

皮膚における自己反応性 CD4⁺ T 細胞による標的抗原認識機構の解明

慶應義塾大学医学部皮膚科

高橋 勇人

Interface dermatitis is a pathological term that consists of lymphocyte infiltration into dermo-epidermal junction, exocytosis, liquefaction degeneration of keratinocytes in the basal layer, Civatte body. This pathological change is commonly and frequently seen in several inflammatory skin diseases such as lichen planus, graft-versus-host disease, dermatomyositis, lupus erythematosus, severe drug adverse eruption and so on. However, the details on the pathomechanism of the disease remains still unclear. Recently we developed Dsg3-specific T cell receptor transgenic mice (Dsg3H1 mice) that T cells recognize Dsg3, epidermal targeted autoantigen by pemphigus vulgaris. Dsg3H1 CD4⁺ T cells can recognize Dsg3 in vivo and attack epidermal keratinocyte when they are transferred into Rag2^{-/-} mice. In this study, we investigated pathomechanism of interface dermatitis by using Dsg3H1 T cells. When factor X is knocked-out in Dsg3H1 CD4⁺ T cells, recipient Rag2^{-/-} mice did not develop interface dermatitis. However, Dsg3H1 CD4⁺ T cells vigorously proliferated in skin-draining lymph nodes and prominent lymphadenopathy was observed. This result suggested that factor X is important for Dsg3H1 T cells to leave lymph nodes to target tissue but not to recognize the antigens and proliferate. On the other hand, how Dsg3H1 CD4⁺ T cells recognize epidermal autoantigen and damage keratinocytes is another question. Antigen presentation by MHC class II on keratinocytes is believed to mediate this action. But supportive evidence is very limited. Using animal model of interface dermatitis, this fundamental question can be answered. The investigation to obtain a conclusion is still under way. In conclusion, through this study, factor X was identified as crucial molecule to achieve interface dermatitis.

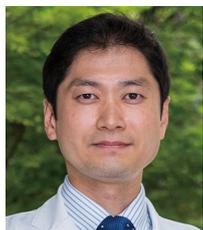
1. 緒言

Interface dermatitis (ID) は扁平苔癬、移植片対宿主病 (GVHD)、膠原病 (皮膚筋炎、全身性エリテマトーデスなど)、重症薬疹 (Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症) などに認める皮膚炎の一型であり、皮膚病理学的な分類である。ID は様々な疾患に共通して認める病理学的変化であるため、日常診療において比較的遭遇する頻度の高い皮膚炎である。しかしその発症メカニズムの詳細に関して、明確には理解されていない。

以前より、私たちは尋常性天疱瘡 (PV) 自己抗原である Dsg3¹⁾ に対する自己反応性 T 細胞の研究を行ってきた。Dsg3 は表皮角化細胞に発現し、デスモゾームを構成するカドヘリン型膜タンパクであり、角化細胞同士の細胞接着に重要な働きを持つ。PV では抗 Dsg3 自己抗体が産生され、Dsg3 の細胞接着が障害されることで、角化細胞がバラバラとなり、口腔粘膜などに水疱・びらんが生じる自己免疫疾患である。Dsg3 特異的 T 細胞の解析は PV モデルマウスを用いて解析された。PV モデルの作成には、まず Dsg3 に対する免疫寛容が成立していない Dsg3^{-/-}マ

ウスを組み替え Dsg3 タンパクで免疫する。免疫された Dsg3^{-/-}マウスは容易に抗 Dsg3 抗体を産生するが、標的となる Dsg3 がいないため PV の病態は再現できない。そこで Dsg3^{-/-}マウスのリンパ球を Rag2^{-/-}マウスに移入し、移入されたリンパ球が Rag2^{-/-}マウスで発現する Dsg3 を認識し、抗 Dsg3 抗体を産生するようになり、PV の病態が再現される²⁾。

Dsg3 特異的 T 細胞はこの PV モデルを利用し、以前にクローンが樹立された。そのクローンのいくつかは Dsg3^{-/-}マウス由来の B 細胞と一緒に Rag2^{-/-}マウスに移入すると B 細胞からの抗 Dsg3 抗体の産生を誘導し、PV フェノタイプを再現することができ、病原性を持つクローンであることがわかった³⁾。次に、このクローンが持つ Dsg3 特異的 T 細胞受容体遺伝子を単離し、これを利用して Dsg3 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス (H1 マウス) を作成した⁴⁾。H1 マウス由来 CD4⁺ T 細胞は B 細胞と一緒に Rag2^{-/-}マウスへ移入すると皮膚炎が著明に生じた。しかし、病理学的に観察しても抗 Dsg3 抗体の産生や PV フェノタイプは認めなかった。その代わりに、移入された T 細胞自身が皮膚に浸潤し、とくに表皮真皮境界部への浸潤と、基底層角化細胞の液状変性、Civatte body などが観察され、観察された皮膚炎は ID であることがわかった。これを実験的自己免疫性皮膚炎 (EAD; experimental autoimmune dermatitis) と呼んでいる。一方、H1 マウスを Dsg3^{-/-}マウスと交配し、Dsg3 非存在下で H1 T 細胞を分化させ、これを B 細胞と一緒に Rag2^{-/-}マウスへ移入すると抗 Dsg3 抗体の産生や PV フェノタイプが誘導され



Analysis on the mechanism of antigen recognition by autoreactive CD4⁺ T cells in the skin

Hayato Takahashi

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

た。すなわち Dsg3 特異的 T 細胞はある条件下においては PV フェノタイプと ID の両方の病理学的変化を誘導できることがわかった。通常 PV では ID は観察されないが、paraneoplastic pemphigus (PNP) では PV フェノタイプと ID が同時に観察される。以上の過去の成績から Dsg3 特異的 T 細胞による ID は PNP における ID を考察するうえで、重要なモデルであると考えられた。

従来、T 細胞による組織傷害性は CD8⁺T 細胞が主に担うものとされてきたが、EAD では CD4⁺T 細胞が組織傷害活性を持つ。CD4⁺T 細胞は MHC class II 分子からの抗原提示を受けて、抗原認識を行う免疫細胞である。H1 T 細胞は肝臓など Dsg3 を発現しない組織は傷害せず、Dsg3 を発現する表皮を傷害する。一方、表皮角化細胞は IFN- γ の刺激により MHC class II 分子を発現するが、角化細胞が自己抗原を適切に処理し、MHC II 分子上に提示できる抗原提示細胞としての機能は十分には知られていない。そこで本研究では EAD を利用し、CD4⁺T 細胞がどのように末梢組織で抗原を認識し、組織を構成する細胞(角化細胞)を傷害するのか、その過程を詳細に解析し、CD4⁺T 細胞による組織傷害過程に関わる細胞集団や機構を第一の目標として明らかにする。

一方、臨床の現場においては、全身性ループスエリテマトーデス (SLE) に対してリツキサン (抗ヒト CD20 モノクローナル抗体) が有効であることが報告されている。SLE は自己抗体が出現する自己免疫疾患ではあるが、自己抗体のみで病態が形成されるわけではなく、T 細胞の浸潤を各病変組織で認める。SLE で生じる皮膚炎は ID の病型をとるが、皮膚においても T 細胞が浸潤し組織傷害を及ぼすことで病変が形成され発疹が生じていることがわかっており、自己抗体で皮膚炎が生じるとは考えられていない。このような臨床的な事実から、T 細胞が介する炎症においても、B 細胞がその病態において重要であることが示唆されるが、純粋に T 細胞のみで生じる自己免疫の病態における B 細胞の重要性については十分に理解されていない。そこで、EAD をモデルに、T 細胞依存性皮膚炎の病態における B 細胞の役割を第二の目標として検討していく。

これらの解析結果により ID を効果的に抑制する新たな方法を開発する基礎的データを構築することを本研究の目的とする。

2. 方法

2.1. Interface dermatitis の発症に重要な T 細胞因子の同定

H1 T 細胞は IFN- γ 依存性に ID を誘導することから EAD は Th1 型の炎症であると考えられている⁴⁾。そこで、T 細胞が Th1 に分化するのに必要な因子 X の ID における重要性を検討するために、因子 X のノックアウトマウスと H1 マ

ウスを交配し、X^{-/-}-H1 マウスを作成する。このマウス由来の X^{-/-}-H1 CD4⁺T 細胞を単離後、Rag2^{-/-}マウスへ移入し、ID の状態を観察する。また移入後にレシピエントマウスの脾臓やリンパ節を観察する。

2.2. Interface dermatitis の発症に重要な抗原提示細胞の解析

組織における、CD4⁺T 細胞の抗原認識機構を明らかにするため、抗原認識に必須の分子である MHC class II 分子を皮膚の様々な細胞から欠損させるマウスを作成する。各マウスの中で、EAD が生じるか否かを評価することにより、CD4⁺T 細胞が末梢組織を傷害する際に必要な抗原提示細胞を明らかにしていく。具体的には、野生型マウス、MHC class II-KO マウス、Langerin-DTA マウス、Rag2-KO マウスなどを交配し、骨髄移植を組み合わせることにより、角化細胞、ランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞などが MHC class II 分子を欠損する、あるいは、細胞が存在しないことにより抗原提示がされない状況を作成できる。これらのマウスをレシピエントとして H1 T 細胞を移入して EAD の誘導を試み、EAD 発症の有無を確認する。

2.3. EAD の病態における B 細胞の役割の検討

Dsg3H1 マウスより Dsg3H1 T 細胞を単離し、Dsg3^{-/-}マウス由来 B 細胞と一緒に Rag2^{-/-}マウスへ移入すると ID が生じる。この時、B 細胞と一緒に移入しない群を同時に作成し、移入後に観察される体重減少、皮疹重症度のスコア、14 日後の病理学的変化を両群で比較検討する。この実験により表皮に対する細胞性免疫における B 細胞の重要性が検討できる。

3. 結果

3.1. Interface dermatitis における因子 X の役割の検討

因子 X は T 細胞が Th1 に分化する際に重要な働きを持つ因子である。この因子 X を欠失した H1 T 細胞を Rag2^{-/-}マウスに移入し、レシピエントマウスの皮膚症状を観察したところ、コントロールマウスに比べて症状が軽微であった。またレシピエントマウスの皮膚所属リンパ節を観察すると、コントロールマウスのリンパ節に比べて、X^{-/-}-H1 CD4⁺T 細胞を移入されたマウスのリンパ節は著明に腫脹していた。またリンパ節に存在する X^{-/-}-H1 CD4⁺T 細胞の IFN- γ 産生はほとんど観察されなかった。これらの結果から、因子 X は EAD において Th1 への分化に大事であることがわかった。またリンパ節内での抗原認識自体には因子 X は関連しないため、リンパ節内で X^{-/-}-H1 CD4⁺T 細胞は抗原刺激をうけ増殖するが、リンパ節から皮膚へ遊走できなくなっている機序が考えられた。

3.2. Interface dermatitisの発症に重要な抗原提示細胞の解析

本研究を進めていく中で、MHCII^{-/-}マウスに野生型から骨髄移植したマウスは2~3ヶ月かけて全身に炎症が生じることがわかった。このマウスにはCD4⁺T細胞は通常通り分化している。炎症が生じる機序として分化したT細胞に対する免疫寛容機構が通常通り働かない状態となっていることが想定された。さらに、末梢組織におけるMHC class II分子は発現できない状況にあるが、それにもかかわらず、末梢組織の炎症が観察されることから、末梢組織でのMHC class II分子は末梢組織の炎症が惹起されるうえで無関係である可能性が示唆された。しかし、このマウスではCD8⁺T細胞が炎症を惹起している可能性もあり得るため、さらなる検討が必要と考えられた。

一方、Rag2^{-/-}マウスとLangerin-DTAマウスを交配しLangerin-DTA-Rag2^{-/-}マウスを作成した。Langerin-DTAマウスではランゲルハンス細胞を欠失する。このマウスにH1 CD4⁺T細胞を移入したところ、EADの症状が増悪することがわかった。またランゲルハンス細胞とCD4⁺T細胞を共培養すると制御性T細胞が有意に増殖することがわかった。これらの結果から、ランゲルハンス細胞は制御性T細胞の誘導に関わり、EADの症状に対して抑制的に働いていることがわかった。

最後に、MHCII^{-/-}マウスにRag2^{-/-}マウスから骨髄移植し、角化細胞などのradio-resistantな末梢組織を構成する細胞でMHC class II分子が欠損した状態で、かつT細胞とB細胞を欠失したマウス([Rag2^{-/-}→MHCII^{-/-}]マウス)を作成した。コントロールとしてRag2^{-/-}マウスにRag2^{-/-}マウスから骨髄移植した[Rag2^{-/-}→Rag2^{-/-}]マウスでは通常通りのEADが生じた。一方で、[Rag2^{-/-}→MHCII^{-/-}]マウスにH1 CD4⁺T細胞を移入すると、軽度のEADが生じることが観察された(図1)。しかし、[Rag2^{-/-}→MHCII^{-/-}]マウスを解析すると骨髄移植が完全ではなくレシピエント側の血球も観察し得たことから、観察されたEADの程度が軽微であった理由として、制御性T細胞の残存や、ランゲルハンス細胞残存の影響など角化細胞以外の影響の存在も考えられた。今後は、実験条件の改善が結論を得るために必要と考えられた。

3.3. EADの病態におけるB細胞の役割の検討

H1マウスよりH1 CD4⁺T細胞を単離し、Dsg3^{-/-}マウス由来B細胞と一緒にRag2^{-/-}マウスへ移入した群と、T細胞のみを移入した群を作成し、両群を比較した。その結果、T細胞とB細胞を両方移入した群でより著しい体重減少と皮疹重症度のスコアの悪化を認めた。この実験結果から、T細胞による表皮に対する細胞性免疫においても、B細胞の存在が重要であることがわかった。

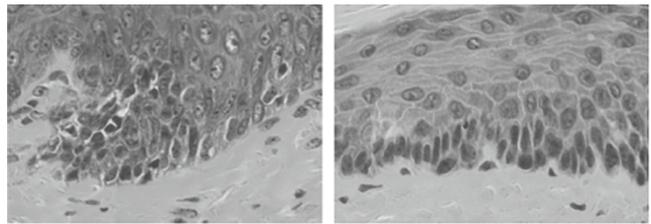


図1 骨髄移植で作成したレシピエントマウスで生じたID (左) Rag2^{-/-}マウスからRag2^{-/-}マウスに骨髄移植したマウスにIDを誘導した。表皮内に細胞浸潤を認める。(右)はコントロール。明らかな細胞浸潤を認めない。

4. 考察

T細胞はinterface dermatitisだけでなく、湿疹、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎や乾癬、その他のほぼ全ての炎症性皮膚疾患の病態にかかわり、自己抗原あるいは外来抗原特異的に免疫応答を開始する。本研究を通じてなされる、皮膚におけるT細胞の抗原認識機構の理解はinterface dermatitisのみならず、湿疹やアトピー性皮膚炎などの疾患制御の観点から重要であるだけでなく、皮膚の健康維持のために大きく役立つと考えられる。

本研究では因子Xのinterface dermatitisにおける重要性が明らかになったが、それ以上に因子Xが欠損すると、Tリンパ球がリンパ節外に出ることができず、リンパ節内にとどまって、増殖を続けることがわかった。現在、そのメカニズムについては検討中であるが、少なくとも、この結果は、因子Xを阻害するような治療は症状の緩和には有用である可能性はあるが、自己免疫応答自体を止めることができないことを意味し、因子Xを阻害する戦略は、治療としては不完全なアプローチになりうるということがわかった。

次に本研究では、まだ最適な条件ではないものの、角化細胞のMHC class II分子が欠損した状態でも、interface dermatitisが生じることが示唆された。このことは、T細胞が角化細胞を認識し、傷害するためには、角化細胞由来の抗原を認識する必要があるが、角化細胞自身が抗原提示をしなくても、角化細胞が認識され傷害されることを意味する。現在のところ、想定される機序は不明であるが、新しい抗原認識機構が存在する可能性がある。

5. 総括

本研究を通じて、interface dermatitisが生じるために必要な分子や新たな抗原認識機構の可能性が明らかになった。今後、より詳細なメカニズムが明らかになれば、皮膚の健康増進に貢献できると考えられた。

(参考文献)

- 1) Amagai M., Klaus-Kovtun V. and Stanley J. R.

- Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; 67 (5) : 869-77.
- 2) Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H. et al. Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. *J Clin Invest* 2000; 105 (5) : 625-31.
- 3) Takahashi H., Amagai M., Nishikawa T. et al. Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2008; 181 (2) : 1526-35.
- 4) Takahashi H., Kouno M., Nagao K. et al. Desmoglein 3-specific CD4⁺T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121 (9) : 3677-88.