

マウス表皮 T 細胞の発生における胎生期および  
新生仔期 T 細胞受容体シグナルの役割

須藤恒一

## 目次

要旨	.....	2
略語表	.....	3
序論	.....	4
材料と方法	.....	10
結果	.....	16
考察	.....	39
謝辞	.....	42
参考文献	.....	43

## 要旨

V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 T 細胞受容体 (TCR) を発現する  $\gamma\delta$ T 細胞 (V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞) は胎生期の胸腺でのみ発生し、表皮へ移動した後は樹状突起を持った dendritic epidermal T cell (DETC) として増殖を繰り返し、感染防御や発がん抑制など皮膚恒常性の維持に働いている。これまで、TCR 関連分子の遺伝子欠損マウスを用いた研究から、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生には TCR シグナルが重要である事が示唆されてきた。例えば、TCR シグナル伝達分子である ZAP70 および Syk を個々に欠損したマウスでは、DETC の細胞数が減少するが、これらのマウスの胎生期胸腺では V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数は変化しなかった。一方で、ZAP70 と Syk の二重欠損マウスでは胸腺においては V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞が減少した。これらの結果より、TCR シグナルが V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞/DETC の発生・分化に関与することは確かである。しかし、TCR シグナルの強度が、どのように V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞/DETC の発生・分化に影響するかは十分に明らかになっていない。この点を詳細に検証するためには、従来のような遺伝子欠失マウスの使用には限界があると考えた。そこで、本研究では、ZAP70 に点突然変異を持ち TCR シグナルが部分的に減弱した SKG マウスを用いて、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生における TCR シグナルの役割を検証した。

成体 SKG マウスの表皮では DETC の細胞数が WT マウスの約 10% にまで低下しており、樹状突起の減少を示した。一方で、胎生期胸腺では V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数は WT マウスの約 50% 程度までにしか低下していなかった。また、SKG 変異により V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞は増殖細胞の割合と IL-15 経路への応答性が低下していた。一方で、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の胎生期胸腺内の局在性と Syk の発現量、およびサイトカイン産生能力は WT マウスと SKG マウスで差は見られなかった。

次に生後早期の表皮を調べた結果、SKG マウスにおいて DETC の細胞数は WT マウスの約 50% 程度であった。しかし、経時的な細胞数および形態の変化を検証したところ、WT マウスでは DETC の細胞数の増加と樹状突起の形成を観察したのに対して、SKG マウスではそのどちらも観察できなかった。さらに WT マウスと SKG マウスの F1 マウスの胎生期胸腺では V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数は WT マウスと同程度だったのに対して、成体表皮では DETC の細胞数は SKG マウスと同等に減少していた。さらに、無菌マウス (Germ-free マウス) と SPF マウス間で DETC の細胞数および形態に差は見られなかったことから、表皮における DETC の分化・増殖は皮膚細菌叢非依存的に行われると考えられた。

以上の結果から、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR シグナルはそれぞれ胸腺と表皮における V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞と DETC の発生・分化段階において共に重要であるが、その必要な強度はそれぞれの段階で異なることが示唆された。

## 略語表

Car: coxsackie and adenovirus receptor

DC: dendritic cell

DETC: dendritic epidermal T cell

DN: double-negative

DP: double-positive

E: embryonic day

GF: germ-free

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LC: Langerhans cell

LDA: linear discriminant analysis

MHC: major histocompatibility complex

R: receptor

Skint1: selection and upkeep of intraepithelial T cells 1

TCR: T cell receptor

ZAP70:  $\zeta$ -chain-associated protein 70

## 序論

免疫反応に重要な T 細胞は、細胞表面に発現する T 細胞受容体 (TCR) により  $\alpha\beta$ T 細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞に大別される。 $\alpha\beta$ T 細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞の orthologue は無顎類のヤツメウナギにもその存在が報告されており、少なくとも 5 億年以上前に 2 つのサブセットへ分かれたと考えられる<sup>1</sup>。 $\alpha\beta$ T 細胞が持つ TCR $\alpha$ 鎖と TCR $\beta$ 鎖の組み合わせによるレパトアは理論上  $1 \times 10^{18}$  通りあるため<sup>2</sup>、TCR によるサブセットの分類は難しく、細胞の機能によりヘルパー T 細胞や細胞傷害性 T 細胞、制御性 T 細胞等に分類されている。それに対して、 $\gamma\delta$ T 細胞では TCR レパトアが少なく、TCR $\gamma$ 鎖はマウスでは 7 種類のみのため<sup>3,4</sup>、使われる TCR $\gamma$ 鎖の種類によりサブセットに分類されており、また、これらサブセット毎に個体で発生する時期、局在組織および機能が異なる (**Fig. 1**)。 $\alpha\beta$ T 細胞は主にリンパ組織に局在しており、 $\gamma\delta$ T 細胞は皮膚や腸管、肺などの上皮組織に局在している<sup>5</sup>。 $\alpha\beta$ T 細胞は、活性化には樹状細胞 (DC) が発現する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I/II や関連分子が、末梢組織におけるエフェクター細胞への分化には更に周囲の細胞が発現する表面分子や産生するサイトカイン等が重要である<sup>6</sup>。この抗原特異的な $\alpha\beta$ T 細胞の活性化・分化と獲得免疫の成立には数日間を要する。一方で、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化には MHC class I/II は必要なく、TCR やパターン認識受容体等を介して病原体の構成分子などを直接認識できる<sup>5</sup>。また、胸腺における発生の段階で既にサイトカイン産生能力等を獲得しているため、病原体と遭遇後にエフェクター細胞へ分化する必要が無い<sup>5</sup>。そのため病原体の体内への侵入や組織損傷などの際には、数時間以内に反応することができ、T 細胞でありながら主に初期自然免疫系細胞の役割を果たしている。

個体では $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T 細胞共に胸腺で発生し、その後末梢組織へ移動する (**Fig. 2**)。胸腺では、まず胎生期肝臓あるいは成体骨髄から T 細胞前駆体となる CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) 細胞が移動してきて double negative (DN) 1→DN2→DN3 の順に発生が進行する。DN3 で TCR 鎖の遺伝子再編成が起き、 $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞に分かれる<sup>6</sup>。次に $\alpha\beta$ T 細胞では周囲の細胞が発現する自己 MHC とペプチドの複合体を TCR が認識できるか検査される。認識できる場合、その細胞は生存する事ができる (正の選択)。次の段階では、自己 MHC-自己ペプチド複合体に対する TCR の親和性が調べられ、親和性が一定範囲を超えると、その細胞は細胞死により排除される (負の選択)。この 2 つの過程を介して、抗原に対して反応できない細胞や自己に対して反応する細胞が末梢組織へ移動しないよう制御されている。一方で、 $\gamma\delta$ T 細胞は MHC 非依存的に発生し、 $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる選択を受ける。また、前述のように末梢で最終分化を起こす $\alpha\beta$ T 細胞とは異なり、 $\gamma\delta$ T 細胞は DN 細胞から分化後、胸腺内で成熟しサイトカイン産生能力等を獲得し、最終的に末梢組織へ移動する。 $\gamma\delta$ T 細胞の成熟には TCR

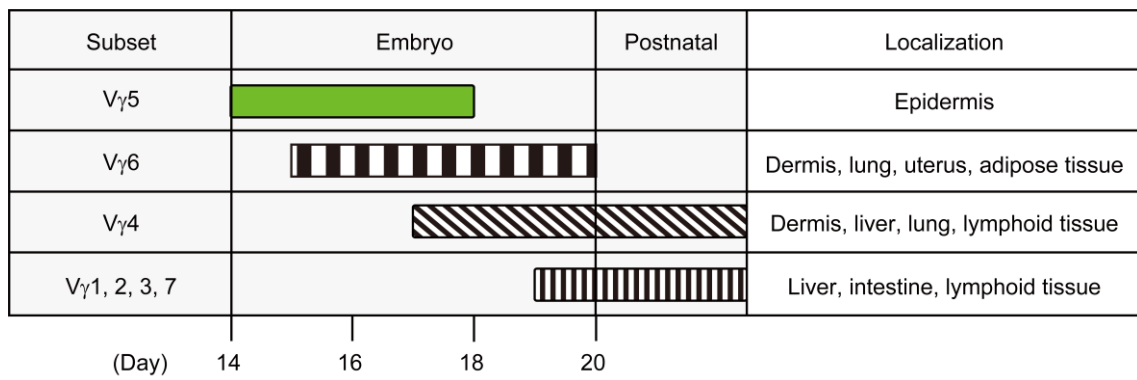


Figure 1 各 $\gamma\delta$ T細胞サブセットの発生時期と末梢での主な局在組織

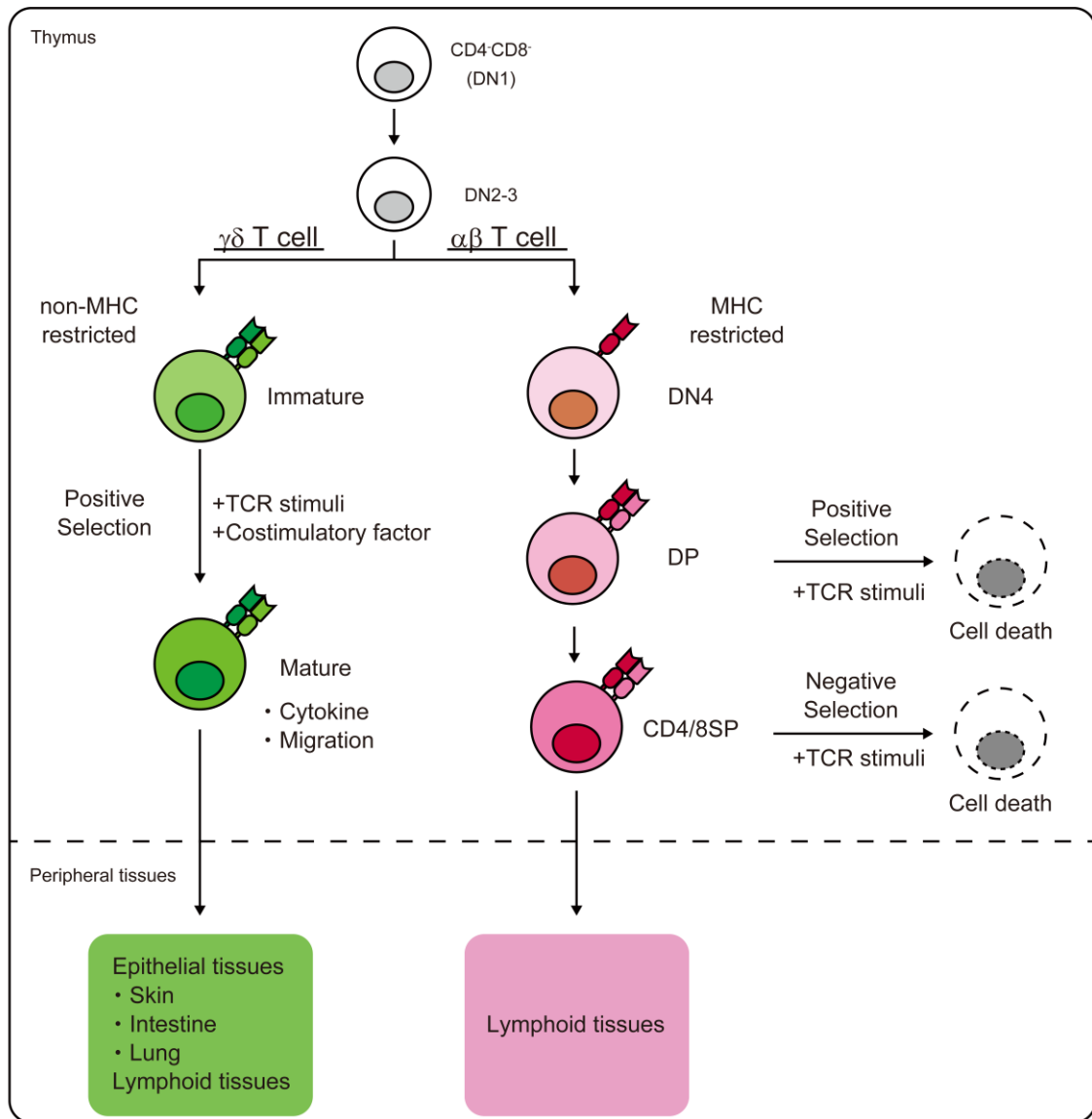


Figure 2  $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の胸腺における発生過程と末梢での主な局在組織

経路や共刺激分子が関与しており、このステップが $\gamma\delta$ T細胞における正の選択だと考えられている<sup>7-11</sup>。しかし、これまで $\gamma\delta$ TCRに対する複数のリガンドが見つかったものの、リガンドやその作用機序はサブセットやクローン毎に異なっており、まだ見つからないリガンドも多いため、負の選択の存在も含め $\gamma\delta$ T細胞の発生機序には未解明な部分が多い<sup>12</sup>。

マウス表皮に存在するT細胞は $V\gamma 5V\delta 1$ TCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞サブセット ( $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞)のみで構成されている<sup>13,14</sup>。また、 $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞は他の組織には存在せず、かつ表皮においては樹状形態を示すことから dendritic epidermal T cell (DETC)と呼ばれている。DETCはJAMLやCD100およびNKG2Dを介して損傷した角化細胞上のリガンドを認識することで創傷治癒を促進したり<sup>15-18</sup>、免疫監視とIgEの産生促進を介して皮膚がんの抑制を行ったりすることにより<sup>19,20</sup>、皮膚恒常性の維持に関与する。

$V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞は個体で最初に発生するT細胞であり、胎生期14-18日の胸腺においてのみ分化する<sup>21-23</sup>。また、 $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞は成体骨髄由来幹細胞からは分化しないが、胎生期肝臓由来幹細胞からは分化が認められる<sup>23</sup>。他の $\gamma\delta$ T細胞同様、胸腺分化中に成熟し、未成熟状態では細胞表面マーカーは $CD5^{hi}CD24^+CD45RB^-CD122^-$ であり、成熟状態では $CD5^{mid}CD24^-CD45RB^+CD122^+$ を示す<sup>24,25</sup>。成熟には免疫グロブリンスーパーファミリーに属する共刺激分子である selection and upkeep of intraepithelial T cells 1 (Skint1)からの刺激が必要だと考えられており、Skint1欠損時には成熟 $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞の減少に加え胸腺から表皮へ移動するためのS1P1やCCR10が発現しないため、表皮DETCが著しく減少する<sup>26,27</sup>。また、Skint1はサイトカイン産生能力にも関与しており、Skint1欠損マウスではIFN- $\gamma$ を産生する $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞が減少し、IL-17を産生する $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞が増加する<sup>28</sup>。しかしながら、Skint1に対する $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞側のリガンドあるいは受容体、さらに細胞とSkint1が直接結合するかは分かっていない。

胸腺から表皮へ移動した $V\gamma 5V\delta 1^+$ T細胞は、生後1-2週間を経たのちに自己増殖により一定の細胞数に達する<sup>29,30,31</sup>。この増殖にはCD122とIL-15が必要である<sup>32,33</sup>。CD122はIL-2/15受容体(R)の $\beta$ サブユニットであり、IL-2RではIL-2R $\alpha$ とIL-2R $\gamma$ と共に、IL-15RではIL-2R $\gamma$ とIL-15R $\alpha$ と共に三量体を形成する<sup>34</sup>。CD122はTCRを介したT細胞の活性化により発現が誘導される<sup>35</sup>。IL-2R $\gamma$ はIL-2、4、7、9、15、21の受容体に共通する重要なサブユニットであり、正常なIL-2R $\gamma$ を欠失した場合ほとんどのT細胞が消失する<sup>36</sup>。通常、サイトカイン受容体は同一細胞上で複合体を形成し作用するが、IL-15のシグナル伝達においては、シグナルを受容する細胞側にCD122とIL-2R $\gamma$ が発現していれば、他の細胞が発現したIL-15R $\alpha$ によりIL-15の提示(trans-presentation)を受け活性化することができる<sup>37</sup>。その後、リン酸化酵素のJAK1/3のリン酸化・活性化、続いてJAKによるSTAT3/5のリン酸化が進



む<sup>34</sup>。次に STAT は核内へ移行し目的遺伝子と結合することにより細胞増殖が促進される。さらに、生後すぐの表皮では V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の形態は丸型であるが、成長に沿って樹状形態を示すようになる<sup>31</sup>。この樹状突起の形成にはインテグリンの CD103 が必要であるとされている<sup>38</sup>。以上の様に、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞は胸腺と表皮の二つの場所でそれぞれ異なる過程を経て分化・増殖すると考えられる。

これまでに DETC の分化・増殖において V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR の組み合わせの必要性が検討されてきた。例えば、V $\gamma$ 5TCR<sup>-/-</sup>マウスと V $\delta$ 1TCR<sup>-/-</sup>マウスの表皮ではそれぞれ V $\gamma$ 5TCR $\cdot$ DETC、V $\delta$ 1TCR $\cdot$ DETC が現れるため、DETC の分化・増殖には V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR の組み合わせは重要でないとも考えることもできる<sup>39,40</sup>。しかしながら、胎生期胸腺における TCR 組換え時に V $\gamma$ 鎖と V $\delta$ 鎖の組換えがそれぞれ V $\gamma$ 5 と V $\delta$ 1 に限定されて起きているとは考えにくく、おそらく複数の組み合わせの中から何らかの選択により V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR を持つ T 細胞が選択されていると考えるのが妥当である。よって、上記の遺伝子を欠損したマウスで得られた結果は、現れた DETC の機能も含め慎重に検討する必要がある。一方で、可溶性 V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR テトラマーを用いた実験では、テトラマーが皮膚の損傷時に角化細胞が発現するリガンドに結合すること、並びに他の可溶性 $\gamma\delta$ TCR テトラマーでは起こらないが V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR テトラマーの投与時には創傷治癒が遅れることから、DETC による創傷治癒並びに組織恒常性の維持には V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR の組み合わせが必要だと考えられる<sup>41</sup>。しかしながら、当該リガンドおよび胎生期胸腺においても予想されるリガンドは依然として同定されていない<sup>41</sup>。

一般的に、T 細胞が TCR を介して抗原ペプチド-MHC 複合体を認識すると TCR 細胞質内領域に存在する immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 内の 2 つのチロシン残基がリン酸化される<sup>42</sup>。続いてチロシンリン酸化酵素である $\zeta$ -chain-associated protein 70 (ZAP70) が 2 つの SH2 ドメインを介してこの 2 つのリン酸化チロシン残基に結合すると、ZAP70 はリン酸化され活性化する。活性化した ZAP70 により他の TCR シグナル関連分子がリン酸化され活性化する。その結果、TCR シグナルが核内に伝達される。別のチロシンリン酸化酵素である Syk も ZAP70 と似た働きを持っている。ZAP70 が主に T 細胞や NK 細胞に発現しており B 細胞に発現していないのに対して、Syk は T 細胞や B 細胞を含む様々な細胞に発現している<sup>43,44</sup>。

DETC の分化・増殖における TCR シグナルの関与は ZAP70 および Syk の遺伝子欠損マウスにて検討されてきた。その結果、それぞれの欠損マウスの表皮では DETC の減少が確認された<sup>45-47</sup>。一方で、予想外にマウス胎生期胸腺ではいずれのマウスにおいても V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞は変化がなかった<sup>48</sup>。しかし、ZAP70 と Syk の両方を欠失したマウス胸腺では V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞は著しく減少した<sup>48</sup>。従って、TCR シグナルは V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生に関与していると考え

られる。しかしながら、TCR シグナルの強度が、どのように  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞/DETC の発生に関与しているかは依然として不明である。さらに、一部の ZAP70 欠失患者では Syk の発現が上昇し、TCR シグナルを補完することが報告されている<sup>49-51</sup>。また、一部の全身性エリテマトーデス患者では CD3 $\zeta$ と ZAP70 経路に代わり Fc $\epsilon$ RI と Syk 経路が存在する<sup>52,53</sup>。ゆえに ZAP70 欠損マウスでは Syk による補完が起きている可能性もある。

以上のことから、 $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞/DETC の分化・増殖における TCR の役割を調べるためには遺伝子欠失マウス以外の方法を採用すべきだと考えた。そこで筆者は ZAP70 内に変異を持ち減弱した TCR シグナルを示す SKG マウスを用いることにした。SKG マウスは突然変異マウスであり、ZAP70 内の 489 番目のヌクレオチドが G から T に置換され、それにより 163 番目のトリプトファンがシステインに置き換わっている (W163C)<sup>54</sup>。この部分は、2 つある SH2 ドメインの内、C 末端側の SH2 ドメインの最初のアミノ酸に当たる。W163C により ZAP70 の立体構造が変化し、TCR 複合体のリン酸化チロシンに対する結合能力が低下する。その結果、TCR 複合体が抗原を認識しても十分な ZAP70 のリン酸化・活性化が起きず下流分子のリン酸化も行えないため、TCR シグナルは停止していないものの減弱している<sup>55</sup>。抗原認識による T 細胞増殖能を検証した結果、SKG 変異を持つ T 細胞が WT の細胞と同程度に増殖するためには WT よりも 10 倍多い抗原量が必要であることから、SKG 変異を持つ T 細胞の TCR 応答性は WT の 10%程度だとされている<sup>54</sup>。また、SKG マウスの T 細胞では Syk の発現は変化しないことが報告されているため<sup>54</sup>、Syk の発現量増加による TCR シグナルへの影響は起きていないことが考えられた。以上を踏まえて、 $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の発生における TCR のより詳細な役割の調査に加えて、胸腺での正の選択のように TCR の閾値が関与している事柄を調べる際には SKG マウスが適していると考え、本研究を開始した。

## 材料と方法

### マウス

BALB/c マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) および日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。SKG マウスは坂口志文博士 (Osaka University, Osaka, Japan) から入手した。マウス飼育環境は3ヶ月毎に SPF 検査を行い、SPF 環境を維持した。記載がない限り、基本的に8-12週齢のマウスを用いた。妊娠マウスを用いた実験では、プラグ確認日をE0とした。全ての実験は京都大学の動物実験ガイドライン (#Lif-K-2008) に従って行った。

### 試薬および抗体

抗 V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR 抗体産生ハイブリドーマ (clone: 17D1) は Dr. Robert. E. Tigelaar (Yale University, CN, USA) より入手した。抗体および細胞染色試薬は BD Pharmingen (NJ, USA)、BioLegend (CA, USA)、BMA Biomedicals (Augst, Switzerland)、eBioscience (CA, USA)、Jackson ImmunoResearch (PA, USA)、Thermo Fisher Scientific (MA, USA)、Vector Laboratories (CA, USA) より購入した。各抗体および試薬は Table 1 の通りである。

抗 CD16/32 (clone: 2.4G2) 抗体産生ハイブリドーマは American Type Culture Collection (VA, USA) より購入し、その培養上清を Fc 受容体のブロッキングに用いた。

### 細胞調製

マウス耳はピンセットを用いて背側と腹側に分け、 $1.0 \times 10^5$  BAEE unit/ml Trypsin (Sigma-Aldrich, MO, USA) 含 Hank's 溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含) (Thermo Fisher Scientific) に真皮側が下になるように浮かせて  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 60 min インキュベートした。表皮と真皮を分けた後、表皮を細かく切断し 5,000 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich) 含 RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific) 中で  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 60 min インキュベートした。組織懸濁液をステンレスメッシュに通して回収後、遠心した。細胞ペレットを 10 mM EDTA (Dojindo, Kumamoto, Japan) 含 RPMI1640 に懸濁した。

マウス胸腺は摘出後、ステンレスメッシュ上でシリンジ内筒を用いて破碎した。

マウス胎生期胸腺は摘出後、0.125% Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) 含 PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含) 中で  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 30 min インキュベートした。22G 針およびピンセットを用いて被膜を割き細胞をピペッティングにより回収した。

得られた細胞は 35  $\mu\text{m}$  孔サイズのナイロンメッシュに通し単一細胞とした後、遠心により回収した。必要に応じて ACK buffer (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.01 mM EDTA) により溶血処理を行った。0.4%トリパンブルーにより細胞染色を行い、Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific) により細胞数を計測した。

### Flow cytometry および cell sorting

溶液は FACS buffer (1% FBS, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 5 mM EDTA 含 PBS) を用いた。2.4G2 ハイブリドーマ培養上清を用いて細胞上の Fc 受容体のブロッキングを行った (15 min, on ice)。各抗体により細胞表面の染色を行った (30 min, on ice)。17D1 ハイブリドーマ培養上清は 5-10 倍に希釈して使用し、抗 rat IgM 抗体を 2 次抗体として用いた。Annexin V 染色は細胞染色の後に Annexin V binding buffer (140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES) を用いて行った (15 min, room temperature (RT))。細胞内染色は BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, NJ, USA) を用いた細胞の固定透過処理の後に行った (30 min, on ice or RT)。pSTAT5 染色では、BD Phosflow Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences) を用いて細胞の固定を行い (10 min, 37°C)、続いて BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) を用いて透過処理を行った (30 min, on ice)。その後細胞を抗 pSTAT5 抗体により染色した (30 min, RT)。データは FACSCalibur (BD Biosciences) または FACSaria III (BD Biosciences) により収集し、解析は FlowJo v10 (BD Biosciences) により行った。

### 耳表皮および胸腺切片の免疫染色

胸腺は Tissue-Tek OCT-compound (SAKURA SEIKI, Tokyo, Japan) 内で -20°C で凍結後、切片 (7  $\mu\text{m}$ ) を作成した。凍結切片は乾燥後、使用するまで -80°C で保存した。切片はアセトン (Wako, Osaka, Japan) を用いて脱水固定処理を行い (20 min, RT)、その後再度乾燥させた。2.4G2 による Fc 受容体のブロッキングを行った後 (60 min, 4°C)、抗体を用いて染色を行った (90 min, 4°C)。

耳は除毛クリームによる処理後、ピンセットを用いて背側と腹側に分けた。腹側の耳を 0.5 M チオシアン酸アンモニウム (Wako) に真皮が下になるように浮かせて 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 30 min インキュベートした。真皮と表皮を分けた後、アセトンを用いて表皮の脱水固定を行った (20 min, RT)。PBS による再水和後、2.4G2 を用いた Fc 受容体のブロッキング (60 min, 4°C) および抗体を用いた染色 (overnight, 4°C) を行った。PBS により 3 回 wash した後、必要に応じて Cy3-streptavidin を添加後静置した (30 min, 4°C)。PBS により 3 回 wash した後、VECTORSHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories) を用いて組織を封入した。観察は OLYMPUS BX51 (Olympus, Tokyo, Japan)、Rolera XR (Qimaging,

BC, Canada) および SlideBook™ 5.0 (Intelligent Imaging Innovations, CO, USA) を用いて行った。

### 胸腺細胞の培養

胎生期 18 日目 (E18) の胸腺細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) を 200  $\mu$ l/well complete RPMI1640 (cRPMI) (10% FBS, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin 含 RPMI1640) 中で培養した。プレートは 96-well flat-bottom plate を用いた。IL-15 への反応性を検証する実験では、細胞を 50 ng/ml recombinant IL-15 (PeproTech, NJ, USA) 存在下で培養した (48 hours, 37°C)。STAT5 のリン酸化を測定する実験では、細胞表面を抗体で染色後、50 ng/ml recombinant IL-15 存在下で培養した (15 min, 37°C)。サイトカイン産生能力を検証する実験では細胞を 25 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、1  $\mu$ g/ml ionomycin および 1  $\mu$ l/ml GolgiPlug 存在下で培養した (4 hours, 37°C)。

### RNA 精製および qRT-PCR

TRIZOL (Thermo Fisher Scientific) を用いて胸腺細胞および表皮細胞から Total RNA を精製した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞から Total RNA を精製した。方法は各試薬およびキットの説明書に従った。

プライマー配列は Primer Express Software (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて決定した。GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, WI, USA) を用いた BRYT Green dye assay による 1-step qRT-PCR (反応条件: Table 2) を行った。測定には StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。遺伝子発現の定量では $\beta$ -actin をコントロールとした $\Delta\Delta C_T$ 法を用いた相対定量を行った。用いたプライマーの配列を Table 3 に記した。

### 16S rRNA sequencing

耳を回収後、使用するまで-80°Cで保存した。DNA 抽出および 16S rRNA sequencing は生物技研 (Kanagawa, Japan) に委託した。方法を簡単に以下に述べる。耳を機械的方法により破碎後、MPure Bacterial DNA extraction Kit (MP Biomedicals, CA, USA) を用いて微生物 DNA を抽出した。16S rRNA の V1/V2 領域を modified-27F および modified-338R primers により増幅した。増幅産物を精製し、index 配列付き primers により 2 回目の PCR を行った。その後、精製した。Illumina MiSeq (Illumina, CA, USA) および MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いた 2 $\times$ 300 bp pair-end reads によりライブラリのシーケンシングを行った。QIIME2 および DADA2<sup>56</sup> を用いてデータ処理を行った。Taxonomy 解析は Greengene 13\_8 97% OUT reference sequences の feature-classifier を用いた amplicon sequence variants に基づいて行った。 $\alpha$ -多様性および $\beta$ -多様性解析は Shannon index および unweighted UniFrac

によりそれぞれ行った。細菌叢の解析は Huttenhower lab Galaxy server<sup>57</sup> の LefSe v1.0 を用いて計算した linear discriminant analysis (LDA) score を基に行った。

#### **Data availability**

16S rRNA sequencing data の accession number は NCBI Bioproject: PRJNA786442 である。

#### **統計解析**

実験結果は平均値±標準偏差で示した。統計解析は two-tailed Student's *t*-test 法を用い、*p* 値が 0.05 以下を有意な差が認められることとした。LefSe 解析における統計解析は Kruskal-Wallis test 法及び pairwise Wilcoxon test 法を用いた。 $\alpha$ -多様性解析における統計解析は Kruskal-Wallis test 法を用いた。全ての実験は 2 回以上行い、代表的な結果を示した。

**Table 1**

抗体/試薬	クローン	会社	抗体/試薬	クローン	会社
B220	RA3-682	BD Pharmingen	JAML	4E10	BioLegend
CD4	GK1.5	BD Pharmingen	Langerin	4C7	BioLegend
CD8 $\alpha$	53-6.7	BD Pharmingen	Syk	5F5	BioLegend
CD11b	M1/70	BD Pharmingen	T-bet	4B10	BioLegend
CD11c	HL3	BD Pharmingen	$\beta$ TCR	H57-597	BioLegend
CD24	M1/69	BD Pharmingen	$\gamma\delta$ TCR	GL3	BioLegend
CD45RB	16A	BD Pharmingen	V $\gamma$ 5 TCR	536	BioLegend
Gr-1	RB6-8C5	BD Pharmingen	rat IgG2a, $\kappa$		BioLegend
I-A <sup>d</sup>	10-3-4	BD Pharmingen	Streptavidin		BioLegend
I-A <sup>d</sup>	AMS-32.1	BD Pharmingen	Ly6c	ER-MP20	BMA Biomedicals
$\beta$ TCR	H57-597	BD Pharmingen	CD3 $\epsilon$	145-2C11	eBioscience
$\gamma\delta$ TCR	GL3	BD Pharmingen	CD4	GK1.5	eBioscience
human Ki-67	B56	BD Pharmingen	CD5	53-7.3	eBioscience
human Stat5 (pY694)	47/Stat5 (pY694)	BD Pharmingen	CD11b	M1/70	eBioscience
mouse IgG1, $\kappa$		BD Pharmingen	CD11c	N418	eBioscience
rat IgG1, $\kappa$		BD Pharmingen	CD27	LG.7F9	eBioscience
rat IgG2a, $\kappa$		BD Pharmingen	CD44	IM7	eBioscience
Annexin V		BD Pharmingen	CD45	30-F11	eBioscience
CD3 $\epsilon$	17A2	BioLegend	CD69	H1.2F3	eBioscience
CD4	RM4-5	BioLegend	NKG2D	CX5	eBioscience
CD25	PC61	BioLegend	Roryt	AFKJS-9	eBioscience
CD100	BMA-12	BioLegend	7AAD		eBioscience
CD122	5H4	BioLegend	hamster IgG		Jackson ImmunoResearch
IFN- $\gamma$	XMG1.2	BioLegend	rat IgM $\mu$ chain		Jackson ImmunoResearch
IL-17A	TC11-18H10.1	BioLegend	UEA-I		Vector Laboratories

**Table 2**

Step	Time	Temp.
逆転写反応	15 min	37°C
RT酵素不活化/Hot-start activation	10 min	95°C
Denature	10 sec	95°C
Anneal	30 sec	60°C
Extend	30 sec	72°C
Cycle	40-50	
Melt Curve	15 sec	95°C
	1 min	60°C
	15 sec	95°C

**Table 3**

gene	forward (5'-3')	reverse (5'-3')
<i><math>\beta</math>-actin</i>	AGCCTTCCTTCTTGGGTATGG	TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG
<i>Car</i>	CGTTCTTGTTAAGCCTTCAGGTACA	CAACGTCTAGTCGCAGCATACAC
<i>H60c</i>	GACAGAGACAGGGTGAAGATGCT	AGCATGATGAGTCATATGTTGAGGAT
<i>Il-15</i>	GGAATACATCCATCTCGTGCTACTT	CCTACACTGACACAGCCCCAAA
<i>Il-15r <math>\alpha</math></i>	GCTATGGAGTCCAGGCCATT	GCTAGGGAGGGGTCTCTGAT
<i>Jak1</i>	CCTTCTTTGAGGCTGCTAGCA	CTCCACCATGATATTTCCACATC
<i>Jak3</i>	ACCCAAGGAAAAGTCCAATTTG	ATTGTGTGGAAGCTCAGCTGTGT
<i>PlexinB2</i>	CACTTCTGCAGAGTATGGTTCTATCC	GGAGCCGGAACACCTTGTC
<i>Skint1</i>	AGAGGTCAAGATCACAGCCATAAAC	GAACCAACCTCCAGAGTGACACT
<i>Stat5a</i>	AGAAACATGTCACTGAAAAGAATCAAG	CTGCCAACGCTGAACTGAGA
<i>Stat5b</i>	GAGAACACCCGCAATGATTACA	GTCAGACCTTTGATTTCGTTTCAG
<i>Tgf- <math>\beta</math></i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GCTGATCCCGTTGATTTCCA



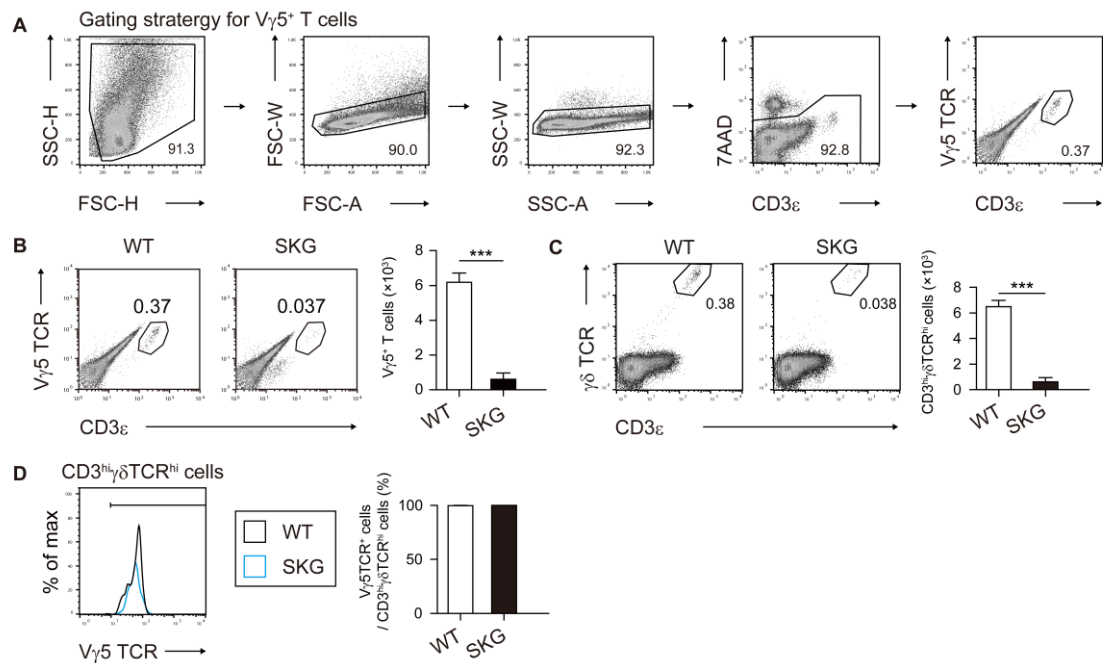
## 結果

### 減弱した TCR シグナルは DETC の形成に影響する

初めに SKG 変異による表皮 DETC への影響を検証した。SKG マウスの DETC (CD3 $\epsilon$ +V $\gamma$ 5TCR<sup>+</sup>細胞) の細胞数は WT マウスの約 10%にまで減少していた (Fig. 3A and B)。また、pan- $\gamma\delta$ T 細胞 (CD3 $\epsilon$ + $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>細胞) の細胞数も同様に減少していた。また、WT、SKG マウス共にほとんどすべての pan- $\gamma\delta$ T 細胞は V $\gamma$ 5TCR 陽性であった (Fig. 3C and D)。これらの結果から SKG 変異による DETC の細胞数の減少には TCR 遺伝子欠損マウスで見られたような TCR レパトアの変化が生じていないことが確認された。一方で、もう一つの主要な表皮の免疫細胞である Langerhans 細胞 (LC) の細胞数は WT マウスと SKG マウス間で同程度だったが、LC における Langerin の発現量は SKG マウスにおいて増加していた (Fig. 4A and B)。Langerin の発現を増加させる *Tgf- $\beta$*  の mRNA 発現量は両マウスで同程度だった (Fig. 4C)<sup>58</sup>。次に SKG 変異による DETC の形態への影響を調べるために表皮の蛍光免疫染色を行った。WT マウスでは CD3 $\epsilon$ +V $\gamma$ 5TCR<sup>+</sup>細胞は樹状突起を示していた一方で、SKG マウスの CD3 $\epsilon$ +V $\gamma$ 5TCR<sup>+</sup>細胞は細胞数の減少に加えて樹状突起の形成不全が観察された (Fig. 5A and B)。樹状突起形成に関与する CD103 の発現量は WT マウスと SKG マウスの DETC で同程度だったため、樹状突起の形成には CD103 だけでなく十分な TCR シグナルも必要だと思われる (Fig. 5C)<sup>38</sup>。DETC の皮膚恒常性維持に関わる JAML、CD100 および NKG2D の発現を調べたが、WT マウス、SKG マウスの DETC は共にこれらの分子を発現していなかった (Fig. 6A)<sup>15-17</sup>。また、それぞれのリガンドである *Coxsackie and adenovirus receptor (Car)*、*PlexinB2* および *H60c* の mRNA 発現量は両マウスの表皮において変化がなかった (Fig. 6B)。TCR $\delta$ 鎖ノックアウトマウスでは表皮 $\alpha\beta$ T 細胞が増加<sup>59</sup>するが、SKG マウスにおいても $\alpha\beta$ T 細胞の増加が見られた (Fig. 6C)。以上の様に、部分的に TCR シグナルが低下した SKG 変異によっても、成体表皮における V $\gamma$ 5TCR<sup>+</sup>DETC の発生に有意な影響が出ることを確認した。

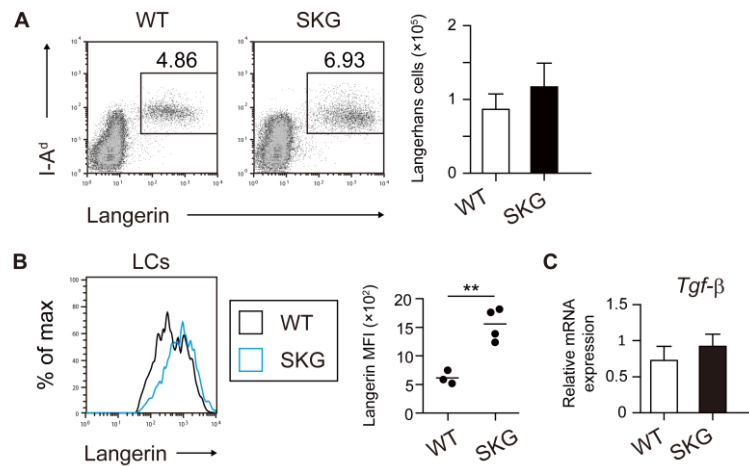
### 減弱した TCR シグナルは胎生期胸腺の V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生に影響する

DETC 前駆細胞は胎生期胸腺でのみ発生する<sup>21</sup>。そこで、SKG マウスの胎生期胸腺における DETC 前駆細胞と他の T 細胞の変化を調べた。胎生期 16 日目 (E16) では T 細胞の前駆体である CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) 細胞の細胞数は DN3 を除き WT と SKG マウスで差は見られなかった。DN3 細胞は SKG マウスにおいて減少していた (Fig. 7A and B;  $p=0.018$ )。次に、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1TCR エピトープを認識する 17D1 抗体産生ハイブリドーマ<sup>39,45</sup>の培養上清を用いてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、E16 および E18 の SKG マウスでは、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞 (V $\gamma$ 5TCR<sup>+</sup>17D1<sup>+</sup>細胞) の細胞数が WT マウスの半分程度に減少していた (Fig.



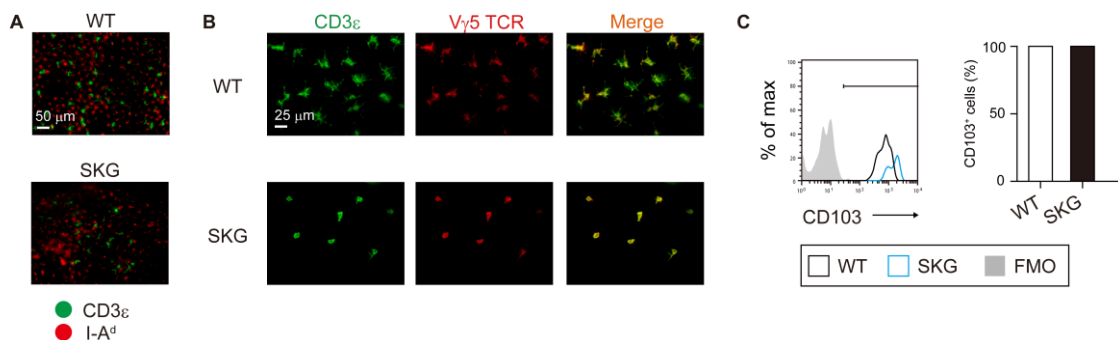
**Figure 3 SKG 変異による成体マウス DETC の細胞数への影響**

(A) フローサイトメトリー解析時における代表的な DETC の解析方法。(B) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の DETC ( $CD3\epsilon^+V\gamma 5TCR^+$ 細胞) の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。 $n=3$ 。(C) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の  $CD3^{hi}\gamma\delta TCR^{hi}$  細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。 $n=3$ 。(D) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の  $CD3^{hi}\gamma\delta TCR^{hi}$  細胞における  $V\gamma 5TCR^+$ 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。 $n=3$ 。(C, D) 実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。\*\*\* $p < 0.001$ 。



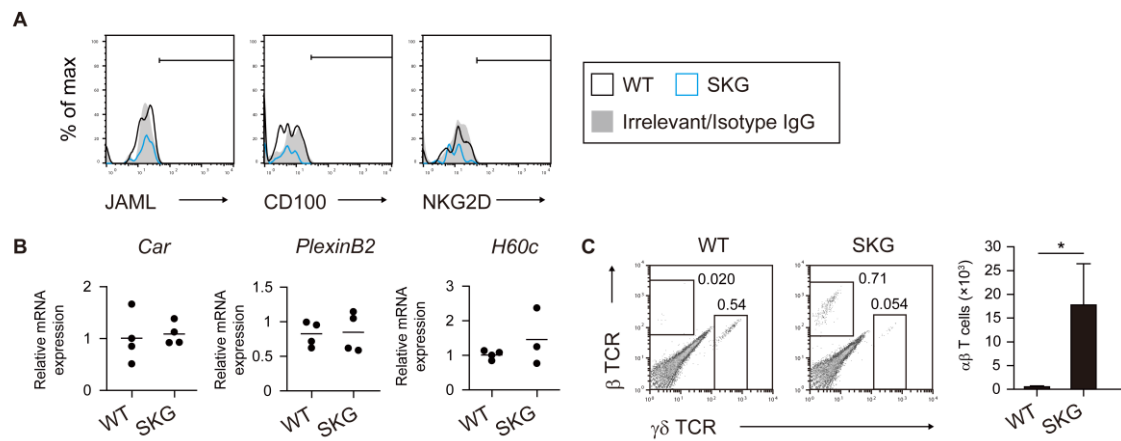
**Figure 4 SKG 変異による成体マウス LC への影響**

(A) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の Langerhans 細胞 (I-A<sup>d</sup>Langerin<sup>+</sup>細胞) の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。(B) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の Langerhans 細胞における Langerin の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。1 つのシンボルは 1 匹のマウスを示す。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3-4。(C) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の *Tgf-β* mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\*\*p < 0.01。



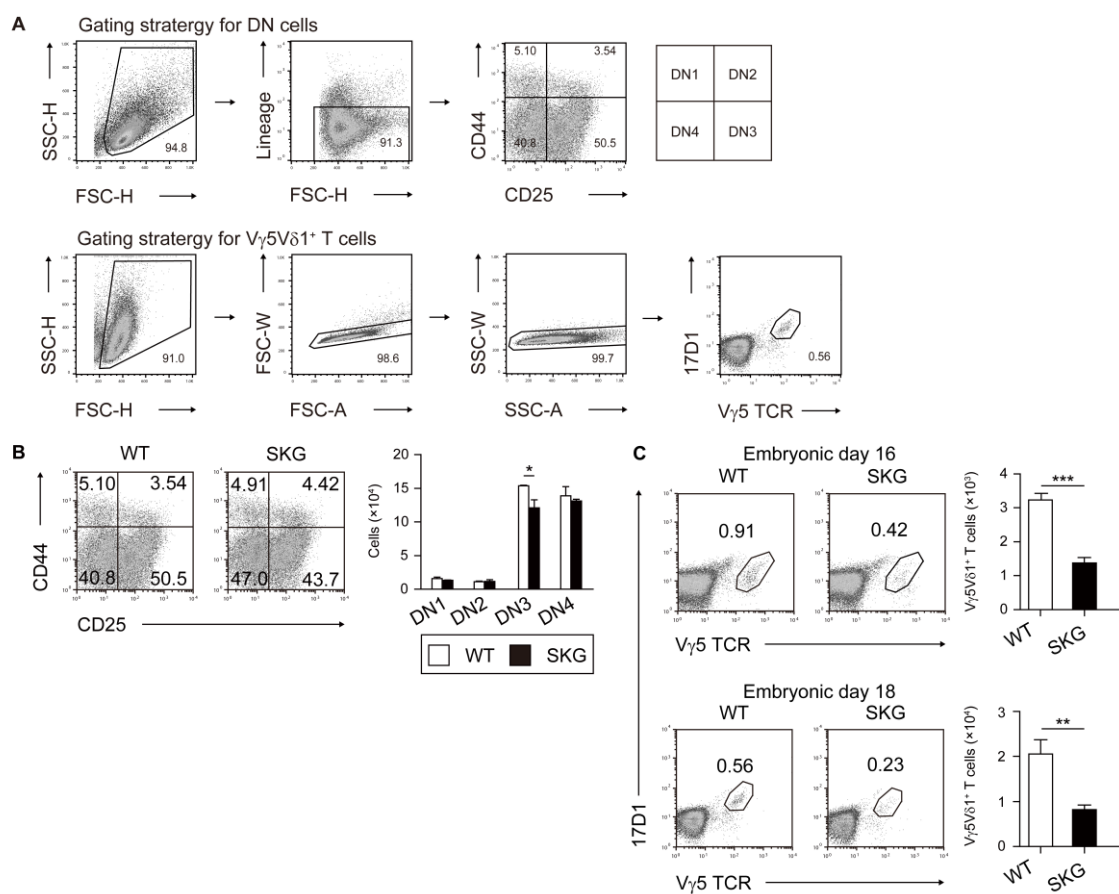
**Figure 5 SKG 変異による成体マウス DETC の形態への影響**

(A, B) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の蛍光免疫染色を行った。表皮を抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (緑色) と抗 I-A<sup>d</sup> 抗体 (赤色) (A) あるいは抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (緑色) と抗 V $\gamma$ 5 TCR 抗体 (赤色) (B) を用いて染色した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。スケールバーはそれぞれ 50  $\mu$ m (A) と 25  $\mu$ m (B) を示す。(C) 成体 WT マウスと SKG マウスの DETC における CD103 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。FMO, fluorescence minus one。



**Figure 6 SKG 変異による成体マウス DETC の表面分子への影響**

(A) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の DETC における JAML、CD100 および NKG2D の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。JAML の解析時には irrelevant IgG を、CD100、NKG2D の解析時には isotype IgG を用いた。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 4。 (B) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の *Car*、*PlexinB2* および *H60c* の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。1 つのシンボルは 1 匹のマウスを示す。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した。n = 3-4。 (C) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳表皮の  $\alpha\beta$ T 細胞 ( $\beta$ TCR<sup>+</sup>細胞) と  $\gamma\delta$ T 細胞 ( $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>細胞) の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\**p* < 0.05。



**Figure 7 SKG 変異による胎生期胸腺 V<sub>γ</sub>5V<sub>δ</sub>1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数への影響**

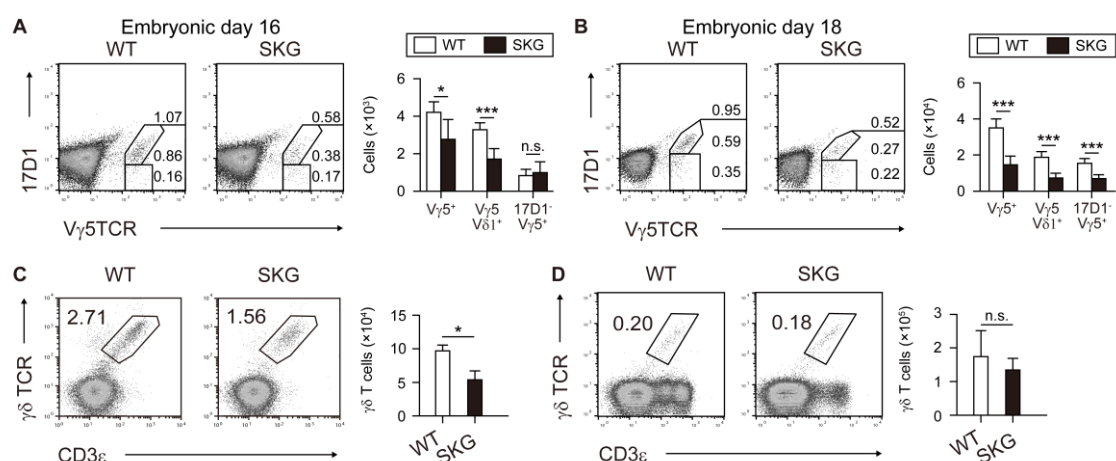
(A) フローサイトメトリー解析時における代表的な胸腺内 DN 細胞および V<sub>γ</sub>5V<sub>δ</sub>1<sup>+</sup>T 細胞の解析方法。各細胞の同定方法は以下の通り。DN1, Lineage (CD3ε、4、8α、11b、11c、45R、Gr-1、Ly6C) (Lin)<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞; DN2, Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞; DN3, Lin<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>細胞; DN4, Lin<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>細胞; V<sub>γ</sub>5V<sub>δ</sub>1<sup>+</sup>T 細胞, 17D1<sup>+</sup>V<sub>γ</sub>5TCR<sup>+</sup>細胞。(B) 胎生期 16 日目 (E16) における WT マウスと SKG マウスの胸腺の各 DN 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。(C) E16 (上段) および E18 (下段) における WT マウスと SKG マウスの胸腺の V<sub>γ</sub>5V<sub>δ</sub>1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、\*\*\*p < 0.001。

7C)。E18 の SKG マウスでは、17D1-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数も半分程度に減少していた (Fig. 8A and B)。E18 において、pan-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞に対する V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の割合は WT と SKG マウスで差は見られず (Fig. 8B; WT : SKG = 53.3 $\pm$ 4.3% : 49.4 $\pm$ 6.3%)、SKG 変異は胎生期胸腺の V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞における V $\delta$ 1 鎖の使用頻度に変化を与えなかった。胎生期胸腺では成体胸腺と異なり pan- $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数も SKG マウスにおいて減少していた (Fig. 8C and D) <sup>60</sup>。

続いて SKG 変異による TCR 複合体発現量への影響について検討した。E16 では、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞上の CD3 $\epsilon$ 、 $\gamma\delta$ TCR および V $\gamma$ 5TCR の発現量は WT マウスと SKG マウスで差は見られなかった (Fig. 9A)。一方、E18 では SKG マウスにおいてこれらの発現量は低下していた (Fig. 9B)。17D1-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞では両マウスにおいて発現量の差は見られなかった (Fig. 9C)。次に、SKG 変異による胸腺内 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の局在への影響を調べるために、胎生期胸腺の免疫染色を行った。まず、先行研究と同様に WT マウスの V $\gamma$ 5<sup>+</sup>細胞は皮質領域 (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>領域) ではなく髄質領域 (UEA-I<sup>+</sup>領域) に主に局在していた (Fig. 10) <sup>61</sup>。SKG マウスでも同様に V $\gamma$ 5<sup>+</sup>細胞は主に髄質領域に局在しており (Fig. 10)、SKG 変異は V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の局在には影響がなかった。

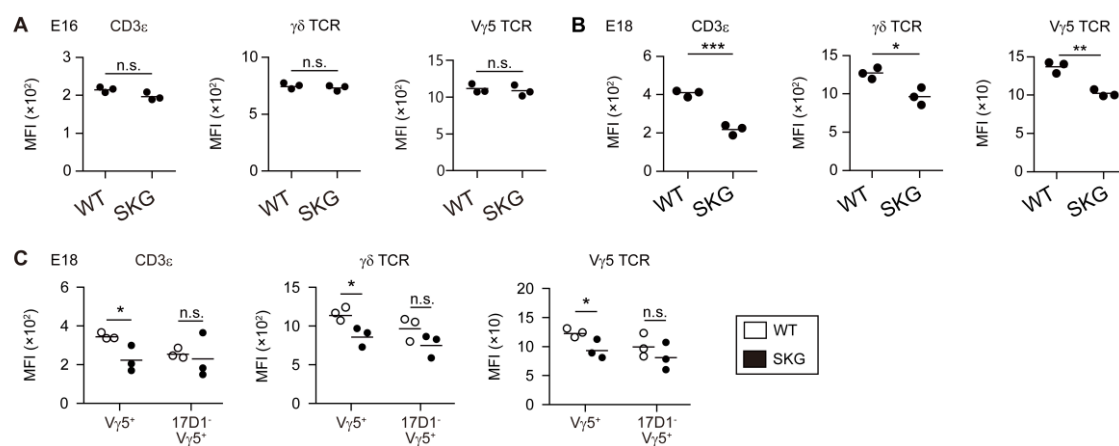
次に SKG 変異による V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数低下の原因を検証するためにアポトーシスおよび細胞の増殖を検討した。Annexin V 染色および Ki-67 染色を行ったところ、Annexin V<sup>+</sup>細胞の割合は V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞と 17D1-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞いずれにおいても WT マウスと SKG マウスで差は見られず、SKG 変異によるアポトーシスへの影響は見られなかった (Fig. 11A and B)。それに対して、Ki-67<sup>+</sup>細胞の割合は SKG マウスの V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞で減少していた (Fig. 11C)。また、17D1-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞では WT マウスと SKG マウスで差は見られなかった (Fig. 11D)。よって、SKG マウスにおける V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の細胞数低下の一因は細胞増殖の低下にあることが示された。一般的に、抗原-MHC 複合体に対する反応において、弱い TCR シグナルを有する  $\alpha\beta$ T 細胞は正の選択によりアポトーシスが誘導されると考えられている (Fig. 11E) <sup>54,55,62</sup>。しかしながら、Fig. 11 の結果から TCR シグナルは  $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる機序によって V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生に関与しており、生存よりも増殖に関与していることが考えられた。

ZAP70 欠失患者では Syk の発現量が増加することで TCR シグナル経路が補完されることが報告されている <sup>49-51</sup>。そのため、SKG マウスにおいても ZAP70 の機能低下による Syk の発現量の変化が考えられた。そこで、V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞における Syk 発現を調べた結果、WT マウスおよび SKG マウスのほとんどの V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞は Syk を発現しており、その発現量に差は見られなかった (Fig. 12)。従って、SKG マウスで観察された V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生の欠損において、Syk の発現上昇による ZAP70 の機能的補完は影響しないと思われた。



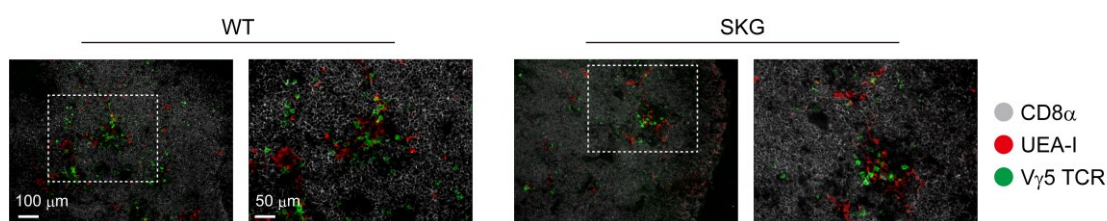
**Figure 8 SKG 変異による胎生期胸腺 pan-V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数への影響**

(A, B) E16 (A) および E18 (B) における WT マウスと SKG マウスの胸腺の各 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 3 回行い、2 回の実験結果を統合したデータを示した。n = 6-7。 (C, D) E18 (C) および成体 (D) における WT マウスと SKG マウスの胸腺の $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\* $p < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ ; n.s, not significant。



**Figure 9** SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5^+T$  細胞の TCR 関連分子発現への影響

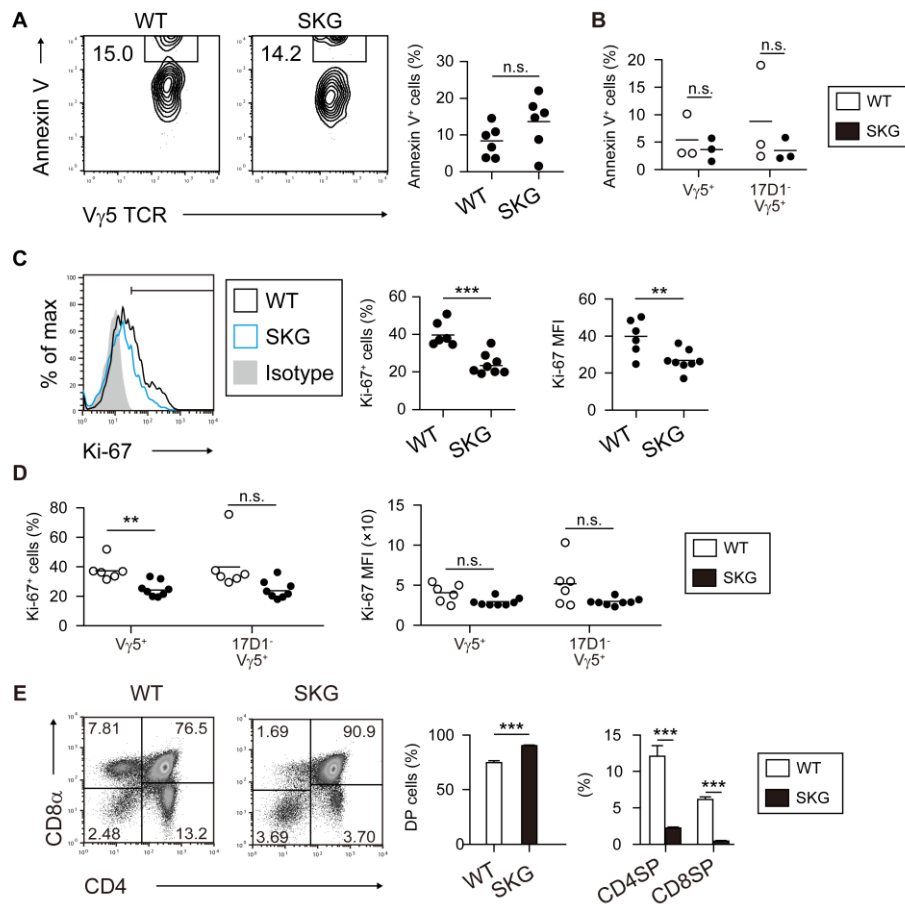
(A, B) E16 (A) および E18 (B) の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞上の CD3 $\epsilon$ 、 $\gamma\delta$  TCR、 $V\gamma 5$  TCR の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は3回行い、代表的なデータを示した。 $n=3$ 。(C) E18のWTマウスとSKGマウスの胸腺の各  $V\gamma 5^+T$  細胞上の CD3 $\epsilon$ 、 $\gamma\delta$  TCR、 $V\gamma 5$  TCR の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は3回行い、代表的なデータを示した。 $n=3$ 。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ ; n.s, not significant.



**Figure 10** SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5^+T$  細胞の局在への影響

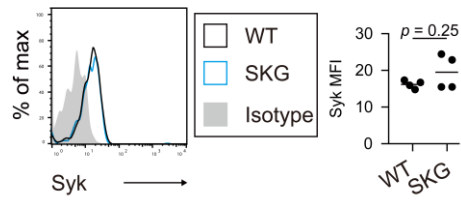
E18のWTマウスとSKGマウスの胸腺の蛍光免疫染色を行った。組織切片を抗CD8 $\alpha$ 抗体(灰色)、UEA-I(赤色)と抗 $V\gamma 5$ TCR抗体(緑色)を用いて染色した。実験は7回行い、代表的なデータを示した。スケールバーはそれぞれ100  $\mu\text{m}$  (左)と50  $\mu\text{m}$  (右)を示す。





**Figure 11 SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$  細胞の細胞死・増殖への影響**

(A, B) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$  細胞 (A) および各  $V\gamma 5^+$  細胞 (B) の Annexin V 染色をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は3回行い、(A) では2回の実験結果を統合したデータを示した。n = 6。(B) では代表的なデータを示した。n = 3。(C, D) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$  細胞 (C) および各  $V\gamma 5^+$  細胞 (D) の Ki-67 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は3回行い、2回の実験結果を統合したデータを示した。n = 6-8。(E) 成体 WT マウスと SKG マウスの胸腺における  $CD4^+CD8\alpha^+$  (DP) 細胞、 $CD4^+CD8\alpha^-$  (CD4SP) 細胞、 $CD4^-CD8\alpha^+$  (CD8SP) 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ ; n.s, not significant。



**Figure 12** SKG 変異による胎生期胸腺 V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の Syk 発現への影響

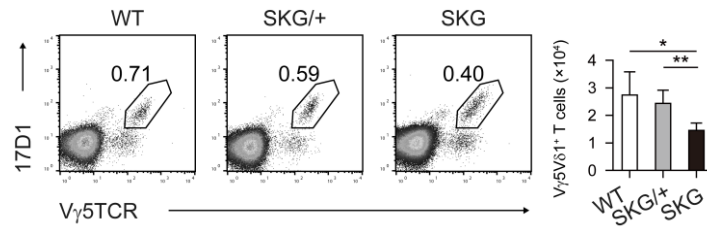
E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺 V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞内の Syk の発現をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=4。

次に、さらに  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の発生と TCR シグナルの強度の関係を調べるため、WT マウスと SKG マウスを交配しその F1 仔マウス (以後 SKG/+マウス) における  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の細胞数を調べた。SKG/+マウスの胎生期胸腺における  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の細胞数は SKG マウスのもより有意に回復し、WT マウスと同程度だった (Fig. 13)。この結果から胎生期胸腺における  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の発生には WT と SKG 変異を持つ ZAP70 分子、各 1 アリルずつの組み合わせから生じる TCR シグナルの強度で十分であることが示された。

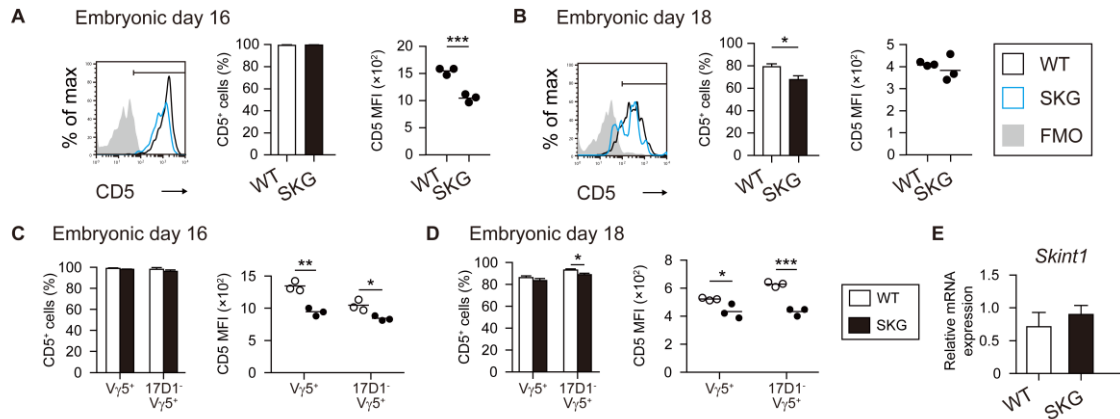
### 減弱した TCR シグナルは胎生期胸腺の $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の成熟に影響する

続いて、SKG 変異による  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の増殖能力低下に関連して、細胞の成熟への影響を検討した。初めに TCR シグナルを受けると発現が上昇することが知られる CD5 の発現を検討した<sup>63</sup>。E16 では WT マウスと SKG マウスのすべての  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞は CD5 を発現していたが、発現量は SKG マウスにおいて低下していた (Fig. 14A)。E18 では CD5 の発現量は両群で差は見られなかったが、CD5<sup>+</sup>細胞の割合は SKG マウスで低下していた (Fig. 14B)。  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞とは異なり 17D1- $V\gamma 5^+$ T 細胞では E18 においても CD5 発現量が SKG マウスにおいて低下していた (Fig. 14C and D)。  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の発生に必要な共刺激分子 *Skint1* の mRNA 発現量は WT マウスと SKG マウスで差は見られなかった (Fig. 14E)。

次に成熟マーカーとして知られる CD24、CD45RB および CD122 の発現を調べた<sup>24,26</sup>。E16 では WT マウスおよび SKG マウスの  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞は共に CD24<sup>-</sup>、CD45RB<sup>+</sup>および CD122<sup>+</sup>細胞の割合が少なく、まだ未成熟の段階にあった (Fig. 15A)。この時点において WT マウスと SKG マウスの間で上記分子の発現割合に差は見られなかった。E18 の WT マウスの  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞では CD24<sup>-</sup>、CD45RB<sup>+</sup>および CD122<sup>+</sup>細胞の割合が高くなっており、成熟の進行を確認した (Fig. 15B)。SKG マウスの  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞でも CD24<sup>-</sup>、CD45RB<sup>+</sup>細胞の割合は高く WT マウスと同程度だったが、一方で増殖に直接関与する CD122<sup>+</sup>細胞の割合は低下していた (Fig. 15B)。また、SKG マウスの 17D1- $V\gamma 5^+$ T 細胞も  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞と同様の表現型を示していた (Fig. 15C and D)。CD122、IL-2R $\gamma$ および IL-15R $\alpha$ で構成される IL-15 受容体と IL-15 の反応は  $V\gamma 5^+$ T 細胞の増殖に必要であることが知られているため<sup>32,33</sup>、胸腺細胞を IL-15 存在下で培養することにより  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の IL-15 に対する応答性を検証した。まず、WT マウスの  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞では IL-15 添加によって細胞数の増加が確認された (Fig. 16A and B)。一方、SKG マウスでは IL-15 添加時に  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞は WT マウスに比べて増殖が弱く、その増加率も低かった (Fig. 16A and B)。次に IL-15 受容体の下流に存在する STAT5<sup>64</sup> のリン酸化について調べたところ、WT マウスの  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞では IL-15 添加による STAT5 のリン酸化を観察した (Fig. 16C)。それに対して、SKG マウスでもリン酸化は行われたものの、そのリン酸化の程度は有意に低かった (Fig. 16C)。IL-15-STAT5 経路

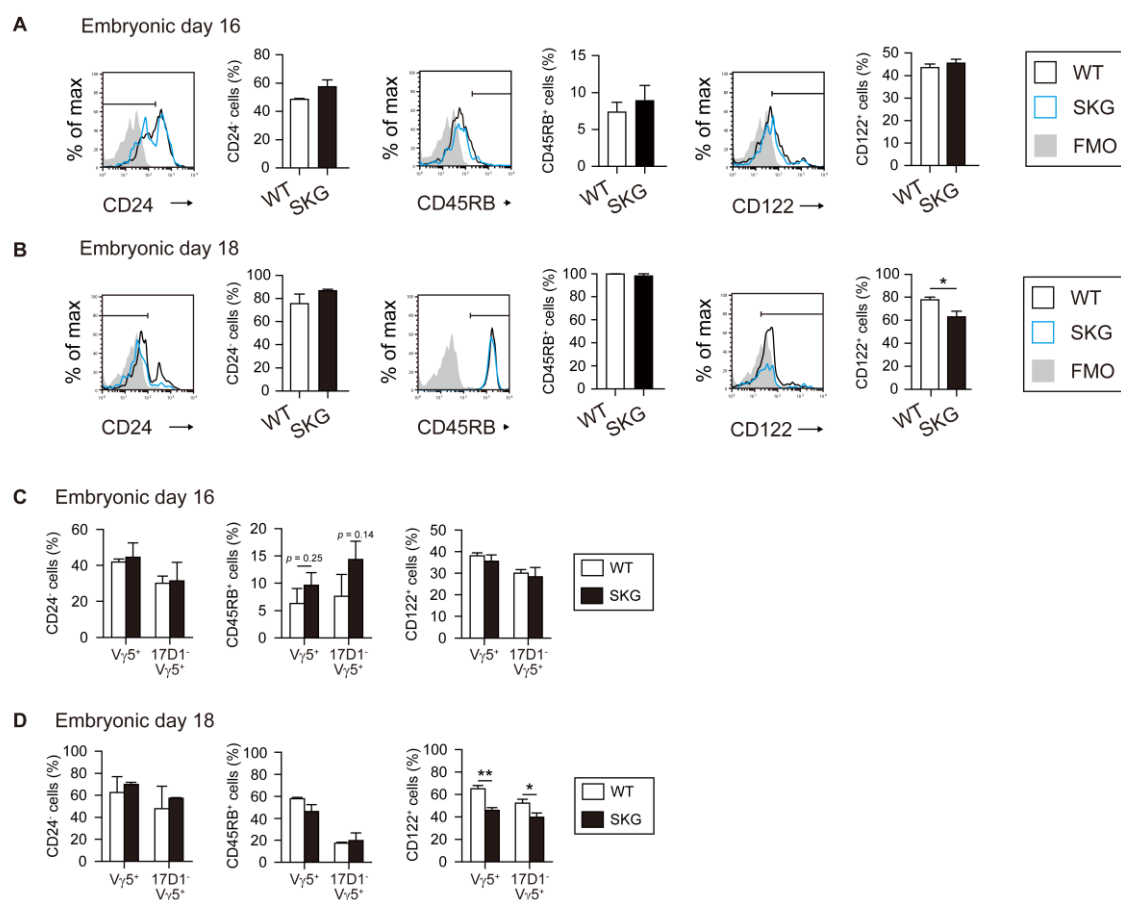


**Figure 13** TCR シグナル強度の違いによる胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の細胞数への影響  
E18 の WT マウス、SKG/+マウス、SKG マウスの胸腺の  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、2 回の実験結果を統合したデータを示した。  $n = 4-8$ 。 \* $p < 0.05$ 、 \*\* $p < 0.01$ 。



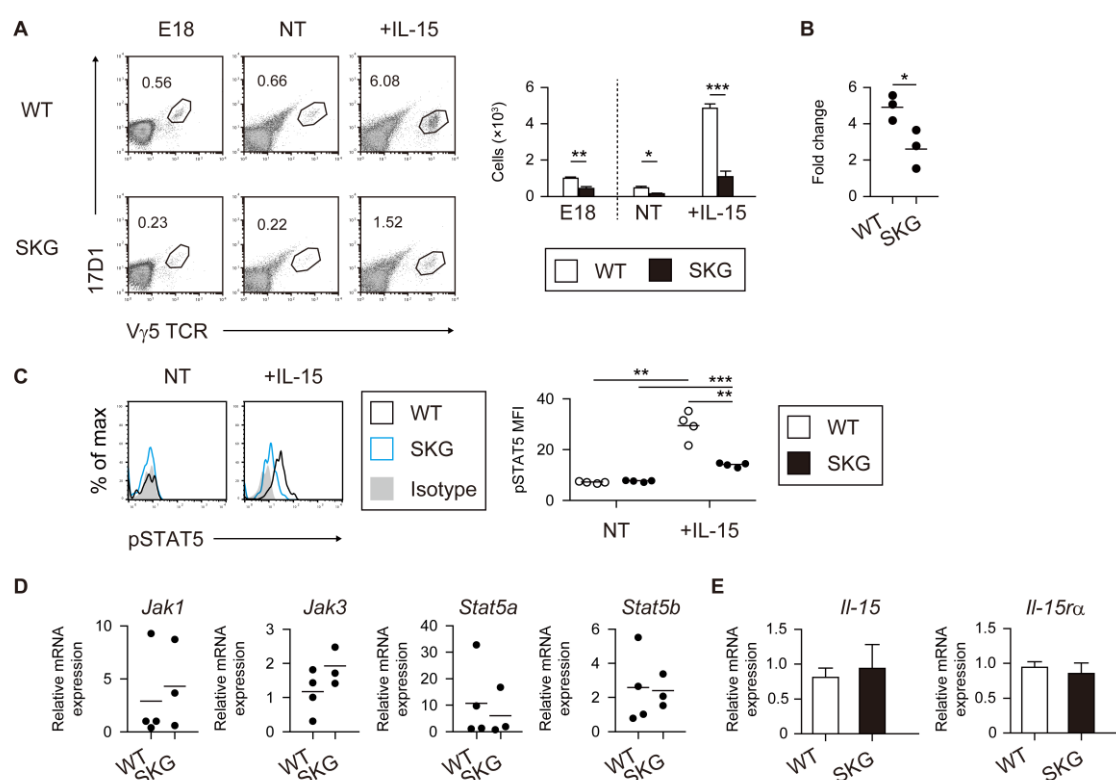
**Figure 14** SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の CD5 発現への影響

(A, B) E16 (A) および E18 (B) の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞上の CD5 の陽性細胞割合 (左) および発現量 (右) をフローサイトメトリーにより解析した。1 つのシンボルは 1 匹のマウスを示す。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。  $n = 3$ 。(C, D) E16 (C) および E18 (D) の WT マウスと SKG マウスの胸腺の各  $V\gamma 5^+$ T 細胞上の CD5 の陽性細胞割合 (左) および発現量 (右) をフローサイトメトリーにより解析した。1 つのシンボルは 1 匹のマウスを示す。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。  $n = 3$ 。(E) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺の *Skint1* の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。  $n = 3$ 。 \* $p < 0.05$ 、 \*\* $p < 0.01$ 、 \*\*\* $p < 0.001$ 。



**Figure 15** SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の成熟への影響

(A, B) E16 (A) および E18 (B) の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞上の CD24 (左)、CD45RB (中央) および CD122 (右) の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。(C, D) E16 (C) および E18 (D) の WT マウスと SKG マウスの胸腺の各  $V\gamma 5^+$ T 細胞上の CD24 (左)、CD45RB (中央) および CD122 (右) の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。



**Figure 16 SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の IL-15-STAT5 経路への影響**

(A) E18 胸腺細胞を培養後、 $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。WT マウスと SKG マウスの胎生期胸腺細胞を 50 ng/ml IL-15 の存在・非存在下で 48 時間培養した。E18 の  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の細胞数は細胞割合に  $2 \times 10^5$  cells を乗ずることで算出した。n=3。(B) (A) の実験において、IL-15 添加群の  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の細胞数を、E18 の  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の細胞数で割り、増加率を算出した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。n=3。(A、B) 実験は2回行い、代表的なデータを示した。(C) E18 胸腺細胞を培養後、 $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞における STAT5 のリン酸化をフローサイトメトリーにより解析した。E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺細胞を 50 ng/ml IL-15 の存在・非存在下で 15 分間培養した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=4。(D) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の *Jak1*、*Jak3*、*Stat5a* および *Stat5b* の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=3-4。(E) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺の *Il-15*、*Il-15ra* の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=3。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

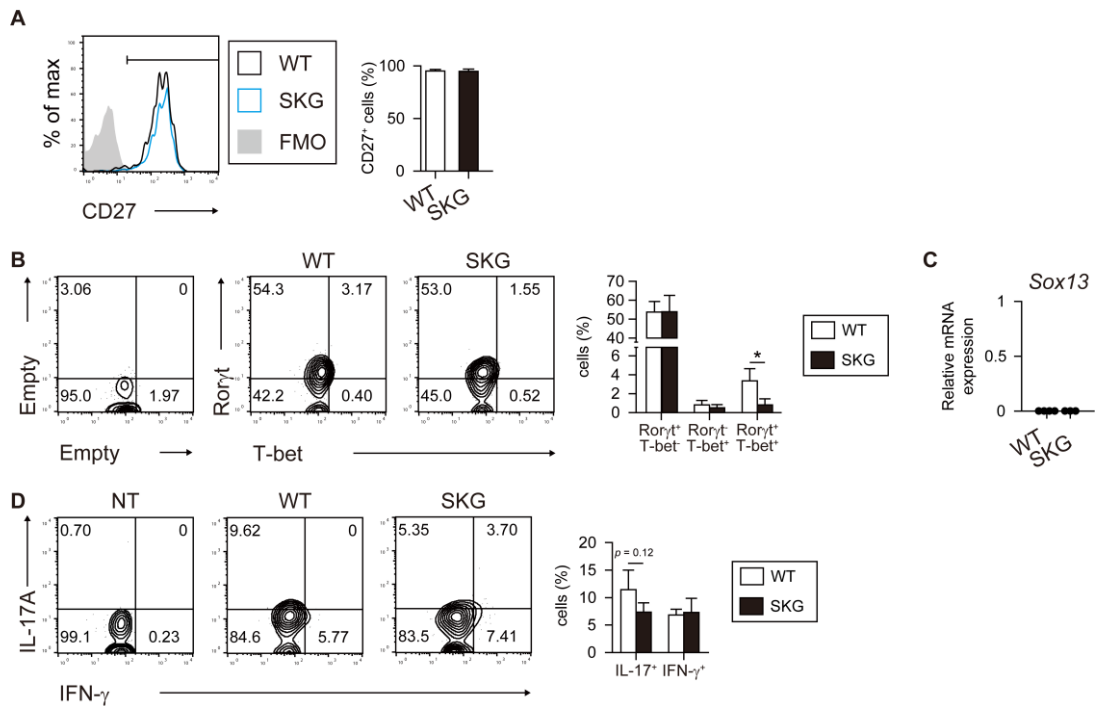
に関わる *Jak1*、*Jak3*、*Stat5a* および *Stat5b* の mRNA 発現量は WT マウスと SKG マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞で差は無かった (Fig. 16D)。胸腺における *Il-15* および *Il-15r $\alpha$*  の mRNA 発現量も両マウスにおいて差は見られなかった (Fig. 16E)。以上の結果から、SKG 変異マウスでは正の選択時に行われる TCR シグナルが低下することで、細胞の成熟と CD122 の発現誘導が低下し、その結果として IL-15 への応答性とその後の細胞増殖が低下していると考えられた。

#### 減弱した TCR シグナルは $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞のサイトカイン産生能力に影響しない

$\gamma\delta$ T 細胞のサイトカイン産生能力は胸腺において決定すると考えられている。さらに SKG マウスでは pan- $\gamma\delta$ T 細胞、 $V\gamma4^+\gamma\delta$ T 細胞、 $V\gamma6^+\gamma\delta$ T 細胞における IL-17<sup>+</sup>細胞が減少することが報告されている<sup>60</sup>。そのため、SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞のサイトカイン産生能力への影響を調べた。初めに  $\gamma\delta$ T 細胞内の IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞と IL-17<sup>+</sup>細胞を識別するマーカーである CD27 の発現を調べたところ、WT マウスと SKG マウスのほとんどすべての  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞は CD27 を発現しており、発現細胞の割合に差は見られなかった (Fig. 17A)。次に T 細胞において IFN- $\gamma$  および IL-17 の産生制御に関わる転写因子である T-bet および Ror $\gamma$ t の発現を調べたところ、WT マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞では Ror $\gamma$ t<sup>+</sup>細胞の割合が高かった (Fig. 17B)<sup>65,66</sup>。SKG マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞においても Ror $\gamma$ t<sup>+</sup>細胞の割合は WT マウスと変わらなかった一方で、Ror $\gamma$ t<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup>細胞の割合が低下していた。Skint1 欠損マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞では *Sox13* の mRNA 発現量が増加するが<sup>28</sup>、SKG マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞では WT マウスと同様に *Sox13* の mRNA を発現していなかった (Fig. 17C)。最後に胸腺細胞を PMA と ionomycin で刺激し、 $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞における実際のサイトカイン産生を調べたところ、WT マウスと SKG マウスの  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞において IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞と IL-17<sup>+</sup>細胞の割合に差は見られなかった (Fig. 17D)。以上の結果から SKG 変異は他の  $\gamma\delta$ T 細胞サブセットとは異なり  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞のサイトカイン産生能力には影響しないことが示された。

#### 減弱した TCR シグナルは生後早期における DETC の増殖を低下させる

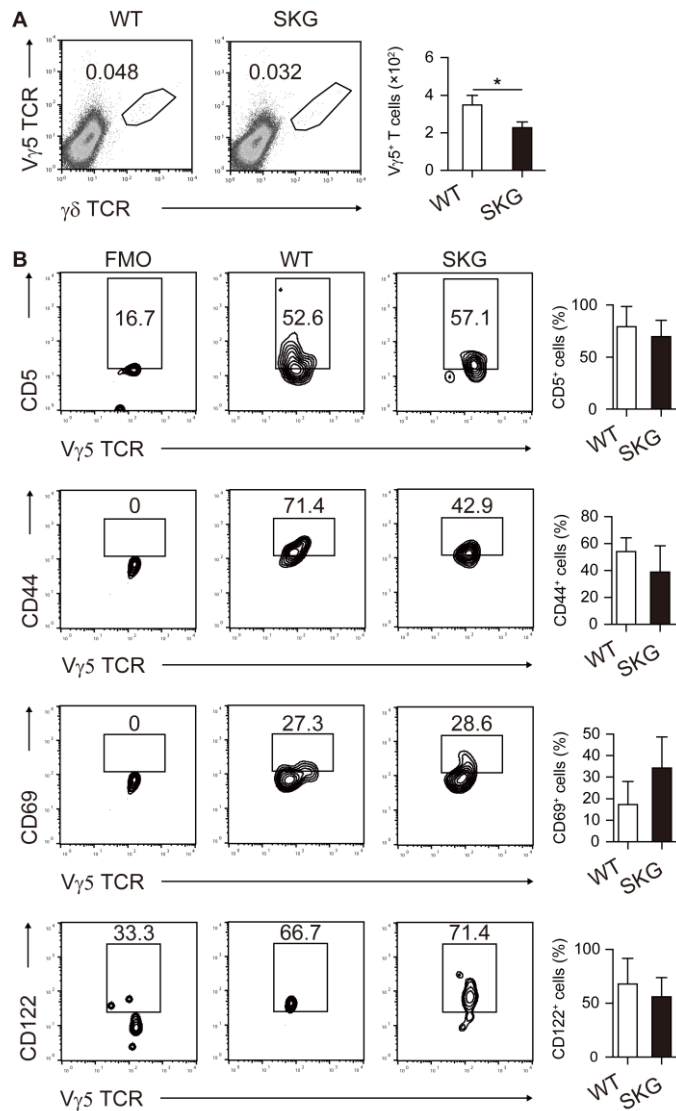
ここまでの結果から、SKG 変異は胎生期胸腺における  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞の発生と成体における DETC の数に影響することが示された。しかし、SKG マウスの胎生期胸腺と成体表皮における  $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞/DETC の細胞数の変化は、WT マウスと比較して胎生期胸腺では約 50%低下しているのに対して、成体表皮では約 90%低下しており、その度合いには齟齬があった。そこで、次にこの減少度合いの違いの原因について、胸腺から表皮への移動能力と表皮における増殖能力に注目し検討した。 $V\gamma5V\delta1^+$ T 細胞は胸腺から表皮へ移動した直後ではなく、生後 1-2 週間を経たのち増殖を始める<sup>31</sup>。そこで耳表皮における DETC の細胞数を生後早期 (16-19 日齢)、若齢期 (4 週齢) および成体期 (7 週齢) の 3 つの期間に分けて検



**Figure 17** SKG 変異による胎生期胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^{+}T$  細胞のサイトカイン産生能力への影響

(A) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^{+}T$  細胞上の CD27 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n=4。(B) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^{+}T$  細胞内の *Roryt*、*T-bet* の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n=4。(C) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^{+}T$  細胞の *Sox13* の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。1 つのシンボルは 1 匹のマウスを示す。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n=3-4。(D) E18 の WT マウスと SKG マウスの胸腺  $V\gamma 5V\delta 1^{+}T$  細胞内の IL-17A、IFN- $\gamma$  の産生をフローサイトメトリーにより解析した。胸腺細胞を 25 ng/ml PMA、1  $\mu$ g/ml ionomycin、GolgiPlug の存在下で 4 時間培養した。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した。n=4。\**p* < 0.05。





**Figure 18 SKG 変異による生後早期の表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数への影響**

(A) 16-19 日齢の WT マウスと SKG マウスの耳表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。両耳における細胞数を算出した。実験は 5 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。 (B) 16-19 日齢の WT マウスと SKG マウスの耳表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞上の CD5 (上部)、CD44 (中央上部)、CD69 (中央下部) および CD122 (下部) の発現をフローサイトメトリーにより解析した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。\*p < 0.05。

討した。生後早期では SKG マウスの  $V\gamma 5^+T$  細胞は WT マウスの約半分程度存在しており、胸腺における DETC 前駆細胞数の低下程度と一致した (Fig. 18A)。また、この結果から SKG 変異は  $V\gamma 5^+T$  細胞の表皮への移動能力には影響しないことが考えられた。この時期における表皮  $V\gamma 5^+T$  細胞の表面マーカーを調べたところ、CD5、CD44、CD69 および CD122 の発現割合は両マウスで差は見られなかった (Fig. 18B)。次に若齢期と成体期について調べたところ、WT マウスの  $V\gamma 5^+T$  細胞は経時的に数が増加したが、SKG マウスの  $V\gamma 5^+T$  細胞では細胞数の増加は見られなかった (Fig. 19A and B)。加えて、表皮免疫染色により WT マウスの  $V\gamma 5^+T$  細胞は生後早期では丸状を示したが若齢期では樹状突起を形成していたのに対して、SKG マウスでは若齢期および成体期においても樹状突起の形成は観察されなかった (Fig. 19C)。以上の結果から SKG マウスでは生後の DETC の増殖が欠損しており、そのため、成体において DETC が顕著に減少することが示された。

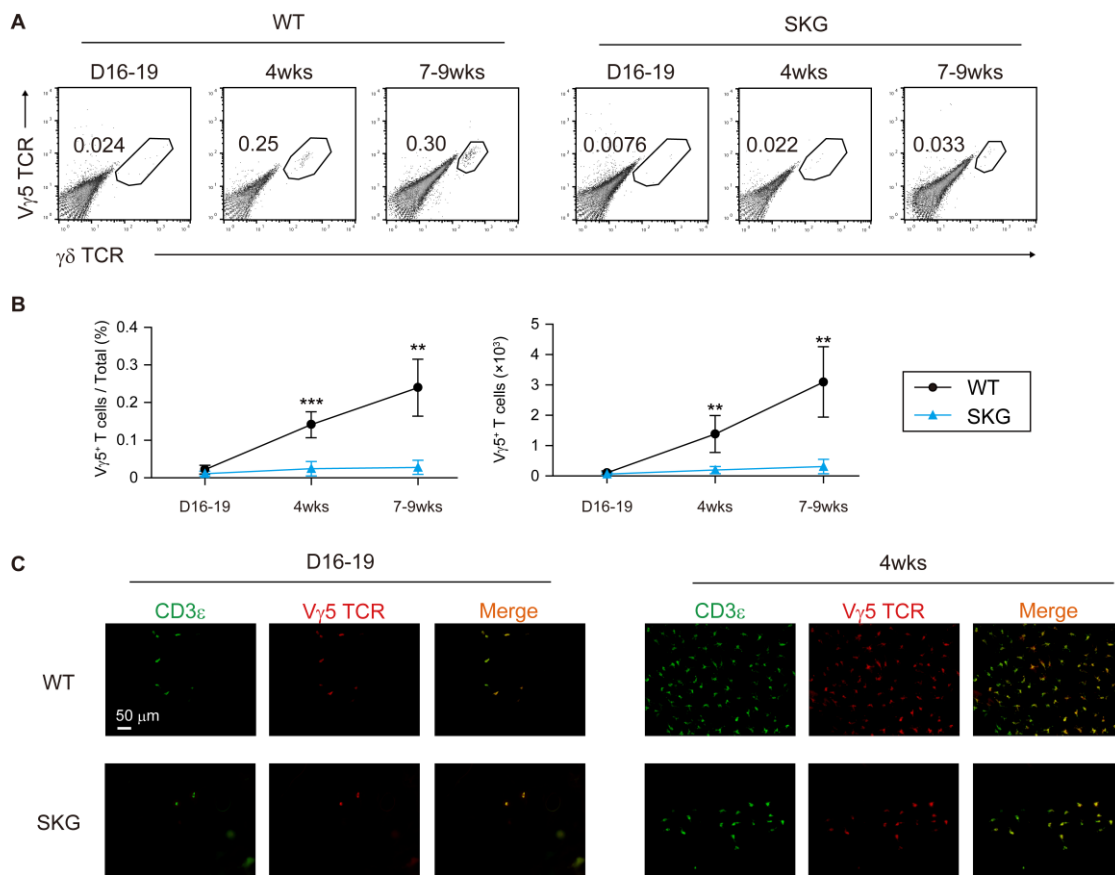
続いて  $V\gamma 5^+T$  細胞の Syk の発現を調べたところ、WT マウスに比べて SKG マウスの生後早期では Syk の発現細胞が増加していた (Fig. 20A)。しかしながら、成体期では WT マウス、SKG マウス共に  $V\gamma 5^+T$  細胞は Syk を発現していなかった (Fig. 20A)。よって、SKG 変異は  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞/DETC における Syk による ZAP70 の機能的補完を引き起こさないと考えられた。

また、Skint1 は表皮においても発現しているため DETC は Skint1 の影響を受ける可能性がある。しかし、表皮 *Skint1* の mRNA 発現量は WT マウスと SKG マウスで差は見られなかった (Fig. 20B)。また、*Il-15* および *Il-15 $\alpha$*  の mRNA 発現量も両マウスで差は認められなかった (Fig. 20B)。

SKG 変異による胎生期胸腺と表皮における細胞数の減少程度の差の原因として、胸腺と表皮では  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞の増殖能力に必要な TCR シグナル強度の閾値が異なることが考えられた。そこで、次に SKG/+マウスにおける DETC の細胞数を検討した。その結果、胸腺の  $V\gamma 5V\delta 1^+T$  細胞とは異なり、SKG/+マウスの DETC の細胞数は SKG マウスと同程度に減少しており、細胞数の回復は認められなかった (Fig. 20C)。この結果から DETC の増殖には WT と SKG 変異を持つ ZAP70 分子、各 1 アリルずつの組み合わせから生じる TCR シグナルの強度では不十分であること、すなわち表皮における DETC の増殖には胸腺よりも強い TCR シグナルが必要であることが示唆された。

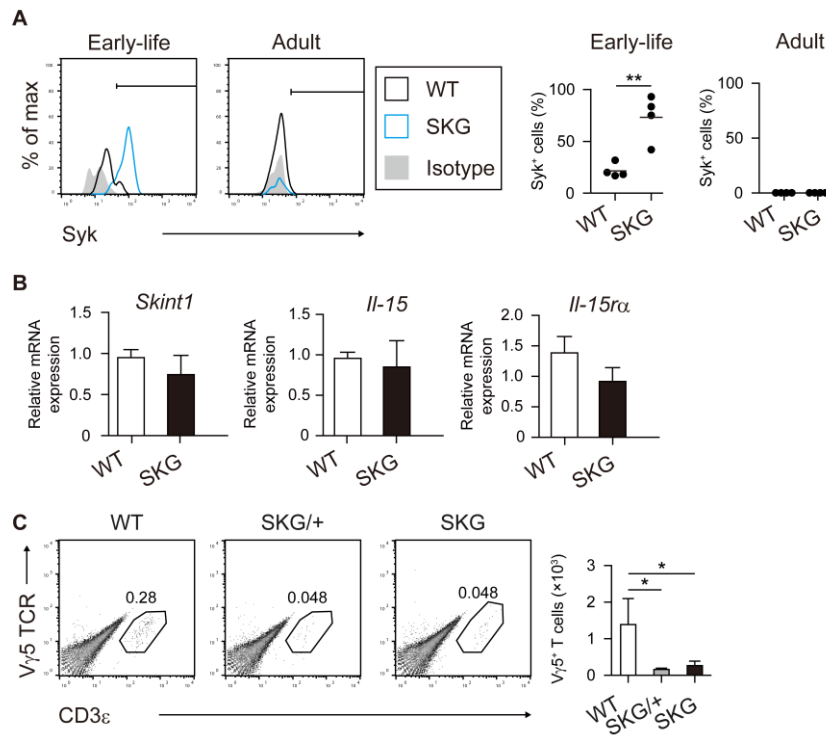
### 無菌マウスにおいて DETC は発生する

皮膚細菌叢は皮膚 T 細胞の発生・局在に影響することが知られている。例えば mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞は MHC class Ib 分子の MR1 上に提示された riboflavin 合



**Figure 19** SKG 変異による表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の増加への影響

(A, B) WT マウスと SKG マウスの耳表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は 4 回行い、2 回の実験結果を統合したデータを示した。n = 6-7。統計解析は同じ日齢・週齢の WT マウスと SKG マウスの間で行った。(C) 16-19 日齢 (左) および 4 週齢 (右) の WT マウスと SKG マウスの耳表皮の蛍光免疫染色を行った。表皮を抗 CD3 $\epsilon$  抗体 (緑色) と抗 V $\gamma$ 5TCR 抗体 (赤色) を用いて染色した。実験は 4 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。\*\* $p$  < 0.01、\*\*\* $p$  < 0.001。



**Figure 20** TCR シグナル強度の違いによる表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数への影響

(A) WT マウスと SKG マウスの耳表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞内の Syk の発現をフローサイトメトリーにより解析した。1つのシンボルは1匹のマウスを示す。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=4。(B) 16-19日齢のWTマウスとSKGマウスの耳表皮の *Skint1*

(左)、*Il-15* (中央) および *Il-15ra* (右) の mRNA 発現量を qRT-PCR を用いて解析した。

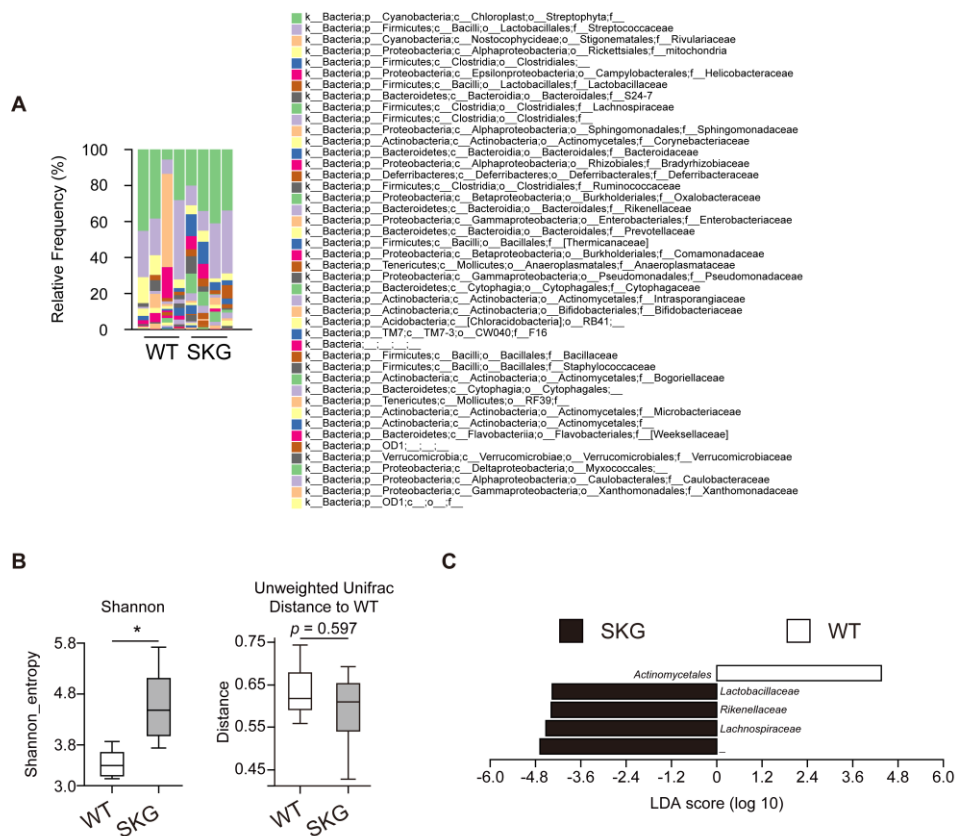
実験は3回行い、代表的なデータを示した。n=3。(C) 成体のWTマウス、SKG/+マウス、SKGマウスの耳表皮 V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は2回行い、代表的なデータを示した。n=3-6。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。

成中間体を認識しており<sup>67,68</sup>、細菌叢がそのリガンドの供給を担うため無菌 (Germ-free; GF) マウスでは MAIT 細胞が著しく減少する<sup>67,69</sup>。また、作用機序は不明だが、IL-17<sup>+</sup>γδT 細胞も GF マウスの皮膚では減少する<sup>70</sup>。

また、SKG マウスは元々関節炎を自然発症するマウスとして同定<sup>54</sup>されたが、コンベンショナルな環境下では関節炎を発症するのに対して SPF 環境下では発症せず、SPF 環境下での発症を誘導するためには微生物の菌体成分のβ-glucan が重要である<sup>71</sup>。加えて GF マウスや抗生物質を与えたマウスではβ-glucan を投与しても関節炎を発症しないことから<sup>72,73</sup>、その発症には腸内細菌叢が関与しており、SKG マウスではその細菌叢の変化が発症に繋がっている可能性がある。以上の事から、SKG マウスでは皮膚細菌叢の変化により DETC の細胞数が影響を受けている可能性を考えた。

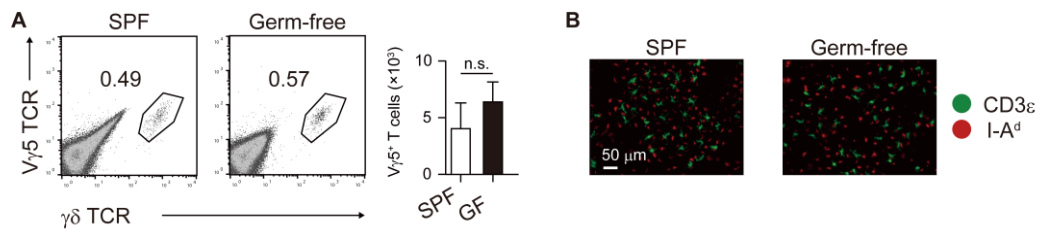
そこで、まず SKG マウスの皮膚細菌叢の 16S rRNA シーケンシングを行い、細菌叢の変化を調べた。細菌叢の指標としては1つのサンプルにおける細菌種の多様性を示すα多様性、および2つのサンプル間の細菌叢の組成の違いを示すβ多様性を検討した。その結果、SKG マウスではα多様性が高く、β多様性は WT マウスと差は見られなかったことから (**Fig. 21A and B**)、SKG マウスでは WT マウスに比べ細菌種が多様である一方で、その細菌叢の組成に大きな差は無いことが考えられた。また、WT マウスと比較して SKG マウスでは *Actinomycetales* (目) が少なく、*Lactobacillaceae* (科)、*Rikenellaceae* (科)、*Lachnospiraceae* (科) が多く存在していた (**Fig. 21C**)。これらの結果により WT マウスと SKG マウスでは皮膚細菌叢が異なることが示され、それが DETC の増殖に影響している可能性が示唆された。

この可能性を確認する為に、細菌叢を欠く GF マウスにおける DETC の細胞数をフローサイトメトリーにより検討したところ、SPF および GF マウス間では DETC の細胞数に差は見られなかった (**Fig. 22A**)。また、表皮免疫染色により GF マウスにおいても DETC の樹状突起の発達を観察した (**Fig. 22B**)。以上の結果から、予想に反して皮膚細菌叢の有無は DETC の形成に影響しないと考えられた。しかしながら、SKG 変異により誘導された皮膚細菌叢の乱れが DETC の形成に影響する可能性もあり、今回の実験ではその可能性を排除することはできなかった。



**Figure 21 SKG 変異による皮膚細菌叢への影響**

(A) 成体 WT マウスと SKG マウスの耳の細菌叢 (科レベル) を 16S rRNA sequencing により解析した。(B) (A) の結果から  $\alpha$  多様性および  $\beta$  多様性を解析した。 $\alpha$  多様性の解析では Shannon index を、 $\beta$  多様性の解析では unweighted UniFrac を用いた。(C) (A) の結果から各群で豊富な細菌を示した。LefSe 解析により LDA スコアを算出した。 $p$  値が 0.05 未満の項目を示した。(A-C) 実験は 2 回行い、2 回の実験結果を統合したデータを示した。 $n = 4$ 。\* $p < 0.05$ 。



**Figure 22** GF マウスにおける表皮 Vγ5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数の検証

(A) 成体の SPF マウスと Germ-free (GF) マウスの耳表皮 Vγ5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。左耳における細胞数を算出した。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。(B) 成体の SPF マウスと GF マウスの耳表皮の蛍光免疫染色を行った。表皮を抗 CD3ε 抗体 (緑色) と抗 I-A<sup>d</sup> 抗体 (赤色) を用いて染色した。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した。n = 3。スケールバーは 50 μm を示す。n.s., not significant。

## 考察

V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞は胎生期胸腺でのみ発生し、その後は表皮で DETC として増殖を続ける。先の研究から、TCR を介したシグナルがこの細胞の発生に必要であることが関連遺伝子の欠損マウスを用いた実験結果より示唆されていた。本研究において、筆者はノックアウトマウスに代え、TCR シグナルが部分的に減弱した SKG マウスを用いることで TCR 経路およびそのシグナル強度が V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生に影響することを示した。その過程で、TCR 経路は胸腺と表皮どちらにおいても V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生に働いており、一方でその必要な TCR シグナルの強度に差がある可能性を示した。

先行研究により、ZAP70<sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスと比較して皮膚の DETC は約 50%減少する一方で、胸腺の V $\gamma$ 5<sup>+</sup>T 細胞の細胞数は変化が無いことが報告されている<sup>46-48</sup>。一般的には、機能を完全に消失した ZAP70 欠失のほうが部分的に減弱した SKG 変異よりも TCR シグナルへの影響は強いと考えられる。しかしながら、今回得た結果と比較すると SKG マウスの方が ZAP70<sup>-/-</sup>マウスより胎生期胸腺 V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞および DETC への影響が強く表れている。この原因としていくつかの候補が挙げられる。1 つ目は、ZAP70<sup>-/-</sup>マウスでは Syk 発現が変化することにより TCR 経路に影響している可能性である。2 つ目に、用いたマウスの背景の違いであり、今回筆者が用いた SKG マウスは BALB/c 背景であり、先行研究で用いられた ZAP70<sup>-/-</sup>マウスは C57BL/6 背景である。この 2 つの可能性を検証するためには、BALB/c 背景の ZAP70<sup>-/-</sup>マウスを用いた検討が必要である。

胸腺における T 細胞の発生には ZAP70 と Syk が関与している。例えば、Syk は DN 細胞における TCR $\beta$ 鎖の発現に関与しており、ZAP70 は DP 細胞における正の選択に関与している<sup>74</sup>。一方で、2 つのキナーゼは重複した役割も持つ。例えば、Syk と ZAP70 のどちらかを欠失しても DP 細胞の細胞数は変化しないのに対して、両方を欠失すると DP 細胞の発生が欠損する<sup>75-78</sup>。さらに、ZAP70<sup>-/-</sup>マウスでは CD4 single positive (SP) 細胞と CD8SP 細胞が減少するが、このマウスに Syk を過剰発現させるとこれらの細胞の細胞数が回復する<sup>79</sup>。また、ZAP70 は末梢組織の T 細胞でも発現しているのに対して、Syk の発現量は低下する<sup>43</sup>。 $\gamma\delta$ T 細胞の場合も胸腺では ZAP70 と Syk の両方を発現しているが、末梢組織では Syk の発現量は低くなる<sup>45</sup>。また、ZAP70<sup>-/-</sup>マウスではなく Syk<sup>-/-</sup>マウスにおいて胸腺の $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数が減少することから、 $\gamma\delta$ T 細胞の胎生期における発生には Syk のほうが強く関与する可能性が考えられる<sup>48</sup>。以上の先行研究を踏まえると、今回示した TCR シグナル強度の閾値の違いを ZAP70 と Syk の発現と結びつけて考えることもできる。すなわち、胸腺における V $\gamma$ 5V $\delta$ 1<sup>+</sup>T 細胞の発生では ZAP70 と Syk 両方が働くため、SKG 変異があっても Syk が ZAP



70 の働きをある程度補完できる。それに対して表皮では Syk の発現が低下しているため SKG 変異の影響が強くなる。その結果、ZAP70 欠失もしくは SKG 変異マウスで胎生期胸腺よりも表皮においてより顕著な影響が出る可能性がある。

表皮には DETC に加えもう一つの免疫系細胞である LC が存在している。SKG マウスでは LC の細胞数には変化がなかったが、レクチン分子である Langerin の発現が増加していた。ヒト Langerin は HIV gp120、細菌細胞壁の  $\beta$ -glucan およびテイコ酸などの様々な病原体構成成分と結合するパターン認識受容体である<sup>80-82</sup>。そのため、SKG マウスにおける細菌叢の変化によって Langerin の発現が変化した可能性がある。これを検証するためには SKG マウスを無菌化する必要があるが、今回はそこまで至らなかった。また、一部の DETC は LC と接触しその部分に TCR が凝集していることから<sup>83</sup>、DETC が LC 上の分子と結合し直接 LC の Langerin 発現および機能を制御していることも考えられる。

胎生期胸腺の  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞で  $\gamma\delta$ TCR および CD3 $\epsilon$  の発現を検討したところ、WT と SKG マウス間で E16 では差が認められなかった。一方で、E18 においては SKG マウスでそれらの発現が低下していた。先の報告では、TNF receptor superfamily である Rank を欠失したマウスでは Skint1 の発現低下、未成熟な CD3<sup>lo</sup> $V\gamma 5$ TCR<sup>lo</sup> 細胞の蓄積および CD45RB<sup>+</sup> $V\gamma 5^+$ T 細胞の減少が起きており、また  $V\gamma 5^+$ T 細胞には Rank ligand が発現していることが示されている<sup>61</sup>。SKG マウスの場合、少なくとも胎生期胸腺における Skint1 mRNA の発現や CD45RB<sup>+</sup> $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の割合に変化が無いことから、SKG 変異により Rank および Skint1 の発現には変化が無いものと予想される。よって、SKG マウスの E18 で観察された  $\gamma\delta$ TCR および CD3 $\epsilon$  の発現の低下は TCR シグナルの低下によるものと考えられる。すなわち、 $V\gamma 5V\delta 1$ TCR からのシグナルが更なる TCR の発現を誘導していると推察できる。一方で、胎生期胸腺の  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の成熟マーカーの解析によると、WT と SKG マウス間で CD24<sup>+</sup>細胞、CD45RB<sup>+</sup>細胞の割合に差は見られなかった。 $\gamma\delta$ T 細胞を含む T 細胞の発生では TCR シグナル以外に様々な分子経路が関連している<sup>6</sup>。例えば、先述の Rank の他に、TNF superfamily である lymphotoxin を介して DP 細胞が  $\gamma\delta$ T 細胞の遺伝子発現を制御することも報告されている<sup>84</sup>。以上の事から、CD24 や CD45RB の発現制御においては TCR シグナルよりも Rank および lymphotoxin などからのシグナル経路が主要な役割を果たしていると考えられる。

成体表皮の DETC は樹状突起を有しこれを介して周囲の細胞および環境とのやり取りを行っており、またこの樹状突起上には TCR が高く発現している<sup>85</sup>。さらに、DETC は外部から刺激があると新規の樹状突起を形成することも知られている<sup>83</sup>。これらの事から、樹状突起形成にはリガンドを結合した TCR からのシグナルが必要であるとも考えられ、SKG マ

ウスでは TCR シグナルの減弱により樹状突起の形成不全が起きている可能性もある。しかし、現状では ligand はまだ同定されていないため、DETC の樹状突起形成を含む一連の経路の解明には更なる研究が必要である。ただし、GF マウスでも DETC の形成は正常に見えることから、想定できる ligand は内因性のものであると考えられる。

SKG/+マウスを用いた実験では、1 つの正常な ZAP70 アリルを有するにもかかわらず、DETC の細胞数は回復せず、SKG マウスとほぼ同程度であった。シグナル分子の機能を理解するにあたり、変異が dominant-negative/優性阻害もしくは haploinsufficiency/ハプロ不全のいずれかの作用を示すかを理解することが重要である。ZAP70 は二量体を形成しないことから、SKG 変異を持つ ZAP70 が正常な ZAP70 の dominant-negative として作用する可能性は低い。また、胎生期胸腺における  $V\gamma 5V\delta 1^+$ T 細胞の細胞数は SKG/+マウスではほぼ WT マウスと同程度であったことから、SKG/+マウスで見られた DETC の細胞数の低下は SKG 変異が dominant-negative に働いた結果による可能性は低い。よって、SKG/+マウスにおいて DETC の細胞数が回復しなかった結果は、TCR シグナルの量/強度の重要性、すなわち haploinsufficiency を示している。これまでに SOCS1 や CTLA4 等いくつかの免疫制御因子の haploinsufficiency が報告されている<sup>86,87</sup>。しかしながら、ZAP70 欠失患者は T 細胞の減少を含む免疫不全を発症するのに対して、ZAP70 変異体のヘテロ接合体保持者は発症しない<sup>88-90</sup>。そのため DETC に見られる ZAP70 の haploinsufficiency は、他のすべての T 細胞に影響するものではないと推察できる。

DETC と同様に、 $V\gamma 6^+\gamma\delta T$  細胞も胎生期胸腺においてのみ発生する。 $V\gamma 6^+\gamma\delta T$  細胞は真皮や生殖組織、脂肪組織等に存在し組織の恒常性維持に働いている。例えば、IL-17 産生と Treg 細胞の制御を介して深部体温の制御に関与する<sup>91</sup>。また、腸管に存在する  $V\gamma 7^+\gamma\delta T$  細胞は離乳期に末梢組織において成熟する<sup>92</sup>。腸管 $\gamma\delta T$  細胞は IL-22 産生の制御等を介して炭水化物の吸収・移送に関する遺伝子発現の制御に関与する<sup>93</sup>。これらの先行研究および今回の研究結果から、DETC を含む $\gamma\delta T$  細胞は胸腺内における成熟の他に末梢においても追加の成熟が行われており、それが組織における機能に影響していると考えられる。そのため、末梢における $\gamma\delta T$  細胞の成熟機構を解明することは、 $\gamma\delta T$  細胞による恒常性維持を理解するために必要であると思われる。

## 謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Koichi Sudo, Takero Todoroki, Yuyo Ka and Kazuhiko Takahara

V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 TCR signaling is required to different extents for embryonic versus postnatal development of DETCs.

*International Immunology*: dxac001., doi: 10.1093/intimm/dxac001., 2022.

本研究は京都大学大学院 生命科学研究科 高次生命科学専攻 生体応答学分野の高原和彦准教授のご指導のもと行いました。学術面、技術面に加え精神面においても多大なるご助言を頂き心から感謝申し上げます。

Germ-free マウスを給与していただいた実験動物中央研究所の Dr. Yuyo Ka に心よりお礼の意を表します。

本研究を進めるうえで多大な協力をしていただいた本研究室の方々に厚くお礼を申し上げます。

最後に、経済的・精神的な支えとして見守ってくれた家族に深く感謝いたします。

2022年1月5日

京都大学大学院 生命科学研究科  
高次生命科学専攻 生体応答学分野所属

須藤 恒一

## 参考文献

- 1 Hirano, M. *et al.* Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature* **501**, 435-438, doi:10.1038/nature12467 (2013).
- 2 Kidman, J. *et al.* Characteristics of TCR Repertoire Associated With Successful Immune Checkpoint Therapy Responses. *Front. Immunol.* **11**, doi:10.3389/fimmu.2020.587014 (2020).
- 3 Heilig, J. S. & Tonegawa, S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* **322**, 836-840, doi:10.1038/322836a0 (1986).
- 4 Garman, R., Doherty, P. & Raulet, D. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell* **45**, 733-742, doi:10.1016/0092-8674(86)90787-7 (1986).
- 5 Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88-100, doi:10.1038/nri3384 (2013).
- 6 Hosokawa, H. & Rothenberg, E. How transcription factors drive choice of the T cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 162-176, doi:10.1038/s41577-020-00426-6 (2020).
- 7 Parker, M. E. & Ciofani, M. Regulation of gammadelta T Cell Effector Diversification in the Thymus. *Front. Immunol.* **11**, 42, doi:10.3389/fimmu.2020.00042 (2020).
- 8 Xiong, N., Kang, C. & Raulet, D. H. Positive selection of dendritic epidermal  $\gamma\delta$  T cell precursors in the fetal thymus determines expression of skin-homing receptors. *Immunity* **21**, 121-131, doi:10.1016/j.immuni.2004.06.008 (2004).
- 9 Munoz-Ruiz, M. *et al.* TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.* **17**, 721-727, doi:10.1038/ni.3424 (2016).
- 10 Correa, I. *et al.* Most  $\gamma\delta$  T cells develop normally in  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 653-657, doi:10.1073/pnas.89.2.653 (1992).
- 11 Bigby, M. *et al.* Most  $\gamma\delta$  T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules. *J. Immunol.* **151**, 4465-4475 (1993).
- 12 Willcox, B. & Willcox, C.  $\gamma\delta$  TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery. *Nat. Immunol.* **20**, 121-128, doi:10.1038/s41590-018-0304-y (2019).
- 13 Asarnow, D. M. *et al.* Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* **55**, 837-847 (1988).
- 14 Kuziel, W. A. *et al.* Regulation of T-cell receptor gamma-chain RNA expression in murine Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Nature* **328**, 263-266, doi:10.1038/328263a0 (1987).
- 15 Witherden, D. *et al.* The Junctional Adhesion Molecule JAML Is a Costimulatory Receptor for Epithelial  $\gamma\delta$  T Cell Activation. *Science* **329**, 1205-1210, doi:10.1126/science.1192698 (2010).

- 16 Witherden, D. *et al.* The CD100 Receptor Interacts With Its Plexin B2 Ligand to Regulate Epidermal  $\gamma\delta$  T Cell Function. *Immunity* **37**, 314-325, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.026 (2012).
- 17 Whang, M., Guerra, N. & Raulet, D. Costimulation of dendritic epidermal  $\gamma\delta$  T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J. Immunol.* **182**, 4557-4564, doi:10.4049/jimmunol.0802439 (2009).
- 18 Jameson, J. *et al.* A role for skin  $\gamma\delta$  T cells in wound repair. *Science* **296**, 747-749, doi:10.1126/science.1069639 (2002).
- 19 Girardi, M. *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by  $\gamma\delta$  T cells. *Science* **294**, 605-609, doi:10.1126/science.1063916 (2001).
- 20 Crawford, G. *et al.* Epithelial damage and tissue  $\gamma\delta$  T cells promote a unique tumor-protective IgE response. *Nat. Immunol.* **19**, 859-870, doi:10.1038/s41590-018-0161-8 (2018).
- 21 Havran, W. L. & Allison, J. P. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* **335**, 443-445, doi:10.1038/335443a0 (1988).
- 22 Havran, W. & Allison, J. Origin of Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal cells of adult mice from fetal thymic precursors. *Nature* **344**, 68-70, doi:10.1038/344068a0 (1990).
- 23 Ikuta, K. *et al.* A Developmental Switch in Thymic Lymphocyte Maturation Potential Occurs at the Level of Hematopoietic Stem Cells. *Cell* **62**, 863-74, doi:10.1016/0092-8674(90)90262-d (1990).
- 24 Leclercq, G., Plum, J., Nandi, D., De Smedt, M. & Allison, J. P. Intrathymic differentiation of V $\gamma$ 3 T cells. *J. Exp. Med.* **178**, 309-315 (1993).
- 25 Kawai, K. *et al.* Impaired development of V gamma 3 dendritic epidermal T cells in p56lck protein tyrosine kinase-deficient and CD45 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J. Exp. Med.* **181**, 345-349, doi:10.1084/jem.181.1.345 (1995).
- 26 Lewis, J. M. *et al.* Selection of the cutaneous intraepithelial  $\gamma\delta^+$  T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat. Immunol.* **7**, 843-850, doi:10.1038/ni1363 (2006).
- 27 Boyden, L. M. *et al.* Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal  $\gamma\delta$  T cells. *Nat. Genet.* **40**, 656-662, doi:10.1038/ng.108 (2008).
- 28 Turchinovich, G. & Hayday, A. C. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon- $\gamma$ -secreting versus interleukin-17-secreting  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* **35**, 59-68, doi:10.1016/j.immuni.2011.04.018 (2011).
- 29 Payer, E., Elbe, A. & Stingl, G. Circulating CD3<sup>+</sup>/T cell receptor V gamma 3<sup>+</sup> fetal murine thymocytes home to the skin and give rise to proliferating dendritic epidermal T

- cells. *J. Immunol.* **146**, 2536-2543 (1991).
- 30 Gentek, R. *et al.* Epidermal gammadelta T cells originate from yolk sac hematopoiesis and clonally self-renew in the adult. *J. Exp. Med* **215**, 2994-3005, doi:10.1084/jem.20181206 (2018).
- 31 Elbe, A. *et al.* Maturation steps of bone marrow-derived dendritic murine epidermal cells. Phenotypic and functional studies on Langerhans cells and Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal cells in the perinatal period. *J. Immunol.* **143**, 2431-2438 (1989).
- 32 Kawai, K. *et al.* Requirement of the IL-2 receptor  $\beta$  chain for the development of V $\gamma$ 3 dendritic epidermal T cells. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 961-965, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00214.x (1998).
- 33 De Creus, A. *et al.* Developmental and functional defects of thymic and epidermal V $\gamma$ 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J. Immunol.* **168**, 6486-6493 (2002).
- 34 Jabri, B. & Abadie, V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 771-783, doi:10.1038/nri3919 (2015).
- 35 Taniguchi, T. & Minami, Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* **73**, 5-8, doi:10.1016/0092-8674(93)90152-g (1993).
- 36 Noguchi, M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* **73**, 147-157, doi:10.1016/0092-8674(93)90167-o (1993).
- 37 Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. & Tagaya, Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-547, doi:10.1016/s1074-7613(02)00429-6 (2002).
- 38 Schlickum, S. *et al.* Integrin  $\alpha_E$ (CD103) $\beta_7$  influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* **112**, 619-625, doi:10.1182/blood-2008-01-134833 (2008).
- 39 Mallick-Wood, C. A. *et al.* Conservation of T cell receptor conformation in epidermal  $\gamma\delta$  cells with disrupted primary V $\gamma$  gene usage. *Science* **279**, 1729-1733 (1998).
- 40 Hara, H. *et al.* Development of dendritic epidermal T cells with a skewed diversity of  $\gamma\delta$ TCRs in V $\delta$ 1-deficient mice. *J. Immunol.* **165**, 3695-3705 (2000).
- 41 Komori, H. K. *et al.* Cutting edge: dendritic epidermal  $\gamma\delta$  T cell ligands are rapidly and locally expressed by keratinocytes following cutaneous wounding. *J. Immunol.* **188**, 2972-2976, doi:10.4049/jimmunol.1100887 (2012).
- 42 Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J. & Kazi, J. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **6**, 412, doi:10.1038/s41392-021-00823-w (2021).

- 43 Chan, A. *et al.* Differential expression of ZAP-70 and Syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J. Immunol.* **152**, 4758-4766 (1994).
- 44 Chan, A., Iwashima, M., Turck, C. & Weiss, A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-662, doi:10.1016/0092-8674(92)90598-7 (1992).
- 45 Mallick-Wood, C. A. *et al.* Disruption of epithelial  $\gamma\delta$  T cell repertoires by mutation of the Syk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9704-9709 (1996).
- 46 Kadlecsek, T. A. *et al.* Differential requirements for ZAP-70 in TCR signaling and T cell development. *J. Immunol.* **161**, 4688-4694 (1998).
- 47 Endo, Y., Ishikawa, O. & Negishi, I. Zeta-chain-associated protein-70 molecule is essential for the proliferation and the final maturation of dendritic epidermal T cells. *Exp. Dermatol.* **14**, 188-193, doi:10.1111/j.0906-6705.2005.00264.x (2005).
- 48 Muro, R. *et al.*  $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program. *J. Clin. Invest.* **128**, 415-426, doi:10.1172/jci95837 (2018).
- 49 Noraz, N. *et al.* Alternative antigen receptor (TCR) signaling in T cells derived from ZAP-70-deficient patients expressing high levels of Syk. *J. Biol. Chem.* **275**, 15832-15838, doi:10.1074/jbc.M908568199 (2000).
- 50 Gelfand, E., Weinberg, K., Mazer, B., Kadlecsek, T. & Weiss, A. Absence of ZAP-70 prevents signaling through the antigen receptor on peripheral blood T cells but not on thymocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1057-1065, doi:10.1084/jem.182.4.1057 (1995).
- 51 Toyabe, S., Watanabe, A., Harada, W., Karasawa, T. & Uchiyama, M. Specific immunoglobulin E responses in ZAP-70-deficient patients are mediated by Syk-dependent T-cell receptor signalling. *Immunology* **103**, 164-171, doi:10.1046/j.1365-2567.2001.01246.x (2001).
- 52 Enyedy, E. *et al.* Fc $\epsilon$  receptor type I  $\gamma$  chain replaces the deficient T cell receptor  $\zeta$  chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **44**, 1114-1121, doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1114::AID-ANR192>3.0.CO;2-B (2001).
- 53 Krishnan, S. *et al.* Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. *J. Immunol.* **181**, 8145-8152, doi:10.4049/jimmunol.181.11.8145 (2008).
- 54 Sakaguchi, N. *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426**, 454-460, doi:10.1038/nature02119 (2003).
- 55 Takeuchi, Y., Hirota, K. & Sakaguchi, S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. *Immunol. Rev.* **294**, 164-176,

- doi:10.1111/imr.12841 (2020).
- 56 Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **37**, 852-857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9 (2019).
- 57 Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60 (2011).
- 58 Caux, C. *et al.* Respective involvement of TGF- $\beta$  and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34<sup>+</sup> progenitors. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 781-791, doi:10.1002/jlb.66.5.781 (1999).
- 59 Jameson, J. M., Cauvi, G., Witherden, D. A. & Havran, W. L. A keratinocyte-responsive  $\gamma\delta$  TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J. Immunol.* **172**, 3573-3579 (2004).
- 60 Wencker, M. *et al.* Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nat. Immunol.* **15**, 80-87, doi:10.1038/ni.2773 (2014).
- 61 Roberts, N. A. *et al.* Rank signaling links the development of invariant  $\gamma\delta$  T cell progenitors and Aire<sup>+</sup> medullary epithelium. *Immunity* **36**, 427-437, doi:10.1016/j.immuni.2012.01.016 (2012).
- 62 Takaba, H. & Takayanagi, H. The mechanisms of T cell selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 805-816, doi:10.1016/j.it.2017.07.010 (2017).
- 63 Azzam, H. S. *et al.* CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* **188**, 2301-2311 (1998).
- 64 Johnston, J. *et al.* Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8705-8709, doi:10.1073/pnas.92.19.8705 (1995).
- 65 Szabo, S. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669, doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3 (2000).
- 66 Ivanov, I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133, doi:10.1016/j.cell.2006.07.035 (2006).
- 67 Treiner, E. *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164-169, doi:10.1038/nature01433 (2003).
- 68 Legoux, F. *et al.* Microbial metabolites control the thymic development of mucosal-associated invariant T cells. *Science* **366**, 494-499, doi:10.1126/science.aaw2719 (2019).
- 69 Constantinides, M. *et al.* MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science* **366**, doi:10.1126/science.aax6624 (2019).
- 70 Naik, S. *et al.* Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals.



- Science* **337**, 1115-1119, doi:10.1126/science.1225152 (2012).
- 71 Yoshitomi, H. *et al.* A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J. Exp. Med.* **201**, 949-960, doi:10.1084/jem.20041758 (2005).
- 72 Rehaume, L. *et al.* ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2780-2792, doi:10.1002/art.38773 (2014).
- 73 Maeda, Y. *et al.* Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 2646-2661, doi:10.1002/art.39783 (2016).
- 74 Palacios, E. & Weiss, A. Distinct roles for Syk and ZAP-70 during early thymocyte development. *J. Exp. Med.* **204**, 1703-1715, doi:10.1084/jem.20070405 (2007).
- 75 Cheng, A. *et al.* Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* **378**, 303-306, doi:10.1038/378303a0 (1995).
- 76 Turner, M. *et al.* Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298-302, doi:10.1038/378298a0 (1995).
- 77 Negishi, I. *et al.* Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* **376**, 435-438, doi:10.1038/376435a0 (1995).
- 78 Cheng, A. *et al.* The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9797-9801, doi:10.1073/pnas.94.18.9797 (1997).
- 79 Gong, Q. *et al.* Restoration of thymocyte development and function in zap-70<sup>-/-</sup> mice by the Syk protein tyrosine kinase. *Immunity* **7**, 369-377, doi:10.1016/s1074-7613(00)80358-1 (1997).
- 80 de Jong, M. *et al.* C-type lectin Langerin is a  $\beta$ -glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol. Immunol.* **47**, 1216-1225, doi:10.1016/j.molimm.2009.12.016 (2010).
- 81 van Dalen, R. *et al.* Langerhans Cells Sense Staphylococcus aureus Wall Teichoic Acid through Langerin To Induce Inflammatory Responses. *mBio* **10**, e00330-00319, doi:10.1128/mBio.00330-19 (2019).
- 82 de Witte, L. *et al.* Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* **13**, 367-371, doi:10.1038/nm1541 (2007).
- 83 Chodaczek, G., Papanna, V., Zal, M. A. & Zal, T. Body-barrier surveillance by epidermal  $\gamma\delta$  TCRs. *Nat. Immunol.* **13**, 272-282, doi:10.1038/ni.2240 (2012).
- 84 Silva-Santos, B., Pennington, D. J. & Hayday, A. C. Lymphotoxin-mediated regulation of  $\gamma\delta$  cell differentiation by  $\alpha\beta$  T cell progenitors. *Science* **307**, 925-928,

- doi:10.1126/science.1103978 (2005).
- 85 Chodaczek, G., Toporkiewicz, M., Zal, M. & Zal, T. Epidermal T Cell Dendrites Serve as Conduits for Bidirectional Trafficking of Granular Cargo. *Front. Immunol.* **9**, doi:10.3389/fimmu.2018.01430 (2018).
- 86 Hadjadj, J. *et al.* Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency. *Nat. Commun.* **11**, 5341, doi:10.1038/s41467-020-18925-4 (2020).
- 87 Kuehn, H. *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* **345**, 1623-1627, doi:10.1126/science.1255904 (2014).
- 88 Elder, M. *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**, 1596-1599, doi:10.1126/science.8202712 (1994).
- 89 Chan, A. *et al.* A novel human autoimmune syndrome caused by combined hypomorphic and activating mutations in ZAP-70. *J. Exp. Med.* **213**, 155-165, doi:10.1084/jem.20150888 (2016).
- 90 Chan, A. *et al.* ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**, 1599-1601, doi:10.1126/science.8202713 (1994).
- 91 Kohlgruber, A. *et al.*  $\gamma\delta$  T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat. Immunol.* **19**, 464-474, doi:10.1038/s41590-018-0094-2 (2018).
- 92 Di Marco Barros, R. *et al.* Epithelia Use Butyrophilin-like Molecules to Shape Organ-Specific  $\gamma\delta$  T Cell Compartments. *Cell* **167**, 203-218.e217, doi:10.1016/j.cell.2016.08.030 (2016).
- 93 Sullivan, Z. A. *et al.*  $\gamma\delta$  T cells regulate the intestinal response to nutrient sensing. *Science* **371**, doi:10.1126/science.aba8310 (2021).