

論文概要 (Thesis Abstract)

○論文題目

Langerhans cells suppress CD8⁺ T cells *in situ* during autoimmune cutaneous disease

(自己免疫性皮膚疾患においてランゲルハンス細胞が皮膚で CD8 T 細胞の抑制をしている)

○指導教員

人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 皮膚科教授

藤本 学

(所属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

(氏名) 久保田 典子

目的：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主要組織適合抗原（MHC）を異物として認識することで起こる一種の自己免疫反応であり、皮膚では水疱を伴う紅斑が出現し、表皮角化細胞死を特徴とする苔癬反応と呼ばれる病理組織像が見られる。この苔癬反応は CD8 T 細胞誘導性と考えられている。一方、ランゲルハンス細胞（LC）は表皮内に存在し、外来抗原を取り込み表在リンパ節に遊走して T 細胞に抗原を提示する機能があるが、aGVHD において LC は皮膚で消失することが知られている。また、表皮内での LC の機能は免疫賦活化や免疫抑制といった相反する機能を示唆する報告があり、未だ明確にはされていない。そこで本研究では、表皮角化細胞特異的に卵白アルブミン（OVA）遺伝子を移入した K14-mOVA Tg マウスを用いた。このモデルマウスは、OVA 特異的 CD8T 細胞（OT-I 細胞）をドナー細胞として移入することで、病理組織学的に苔癬反応を呈する aGVHD 様の皮膚粘膜症状が惹起される。この K14-mOVA Tg マウスを用いて、CD8 T 細胞誘導性自己免疫性皮膚苔癬反応における皮膚での LC の機能を解明することを目的とした。

対象と方法：

- ① K14-mOVA Tg マウスに OT-I 細胞を移入し aGVHD 様自己免疫性皮膚症状を惹起させ、表皮内での LC の数の経時変化を FACS で解析した。
- ② 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（Langerin-DTR Tg マウス）と K14-mOVA Tg マウスを交配し、double Tg マウスを作製した。このマウスに DT を投与して LC を除去した後に OT-I 細胞を移入し aGVHD 様自己免疫性皮膚症状を惹起させ、14 日目の皮膚症状を評価した。
- ③ OVA CD8 エピトープ（SIINFEKL）を提示したマイトマイシン C 処理 Naïve 脾臓細胞を抗原提示細胞とし、OT-I 細胞刺激を行い増殖反応を惹起する際に、マウス表皮より採取した LC と 48 時間共培養し、OT-I 細胞数を WST-I assay で解析した。また、OT-I 細胞の増殖を細胞増殖モニタリング蛍光試薬を用いて解析し、また、OT-I 細胞中のアポトーシス細胞や死細胞の割合を Annexin V-7AAD を用いて FACS 解析した。
- ④ ③と同様の共培養系に、アポトーシス誘導因子や細胞増殖抑制因子に対するブロッキング抗体を各々加え、48 時間培養後、OT-I 細胞の増殖やアポトーシス細胞の割合を FACS 解析した。また、B7-H3 と B7-H4 の LC 上での発現を FACS 解析した。
- ⑤ Langerin-DTR/K14-mOVA double Tg マウスを用いて LC を除去した後、GFP⁺OT-I 細胞を移入し aGVHD 様皮膚症状を惹起させ、14 日目の皮膚の GFP の発現をリアルタイム PCR で解析し、8 日目の皮膚に浸潤した OT-I 細胞中のアポトーシ

ス細胞の割合と、5 日目の表在リンパ節中の OT-I 細胞の数と活性化の状態を FACS 解析した。

結果：

- ① 表皮細胞にのみ抗原がある当モデルマウスでは、aGVHD 様自己免疫性皮膚症状の発症で表皮内の LC の消失はなかった。
- ② LC の存在するコントロール群と比較し LC 除去群で皮膚症状がより強く出現し、皮膚粘膜障害による aGVHD の後期に出現する摂食障害による体重減少も大きかった。
- ③ 共培養実験にて、LC を加えた群では、コントロールとして野生型 naïve 脾臓細胞や K14-mOVA Tg マウスの脾臓より採取した樹状細胞を加えた群と比較して、増殖 OT-I 細胞の数が減少していた。また、K14-mOVA Tg マウスの LC を加えても、野生型 LC を加えても、増殖 OT-I 細胞数に有意差はなかった。LC を加えた群で、OT-I 細胞の増殖が抑制されており、OT-I 細胞中のアポトーシス細胞の割合・実数共に増加していた。
- ④ B7 ファミリーである B7-H3 や B7-H4 に対するブロッキング抗体を加えた際に、LC による増殖 OT-I 細胞数の減少がキャンセルされた。その際、LC による OT-I 細胞のアポトーシス誘導は部分的にキャンセルされたが、OT-I 細胞の増殖抑制はキャンセルされなかった。B7-H3 と B7-H4 はいずれも活性化した LC 上に発現していた。
- ⑤ コントロール群と比較し LC 除去群の皮膚で OT-I 細胞がより多く皮膚に浸潤しており、皮膚に浸潤した OT-I 細胞中のアポトーシス細胞の割合は、より少なかった。またリンパ節中の OT-I 細胞の数と活性化の状態は 2 群間で差はなかった。

考察：一般的に骨髄移植により惹起される aGVHD では LC が消失することが知られているが、当モデルマウスでは皮膚症状発症時においても LC の消失がなかった。これは、骨髄移植の際にはレシピエント LC 上に発現する MHC もドナー T 細胞の標的となるが、当モデルマウスでは表皮角化細胞に発現する OVA のみが抗原となるため、LC がドナー T 細胞の直接の標的にはならないためと考えられる。本研究では aGVHD 様皮自己免疫性皮膚症状を惹起した際、LC の除去で皮膚症状の悪化が見られたが、一方で表在リンパ節中の OT-I 細胞数や活性化に影響がなかったことから、LC は皮膚で免疫抑制に作用していることが示唆された。また、*in vitro* の実験で、LC が直接的に OT-I 細胞増殖を抑制し、またそのアポトーシスを誘導していること、活性化 LC 上に発現する B7-H3 や B7-H4 が部分的に OT-I 細胞のアポトーシス誘導に関与していることが示唆された。これらのことから、

*in vivo*においても LC が皮膚に浸潤した OT-I 細胞のアポトーシスを誘導し、免疫抑制的に機能していることが示された。

結論：LC は皮膚で表皮特異的 CD8 T 細胞の増殖を抑制し、かつ B7-H3 や B7-H4 を介してアポトーシスを誘導することで、自己免疫性皮膚苔癬反応の進展を抑制している。