

博士論文(要約)

$\gamma\delta$ T 細胞の分化制御における Skint ファミリーの機能解析

成田 知也

免疫系は、生体内で病原体、外来性物質またはがん細胞のような異常細胞を非自己(異物)と認識し排除するシステムである。免疫系において T 細胞は感染防御や炎症、腫瘍免疫など多くの生体反応の中核を担っており、T 細胞の制御機構の破綻あるいは機能不全はこれらの生体反応が適切に起こらなくなるだけでなく自己免疫疾患やアレルギー、免疫不全など様々な免疫系の異常を引き起こす。

T 細胞は T 細胞受容体(T cell receptor : TCR)を発現するリンパ球の一種で、TCR で抗原を認識することで活性化され抗原特異的な免疫応答を引き起こす。T 細胞は発現する TCR によって $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の二つの集団に分けられ、両者は異なる抗原認識、組織分布、機能を示す。

$\gamma\delta$ T 細胞は非古典的 T 細胞のひとつで、自然免疫様 T 細胞とも呼ばれる。 $\gamma\delta$ T 細胞の分化は個体発生に伴って厳密に調節されており、個体の発生段階によって異なる V γ 鎖を発現する $\gamma\delta$ T 細胞が分化する。胸腺においてどのように特定の $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの分化が制御されているのかよくわかっていないが、2008 年に皮膚の恒常性維持を担っている V γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T 細胞の分化を選択的に制御する分子 Skint1 が同定された。Skint1 は胸腺と皮膚に特異的に高発現している B7 様分子であり、胸腺で未熟な V γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に成熟させるのに機能している。

マウスには Skint1 の他に 10 の Skint ファミリー分子が存在する。Skint ファミリーは Butyrophilin ファミリーを構成するサブファミリーの一つであり、Butyrophilin ファミリーには $\gamma\delta$ T 細胞を制御する分子がいくつか報告されている。したがって、Skint1 以外の Skint ファミリー分子も $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御に寄与することが予想されるが、Skint1 以外の Skint ファミリー分子の胸腺における役割は未だ明らかになっていない。

本研究では胸腺における $\gamma\delta$ T 細胞の分化を制御するメカニズムを明らかにするために、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御分子の候補である Skint ファミリーに着目し、ゲノム編集技術によって Skint ファミリー遺伝子を全て欠損するマウスを作製した。このマウスの表現型を詳細に解析することで、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御における Skint ファミリー遺伝子の生理的意義を検討した。

はじめに、マウスの主要な組織における Skint ファミリー遺伝子の発現パターンをリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。全ての Skint ファミリー遺伝子は皮膚に高く発現しており、Skint5、6 以外の Skint ファミリー遺伝子は胸腺にも発現していた。胸腺において Skint1、2、3、4、7 は胸腺髄質上皮細胞に高く発現しており、その発現レベルは皮膚と同等かそれ以上に高かった。一方、胸腺髄質上皮細胞における Skint8、9、10、11 の発現は皮膚と比較して非常に低かった。胸腺皮質上皮細胞では Skint ファミリー遺伝子はほとんど検出されなかった。

Skint1 に加えいくつかの *Skint* ファミリー遺伝子が胸腺髄質上皮細胞に高く発現していることから、*Skint1* 以外の *Skint* ファミリー分子も胸腺における $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御に寄与しているのではないかと考えられた。

Skint ファミリー遺伝子の生理的意義を明らかにするため、CRISPR/Cas9 によって全 *Skint* ファミリー遺伝子欠損マウスの作製を試みた。*Skint* ファミリー遺伝子はマウス 4 番染色体上に 1 つのクラスターを形成している。したがって、*Skint* ファミリーの両端に位置する *Skint8* と *Skint11* の遺伝子上に sgRNA を設計し、ゲノムの切断と非相同末端連結により全ての *Skint* ファミリー遺伝子を含む約 2.2Mb の領域を欠失する *Skint large-deletion* (SKLD) マウスを作製した。また、*Skint1* 欠損による表現型との違いを検証するため、新たに C57BL/6 遺伝背景 *Skint1* 欠損マウスを CRISPR/Cas9 法によって作製した。

全ての *Skint* ファミリー遺伝子は皮膚に高く発現しているため、SKLD マウスの皮膚の構造を組織学的に観察した。野生型マウスと比較して *Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスの皮膚の厚さや構造に明らかな違いは観察されなかった。*Skint1* 変異マウスでは皮膚 $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞が減少することが示されている。したがって、*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスの皮膚の $\gamma\delta$ T 細胞を蛍光免疫染色及びフローサイトメトリー法により解析した。*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスの皮膚では野生型マウスに比べて $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の数と頻度が顕著に減少していた。一方で、*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスの皮膚では $V\gamma1$ 、 $V\gamma4$ 、 $V\gamma7$ $\gamma\delta$ T 細胞の数と頻度が増加していた。以上より、SKLD マウスは *Skint1* 欠損マウスと同様に、皮膚 $\gamma\delta$ T 細胞レパトアが大きく変化していることが明らかになった。

Skint1 変異マウスでは胎仔胸腺における $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の分化が障害されていることが示されている。*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスでは野生型マウスに比べて胎仔胸腺における $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞及び $CD45RB^{hi}V\gamma5^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の頻度が有意に減少していた。以上より、*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスの皮膚における $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の顕著な減少は $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の胎仔胸腺における分化が大きく障害されていることが原因と考えられた。

Skint ファミリー遺伝子の創傷治癒における生理的意義を確かめるため創傷治癒を評価した。マウスの背部皮膚に全層貫通の穴を開け、損傷後 7 日目まで穴の面積を経時的に観察した。その結果、野生型マウス、*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスにおいて創傷が塞がる速さに有意な差は見られなかった。以上より、SKLD マウスでは野生型マウスと同等に創傷治癒が起こることが明らかになった。

Skint5、*6* を除く全ての *Skint* ファミリー遺伝子が胸腺上皮細胞に発現しており、大部分の $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺で

分化することから、私は *Skint1* 以外の *Skint* ファミリー遺伝子が V γ 5V δ 1 以外の $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの分化を制御しているのではないかと考えた。したがって、主要な組織における $\gamma\delta$ T 細胞のレパトアをフローサイトメトリー法により解析した。驚くべきことに、*Skint1* 欠損マウスと同様に SKLD マウスの胸腺、脾臓、リンパ節、肺及び小腸における $\gamma\delta$ T 細胞のレパトアに変化は見られなかった。以上より、*Skint* ファミリー遺伝子は胸腺における V γ 5V δ 1 以外の $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの分化や皮膚以外の末梢組織における $\gamma\delta$ T 細胞のレパトアの形成には必要ないことが明らかになった。

$\gamma\delta$ T 細胞はサイトカインの産生能によって IFN γ 産生型と IL-17 産生型に分類される。したがって、 $\gamma\delta$ T 細胞の IFN γ と IL-17 の産生能に影響がないか確認するために脾臓における IFN γ ⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と IL-17A⁺ $\gamma\delta$ T 細胞をフローサイトメトリー法により解析した。その結果、野生型マウス、*Skint1* 欠損マウス及び SKLD マウスにおける IFN γ ⁺ $\gamma\delta$ T 細胞と IL-17A⁺ $\gamma\delta$ T 細胞の数に有意な差は見られなかった。したがって、*Skint* ファミリー遺伝子は末梢組織の $\gamma\delta$ T 細胞の IFN γ と IL-17A の産生能には関与していないことが明らかになった。

Skint ファミリー遺伝子の欠損が $\gamma\delta$ T 細胞以外の皮膚の免疫細胞に影響を与える可能性を想定し、皮膚の $\gamma\delta$ T 細胞以外の免疫細胞をフローサイトメトリー法により解析した。その結果、野生型マウス及び SKLD マウスにおいて皮膚 $\alpha\beta$ T 細胞、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、ミエロイド細胞及び NK 細胞に変化は見られなかった。以上より、生理的条件下での *Skint* ファミリー遺伝子の欠損は皮膚 $\alpha\beta$ T 細胞、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、ミエロイド細胞及び NK 細胞へ影響を与えないことが明らかになった。

V γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T 細胞以外のリンパ球への影響を調べるため、胸腺及び脾臓における $\gamma\delta$ T 細胞以外の主要な免疫細胞をフローサイトメトリー法により解析した。野生型マウス及び SKLD マウスの胸腺における $\alpha\beta$ T 細胞の分化に変化は見られなかった。また、NKT 細胞や制御性 T 細胞の分化にも変化は見られなかった。さらに脾臓における $\alpha\beta$ T 細胞、B 細胞、樹状細胞、ミエロイド細胞及び NK 細胞の数にも変化は見られなかった。以上より、 $\gamma\delta$ T 細胞以外の主要な免疫細胞の分化や末梢組織での維持には *Skint* ファミリー遺伝子は必要ないことが明らかになった。

本研究を通じて、全 *Skint* ファミリー遺伝子を欠損する SKLD マウス及び C57BL/6 遺伝背景 *Skint1* 欠損マウスを樹立した。これらのマウスの解析から、マウスの $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御において、*Skint* ファミリー遺伝子は V γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T 細胞の分化に必須であることが示された。本研究から得られた *Skint* ファミリー遺伝子の生理的意義及びマウスの $\gamma\delta$ T 細胞の組織特異的レパトア形成に関する知見がマウス $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御メカニズムの

解明に貢献し、ひいてはヒトの $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御メカニズムの解明に繋がることが期待される。