

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15468

研究課題名（和文）有限な皮膚内ニッチをめぐる記憶T細胞間の競合機序の解析

研究課題名（英文）A mechanistic analysis of Trm competition for epidermal niche

研究代表者

平井 敏郎（Hirai, Toshiro）

大阪大学・微生物病研究所・特任講師（常勤）

研究者番号：00895815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：組織局在型記憶T細胞(Trm)は、末梢組織に局在する記憶T細胞である。これまでに、Trmが組織内で維持される数に上限があること、さらに、新規免疫誘導が、過去の免疫記憶を失わせてしまう可能性が明らかとなっている。本研究では、このT細胞間のニッチ競合の機序解明を最終目標に、競合に強いTrmが高率に発現している分子に着目し、その分子の意義について、Trmの定常時、並びに特異的抗原による再刺激後の増殖反応時に評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Trmは、高い感染防御能を示すとともに、アレルギーや自己免疫疾患では病原性を示す。Trm同士の維持ニッチをめぐる競合機序に関する知見は、Trmの誘導や維持に関する機序を理解することにつながる。そのため、Trmをより効率よく誘導するワクチンの開発や、Trmが重要な病原性因子となるアレルギーや自己免疫疾患の新規治療法の開発等に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tissue-resident memory T cells (Trm) are the non-circulating subset of memory T cells. It has been suggested that there is an upper limit to the number of Trm maintained in epidermis and that recruitment of new T cells clones into epidermis may result in the loss of past immune memory. Elucidating the mechanism of competition of Trm for epidermal niche, we analyzed roles of CD86 on Trm in steady state and during proliferation followed by re-encounter to specific antigen.

研究分野：ワクチン

キーワード：T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫を構成するT細胞は、新規病原体(由来の特異的抗原)への会合を経て、再感染を強力に阻害する免疫記憶を形成する。免疫記憶の本体は、病原体を特異的に認識できる抗原特異的細胞の、個々のエピジェネティックな変化とともに、純粋な数の増加にある。近年、この増加した細胞、すなわち記憶T細胞がかなりの割合で、血液を介して循環せず末梢組織に分布していることが明らかとなった(組織局在型記憶T細胞:Trm)。一方で、末梢の組織、特に感染防御に重要な上皮内などでは、Trmが利用できるリソースは限られていると推察され、特定の末梢組織が維持できるTrmの数は有限である可能性が考えられた。すなわち、すでに一定のTrmが存在する組織に新たな免疫が誘導された際には、T細胞同士でニッチをめぐる競合が発生し、例えば過去の免疫記憶が塗り替えられ、消去されてしまう可能性や、逆に、新しい感染に対して免疫記憶を形成できないなどの問題が想起される。しかし、Trmニッチの有限性は未だ実証されていなかった。本観点から本研究者は、皮膚基底膜上のみという二次元の分布域しか持たない表皮CD8⁺Trm(以降単にTrm、あるいはT細胞はCD8⁺)をモデルとして検討を行ってきた。その結果、表皮のTrmニッチの有限性を初めて明らかとし、すでにTrmの存在する皮膚に新たなT細胞を侵入させると、T細胞間の競合を介して、既存のTrmの一部が置換されて消去されてしまうことを明らかとした。さらに、個々のTrmによっては、この競合による「置換されやすさ」が異なることを見いだした。すなわち、皮膚抗原特異的Trm(リンパ節に引き続き、皮膚でも抗原を認識)は新しいT細胞に置換されにくく、有限ニッチ内で保存されやすいことが明らかとなった。一方で、T細胞の密度を制御している機序は不明であり、また、個々のTrmで置換されやすさが異なる機序、すなわち競合の機序も未解明である。Trmの密度制御や競合の機序を明らかとすれば、感染防御に重要なTrmをより効率的に誘導するワクチンの開発や、Trmが病原性を示し、難治性の原因となるアレルギーや自己免疫疾患において、Trmを除去する新規戦略の確立等にも貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

リンパ節で活性化したT細胞が、皮膚にて抗原を再度認識して分化した抗原特異的Trmと、皮膚で抗原を認識せずにTrmへと分化した抗原非特異的Trmでは置換されやすさが異なる。これら置換されやすさの異なる抗原特異的Trmと抗原非特異的Trmについて、発現遺伝子の網羅的解析により、発現の程度の異なるものが複数同定されている。そこで本研究では、これら変動遺伝子、特にTrmの表面に発現すると考えられるタンパク質に着眼し、Trmの置換されやすさや密度との関連を評価し、Trm細胞間の皮膚での競合機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

Trmの誘導は下記により行なった。C57BL/6Jマウスにニワトリ卵白アルブミン(OVA)由来ペプチドOVA₂₅₇₋₂₆₄とを特異的に認識するトランスジェニックCD8⁺T細胞であるOT-I細胞(コンジュニックマーカーとしてCD90.1を発現)を静脈内より移入した。マウスの皮膚、あるいは皮下よりOVA₂₅₇₋₂₆₄あるいはOVAタンパク質を発現するワクシニアウイルス、またはアデノウイルスベクターを感染・免疫し、OT-I細胞をマウス体内で活性化させ、増殖させた。Trmは、感染や免疫を行った皮膚、OVA₂₅₇₋₂₆₄を塗布した皮膚、起炎性物質であるDNFBを塗布した皮膚部位で誘導できるが、皮膚におけるOVA₂₅₇₋₂₆₄の存在の有無により、前者二つの処置により誘導されたTrmを抗原特異的Trm、後者により誘導されたTrmを抗原非特異的Trmとして扱った。また、最初の免疫より1ヶ月以上経って皮膚で安定に維持されているものをTrmとして扱い、フローサイトメトリーあるいは表皮の免疫染色によりTrmの数や表現型を評価した。一部の実験では、Trm誘導後1ヶ月以上経過したのちに、OVA₂₅₇₋₂₆₄を塗布し、Trmを再活性化した際の変化を解析した。また、CD86に対する中和抗体(GL-1)は、左右両側面に抗原特異的Trmを誘導したマウスの左側側面皮膚にOVA₂₅₇₋₂₆₄を塗布後、3日目から3日ごとに200µgずつを計4回腹腔内へ投与し、最終投与の2日後(OVA₂₅₇₋₂₆₄を塗布14日後)に左右の皮膚を回収し、評価した。

4. 研究成果

(1) 発現変動遺伝子のタンパク質レベルでの発現評価

網羅的遺伝子発現解析より示唆されていた変動遺伝子のうち、GzmA、GzmB、Cd80、Cd86、CTLA4について、タンパク質レベルでの発現変動を評価するため、Trm誘導後の表皮をトリプシンで消化後、フローサイトメトリーで評価した。この結果、Granzyme A、Granzyme B、CD86の発現に関して抗原特異的Trmで、抗原非特異的Trmと比較して有意な発現陽性率の上昇が観察された。一方で、CD80、CTLA4に関しては発現比率、発現強度に変化は検出できなかったが、トリプシン消化による影響等を含めて今後技術的な精査も必要である。一方で、CD86は通常抗原提示細胞に

発現する共刺激分子として知られるが、近年の報告では、T細胞同士のシグナル伝達に関わる可能性が報告されており（Quorum Regulation）、T細胞の抗原依存的増殖反応の負のフィードバック機構として働くことが示唆されている（Zenke et al. *Immunity* 2020）。また、表皮の Trm は、表皮に唯一存在する樹状細胞であるランゲルハンス細胞の非存在下でも誘導、維持に影響を受けないことが報告されている。これらを踏まえると、表皮の Trm の密度制御や競合においても CD86 の関与が考えられた。

（2）抗原再刺激時の Trm の応答

抗原再刺激時の抗原特異的 Trm、抗原非特異的 Trm の応答を評価するため、Trm 誘導後、Trm を誘導した皮膚部位に OVA₂₅₇₋₂₆₄ を塗布し、さらに 2 ヶ月経過後の Trm を解析した。興味深いことに、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 塗布により、抗原特異的、非特異的に関わらず Trm の数はこれまでの表皮における CD8+T 細胞の維持上限と考えられた数を上回って維持されていることが明らかとなった。一方で、皮膚における TGF 活性化インテグリンや Trm の生存に必須のサイトカインの発現レベルは調べた限りでは変動が観察されなかった。したがって、皮膚における Trm 生存のリゾース量の変化というよりも、Trm 自身が変化した可能性が考えられる。記憶 T 細胞は繰り返す抗原刺激によって遺伝子発現を変動させていくことが報告されており（Wirth et al. *Immunity* 2010）、Trm も抗原刺激により皮膚での適応が進んだ結果、同じリゾースに対してより多くの数を維持できるようになった可能性などが考えられる。一方で、抗原再刺激前は同様の数維持されていた抗原特異的 Trm と抗原非特異的 Trm において、抗原刺激後は抗原特異的 Trm がより多く維持されていることが明らかとなった。したがって、初期の Trm 分化時の皮膚での抗原再認識による影響は、少なくとも一回の抗原再刺激では消去されず、維持されることが示唆された。さらに、フローサイトメトリーによって Trm の表現型を解析した結果、CD69 や CD103 といった Trm のマーカーに用いられる分子には変動が見られなかった一方で、抗原特異的 Trm と非特異的 Trm で変動の観察されていた CD86 を発現する Trm の割合が増加していることが観察された。なお、抗原再刺激による分子の発現率の上昇は抗原特異的 Trm、抗原非特異的 Trm のどちらでも観察されたが、それでもなお、抗原特異的 Trm で抗原非特異的 Trm よりも発現が高い傾向であった。したがって、抗原の再刺激によって Trm の皮膚内での密度が増加するとともに、CD86 陽性 Trm の割合が増加することが明らかとなった。

（3）Trm 間の Quorum Regulation を介した密度制御の可能性の検証

Trm が発現している CD86 について、定常状態、並びに Trm を抗原で再刺激した際の役割について検証するため、CD86 に対する中和抗体を用いた検討を実施した。抗原特異的 Trm を左右の側面皮膚で誘導したマウスにおいて、左側のみ抗原で再刺激し、再刺激の 14 日後に両側の皮膚を回収して Trm における CD86 の発現、Trm の数を評価した。まず CD86 発現の検出を、中和抗体と同じクローンの抗体で試みた結果、CD86 に対する中和抗体を投与したマウスでは、CD86 陽性となる Trm がほとんど検出されなかった。したがって、表皮中の Trm の細胞表面に投与した CD86 が十分に行き渡っていることが確認され、CD86 の作用を十分に阻害できていることが示唆された。なお、CD69 や CD103 といった Trm のマーカーの発現は、CD86 に対する中和抗体によって影響を受けないことを確認している。次に、抗原再刺激を行わなかった側の Trm の数を比較したところ、CD86 中和抗体を投与したマウスでは、Trm の数が増加していることが観察された。さらに、CD86 中和抗体による Trm の増加は、抗原再刺激を行った側の皮膚でも観察されることが明らかとなった。したがって、CD86 は抗原再刺激後の T 細胞の増殖期のみならず、定常時の Trm においてもその数の制御に役割を果たしている可能性が明らかとなった。CD86 は、CTLA4 との相互作用を介して T 細胞の増殖を負に制御すると考えられるが、相互作用先の CTLA4 が、現在想定している Trm 上に発現するものであるのか、あるいは、表皮内に存在する他の細胞により提供されるものであるかは、今後更なる検証を必要とする。また、可能性は低いと考えられるが、CD86 を中和したことにより Trm 以外の細胞群が影響を受け、間接的に Trm の数が増加した可能性も排除はできないことには留意したい。一方で、Trm の密度に比例して CD86 陽性 Trm の増加が確認されることを踏まえると、Trm 上の CD86 が Trm 同士の相互作用に関わり、表皮内での数の制御に関わっていると考えられる。他方、抗原特異的 Trm に CD86 の発現割合が高いことは、抗原特異的 Trm の Trm 間での競合における優位性の機序ではないと考えられる。CD86 が抗原特異的 Trm で高い機序に関しては、CD86 の発現が T 細胞密度によって正の制御を受けるとする前述の報告を踏まえると、抗原特異的 Trm が皮膚で Trm へと分化する際、皮膚での抗原認識による増殖などを介して、抗原特異的 Trm よりも高密度の状況を経験したことなどによる可能性が考察できる（最終的に維持される最大数は抗原特異的 Trm と抗原非特異的 Trm で同じ：初回誘導時）。今回、Trm の競合機序の追求を通じ、Trm の皮膚内密度の制御に関わる可能性のある分子を同定した。また、抗原による刺激を重ねることで、Trm の皮膚における適応性が向上し、存在数における上限などが変化する可能性を見出した。本知見は、Trm 同士の競合が想定したよりも複雑な過程であることを意味しており、ワクチンや病態の治療に応用するにあたって、現実の、よりヘテロな Trm 集団の中で、競合機序がどのように働くかを理解していくことが重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hirai Toshiro, Yoshioka Yasuo | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Considerations of CD8+ T Cells for Optimized Vaccine Strategies Against Respiratory Viruses | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.918611 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Hirai Toshiro | 4. 巻 142 |
| 2. 論文標題 Competition between T Cells for a Finite Epidermal Niche Promotes Selective Retention of Antigen-specific Memory T Cells in the Epidermis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI | 6. 最初と最後の頁 1327 ~ 1332 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.22-00155 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 平井敏郎 |
| 2. 発表標題 TGFβ活性化をめぐるT細胞間競合が形作る皮膚免疫記憶 |
| 3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平井敏郎、Daniel H. Kaplan |
| 2. 発表標題 表皮内ニッチをめぐる競合が、抗原特異的 T細胞保存の選択圧として働く |
| 3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平井敏郎 |
| 2. 発表標題 Interclonal competition for active TGFb preferentially enrich antigen-specific tissue resident memory T cells in the epidermal niche |
| 3. 学会等名 第46回年次学術大会・総会 日本研究皮膚科学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平井敏郎 |
| 2. 発表標題 Skin local activation of TGFb shapes antigen-specific memory CD8+ T cell pool for optimal skin defense |
| 3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演） |
| 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 |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | カプラン ダニエル (Kaplan Daniel) | | |

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 | | |
|---------|--------------------------|--|--|
| 米国 | University of Pittsburgh | | |