

氏名	久保田 典子		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9252 号		
学位授与年月	令和元年7月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Langerhans cells suppress CD8 <sup>+</sup> T cells <i>in situ</i> 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)		
主査	筑波大学教授	医学博士	住田 孝之
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	坂田 麻実子
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	矢作 直也
副査	筑波大学講師	博士（医学）	田原 聡子

## 論文の内容の要旨

久保田典子氏の博士学位論文は、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局所において CD8<sup>+</sup>T 細胞を抑制していることを検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

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<sup>+</sup>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。一方、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 マウスは、OVA 特異的 CD8<sup>+</sup>T 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マウスモデルである。著者は、この K14-mOVA Tg マウスと OT-I 細胞移入の実験系を用いて、CD8<sup>+</sup>T 細胞誘導性自己免疫性皮膚苔癬反応における皮膚 LC の機能を明らかに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 様皮膚粘膜症状を惹起させ、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 様皮膚粘膜症状を惹起させ、14 日目の皮膚粘膜症状を評価した。
- ③ OVA CD8 エピトープ(SIINFEKL)を提示したマイトマイシン C 処理ナイーブ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<sup>+</sup>OT-I 細胞を移入し aGVHD 様皮膚粘膜症状を惹起させ、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 様皮膚粘膜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ナイーブ脾臓細胞や 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、OT-I 細胞の増殖が抑制されていた。また、K14-mOVA Tg マウスの LC を加えても、野生型 LC を加えても、OT-I 細胞の増殖に有意差はなかった。LC を加えた群では、OT-I 細胞中のアポトーシス細胞の割合と実数が共に増加していた。
- 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 細胞の増殖の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、著者が検討したモデルマウスでは皮膚粘膜症状発症時においても LC の消失は見られなかった。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た。著者は、aGVHD 様皮膚粘膜症状を惹起した際、LC の除去で皮膚症状の悪化を見たが、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 が皮膚局所で OT-I 細胞を抑制していることを明らかにした。著者は、*in vitro* の実験により、LC が直接的に OT-I 細胞増殖を抑制していること、アポトーシスを誘導していること、そのアポトーシスに活性化 LC 上に発現する B7-H3 や B7-H4 が部分的に関与していることを明らかにした。以上の実験結果から、著者は、LC が皮膚に浸潤した OT-I 細胞のアポトーシスを誘導し、自己免疫性皮膚苔癬反応を抑制していることを示唆した。

#### 結論：

LC は皮膚局所で表皮特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の増殖を抑制し、B7-H3 や B7-H4 を介したアポトーシスを誘導することにより、自己免疫性皮膚苔癬反応を抑制している。

## 審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、K14-mOVA Tg マウスと OT-I 細胞移入の実験系を用いて、CD8+T 細胞誘導性自己免疫性皮膚苔癬反応における皮膚 LC の機能を明らかにすることを目的とした。その結果、著者は、LC が皮膚局所で表皮特異的 CD8+T 細胞の増殖を抑制していること、B7-H3 や B7-H4 を介したアポトーシスを誘導していることを明かし、皮膚 LC が自己免疫性皮膚苔癬反応を抑制していると結論づけた。本研究は自己免疫性皮膚疾患の発症機構を解明する上で極めてユニークであり、世界でも高く評価されている。

令和元年 6 月 3 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。