

# 制御性 T 細胞による皮膚恒常性維持メカニズムの解明

東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室

堀 昌平

Foxp3-expressing regulatory T cells (Treg) are indispensable for the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis. Recent studies have revealed that Treg cells reside not only in lymphoid, but also in non-lymphoid, tissues including the skin and that skin Treg cells play an important role in maintaining skin homeostasis. However, the molecular mechanisms that regulate Treg accumulation and function in the skin remain elusive. We have previously shown that the Foxp3<sup>A384T</sup> mutation, which was identified in human IPEX patients, impairs accumulation of Treg cells in selective tissues including the skin and causes inflammation in those sites at least in part by repressing expression of the transcription factor BATF, which act down-stream of TCR signaling. In this study, by generating and analyzing Treg-specific BATF conditional knockout mice, we show that BATF is indispensable for the accumulation and suppressive function of Treg cells in the skin. BATF appears to cooperate with Foxp3 to control Treg accumulation in the skin by promoting expression of molecules implicated in leukocyte migration to and retention in the skin. Furthermore, we also show that skewed TCR repertoire selectively exacerbates skin inflammation in Foxp3<sup>A384T</sup> mutant mice, which otherwise develop mild dermatitis. In summary, our results suggest that interactions between Foxp3 and the TCR-BATF axis represents an important determinant of Treg accumulation and anti-inflammatory function in the skin.

## 1. 緒言

皮膚は様々な病原体の侵襲から身体を守る免疫応答の場であるとともに、組織を傷害する過剰な免疫応答から「自己」を守る免疫寛容の場でもある。「自己」に対する免疫寛容は制御性 T 細胞 (regulatory T cells、以下 Treg) によって能動的に維持されている。我々は、ヒト自己免疫疾患 IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群の原因遺伝子として同定された Foxp3 が Treg 分化と機能を司るマスター転写因子として機能することを世界に先駆けて報告し、Treg の分子基盤と生理的意義を明らかにした<sup>1,2)</sup>。近年、Treg は皮膚にも多数存在し、Treg の数的・機能的な異常が IPEX を含む様々な皮膚疾患(アレルギー疾患、自己免疫疾患など)の発症にかかわっていることが明らかにされてきた。さらに最近、皮膚における Treg の機能は免疫抑制に留まらず、創傷治癒や毛包幹細胞の増殖・分化の促進など皮膚組織自体の恒常性維持にも及ぶことが明らかにされており、皮膚恒常性維持における Treg の役割が注目されている<sup>3)</sup>。しかしながら、Treg が皮膚に移行・集積し機能する分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。

Treg は通常型 Foxp3-T 細胞 (conventional T cells; Tconv)



Elucidating the mechanisms of regulatory T cell-dependent maintenance of skin homeostasis

Shohei Hori

Laboratory for Immunology and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

と同様に、2 次リンパ組織を巡回する CD44<sup>low</sup> CCR7<sup>high</sup> ナイーブ型サブセットと、抗原刺激を受けて活性化した CD44<sup>high</sup> CCR7<sup>low</sup> エフェクター型サブセットに大別され、非リンパ組織の Treg は専らエフェクター型 Treg によって構成されている。我々は Foxp3 による Treg 分化と機能の制御メカニズムを明らかにするために、ヒト IPEX 患者で同定されている Foxp3 変異を導入したマウスモデルを作製してその影響を分子、細胞、個体レベルにわたって解析してきた。その過程で、機能欠失型変異が Treg の分化や抑制機能など広範な性質を障害して皮膚、肺、肝臓など様々な組織に Th1 および Th2 型の炎症を惹起するのに対し、Foxp3<sup>A384T</sup> 変異 (Ala384 の Thr への置換) が DNA 結合特異性を拡大させる機能獲得型変異であり、皮膚・肺・大腸など特定の組織における Treg の集積を障害し、これらの組織選択的に Th2 および Th17 型の炎症を惹起することをみいだした。さらに、Foxp3<sup>A384T</sup> マウスにおけるこれら組織への Treg の集積障害は AP-1 ファミリーに属する転写因子 BATF の発現抑制に起因することを明らかにした<sup>4)</sup>。しかしながら、BATF がどのように皮膚への Treg の集積を制御するのか、また、Foxp3<sup>A384T</sup> 変異がなぜ皮膚や肺などの組織選択的に Treg の集積を障害して組織選択的な自己免疫疾患を惹起するのかは明らかでない。

本研究で我々は、これら 2 つの問題の解明に取り組んだ。まず、BATF による Treg の皮膚への集積制御メカニズムとその意義の解明を目指した。そして、Treg の TCR レパートアは組織間で異なっており、組織集積には TCR 特異性が重要であるという報告に基づき、Foxp3<sup>A384T</sup> 変異により皮膚抗原特異的な Treg の TCR クローンが欠失し、そのために皮膚抗原に対する自己免疫応答の制御が破綻するの

ではないかと仮説を立て、その検証を試みた。

## 2. 方法と結果

### 2.1. BATFによるTregの皮膚への集積メカニズムとその意義

Tregの皮膚への集積と炎症制御における転写因子BATFの役割を明らかにするために、*Foxp3*<sup>YFP<sup>Cre</sup></sup>マウスと*Batf*<sup>fl/fl</sup>マウスを交配させてTreg特異的BATF欠損マウス(以下cKOマウス)を作製した。cKOマウスは生後8週齢までに約半数が死亡し、皮膚、肺、肝臓、大腸などの組織において炎症細胞の浸潤を伴う激しい炎症を呈した(図1)。このとき各組織のCD4<sup>+</sup>T細胞中のCCR7<sup>low</sup> Foxp3<sup>+</sup>エフェクター型Treg、CCR7<sup>low</sup> Foxp3<sup>-</sup>エフェクター型Tconvの割合を検討したところ、前者が著しく減少していたのに対し、後者は逆に顕著に増加していた。以上の結果から、BATFがTregの皮膚への集積に必須の役割を担っていることが明らかになった。

BATFによるTregの皮膚への集積メカニズムを明らかにするために、cKO Tregおよび野生型TregのRNA-seq解析を行い、BATFの標的遺伝子の同定を行った。その結果、BATF cKO Tregではエフェクター型Tregに高発

現するケモカイン受容体、サイトカイン受容体、接着分子、副刺激分子などの発現が低下しており、なかでもリンパ球の皮膚への移行と保持に関与することが報告されている複数の分子の発現が低下していた。このことから、BATFがこれら分子の発現を制御することによりTregの皮膚への集積を制御していると考えられた。

次に、TregおよびTconvにおいてBATFのChIP-seq解析を行い、ゲノム上のBATF結合領域を比較した。その結果、全BATF結合領域のうち18.6%がTreg選択的に結合する領域であった。そしてこれらTreg選択的BATF結合領域近傍に存在する遺伝子のGene Ontology解析を行ったところ、*Foxp3*の標的遺伝子が多く含まれることがわかった。実際、Treg選択的BATF結合領域の約半数に*Foxp3*も結合していた。これらTreg選択的BATF結合領域の近傍にはエフェクター型Treg選択的に高発現する遺伝子が多く含まれており、それらの遺伝子近傍のTreg選択的BATF結合領域には、特にエフェクター型Treg選択的に*Foxp3*が結合していた。以上の結果から、BATFは*Foxp3*と機能的に協調することによりエフェクター型Treg選択的遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。

以上の結果から、BATFのみならず*Foxp3*もエフェ

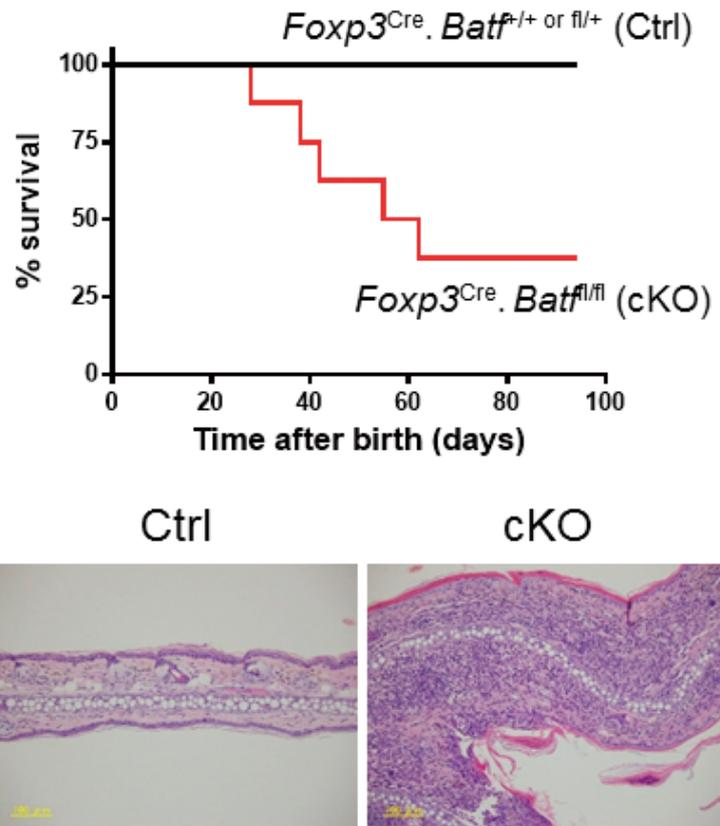


図1 Treg特異的BATF欠損マウスは皮膚炎を伴う致死的な自己免疫疾患を発症する。Treg特異的BATF欠損マウス(cKO)と対照マウス(Ctrl)マウスの生存曲線(上)と皮膚(耳介)のHE染色像(下)。

クター型 Treg の分化と組織への集積に重要である可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Foxp3 の DNA 結合活性を欠失させる amorphic 変異である Foxp3<sup>R397W</sup> 変異を導入したノックインマウスを解析したところ、この Foxp3 変異マウスもエフェクター型 Treg を欠いており、皮膚における Treg も激減していた。

## 2.2. 皮膚炎制御における Treg の TCR レパトアの役割

Foxp3<sup>A384T</sup> 変異マウスにおいてなぜ皮膚を含む特定の臓器において Treg の集積に異常がみられ、これらの組織選択的に炎症が発症するのかを明らかにすることを目指して研究を進めた。1つの仮説として、これらの組織に特異的に発現する（自己）抗原を認識する抗原特異的 Treg がこの変異により欠損することが考えられる。この仮説を検証するために、次世代 DNA シーケンシングにより Treg および Tconv の T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析を行うことにした。

これまでに、独自に樹立した単一の TCRβ 鎖を発現する TCRβ<sup>fixed</sup> マウスを活用し、TCRα 鎖のレパトアを次世代シーケンシングにより網羅的に解析する手法を確立している (TCRβ 鎖を固定することで、TCRα 配列を決定すれば個々の細胞の TCR のクローン型を一義的に決定できる)。そして、このマウスと Foxp3<sup>A384T</sup> 変異マウスを交配させ、TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスでも固定しない (以下 TCRβ<sup>WT</sup> と表記) Foxp3<sup>A384T</sup> マウスと同様の組織選択的な Treg の減少、組織選択的な炎症がみられるかを検討した。炎症の指標としては、組織から単離される白血球数と炎症性サイトカインを発現する Tconv の割合を計測した。その結果、TCRβ 鎖の固定の有無にかかわらず、皮膚と肺では Foxp3<sup>A384T</sup> 変異により Treg の割合が大きく減少し白血球数が増加したが、肝臓では Treg の減少と白血球数の増加は認められなかった。

一方で、TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスでは TCRβ<sup>WT</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスよりも皮膚 (耳介) の厚み、白血球数 (特に好中球数) が選択的に増加することがわかった。また炎症の程度に大きな個体差がみられた (図2)。皮膚の炎症増悪と関連する遺伝子を定量的 RT-PCR で探索した所、炎症が増悪した TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスの皮膚では、TCRβ<sup>WT</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスと比べ Th1 応答に関連するケモカインとサイトカイン遺伝子の発現が特異的に亢進していた。

研究の過程で、C57BL/6 背景 (MHC ハプロタイプは H-2<sup>b</sup>) と考えられていた TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>WT</sup> および TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスに、B10.BR 系統に由来する MHC ハプロタイプ (H-2<sup>k</sup>) が混入していることが発覚した。そこで、皮膚炎の個体差が MHC ハプロタイプの違いによるのでは

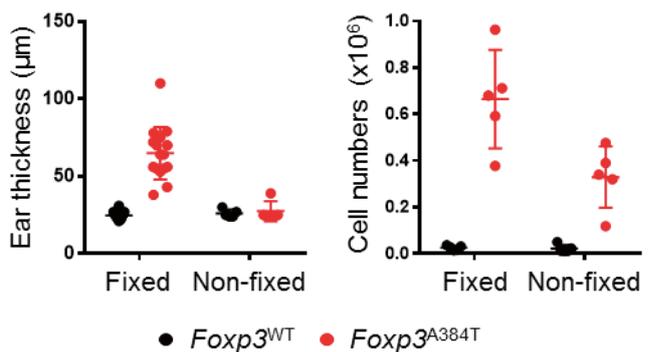


図2 TCRβ鎖固定による Foxp3<sup>A384T</sup> 変異マウスの皮膚炎増悪。耳介の厚み(左)と白血球数(右)。

ないかと考え、TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスを H-2 のハプロタイプごとに分類し、それぞれの皮膚の肥厚、皮膚の Th1 応答関連遺伝子の発現を比較した。その結果、H-2<sup>k/k</sup> および H-2<sup>k/b</sup> 背景の TCRβ<sup>fixed</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスでのみ顕著な皮膚の肥厚や Th1 応答関連遺伝子の発現上昇がみられた。

## 3. 考察・総括

Treg は炎症抑制のみならず、創傷治癒、発毛など、皮膚の様々な生理的、病理的現象に深くかかわっている。従って、皮膚における Treg の集積と機能のメカニズムを明らかにすることは、自己免疫疾患やアレルギー疾患などの皮膚疾患の治療という観点はもちろん、皮膚の美容と健康を保つというコスメトロジーの観点からも重要な課題である。

本研究により、Treg の皮膚への集積と炎症抑制機能において転写因子 BATF が必須の役割を担っていること、BATF は Treg の皮膚への移行・保持にかかわることが知られている遺伝子群の発現を制御することで皮膚への集積を制御していることが明らかになった。さらに、Treg の皮膚への集積には Foxp3 も重要であり、Foxp3 は BATF と協調することでエフェクター分化と皮膚への集積を制御する可能性が示唆された。このことは、BATF と Foxp3 の機能的協調作用を人為的に強化または阻害することで、皮膚において Treg と Tconv のバランスを操作することができる可能性を示唆している。両者の機能的協調のメカニズムの詳細を明らかにすることで、皮膚における自己免疫疾患やアレルギーなどの病的免疫応答を抑制し、がん免疫を強化するための新しい治療法の開発につながる事が期待される。

一方、TCRβ 鎖を固定した Foxp3<sup>A384T</sup> 変異マウスの解析から、このマウスにおいて皮膚炎が選択的に増悪する個体がいること、そして皮膚炎の重症化は H-2<sup>k</sup> ハプロタイプの存在に依存していることが明らかになった。現時点では皮膚炎の増悪に Foxp3<sup>A384T</sup> 変異と H-2<sup>k</sup> のみで十分であるのか、TCRβ 鎖の固定も必要であるのか不明である。この問題を検討するために、現在 H-2<sup>k</sup> 背景の TCRβ<sup>WT</sup> Foxp3<sup>A384T</sup> マウスを作成して病態解析を進めている。いずれにせよ、MHC

は TCR レパトア 選択において中心的な役割を担うことから、この知見は  $\text{Foxp3}^{\text{A384T}}$  変異と TCR レパトアの相互作用により皮膚炎が重症化することを強く示唆している。これまでの自己免疫疾患の GWAS 解析から、疾患感受性遺伝子として MHC 遺伝子の特定のハプロタイプと *CTLA4* や *IL2Ra* などの Treg 関連遺伝子が同定されている。このことは、特定の MHC ハプロタイプによる TCR のレパトアの偏りと Treg の異常が相互作用することで自己免疫疾患の組織選択性が規定されている可能性が考えられる。 $\text{H-2}^{\text{k}}$  ハプロタイプと  $\text{Foxp3}^{\text{A384T}}$  変異の相互作用による皮膚炎増悪のメカニズムを解明することで、自己免疫疾患の組織選択性を規定するメカニズムの解明の貢献することが期待される。

#### (引用文献)

- 1) Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 : 1057–61, 2003
- 2) Komatsu N, and Hori S. Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 8959–64, 2007
- 3) Kalekar LA, and Rosenblum MD. Regulatory T cells in inflammatory skin disease: from mice to humans. *Int Immunol* 31 : 457–63, 2019
- 4) Hayatsu N, Miyao T, Tachibana M, Murakami R, Kimura A, Kato T, Kawakami E, Endo TA, Setoguchi R, Watarai H, Nishikawa T, Yasuda T, Yoshida H, and Hori S. Analyses of a Mutant Foxp3 Allele Reveal BATF as a Critical Transcription Factor in the Differentiation and Accumulation of Tissue Regulatory T Cells. *Immunity* 47 : 268–83 e9, 2017