

紫外線で誘導される制御性 T 細胞が 創傷治癒を促進するメカニズムの解明

名古屋市立大学医学研究科免疫学分野

志馬 寛明

Skin wound healing is a highly organized process that maintains tissue integrity and function. We found that ultraviolet-B (UVB) irradiation promotes skin wound healing. However, the mechanism by which UVB regulates the repair process is not fully understood. Regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in maintaining immune homeostasis. Skin exposure to UVB induces the expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells. UVB-expanded Tregs (UVB-skin Tregs) enhance re-epithelialization by producing proenkephalin (PENK) and Areg, promoting wound healing of the skin. In this study, we further investigated the mechanisms by which UVB-skin Tregs interact with other immune cells and inflammatory mediators to regulate wound healing. Full-thickness wounds were made on the back skin of mice irradiated with UVB before 30 minutes or 6 days and compared to wounds of non-irradiated mice. UVB irradiation before 6 days promoted wound healing in mice, whereas UVB irradiation before 30 minutes rather delayed wound healing. Flow cytometric analysis showed that UVB-skin Tregs highly accumulated in the wounds of mice irradiated with UVB before 6 days but not 30 min. UVB-skin Tregs strongly expressed activation markers such as KLRG1, indicating that they were highly activated in the wounds. UVB irradiation also induced an inflammatory response in the wounds that negatively regulates tissue repair. Pro-inflammatory cytokine expression and inflammatory macrophage accumulation in the wounds were enhanced by UVB irradiation and those were partially suppressed by UVB-skin Tregs. These results suggest that UVB irradiation has both positive and negative impacts on the tissue repair function of the skin. Controlling these responses might enhance UVB-promoted skin wound healing.

1. 緒言

皮膚は、擦り傷や切り傷、火傷などの様々な外傷を受ける。傷が素早く修復されるかどうかは、皮膚のバリア機能、すなわち角質層下の水分の保持や損傷部位からの感染に対する防御能を維持する上で非常に重要である¹⁾。傷の修復過程が終了した後でも、その部位が傷痕(瘢痕)として残ると外見に大きく影響する場合があるため、元の組織構造に可能な限り近づけることも重要視される。また、糖尿病患者や寝たきりの高齢者の増加に伴って、創傷治癒過程の遅延に起因する難治性潰瘍を患う人々は増加しており、国内では約130万人もの患者がいるとされている。事故や手術による創傷を早く修復することができれば、入院時間を短縮し、早期に日常生活に復帰することが可能となる。しかし、創傷治癒に対する治療法は限られており、新たな手段の開発が求められている。創傷治癒過程は、炎症期、増殖期、再構築期に分けられ、各過程が重複しながら進行していく¹⁾。炎症期には免疫細胞の集積により感染や異物を除去することで傷が清浄化され、増殖期にはケラチノサイトによる再上皮化、線維芽細胞によるコラーゲンの産生や血管形成誘導により創傷部位が埋められる。さらに再構築期

では、結合組織の再構成により強度が増加する。これら一連の過程は、免疫系による制御を受ける。マクロファージやリンパ球、制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)、自然免疫細胞など多種類の免疫細胞とケラチノサイトや線維芽細胞などの非免疫細胞との相互作用により、創傷治癒過程が制御されていると考えられているが、その機序は十分に解明されていない²⁾。

我々は、紫外線が皮膚の免疫機能に与える影響を解析してきた。皮膚が紫外線に長時間暴露すると、サンバーン(日焼け)やサンタン、光老化(シミ、しわ、たるみ)、皮膚がんの誘発など多くの害をもたらす(図1)。そのため一般的には、紫外線への暴露を避けることが健康を保つために重要であると考えられている。その一方で、適切にコントロールされた紫外線照射は、人体に有益な影響を与える。例えば、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚免疫疾患に対して紫外線照射による治療が有効である。照射波長の範囲を限定したナローバンドUVBは、治療効果が高く、前述の副作用が少ないため急速に普及した。しかし、紫外線が人体に与える影響には未だ不明な点が多い。紫外線がもつ有益な作用を見出し、作用機序を明らかにすることによって、その有益な作用を選択的に利用できることが期待される。最近我々は、紫外線を照射したマウスの皮膚で創傷治癒能(組織修復)が亢進することを見出した³⁾(図1)。

Tregは、免疫機能の過剰な応答を抑制することで自己免疫反応の抑制や炎症反応の調節を担う免疫細胞である。健常人では、末梢のCD4陽性T細胞のうち5~10%をTregが占めるが、炎症やがんなどではその割合が増加する。組織に分布したTregは、免疫抑制に関わる基本的



Elucidation of the mechanism by which UV-expanded regulatory T cells promote skin wound healing

Hiroaki Shima

Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

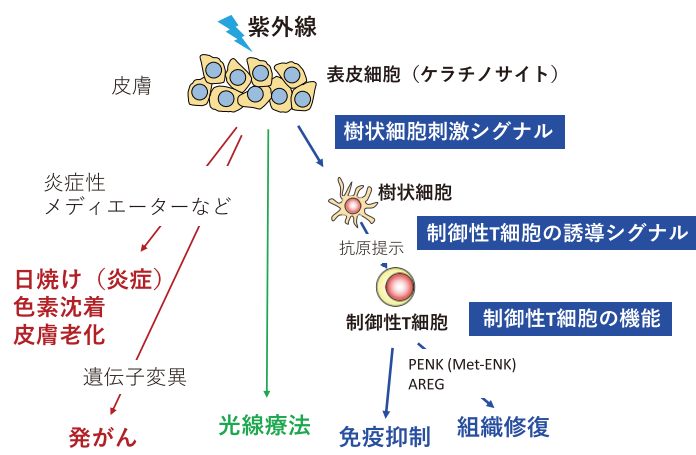


図1 紫外線の有害な作用と有益な作用
紫外線で Treg が増加する。Treg の働きによる有益な作用を明らかにし、選択的に利用し、健康増進に役立てることを目指す。

な機能は維持しながらも組織ごとに特徴的な性質を示すことから、リンパ組織の Treg と区別して組織 Treg と呼ばれ、それぞれの組織の恒常性の維持における役割が注目されている⁴⁾。皮膚に常在する Treg は、微生物感染に対する免疫応答の制御や皮膚炎症性疾患の抑制のみならず、創傷治癒や毛包幹細胞の維持など多様な役割を果たすが、皮膚での細胞数や機能およびその調節に関するメカニズムは不明である⁵⁾。

紫外線 B 波 (ultraviolet-B, UVB) の照射を受けると、皮膚や全身の免疫機能が抑制されることは以前から知られてきた⁶⁾。紫外線照射を受けた皮膚では、7 日目をピークに Foxp3 陽性 Treg が通常の 3～5 倍にまで増加することから、免疫抑制が起こる原因となると考えられている⁷⁾。紫外線による Treg 増加の機序の全容は明らかになっていないが、皮膚の樹状細胞が必須であり、特に CD11b 陽性樹状細胞が中心的な役割を持つと考えられている⁸⁾。紫外線により増加した皮膚の Treg (UVB-skin Treg) は特徴的な遺伝子発現パターンを示すことから、皮膚の恒常性維持に寄与する生理的役割を持つことが予想されたものの、免疫抑制以外の機能は不明であった。我々は、紫外線による皮膚の創傷治癒の促進に UVB-skin Treg が必須であることを明らかにした³⁾。UVB-skin Treg は、皮膚のバリア機能の維持に重要な再上皮化を促進する。プロエンケファリン (proenkephalin, PENK) や Areg の産生により、ケラチノサイトの伸展を促進することによって創傷部位の再上皮化を促進することがわかった。他にも UVB-skin Treg は、血管新生因子や組織再構築に関わるプロテアーゼの産生により創傷治癒を促進することが示唆されているものの、再上皮化以外の過程に与える影響は不明である。本研究では、UVB-skin Treg による創傷治癒促進効果のメカニズムの

さらなる解明を目的とした。

2. 方法

2.1. 創傷治癒モデルおよび皮膚免疫細胞解析

C57BL/6J マウスまたはジフテリア毒素 (DT) の投与で Foxp3 陽性 Treg を除去できる Foxp3-DTR-GFP マウスに紫外線 B 波を 500 mJ/cm² 照射した。6 日経過後に、組織損傷が真皮層を越して皮下組織まで及ぶ全層創傷 (full-thickness wound、直径 6 mm) を背中皮膚に作成し、経時的に創傷を写真撮影した。Image J ソフトウェアを用い、シングルブラインド方式で創傷部位の面積を計測した。また、創傷部位を採取し、細かく切断したのち、リベラーゼまたはコラゲナーゼを 37℃、60 分間作用させて単一細胞懸濁液を調製した。Treg、マクロファージなどの表面マーカーを蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで細胞集団の割合を解析した。

2.2. skin explant assay

紫外線照射および未照射マウスの耳の皮膚を直径 3 mm の円形に切り出し、24 穴プレートに付着させた後、培養した。一日後に培養液を追加してさらに一日培養後、皮膚片から進展したケラチノサイトを顕微鏡下で撮影し、皮膚切片の端からケラチノサイトが移動した距離および面積を計測した。

2.3. 皮膚の遺伝子発現解析

マウスの皮膚から全層創傷部位または近傍の正常な皮膚を回収し、RNA を抽出した。定量的 PCR 法により各遺伝子の発現レベルを測定した。

3. 結 果

紫外線照射のタイミングと創傷治癒の促進効果の関係について明らかにするために、紫外線照射直後または、紫外線照射6日経過後のマウスの皮膚に全層創傷を作製した。同様に紫外線未照射のマウスにおいても創傷を作製した。前もって紫外線照射をしておいたマウスは、未照射の皮膚よりも傷の面積が早期に縮小(治癒)したのに対して、紫外線照射直後の皮膚に作製した場合は、未照射マウスよりも治癒が遅延し、むしろ悪影響を及ぼすことがわかった(図2)。傷を受けて早期に開始される炎症期の増大は創傷治癒の遅延をもたらす。紫外線照射は一過性の炎症反応を誘導するため紫外線照射して6時間から24時間経過後、皮膚の炎症性サイトカイン遺伝子の発現を調べたが、ほとんど変化していなかった。すなわち、紫外線照射直後に創傷治癒が遅延する原因は炎症の増大によるものではないと考えられた。

創傷部位を単離してフローサイトメトリー解析を行い、免疫細胞の集積を調べたところ、前もって紫外線照射した皮膚に作製した傷は、照射直後に作製した傷に比べてUVB-skin Tregが多く集積していた。また、それらはKLRG1などの活性化マーカーを強く発現していたことから、強い活性化状態にあることがわかった(図3)。さらに、他の免疫細胞についても同様に解析を行った。マクロファージの集積やその性質を反映するM1/M2マーカーの発現に大きな違いはなかった。マクロファージ欠損マウスで見られる創傷治癒の遅延は、紫外線照射により改善した。また、ケラチノサイトの皮膚切片からの伸展も誘導された。さらなる詳細な解析が必要であるが、紫外線で増加した皮膚のTregは、マクロファージと相加的に働き、創傷治癒を制御することが示唆された。また、CD8陽性T細胞のICOS発現が低下し、ジフテリア毒素の投与でTregを除

去したFoxp3-DTR-GFPマウスに紫外線照射した場合は、ICOS発現が上昇した。すなわち、紫外線によって増加したUVB-skin TregによりCD8陽性T細胞の活性が抑制されることが示唆された。

紫外線照射した皮膚では、日数を経るに従ってUVB-skin Tregの増加が徐々に起こり、7日でピークを迎える。それとともにTNF- α , IL-6, IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現誘導も起こる。創傷部位でも検討したところ、これらの反応は正常皮膚と同様に起こることがわかった。また、炎症性ミエロイド系免疫細胞について解析したところ、Ly6C陽性炎症性マクロファージが増加していた(図3)。さらに、創傷部位には好中球の浸潤も見られた。ジフテリア毒素を投与してTregを除去したFoxp3-DTR-GFPマウスでは、傷を受ける6日前に紫外線を照射しておいても創傷治癒は遅延し、これらの炎症応答がさらに増大した。よって、UVB-skin Tregはケラチノサイトによる再上皮化を促進する一方で、紫外線照射によって誘導されるこれらの炎症反応を抑制しているものの、その抑制は十分でないことが示唆された。

4. 考 察

紫外線の照射が皮膚や全身性の免疫抑制を誘導することは広く知られてきたが、創傷治癒を促進することはこれまで知られていなかった。創傷治癒と免疫系の関連については、特にマクロファージによる制御に関して多くの報告があるものの、Tregの役割には不明な点が多い。本研究により、紫外線は皮膚で増加するTregを介した再上皮化の促進により創傷治癒を早めると同時に、一過性に誘導される炎症反応が創傷治癒を遅延させる一面もあることが示唆された。

紫外線照射のタイミングと創傷治癒との関係については、紫外線照射直後の皮膚に傷を作成した場合に治癒の促進効

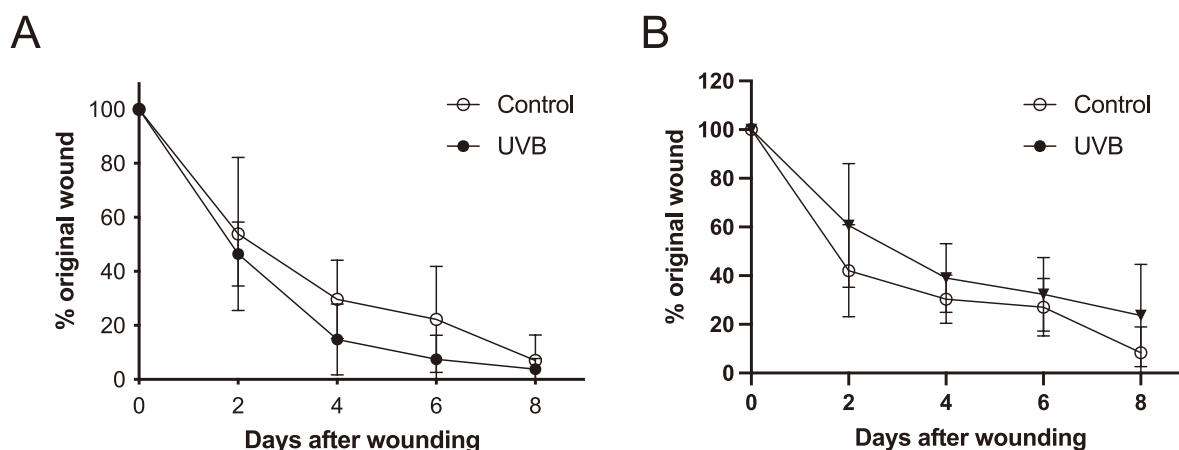


図2 紫外線照射のタイミングと創傷治癒促進作用
(A) 紫外線照射6日後に傷を作成 (B) 紫外線照射直後に傷を作成

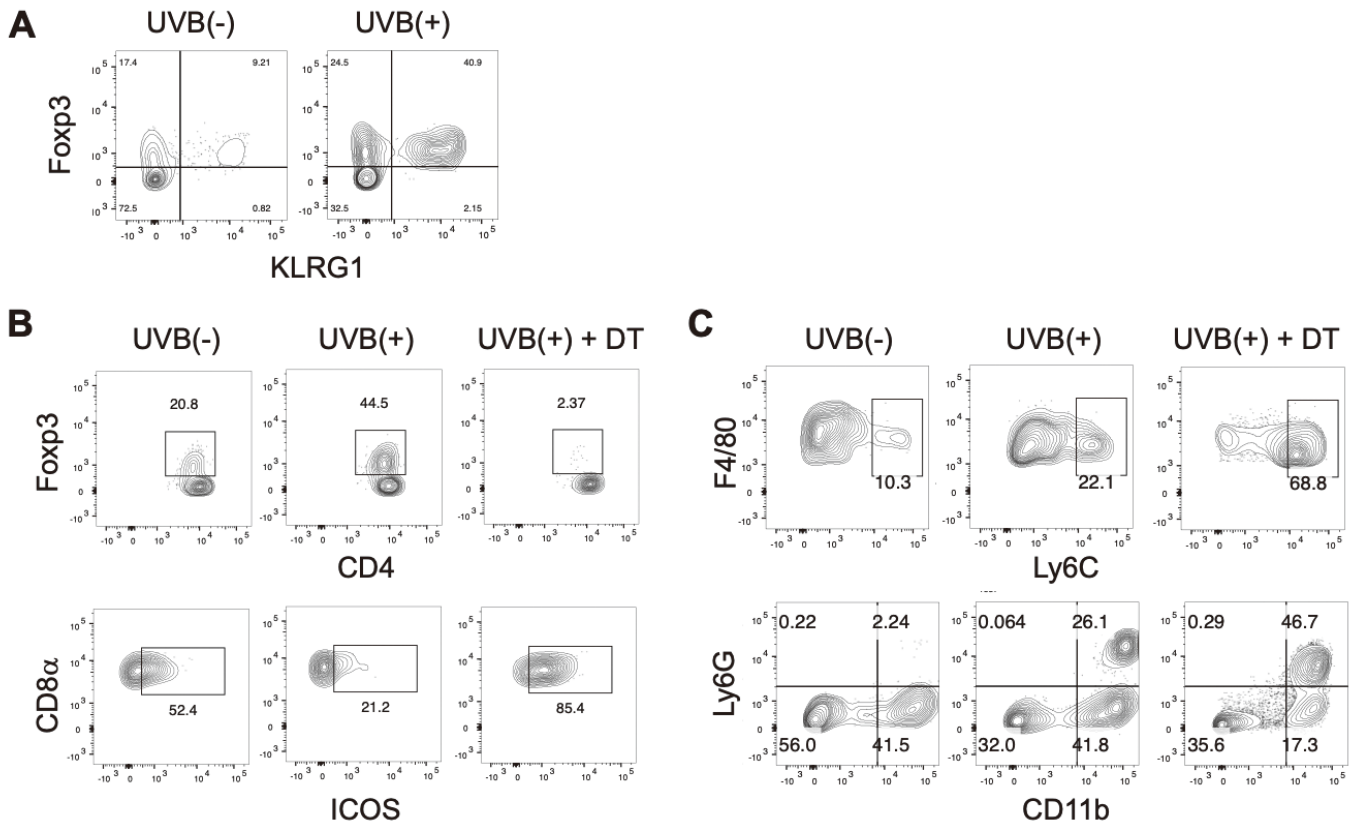


図3 創傷部位の免疫細胞

(A) Foxp3 陽性 Treg、(B) Foxp3 陽性 Treg (上段) および CD8 陽性 T 細胞 (下段)、
(C) Ly6 陽性マクロファージ (上段) および好中球 (下段)

果が見られなかったことから、創傷治癒の促進効果を期待する場合、紫外線照射のタイミングは極めて重要であることが示唆された。炎症性サイトカインの産生は、炎症期を持続させ、治癒過程を遅延させる。紫外線照射により誘導される炎症性サイトカイン遺伝子の発現は数日経過した後起こることから、創傷治癒過程の炎症期に重なって、紫外線によって急性炎症反応が高まることが原因ではなく、傷を受ける際に Treg の集積が十分に起きていないためであると考えられた。一方、紫外線照射して6日経過後に傷を作製するモデルでは、紫外線照射により炎症性サイトカインの産生が起こると同時に Ly6C 陽性マクロファージや好中球が創傷部位で増加することから、傷の作成時に皮膚の炎症反応がすでに起こっていることになる。Treg の除去によりサイトカイン産生がさらに増強したことは、紫外線照射により増加した活性化 UVB-skin Treg は並行して誘導される炎症反応に対して抑制的に働いているものの、作用が十分ではないことを示唆する。また、CD8 陽性 T 細胞の活性化は Treg を介して抑制されていた。創傷治癒における CD8 陽性 T 細胞の役割はよくわかっていないが、IFN- γ の産生によって炎症を持続させることにより負に働くことが予想される。紫外線によるこれらの影響を取り除

くことで、UVB-skin Treg を介した治癒効果を高めることが期待できる。

日常生活を送る中で皮膚が創傷を受ける機会が多い。創傷部位を素早く修復するだけでなく、瘢痕を残さずに治癒させることに対する世間一般の関心は非常に高い。皮膚の創傷治癒は、単に皮膚機能を正常化させることだけでなく、美容面や精神状態の健全性にまで影響する点で重要である。もともとヒトは他の生物と比較して傷が治りにくいといわれるなか、創傷治癒過程を遅延なく進行させることを目指して、創傷の種類に応じた様々な治療が行われている。しかし、外用薬や湿潤療法などの効果には限界があるため、皮膚の修復メカニズムの理解に基づいて、分子レベルでの制御により、早くきれいに治す治療方法の開発が求められている。本研究は、免疫機能の制御により、治癒能力を増強する方法を見出すことを目指している。紫外線で誘導される UVB-skin Treg を介した創傷治癒の促進機序を明らかにすることにより、皮膚のバリア機能を早期に回復させることに加え、外見に影響する瘢痕の形成を抑えた治療法の開発につながる知見を得られる可能性がある。

(引用文献)

- 1) Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321 (2008)
- 2) Brancato, S. K. & Albina, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am. J. Pathol.* **178**, 19-25 (2011)
- 3) Shime, H. *et al.* Proenkephalin⁺ regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 20696-20705 (2020)
- 4) Muñoz-Rojas, A. R. & Mathis, D. Tissue regulatory T cells: regulatory chameleons. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 597-611 (2021)
- 5) Boothby, I. C., Cohen, J. N. & Rosenblum, M. D. Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci Immunol* **5**, (2020)
- 6) Bernard, J. J., Gallo, R. L. & Krutmann, J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **76**, 6591-6514 (2019)
- 7) Yamazaki, S. *et al.* Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin- Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the Skin. *J. Immunol.* **200**, 119-129 (2018)
- 8) Yamazaki, S. *et al.* Homeostasis of thymus-derived Foxp3⁺ regulatory T cells is controlled by ultraviolet B exposure in the skin. *The Journal of Immunology* **193**, 5488-5497 (2014)