

論 文 要 旨

Role for E-cadherin as an inhibitory receptor on epidermal $\gamma\delta$ T cells

Eカドヘリンは表皮 $\gamma\delta$ T細胞において
抑制性受容体として機能している

内 田 洋 平

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

成体において、Eカドヘリンは表皮ケラチノサイトなどの上皮細胞同士の細胞間接着を担う接着分子である。マウスの表皮内 $\gamma\delta$ T細胞である樹枝状表皮T細胞 dendritic epidermal T cell (DETC) もEカドヘリンを発現しているが、DETCにはEカドヘリンの受容体である $\alpha E\beta 7$ インテグリンも発現している。

これまでに腸管上皮内リンパ球 intraepithelial lymphocyte (IEL) などは、 $\alpha E\beta 7$ インテグリンを介したヘテロフィリックな結合によりEカドヘリンを発現する上皮細胞に接着して上皮内に留まることが示されてきた。また、細胞傷害性T細胞上に発現する $\alpha E\beta 7$ インテグリンはEカドヘリンを発現する腫瘍細胞に対する細胞傷害に重要である。活性化したIELとCD8+T細胞において、 $\alpha E\beta 7$ インテグリンは共刺激受容体として働いていると考えられている。DETCはインテグリン αE 鎖欠損マウスで減少するため、DETCは $\alpha E\beta 7$ インテグリンを介して表皮内に留まる可能性が示唆されてきた。しかしながら、DETCのケラチノサイトに対する接着、DETCのケラチノサイトに対する細胞傷害、または、DETCの活性化調節などにおける $\alpha E\beta 7$ インテグリンの役割は不明であった。さらに、DETCのEカドヘリンと $\alpha E\beta 7$ インテグリンの機能的な違いについてもこれまでに報告がない。そこで申請者らは、DETCとケラチノサイトの細胞間接着におけるEカドヘリン同士のホモフィリックな結合と $\alpha E\beta 7$ インテグリンを介したヘテロフィリックな結合の機能的な違いに関する研究を行った。

【材料および方法】

雌の6-12週齢のC57BL/6マウスを実験に使用した。全ての手技は、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得た。DETC細胞株は、1 mM塩化カルシウム含有1%トリプシンで処理したマウス皮膚より得られた表皮細胞をIL-2の存在下でTCR (T cell receptor) 刺激して7日間培養後にコンカナバリンAで刺激して作製した。最後の刺激から14日間培養した細胞をresting DETCとして用い、さらに24時間TCR刺激したDETCをactivated DETCとして用いた。DETCの接着分子や、活性化刺激に対するDETCのサイトカイン産生と脱顆粒などの測定はフローサイトメトリー法を用いた。創傷周囲の活性化したDETCやin vitroでEカドヘリンを結合させたプレート上で培養したDETCのEカドヘリンの発現量の変化は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。DETCのケラチノサイトに対する接着は、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) でラベルしたDETCとケラチノサイトを接着分子に対するブロッキング抗体の存在下で培養し、ケラチノサイトに接着したDETCの数を蛍光顕微鏡下で解析した。DETCのケラチノサイトに対する細胞傷害の解析は、Pam212ケラチノサイトとDETCを抗 $\alpha E\beta 7$ インテグリンモノクローナル抗体の存在下で培養し、傷害されたケラチノサイトから放出されるLDHを比色分析法により定量化した。

【結果】

1. 新鮮単離された DETC において E カドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの発現は認められたが、E カドヘリンのもう一つのリガンドである killer cell lectin-like receptor (KLRG1) の発現は認められなかった。
2. 創傷周囲の活性化した DETC は樹枝状の突起が消失し丸く形を変え、E カドヘリンの発現低下が認められたが、 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの発現は保たれていた。
3. *In vitro* で、TCR 刺激で活性化した DETC において E カドヘリンの発現低下が認められたが、 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの発現は保たれていた。
4. *In vitro* で、DETC のケラチノサイトに対する 1 時間の接着は、 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンと E カドヘリンの結合を阻害する抗 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンモノクローナル抗体で阻害されたが、ホモフィリックな E カドヘリン同士の結合を阻害する抗 E カドヘリンモノクローナル抗体では阻害されなかった。
5. 抗 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンモノクローナル抗体の存在下では、DETC によるケラチノサイトに対する細胞傷害は抑制された。
6. *In vitro* で、リコンビナント E カドヘリンを固相化したプレート上で DETC を培養した際、培養 1 時間後では DETC 底面の E カドヘリンの発現は認められなかったが、培養 24 時間後には DETC 底面に E カドヘリンの発現を認めるようになり、DETC の細胞突起の伸長が認められた。
7. 抗 E カドヘリンモノクローナル抗体を固相化したプレート上で DETC を培養し、DETC 上の E カドヘリンを架橋した際、TCR 刺激に対する DETC のサイトカイン産生と脱顆粒の抑制が認められたが、固相化した抗 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンモノクローナル抗体による DETC 上の $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの架橋では、TCR 刺激に対する DETC のサイトカイン産生と脱顆粒の増強が認められた。
8. リコンビナント E カドヘリンを固相化したプレート上で DETC を 4 時間培養し、リコンビナント E カドヘリンと DETC 上の $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを結合させた際、マイトジェンにより誘導された DETC のサイトカイン産生と脱顆粒の増強が認められたが、24 時間培養後のリコンビナント E カドヘリンと DETC 上の E カドヘリンの安定した結合では DETC のサイトカイン産生と脱顆粒の抑制が認められた。
9. アセトン固定したケラチノサイト上で DETC を 24 時間培養した際、ホモフィリックな E カドヘリン同士の結合を阻害する抗 E カドヘリンモノクローナル抗体の存在下では DETC のサイトカイン産生と脱顆粒の増強が認められた。

【結論及び考察】

In vivo および *in vitro* で活性化した DETC において E カドヘリンの発現低下が認められたが、 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの発現は保たれていたことから、DETC の E カドヘリンの発現は活性化状態によって調整されることが示された。さらに、*in vitro* における DETC のケラチノサイトに対する短時間での接着は $\alpha_E\beta_7$ インテグリンと E カドヘリンのヘテロフィリックな結合に依存性であり、DETC 上の E カドヘリンと固相化リコンビナント E カドヘリンの間の安定したホモフィリック結合の形成には、より長時間を要した。また、*in vitro* において DETC を活性化する際に $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを架橋するとサイトカイン産生および細胞傷害性顆粒の放出が増強したのに対して、DETC 上の E カドヘリンを架橋すると DETC の活性化が抑制された。

このように、DETC 上に発現する E カドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリンはケラチノサイトへの接着に関わるのみではなく、DETC 上の E カドヘリンは抑制性受容体として機能し、共刺激受容体である $\alpha_E\beta_7$ インテグリンとともに DETC の活性化を調整していることが明らかになった。

(The Journal of Immunology 2011 ; 186 (12) : 6945-6945 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 220 号	学位申請者	内田 洋平
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	黒野 祐一	副査
	副査	松山 隆美	副査
			博士 (医学)
			小松澤 均
			久保田 龍二

Role for E-cadherin as an inhibitory receptor on epidermal $\gamma\delta$ T cells

(Eカドヘリンは表皮 $\gamma\delta$ T細胞において抑制性受容体として機能している)

Dendritic epidermal T cell (DETC) はマウスの表皮に常在する $\gamma\delta$ T 細胞であり、 $V\gamma 1$ と $V\delta 3$ の組み合わせからなる多様性のない $\gamma\delta$ TCR を発現する。DETC はストレスや傷害を受けた、あるいは腫瘍化したケラチノサイト上に発現する「異常自己」抗原を TCR を介して認識し、免疫制御、腫瘍監視、創傷治癒において重要な役割を演じている。Eカドヘリンはカルシウム依存性のホモフィリックな接着分子である。Eカドヘリンは分子量 123kDa 前後の糖蛋白質であり、N末端が細胞外に、C末端が細胞内にあり、細胞外ドメインは約 110 のアミノ酸残基からなる 5 つのくり返し構造を持つ。Eカドヘリンの細胞内ドメインは、カテニンなどを介してアクチン細胞骨格に作用する。Eカドヘリンは表皮ケラチノサイト同士の adherence junction における主要な接着分子である。DETC は Eカドヘリンを発現することが報告されており、DETC 上の Eカドヘリンとケラチノサイト上の Eカドヘリンのホモフィリック結合を介して表皮内に留まっている可能性が示唆されているが、DETC は Eカドヘリンの受容体である $\alpha_E\beta_7$ インテグリンも発現する。本論文では、DETC とケラチノサイトの細胞間接着における Eカドヘリン同士のホモフィリックな結合と $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを介したヘテロフィリックな結合の機能的な違いを検討した。その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

1. *In vivo* および *in vitro* で、活性化した DETC において Eカドヘリンの発現低下が認められたが、 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの発現は保たれていた。
2. *In vitro* における DETC のケラチノサイトへの短時間の接着は $\alpha_E\beta_7$ インテグリンと Eカドヘリンのヘテロフィリックな結合に依存し、DETC 上の Eカドヘリンと固相化した Eカドヘリンの安定した結合には長時間を要した。
3. DETC のケラチノサイトに対する細胞傷害は $\alpha_E\beta_7$ インテグリンに依存した。
4. DETC の活性化において、DETC 上の $\alpha_E\beta_7$ インテグリンは共刺激レセプターとして機能し、DETC 上の Eカドヘリンは共抑制レセプターとして機能した。

本研究により、DETC 上に発現する Eカドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリンはケラチノサイトへの接着に関わるのみではなく、DETC 上の Eカドヘリンは抑制性受容体として機能し、共刺激受容体である $\alpha_E\beta_7$ インテグリンとともに DETC の活性化を調節していることが明らかにされた。本研究は、上皮内 T 細胞の過剰な活性化の抑制と免疫機能の発現における細胞接着分子の役割を明らかにした点で非常に興味深い。よって学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 220 号		学位申請者	内田 洋平
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	黒野 祐一	副査	小松澤 均
	副査	松山 隆美	副査	久保田 龍二

主査および副査の5名は、平成24年10月29日、学位申請者 内田 洋平 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) DETCの短時間の接着と安定した接着は、DETCの活性化と関連してどのような違いがあるか。

(回答) 短時間の接着は、炎症を起こした皮膚で活性化した DETC が $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを介して表皮内でケラチノサイトに接着し免疫機能を発揮する動的な接着を意味し、DETC の E カドヘリンを介した安定した接着は、定常状態における静的な接着を意味する。

質問2) 腸管上皮内には $\alpha\beta$ T細胞も存在するが、表皮内に $\gamma\delta$ T細胞だけが存在することは、どのような利点をもたらすか。

(回答) 表皮ではケラチノサイトによる角層の形成により外界からのバリアが形成されているが、単一の T 細胞レセプターを発現する $\gamma\delta$ T細胞が密に分布していることにより、創傷や皮膚腫瘍の監視において迅速に反応できる。

質問3) DETCの単離は耳介皮膚から行い、表皮シート作製は背部皮膚から行った理由はどのようなものか。

(回答) 耳介皮膚は毛が少なく処理が容易で、マウス1匹で 1×10^6 個程度の安定した DETC が単離できるため耳介皮膚から DETC を単離した。耳介に潰瘍を作製すると壊死しやすいため、脱毛した背部の皮膚に潰瘍を作製し表皮シートを作製した。

質問4) ヒトとマウスの皮膚に違いはあるか。

(回答) マウスの表皮はヒトに比べ薄く、毛包が多く存在する。ヒトの皮膚には DETC のホモログは存在しないが、ヒトの皮膚にもリンパ節や末梢血とは異なる $\gamma\delta$ T細胞が存在している。ヒトの皮膚に存在する $\gamma\delta$ T細胞は DETC と似た免疫機能を持つことが知られている。

質問5) 接着因子 (Eカドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリン) の発現はヒトとマウスでは異なるか。

(回答) マウスの表皮では、Eカドヘリンは DETC、ランゲルハンス細胞、ケラチノサイト、メラノサイトに発現している。ヒトでは Eカドヘリンを発現する T細胞は知られていない。 $\alpha_E\beta_7$ インテグリンはヒトとマウスの両方において、intraepithelial lymphocyte (IEL)、CD8 陽性傷害性 T細胞、regulatory T細胞や樹状細胞の一部に発現している。Eカドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリンの両方を発現しているのは DETC だけである。

質問6) DETCはどこで分化するか。腸管の IEL とは異なるのか。

(回答) DETC の前駆細胞は胎生 14-17 日頃の胎児胸腺で分化して表皮に生着するが、腸管の IEL の前駆細胞は腸管のクリプトパッチで分化することが報告されている。

質問7) Fig. 8の実験で、IFN- γ と TNF- α を選択した理由はどのようなものか。

(回答) DETC の活性化のマーカーとして DETC が産生することが明らかにされている IFN- γ と TNF- α を用いた。

質問8) $\gamma\delta$ T細胞はヒトの表皮に存在するのか。

(回答) ヒトの正常表皮内には T細胞は少ないが、表皮内・真皮内とも T細胞の 10%が $\gamma\delta$ T細胞である。

質問9) マウスとヒトで $\gamma\delta$ T細胞の接着システムは異なるか。

(回答) DETC 以外の $\gamma\delta$ T細胞は Eカドヘリン陰性のため DETC 以外の $\gamma\delta$ T細胞では接着システムが異なる。

質問10) マウスのケラチノサイトは $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを発現していないのか。

(回答) 発現していないことを確認した。

最終試験の結果の要旨

質問 11) DETC は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現するか。

(回答) DETC は $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現しない。

質問 12) Fig. 6 で、Eカドヘリン同士のホモフィリック結合が短時間に形成されない理由は何か。

(回答) Eカドヘリン分子同士の親和性は低く、安定したホモフィリック結合の形成には細胞内骨格の再構成が必要であるためと考えられる。

質問 13) 固相化リコンビナント Eカドヘリンを用いた結合実験は過去に行われているか。

(回答) $\alpha_E\beta_7$ インテグリンと Eカドヘリンの結合実験が同様の実験系で行われている。過去の Eカドヘリン同士の結合実験にはケラチノサイトが用いられており、DETC のケラチノサイトに対する短時間の接着に Eカドヘリンが関与しないことが過去にも報告されている。本研究においても、同様の結果が得られたため、長時間の接着における Eカドヘリンの関与について固相化リコンビナント Eカドヘリンを用いて検討した。

質問 14) Eカドヘリン同士の結合と Eカドヘリンと $\alpha_E\beta_7$ インテグリンとの結合では Eカドヘリン上での結合部位は異なる領域か。

(回答) EC1 領域内の異なるエピトープで結合する。

質問 15) Eカドヘリンへの刺激により $\alpha_E\beta_7$ インテグリンのコンフォメーションが変化するか。

(回答) 今回は解析していない。

質問 16) Fig. 1 のマウスから単離した細胞浮遊液は種々の細胞を含んでいるか。

(回答) DETC 以外にケラチノサイトを含めた種々の細胞を含む。

質問 17) Fig. 3 の培養 DETC では Fig. 1 の単離直後の DETC に比べて Eカドヘリンの発現は減っているか。

(回答) 培養 DETC では DETC 上の Eカドヘリンの発現が低下していた。

質問 18) Fig. 7 の固相化実験では、抗 Eカドヘリン抗体で刺激後に DETC の形態に変化があったか。

(回答) 明らかな形態の変化は認められなかった。

質問 19) Fig. 8 ではリコンビナント Eカドヘリン上で 24 時間培養後の DETC の形態に変化があったか。

(回答) 偽足形成などの形態変化があった。

質問 20) 固相化抗体や Con A による刺激は細胞形態の影響を受ける可能性があるが、PMA とカルシウムイオノフォアなどによる刺激については検討したか。

(回答) PMA とカルシウムイオノフォアを用いた刺激実験は行わなかった。

質問 21) Fig. 8 でヘテロフィリックな結合を阻害する抗体でサイトカイン産生の増強を抑制する必要はなかったか。

(回答) 実験を行わなかったが、検討が必要であった。

質問 22) $\alpha_E\beta_7$ インテグリンノックアウトマウスでは皮膚に症状があるのか。

(回答) DETC が減少するが、症状はない。

質問 23) 脱顆粒の検出時に、モネンシンを入れる目的は何か。

(回答) 感度をあげる目的で用いた。

質問 24) Fig. 5 で細胞傷害が抑制された理由は、接着の減弱か、共刺激の減弱か。

(回答) 両方が理由であると考えられる。

質問 25) DETC の発現する T 細胞レセプターの認識する抗原は同定されたか？

(回答) 候補分子として skint1 が報告されているが、コンセンサスは得られていない。低分子量の非ペプチドである可能性が報告されている。

質問 26) Fig. 5 で DETC がケラチノサイトを傷害するのは何故か。

(回答) 本研究で用いた Pam212 ケラチノサイトはマウス扁平上皮癌細胞株であり、DETC は Pam212 上の異常自己抗原認識して細胞傷害性を示す。

質問 27) 低分子量物質の ELISA では反応に時間を要することが経験されるが、ホモフィリックな Eカドヘリン同士の結合に時間を要したのは、Eカドヘリン分子の特性に因るのか。

(回答) Eカドヘリン分子同士の結合親和性は低いため、安定したホモフィリック結合の形成には Eカドヘリン分子同士のクラスター形成や細胞内骨格の再構築などが必要と考えられる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。