

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2005～2008

課題番号：17209039

研究課題名（和文）皮膚ランゲルハンス細胞活性化分子の機能解析とその治療への応用

研究課題名（英文）Investigation of Langerhans cell stimulatory molecule and its application in skin disease therapy

研究代表者

玉置 邦彦 (TAMAKI KUNIHICO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号 30010432

研究成果の概要：樹状細胞の成熟を促進する新規遺伝子(GeneA(仮))をマウスランゲルハンス細胞(LC)を用いた cDNA サブトラクション法により見出した。さらに GeneA が CD40 の発現を促進し、樹状細胞からの IL-12 産生を促進する事により、Th1 系反応の誘導に寄与する可能性が示唆された。今後、腫瘍免疫や初期免疫の誘導に GeneA を応用する可能性について引き続き検討して行く。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2006 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ランゲルハンス細胞、樹状細胞、共刺激分子

1. 研究開始当初の背景

皮膚 LC は採取できる細胞数に限りがあるため、これまで成熟 LC と未成熟 LC とでの representative differential analysis が行なえていなかった。また、他の樹状細胞と LC とでは、例えば LC は比較的 LC 特異的とされるランゲリン蛋白を発現するなど、異なる特徴を有しており、LC においてこの解析を行なう事により、これまで樹状細胞を用いて行なわれていた representative differential analysis において報告されてきた結果と異

なる分子が見つかる可能性があった。我々は純度の高い十分数の LC をマウス皮膚より panning 法にて採取できるようになったため、この手技を用いて LC の成熟を促進する新規の活性化分子を見出すこととした。

2. 研究の目的

LC の成熟にかかわる新規の活性化分子を見出し、in vitro, in vivo でのその分子の役割について解析する。さらには、この分子を用いて、各種皮膚疾患治療への臨床応用の道筋を

つけることが目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚より panning 法により、高純度の未成熟な LC を分離精製し、GM-CSF により成熟 LC とし、suppressive subtractive hybridization (SSH) 法により、成熟 LC で特に発現が増強している新規遺伝子を同定、クローニングする。

(2) 新規遺伝子 (Gene A(仮)) のコードする蛋白 Protein A に対するペプチド抗体を精製する。

(3) 臓器別、細胞別での Gene A mRNA と Protein A の発現解析を real time PCR, 免疫染色、フローサイトメトリー、免疫プロットにて行なう。

(4) Protein A を樹状細胞で強発現させ、共刺激分子発現や樹状細胞の機能などへの影響を検討する。

4. 研究成果

(1) SSH 法により、LC の成熟に関連する遺伝子で特に発現が増強している新規遺伝子 Gene A (仮) を同定、クローニングした。今回の我々の SSH 法を用いた結果においては、この他に成熟に関連する遺伝子としてランゲリンが一番多いコピー数で検出されており、ランゲリンは LC の成熟に伴ってその発現が低下することが既知であるため、今回の実験結果の信憑性が高い事が示唆された。

(2) 新規遺伝子 (Gene A(仮)) のコードする蛋白 Protein A (仮) の C 末端ペプチドに対するペプチド抗体を精製した。作成したペプチド抗体が免疫染色、免疫プロット、フローサイトメトリーで使用できるかどうかを GeneA を強制発現させた COS-1 細胞を用いて確認した。フローサイトメトリーの結果から、抗体認識部位は細胞内にあることもわかった。

(3) Gene A は臓器別の real time PCR にて、成熟した樹状細胞 (dendritic cells:DC) の集まる末梢リンパ節での発現が有意に高かった。この他、リンパ組織としては脾臓においても高い発現を認めた。また、細胞別では LC のみならず、脾臓 DC や骨髄由来 DC (BMDC) においてもコルヒチンや LPS 刺激による成熟に伴い、発現が増強し、この発現増強は蛋白レベルでも免疫染色とフローサイトメトリーにて確認された。特にコルヒチンにおいてはその刺激濃度依存性に CD40 の発現増強もみられた。T 細胞 cell line (EL4) や B 細胞 cell line (A20) では Protein A の発現は免疫プロットで

確認できず、以上の結果から、Gene A が比較的樹状細胞特異的に発現する遺伝子であり、LC のみならず、他の DC においてもその成熟に関与する分子であることが示唆された。

(4) BMDC において、Protein A の発現亢進が細胞表面の CD40 の発現亢進とよく相関していると思われる、また、無刺激のマウス BMDC cell line (DC2.4) に Gene A をエレクトロポレーションを用いて、強制発現させたところ、CD40 の細胞表面での発現亢進を認めた。この CD40 の発現亢進が生体内において意味を持つものであるかどうかを検討するため、Gene A を強制発現させた DC2.4 を抗 CD40 抗体と IFN- γ 存在下で培養し、Gene A を強制発現させなかった場合とで IL-12 p40 産生を比較した。予想通り、Gene A を強制発現させた DC2.4 においてより多くの IL-12 p40 産生を認めた。以上から Gene A は樹状細胞の成熟に関連する遺伝子あると同時に、CD40 の発現亢進を促し、樹状細胞からの IL-12 産生を促進する事により、Th1 系反応の誘導に寄与する可能性が示唆された。これらの結果は将来的に樹状細胞を用いた腫瘍免疫療法において、この分子を樹状細胞に強制発現させることによる新たな抗腫瘍免疫療法の開発の可能性を示唆するものとする。また、全く新規の分子であるため、今後様々な皮膚疾患における発現を検討し、それぞれの皮膚疾患の治療にも応用していきたいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

(1) Kagami S, Saeki H, Tsunemi Y, Nakamura K, Kuwano Y, Komine M, Nakayama T, Yoshie O, Tamaki K. CCL27-transgenic mice show enhanced contact hypersensitivity to Th2, but not Th1 stimuli. Eur J Immunol. 38 巻, 647-657, 2008, 査読有り

(2) Watanabe R, Fujimoto M, Ishiura N, Kuwano Y, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, Sato S, Tedder TF, Tamaki K. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. Am J Pathol. 171 巻, 560-570, 2007. 査読有り

(3) Fujita H, Asahina A, Komine M, Tamaki K. The direct action of 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 on purified

mouse Langerhans cells. Cell Immunol. 245 巻、70-79、2007. 査読有り

(4) Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Tamaki K. Involvement of the constitutive complex formation of c-Ski/SnoN with Smads in the impaired negative feedback regulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma fibroblasts. Arthritis Rheum. 56巻、1694-1705、2007. 査読有り

(5) Komine M, Karakawa M, Takekoshi T, Sakurai N, Minatani Y, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Asahina A, Tamaki K. Early inflammatory changes in the "perilesional skin" of psoriatic plaques: is there interaction between dendritic cells and keratinocytes? J Invest Dermatol. 127巻、1915-1922、2007. 査読有り

(6) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Nagakubo D, Nakayama T, Yoshie O, Kagami S, Shimazu K, Kadono T, Sugaya M, Komine M, Matsushima K, Tamaki K. CCL17 transgenic mice show an enhanced Th2-type response to both allergic and non-allergic stimuli. Eur J Immunol. 36巻、2116-2127、2007. 査読有り

(7) Hoashi T, Muller J, Vieira WD, Rouzaud F, Kikuchi K, Tamaki K, Hearing VJ.

The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers. J Biol Chem. 281巻、21198-21208、2006. 査読有り

(8) Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Tamaki K. Increased expression of integrin alphavbeta5 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. Am J Pathol. 168巻、499-510、2006. 査読有り

(9) Fujimoto M, Kuwano Y, Watanabe R, Asashima N, Nakashima H, Yoshitake S,

Okochi H, Tamaki K, Poe JC, Tedder TF, Sato S. B cell antigen receptor and CD40 differentially regulate CD22 tyrosine phosphorylation. J Immunol. 176巻、873-879、2006. 査読有り

(10) Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. J Immunol. 175巻、7708-7718、2005. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

(1) Tamaki K: Invited lecture: Langerhans cells and Toll-like receptors. 10th International Workshop on Langerhans cells. Sep 2-4, 2007. Bern, Switzerland.

(2) Tamaki K: Symposium: Basic and Clinical Allergology. World Congress of Dermatology. October 1-5, 2007. Buenos Aires Argentina

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉置 邦彦 (TAMAKI KUNHIKO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30010432

(2) 研究分担者

朝比奈 昭彦 (ASAHINA AKIHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教授
研究者番号: 50202601

小宮根 真弓 (KOMINE MAYUMI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00282632

渡邊 孝宏 (WATANABE TAKAHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 30280960

多田 弥生 (TADA YAYOI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00334409

(3)連携研究者
なし