

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17307

研究課題名(和文)皮膚移植片対宿主病におけるランゲルハンス細胞の免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文)Immunosuppressive mechanisms of langerhans cells during mucocutaneous graft-versus host disease

研究代表者

久保田 典子(Kubota, Noriko)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：10844847

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):急性移植片対宿主病(aGVHD)は、ドナーリンパ球がレシピエント組織上の腫瘍組織適合抗原を異物と認識し発症する血液幹細胞移植後合併症で、その皮疹はCD8 T細胞誘導性と考えられている。我々はジフテリア毒素の投与でランゲルハンス細胞(LC)を除去できるマウス(Langerin-DTR Tg)を用いて実験を行った。このマウスのLCを除去した後に放射線を照射し、同種異系マウスの骨髄細胞を移入すると、aGVHDの皮膚粘膜症状が悪化した。このLCの疾患抑制機能は、表皮特異的自己反応性CD8 T細胞の増殖抑制と、B7ファミリー分子(B7-H3、B7-H4)を介したアポトーシス誘導によることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮内に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の、炎症性皮膚疾患における表皮内での機能は、報告により免疫賦活化もしくは抑制とされて相反しており、未だ明確ではない。一般的には、炎症性皮膚疾患において表皮内LCは活性化し増殖するが、GVHDにおいては、皮膚炎の成立と共に表皮内からLCが消失することが知られている。本研究で、LCが免疫反応へ抑制的に作用したことを明らかにし、さらにその機序を解明し、皮膚GVHDにおけるLC消失が皮膚症状をさらに悪化させていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):Acute graft-versus-host disease (aGVHD) in patients with major histocompatibility complex-unmatched bone marrow transplantation is an autoimmune disorder in which donor lymphoid cells attack recipient organ tissues, resulting in erosive mucocutaneous disease. We showed initial depletion of recipient Langerhans cells (LCs) exacerbates mucocutaneous lesions in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation-induced aGVHD. Moreover, we showed LCs regulate mucocutaneous aGVHD by directly inhibiting the population of antigen specific autoreactive CD8+ T cells, and LCs have immuno-regulatory effects by inducing the apoptosis of infiltrating antigen-specific autoreactive CD8+ T cells partly via B7-H3 and B7-H4.

研究分野：皮膚

キーワード：移植片対宿主病 ランゲルハンス細胞

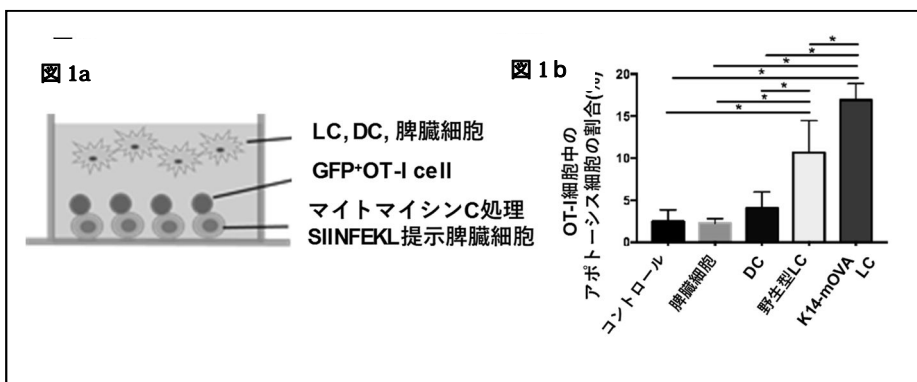
### 1. 研究開始当初の背景

血液悪性腫瘍患者などに対する血液幹細胞移植では、移植片対宿主病 (GVHD) が合併症として問題となる。GVHD はドナーリンパ球がレシピエント組織上の主要組織適合抗原 (MHC) を異物として攻撃することで起こる一種の自己免疫反応で、肝炎・腸炎と共に皮膚炎が主要徴候である。その皮膚炎は、ドナーCD8 T 細胞による表皮角化細胞の傷害が本態と考えられている (Correia O, et al., Dermatology 203, 2001)。一方、ランゲルハンス細胞 (Langerhans cell: LC) は表皮内に存在する抗原提示細胞である。皮膚 GVHD では、表皮内 LC は症状の進展に伴って消失し、その機能は、骨髄移植誘導性 GVHD マウスモデルで LC が CD8 T 細胞の活性化を誘導した報告がある (Bennett CL, et al. Blood 117, 2011) 一方、LC 除去マウスモデルでは皮膚症状が悪化するという相反する報告 (Li H, et al. Blood 117, 2011) があり、未だ明確になっていない。LC が炎症性皮膚疾患に対し免疫制御性であるか否かは皮膚免疫学における大きな論点である

### 2. 研究の目的

本研究では、抗原特異的 CD8 T 細胞で惹起される皮膚 GVHD での LC の免疫学的機能と、幹細胞移植後皮膚 GVHD において LC が表皮内から消失する意義を解明する。我々は、表皮角化細胞特異的に卵白アルブミン (OVA) 遺伝子を導入した keratin 14 promoter-membrane ovalbumin transgenic (K14-mOVA Tg) マウス (米国国立衛生研究所 Stephen I Katz 博士より譲渡) を用いた実験を行っている。このマウスは、OVA 特異的 CD8 T 細胞 (OT-I 細胞) の移入で、GVHD 様皮膚粘膜症状が惹起される。K14-mOVA Tg マウスと、Langerin プロモーター下にジフテリア毒素受容体 (DTR) が導入されたマウスを交配して double Tg マウスを作製し、DT を投与して Langerin+細胞 (LC、Langerin+真皮樹状細胞 (DC)) を除去した後に OT-I 細胞を移入し GVHD

様皮膚粘膜症状を惹起すると、Langerin+細胞除去群で皮膚症状が悪化した。また、OVA CD8 エピトープ (SIINFEKL) で刺激した OT-I 細胞増殖系で、マウス表皮より採取した LC と共培養したところ

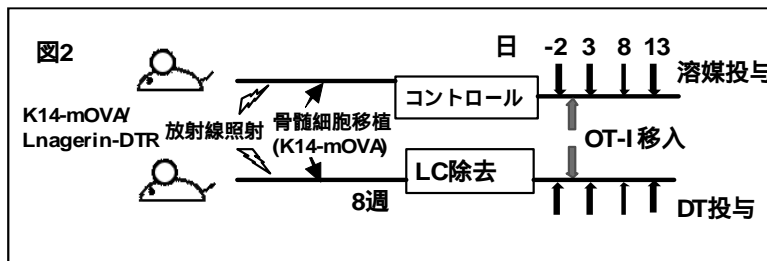


(図 1a) OT-I 細胞増殖が抑制され、そのアポトーシスが LC により誘導されていた (図 1b)。このアポトーシス誘導に、活性化 LC が発現する B7 ファミリー分子 (B7-H3、B7-H4) が関与することが示唆された。本研究では引き続き、Langerin+細胞全般ではなく LC のみ除去した際にも GVHD 様皮膚粘膜症状が悪化するか観察し、よりヒト GVHD の病態を反映する同種異系血液幹細胞移植誘導性 GVHD マウスモデルでの LC の機能も解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) LC のみ除去下での GVHD 様皮膚粘膜症状の観察

方法: K14-mOVA/Langerin-DTR double Tg マウスに放射線照射後、K14-mOVA Tg マウスの骨髄細胞を移植すると、8 週で放射線抵抗性の LC はレシピエント由来のまま残存し、Langerin+真皮 DC はドナー由来に置き換わる。そのマウスに DT を腹腔内投与し、DTR が組み込まれた LC のみを除去した後、OT-I 細胞を通常プロトコルの  $1 \times 10^6$  個移入して GVHD 様皮膚粘膜症状を惹起する (図 2)。なお、OT-I 細胞は、ユビキチンプロモーター下に蛍光色素 GFP を組み込んだ OT-I マウスより採取する。コントロールとして、DT を投与しない、放射線照射後 K14-mOVA Tg マウス骨髄移植



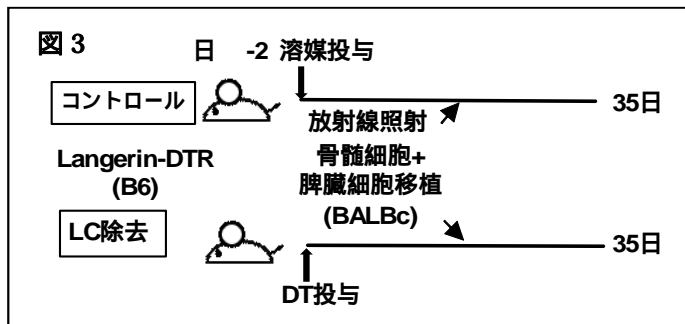
K14-mOVA/Langerin-DTR double Tg マウスを用いる。皮膚粘膜症状の指標として、GFP+OT-I 細胞移入後

14 日目に耳、眼周囲、口周囲の各部位の紅斑・びらん・痂皮の程度と、脱毛の程度をそれぞれ 0~2 点で評価し、その合計を算出したものをスキンスコアとして用いる。耳皮膚切片を病理

組織学的に観察して、耳の全長に対する苔癬反応 (IFD) のある部位の長さの割合を百分率で算出したものを病理組織スコアとして用いる。また、皮膚に浸潤した GFP+OT-1 細胞数を計測する。耳介皮膚切片をコラゲナーゼ処理し皮膚の細胞を分離したサンプルを Annexin V-7AAD でフローサイトメトリー解析して、皮膚に浸潤した GFP+OT-1 細胞中のアポトーシス細胞 (GFP+AnnexinV+7AAD-) の割合を計測する。

## (2) 同種異系骨髄移植誘導性 GVHD での LC の役割の解明

方法：DT を投与してあらかじめ LC を除去した C57BL/6 バックグラウンド Langerin-DTR Tg マウスに、放射線照射後、同種異系野生型 BALBc マウスの骨髄細胞と脾臓細胞を移入して GVHD を惹起させ、移植後の耳介表皮内 LC (CD45+Langerin+CD3<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup>) 数を FACS 解析にて計測し、移植後 35 日目の皮膚粘膜症状を skin score を付けて観察する (図 3)。

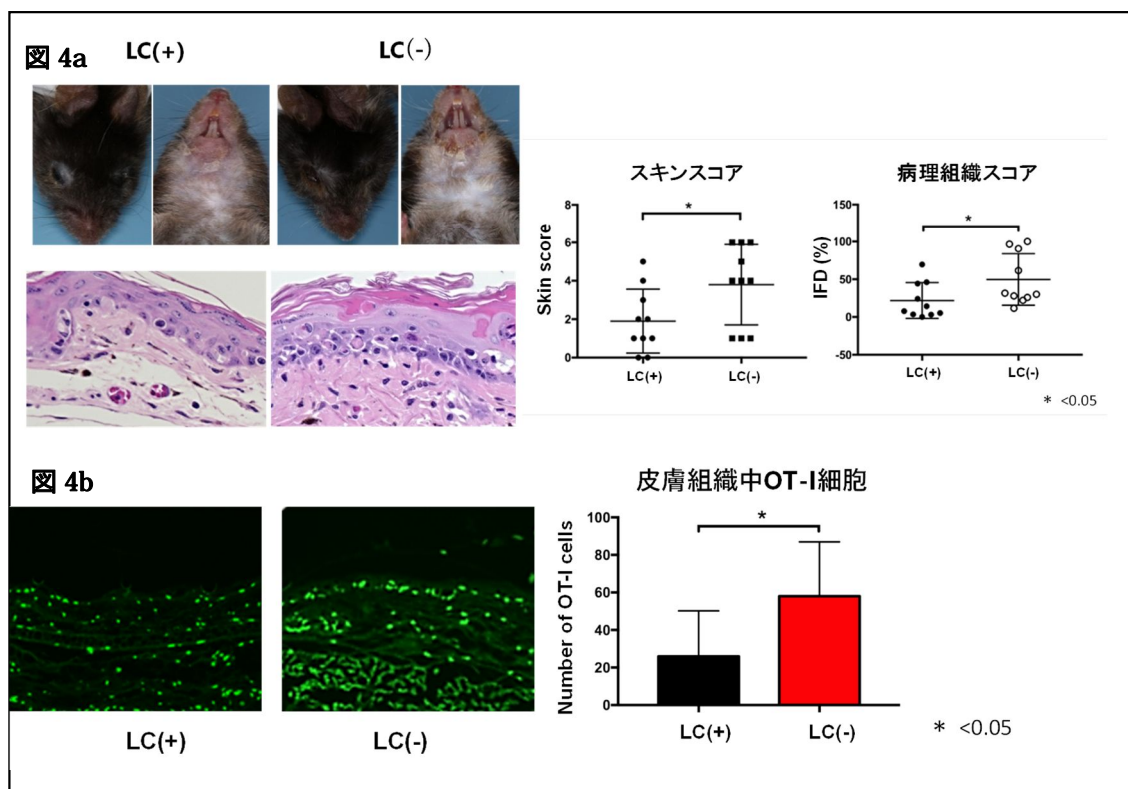


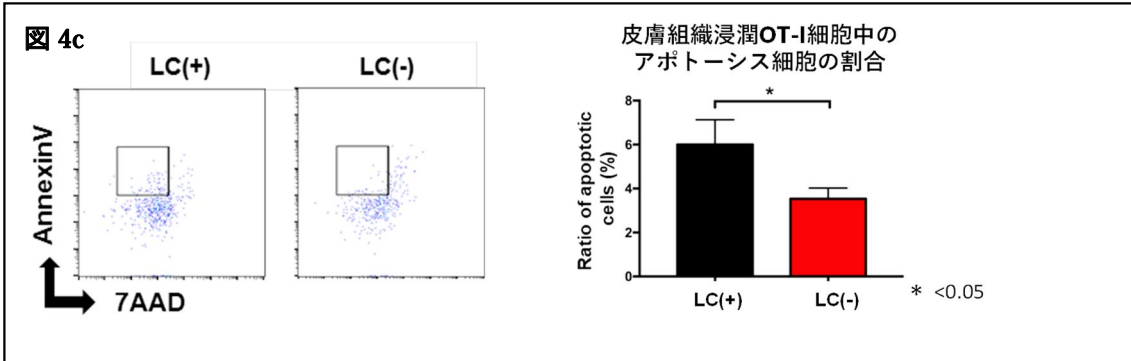
## 4. 研究成果

Langerin+細胞全般ではなく LC のみ除去した際にも GVHD 様皮膚粘膜症状が悪化すること、また、よりヒト GVHD の病態を反映する同種異系血液幹細胞移植誘導性 GVHD マウスモデルにおいても同様に、LC の除去で GVHD における皮膚粘膜症状が増強することが分かった。また、LC の GVHD 皮膚粘膜症状抑制機構は、皮膚に浸潤した自己抗原特異的 CD8 T 細胞のアポトーシスの誘導を介していることを解明した。これまで、一般的には炎症性皮膚疾患において活性化・増殖するものの、GVHD においては人工的に除去されてしまう LC が、皮膚局所で免疫賦活あるいは抑制に働くのかは不明確であったが、本研究において、皮膚 GVHD において LC が皮膚局所で免疫抑制に寄与していることと、その機序の一部が明示できた。我々の先の研究では、LC の免疫抑制機構に、活性化 LC が発現する B7 ファミリー分子 (B7-H3、B7-H4) が関与していることが示唆されたが、この機構をより明確に解析することで、GVHD のみならず、GVHD と同様の苔癬反応 (IFD) を呈する重篤な皮膚粘膜疾患の一群における LC の機能が解明され、皮膚免疫学の方向性を決定づける一助となると考える。

### (1) LC 除去で GVHD 様皮膚粘膜症状が増強した

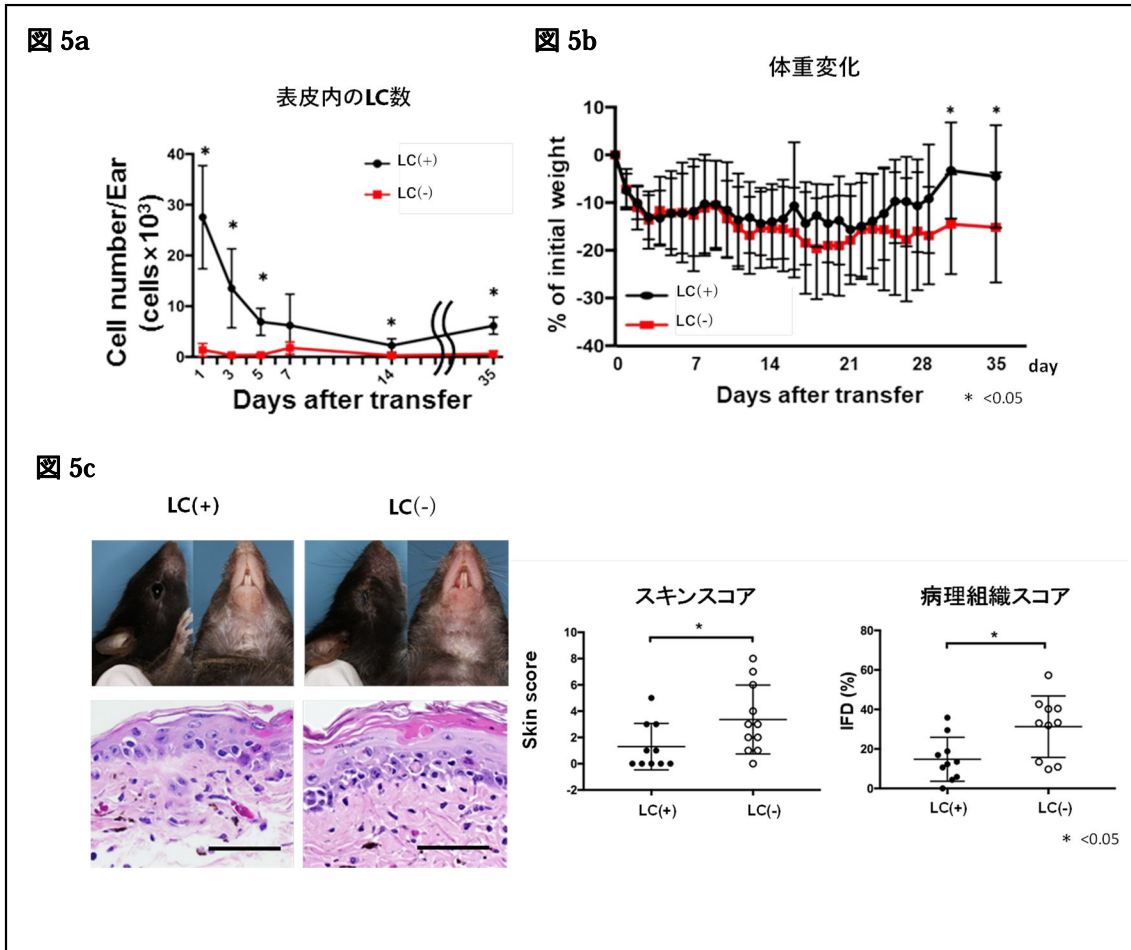
研究の方法(1)による実験の結果を示す。コントロールと比較して LC 除去群で GVHD 様皮膚粘膜症状がより悪化し、病理組織においても、LC 除去群でより IFD が広範囲で起きていることが分かった (図 4a)。また、LC 除去マウス皮膚組織で OT-1 細胞がより多く浸潤しており (図 4b)、OT-1 細胞のアポトーシスが減少していた (図 4c)。





**(2) LC 除去で GVHD 皮膚粘膜症状が増強した**

研究の方法(2)による実験の結果を示す。LC を除去しなかったマウスでも、同種異系骨髄移植により LC は徐々に減少し 14 日目には消失していた (図 5a)。また、LC 除去群で体重減少が大きく (図 5b)、GVHD の皮膚粘膜症状も増強していた (図 5c)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noriko Kubota, Akimasa Saito, Ryota Tanaka, Yoshiyuki Nakamura, Rei Watanabe, Yasuhiro Fujisawa, Yosuke Ishitsuka, Bjorn E Clausen, Manabu Fujimoto, Naoko Okiyama	4. 巻 141(5)
2. 論文標題 Langerhans Cells Suppress CD8 + T Cells In Situ during Mucocutaneous Acute Graft-Versus-Host Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1177-1187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2020.09.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田典子, 沖山奈緒子
2. 発表標題 移植片対宿主病皮膚病変局所におけるランゲルハンス細胞の病原性 CD8 T 細胞抑制機構
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriko Kubota, Ryota Tanaka, Yoshiyuki Nakamura, Bjorn E. Clausen, Manabu Fujimoto, Naoko Okiyama
2. 発表標題 Langerhans cells suppress the population of pathogenic CD8+ T cells in situ during mucocutaneous acute graft-versus host disease
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------