：皮膚在住白血球の恒常性維持機構の模式図。毛囊上皮細胞が部分毎に異なるケモカインを産生し皮膚樹状細胞のトラフィックを制御するとともに、サイトカインを産生し皮膚在住 T 細胞の生存に寄与する。

また、毛囊内、毛囊周囲に皮膚在住 T 細胞が存在し、これら T 細胞が毛囊と近接して皮膚分布する像を観察した (図 2)。毛囊が皮膚在住 T 細胞の生存に重要な因子を提供している可能性を考え、T 細胞維持に必須のサイトカインである IL-7、IL-15 の発現を RT-PCR を用いて解析し、毛囊漏斗部、峡部の優位な発現を確認した。これらサイトカインを特異的に欠損させた表皮では、T 細胞数の減少がみられ、以上の結果から毛囊上皮細胞由来のサイトカインが皮膚在住 T 細胞の生存に寄与することが示された。

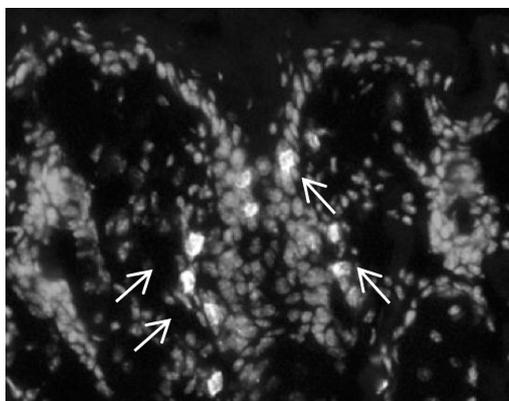


図 2：野生型マウス皮膚の免疫蛍光染色。CD4 陽性 T 細胞 (矢印) と毛囊との近接

この過程で、非炎症下の野生型マウスの皮膚をフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析を行うと、CD45<sup>+</sup>EpCAM-TCR<sup>-</sup>CD4-CD8<sup>-</sup>の細胞集団内に、B 細胞マーカーである B220 陽性細胞が観察された。皮膚の B 細胞については未だ十分な解析がなされておらず、本研究課題では、皮膚在住 T 細胞についての解析を継続し、その結果と比較検討することで「皮膚在住 B 細胞の生理学的機能」の解明についても焦点を当て解析を進めることとした。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスを用いて、皮膚在住 B 細胞の生理学的機能の解明という新しい側面から皮膚免疫機構を解析するとともに、皮膚在住 T 細胞の生存に寄与することが示唆された毛囊上皮細胞由来のサイトカインが、これら皮膚在住 T 細胞が悪性化した場合の影響をヒト検体も用いて明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

定常状態の皮膚在住 B 細胞の特徴を明らかにするため、非炎症下の野生型マウスの皮膚の FCM 解析を行い、B220、CD19、IgM、CD138 等 B 細胞や形質細胞等のマーカーを発現する細胞を確認するとともに、これら細胞の皮膚への homing receptor 発現を解析した。また、皮膚在住 B 細胞の解剖学的解析のため、野生型マウス皮膚の凍結切片を用いた垂直断面、耳の表皮シートおよび真皮シートを用いた水平断面の免疫蛍光染色を行い、特定の局在の有無、niche を形成しているかどうかを確認する。

一方、定常状態において観察してきた T 細胞の皮膚に局在する挙動 (表皮向性) が、皮膚の T 細胞が悪性化した疾患である皮膚 T 細胞リンパ腫のリンパ腫細胞の挙動に非常に類似していたため、毛囊由来のサイトカインが悪性化した皮膚 T 細胞にも寄与するかどうか検討した。具体的には、腫瘍抑制遺伝子 *Cdkn2a* ノックアウトマウス由来の細胞 (CD4<sup>+</sup>T 細胞) にレトロウィルスを用いてがん遺伝子 *Myc* を導入する方法により、新しい皮膚 T 細胞リンパ腫のマウスモデルを作製。*Myc* 遺伝子導入後の *Cdkn2a* 欠損 CD4<sup>+</sup>T 細胞をリンパ球欠損レシピエントマウスに養子移入 3 週間後に皮膚の解析を行った (図 3)。

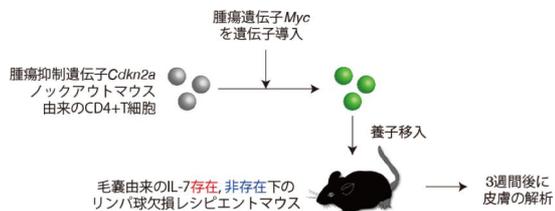


図 3：悪性化した皮膚 T 細胞の表皮向性に対する毛囊由来 IL-7 の影響を確認する系の模式図

#### 4. 研究成果

非炎症下の野生型マウス表皮のフローサイトメトリー解析により、CD45+EpCAM-TCR-CD4-CD8-の白血球集団中 30%程度が B220陽性であり、うち 10%程度が IgM を発現していた。これら B220 陽性細胞はリンパ節への homing receptor である CD62L が陰性であり、皮膚に在住する性格が示唆された(図 4)。しかし、同細胞中 CD19 陽性細胞は 25%程度、CD138 陽性細胞はわずかであり、予想外に B 細胞数が少ない可能性が示唆された。実際 B 細胞局在の同定、niche 形成有無の確認のために行った免疫蛍光抗体法を用いた観察が困難であり、詳細な解析に時間を要している。

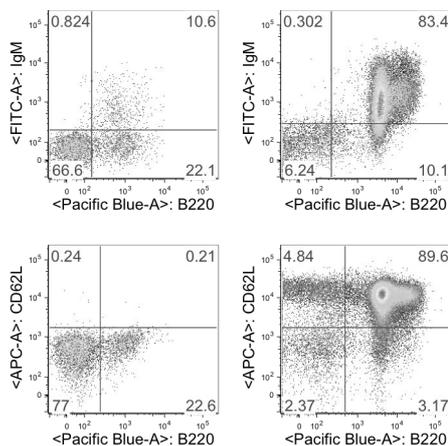


図 4：皮膚(左、CD45+EpCAM-TCR-CD4-CD8)、リンパ節(右、CD45+CD11c-TCR-CD4-CD8-)の FCM 解析結果。皮膚に B220+IgM+CD62L-の細胞(皮膚在住 B 細胞)が確認された。



図 5：毛嚢由来 IL-7 非存在下のレシピエントは皮膚表現型・病理組織所見ともに消失した。

一方、T 細胞については毛嚢内、毛嚢周囲に皮膚在住 T 細胞が存在し、その表皮生存に毛嚢上皮細胞由来の IL-7、IL-15 が重要であることを観察していたが、これら皮膚在住 T 細胞が悪性化した場合の表皮向性にも寄与している可能性を考え、新規マウスモデル (Cdkn2a<sup>-/-</sup>マウス由来の CD4 陽性 T 細胞にレトロウイルスを用いて Myc を導入後、毛嚢由来の IL-7 存在/非存在下の Rag2<sup>-/-</sup>マウスへ養子移入する系) を用

いて検討を行った。結果、毛嚢由来の IL-7 を欠損したレシピエントでは、皮膚表現型・病理組織所見ともに消失し(図 5)、毛嚢由来のサイトカインがリンパ腫細胞の表皮向性にも重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 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 6 件)

足立剛也:さまざまな皮膚疾患に寄与するレジデントメモリー T 細胞の重要性. 臨床皮膚科, 査読無, 71(5 増): 37-41, 2017 年

Adachi T, Tanese K, Ouchi T, Igawa S, Nakano H, Ishiko A: Case of isolated epidermolytic acanthoma: genetic and immunohistochemical analysis. J Dermatol, 査読有, 43(8):974-75, 2016 Aug.

足立剛也:毛嚢由来のサイトカインは皮膚在住型メモリー T 細胞の恒常性およびリンパ腫を制御する. 免疫学会ニュースレター, 査読無, 24(2): 25, 2016 年.

足立剛也, 永尾圭介:Current Topics 毛嚢によるレジデントメモリー T 細胞の制御機構. 実験医学, 査読無, 34(6):931-34, 2016 年 4 月.

Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, Nagao K: Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. Nat Med, 査読有, 21(11): 1272-79, 2015 Nov.

Ise M, Tanese K, Adachi T, DU W, Amagai M, Ohshima M: Postherpetic Wolf's isotopic response: Possible contribution of resident memory T cells to the pathogenesis of lichenoid reaction. Br J Dermatol, 査読有, 173(5): 1331-34, 2015 Nov.

(学会発表)(計 5 件)

入来景吾, 大内健嗣, 澤田美穂, 向井美穂, 馬場裕子, 足立剛也, 船越建, 天谷雅行, 高橋勇人: アクテムラ®投与中に薬剤性過敏症

候群 (DIHS) に特徴的な症状を呈した薬疹の 1 例. 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 京王プラザホテル (東京都・新宿区), 2016 年 11 月 5 日.

Eto A, Kyogoku C, Yamamura M, Ohno M, Hayano M, Iwamoto R, Sadamoto S, Adachi T: Potential Collaboration between Japan and Germany in Pioneering Global Endeavors in Aging Society. Workshop of the Junior Experts Exchange Program in Germany 2016, Berlin, Germany, June 18<sup>th</sup>, 2016.

足立剛也: Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma —毛嚢による皮膚 T 細胞の制御機構—. 皆見賞受賞記念講演, 第 115 回日本皮膚科学会総会, 国立京都国際会館 (京都府・京都市), 2016 年 6 月 3 日.

Kobayashi T, Kitashima DY, Adachi T, Takahashi H, Kaplan DH, Clausen BE, Tai X, Singer A, Amagai M, Nagao K: Langerhans cell-mediated peripheral tolerance against an epidermal autoantigen, desmoglein 3. Keystone symposia, California, USA, February 29<sup>th</sup>, 2016.

足立剛也, 高橋勇人, 舩越建, 平井博之, 橋口明彦, 天谷雅行, 永尾圭介: 薬剤アレルギー評価における好塩基球活性化試験と薬剤リンパ球刺激試験の有用性の検討. 第 114 回日本皮膚科学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2015 年 5 月 30 日.

〔図書〕(計 1 件)

足立剛也 他: デンタルダイヤモンド社, 薬剤アレルギー検査. 歯科アレルギー-NOW 疾患の基礎と臨床のエッセンシャル, 187 (24-29), 2016 年 4 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 剛也 (Takeya Adachi)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 30573258