

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09742

研究課題名(和文) 紫外線皮膚炎症の終息における表皮ランゲルハンス細胞・アポトーシス細胞の役割

研究課題名(英文) The role of epidermal Langerhans cells and apoptotic cells in the termination of UV-induced cutaneous inflammation

研究代表者

福永 淳 (Fukunaga, Atsushi)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10467649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線による皮膚障害は急性反応としては「日焼け」として観察される。「日焼け」は皮膚癌の発症リスクとなる。本研究では「日焼け」による皮膚炎症反応の終息機序に関して、皮膚の最外層に存在する表皮ランゲルハンス細胞(LC)と「日焼け」によりアポトーシスに陥った角化細胞の役割に焦点をあてた。本研究により紫外線による皮膚炎症反応の抑制に表皮LCとアポトーシスに陥った角化細胞が役割を果たし、アポトーシスに陥った角化細胞をLCが貪食することで炎症抑制性のシグナルを体内に伝達していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Skin disorders caused by ultraviolet are observed as "sunburn" as an acute reaction. "Sunburn" is a risk factor of developing skin cancer. In this study, we focused on the role of epidermal Langerhans cells (LCs) and the UV-induced apoptotic keratinocyte in the outermost layer of the skin in relation to the termination of the UV-induced cutaneous inflammation. This study demonstrated that LC and apoptotic keratinocytes plays a role in suppression of UV-induced cutaneous inflammation. The inflammatory suppression mechanism and signal are mediated by LC phagocytosis of apoptotic keratinocytes.

研究分野：Dermatology

キーワード：紫外線 炎症 ランゲルハンス細胞 アポトーシス 貪食 角化細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚は様々な外的危険因子に曝露している。その中でも太陽光中の紫外線(ultraviolet light;UV)は最も普遍的なストレスであるが、炎症惹起と共に免疫抑制を誘導できる特異な特徴を有する。免疫抑制の側面としては、臨床的にUV治療器を用いて乾癬などの皮膚疾患の治療が行われている。炎症惹起の側面としては、UVの過度の照射による生じる急性皮膚障害があり臨床的に「サンバーン」、「日光皮膚炎」、「日焼け」として観察される。サンバーンは主にUVの中波長紫外線であるUVBにより生じるとされており、マウスではUVBを照射することでUV誘導性皮膚炎症(紫外線皮膚炎症)として観察できる。一方、最近になり、紫外線皮膚炎症がメラノーマや非メラノーマの皮膚癌発症や転移に関与することが報告されてきている(Bald T et al. Nature. 2014;507:109-113)。紫外線皮膚炎症は、UVがDNA、蛋白、脂質に酸化的損傷を与えることに引き続いて角化細胞から産生される各種IL-1などのサイトカイン、IL-6などのケモカイン、プロスタグランジン、TLR3,4(Bernard JJ et al. Nat Med. 2012;18:1286-90)などが関与し、好中球を中心とした炎症細胞が皮膚に浸潤することで生じる。一方、UVBの照射により紅斑が生じた部位の表皮にはアポトーシスに陥った角化細胞であるサンバーン細胞が観察される。しかし、「日焼け」として観察される紫外線皮膚炎症における表皮ランゲルハンス細胞(LC)やアポトーシス細胞の果たす役割は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

紫外線皮膚障害の代表として紫外線皮膚炎症の終息機序の解明に着目して研究をすすめる。研究代表者は紫外線皮膚炎症が単なる一次刺激性の炎症ではなく、特にその制御に免疫担当細胞が関与していると推察しており、細胞レベルでは特にLCとサンバーン細胞の役割に着目して研究をすすめる。さらに光線過敏症は日光照射によって皮膚炎が遷延、増悪する疾患の総称であるが、紫外線皮膚炎症の終息が遅延、増強したマウスは光線過敏症のモデルマウスになりえるのではないかと考えている。加えて、免疫抑制性サイトカインであるIL-10、制御性T細胞の紫外線皮膚炎症における役割についても着目して研究をすすめる。

3. 研究の方法

(1)マウスUV誘導性皮膚炎症モデルにおけるLCの役割の検討

研究代表者は、LC欠損マウスを用いてUVB照射した際に表皮LCがリンパ節へと遊走しNKT細胞を活性化することで抗原特異的なUV誘導性免疫抑制を誘導することを過去に報告している(Fukunaga A et al. J Immunol. 2010;185:4633-4640)。他にも、LCではなく

真皮樹状細胞が接触過敏反応などの抗原特異的免疫反応の誘導に必須の役割を果たす事(Fukunaga A et al. J Immunol. 2008;180:3057-3064)、LCの表皮からリンパ節への遊走にLC上に発現しているSIRP- α が重要な役割を果たす事(Fukunaga A et al. J Immunol. 2004;172:4091-4099)などを報告しており、LCを含む皮膚樹状細胞の研究を多数行ってきている。

LC欠損マウスを用いて紫外線皮膚炎症が増強、遷延することを観察するために、LC欠損マウスと野生型マウスにUVBを照射しそれぞれのマウスにおける耳介腫脹反応の経時的な変化を観察する。紫外線皮膚炎症ではTNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10などのサイトカイン、ケモカインが上昇することが知られているため、紫外線照射したLC欠損マウス皮膚におけるこれらの発現を検討する。マウスにUVBを照射するとUVによりCPDや6-4光産物などのDNA損傷が生じるが、LC欠損マウスにおけるこれらDNA損傷の修復についても検討を行う。

(2)マウスUV誘導性皮膚炎症モデルにおけるアポトーシス細胞の役割の検討

マウスにUVBを照射すると角化細胞がアポトーシスに陥り、HE染色にてサンバーン細胞として観察されるが、LC欠損マウスと野生型マウスにおけるアポトーシス細胞の経時的な変化をTUNEL法とcleaved caspase-3の発現をFACSでみることにより検討する。

抗アポトーシス剤であるbroad spectrumのカスパーズ阻害剤であるQ-VD-OPhをマウスに前投与することでサンバーン細胞の形成を阻害できるかを観察する。野生型マウスにカスパーズ阻害剤を前投与し紫外線皮膚炎症を観察する。加えて、LC欠損マウスに対してもカスパーズ阻害剤を前投与し紫外線皮膚炎症を観察する。これらの実験系において、紫外線炎症惹起皮膚における炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を検討する。

(3)UV誘導性アポトーシス角化細胞とLCの相互作用の検討、LCによるアポトーシス角化細胞の貪食に関する検討

UVB照射した表皮シートをマウスより回収し、*ex vivo*にてorgan cultureし培養液中に遊走したLCがアポトーシスに陥った角化細胞を貪食していることを蛍光顕微鏡もしくはFACSにて証明する。さらにUVB照射後に培養液中に遊走したLCがIL-10を含めた抗炎症性サイトカインを産生するかを検討する。同organ cultureの実験系ではLC欠損マウス由来の表皮シートと野生型由来の表皮シートの観察を行うことでこの実験系におけるLCの役割を検討する。Organ cultureの実験系にカスパーズ阻害剤を加える事で、アポトーシス細胞のこの実験系における役割を検討できる。

4. 研究成果

(1)LCによるUV誘導性皮膚炎症の遷延の抑制

まず Lang-DTR-EGFP マウス にジフテリアトキシン (DT) を投与しその1日後に表皮 LC と真皮ランゲリン陽性樹状細胞が欠損していること、さらに投与14日後においては表皮 LC が欠損した状態であるが真皮ランゲリン陽性樹状細胞が回復してきていることを確認しこのモデルが LC 欠損モデルマウスであることを確認した。このモデルを用い LC 欠損マウスと LC を欠損させていないマウス (LC 正常マウス) に UVB 照射し炎症反応の違いを耳介腫脹反応として確認した。UVB 照射早期の炎症反応には違いはなかったが、照射後期 (5-10 日目) の炎症反応が LC 正常マウスと比較して LC 欠損マウスでは遷延していたことを観察した。

このモデルで真皮への炎症細胞浸潤を UVB 照射8日目と比べると CD3+, F4/80+, CD11c+ 細胞の浸潤が LC 欠損マウスでは有意に増加していることを観察し、さらにサイトカイン発現においては LC 欠損マウスでは UVB 照射後の IL-10 の産生、発現上昇が LC 正常マウスと比較して減弱していることを観察した。

以上の結果により、LC が IL-10 などの抑制性サイトカインの発現を介して UVB 誘導性皮膚炎症の遷延の抑制に寄与していることが確認された。

(2)アポトーシスに陥った角化細胞による UV 誘導性皮膚炎症の遷延の抑制

LC 欠損マウスと LC 正常マウスにおけるアポトーシス細胞の経時的な変化を TUNEL 法と表皮懸濁液の cleaved caspase-3 の発現を FACS でみることにより検討した。UVB 照射12時間後の TUNEL 陽性アポトーシス細胞は LC 欠損マウスと LC 正常マウスにおいて有意な差は見られなかったが、24時間後の TUNEL 陽性アポトーシス細胞は LC 欠損マウスにおいて有意に増加していた。さらに表皮懸濁液における cleaved caspase-3、pan-cytokeratin 陽性のアポトーシスに陥った角化細胞も LC 欠損マウスにおいて有意に増加していた。以上の経時的な結果により、LC がアポトーシスに陥った角化細胞のクリアランスにおいて役割を果たしていることが示唆された。

次に、抗アポトーシス剤である broad spectrum のカスパーゼ阻害剤である Q-VD-OPh をマウスに前投与し UVB 照射を行うと TUNEL 陽性細胞は著明に減少したため Q-VD-OPh が抗アポトーシス効果を in vivo でも発揮することが確認された。野生型マウスにおいての Q-VD-OPh の投与は LC 欠損マウスと類似した経時的な変化で UV 誘導性炎症反応を遷延させることが判明した。さらに Q-VD-OPh の投与後に UVB を照射した野生型マウスでは TNF- α や IL-6 の産生が増強し、IL-10 の産生が抑制されていた。

以上の結果により、アポトーシスに陥った細

胞は UVB 誘導性皮膚炎症の遷延の抑制に寄与していることが示唆された。

(3)LC とアポトーシスに陥った角化細胞の相互作用が UV 誘導性皮膚炎症の遷延を抑制する

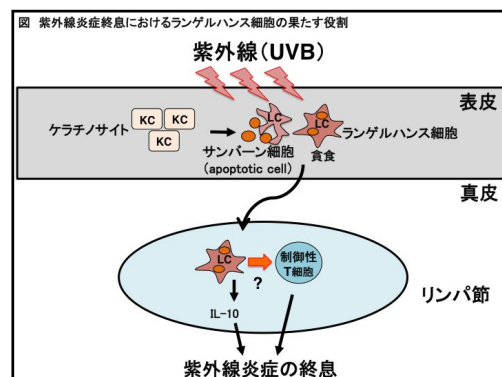
アポトーシスに陥った細胞の UVB 誘導性皮膚炎症の遷延の抑制と LC の関係を明らかにするために、LC 欠損マウスに Q-VD-OPh を投与し UVB 誘導性皮膚炎症を観察した。LC 欠損マウスにおいては Q-VD-OPh を投与した際の UVB 誘導性皮膚炎症の遷延は観察されなかった。以上の結果から、LC とアポトーシス細胞の相互作用が UVB 誘導性皮膚炎症の遷延を抑制に必須であることが確認された。

(4)LC によるアポトーシスに陥った角化細胞の貪食による UV 誘導性皮膚炎症の遷延抑制

上記の(2)と(3)の結果から LC とアポトーシス細胞の相互作用に LC によるアポトーシスに陥った角化細胞の貪食が関与する可能性を我々は推察した。UVB 照射した耳介表皮シートを organ culture し培養液中に遊走した LC がアポトーシスに陥った角化細胞を貪食していることをフローサイトメトリーと蛍光顕微鏡で確認することに成功した。LC が角化細胞を貪食することを直接観察したのは本研究が初であると認識している。

さらに貪食阻害剤である Cytochalasin D をマウスに投与し UVB 照射した耳介表皮シートを organ culture したところ LC がアポトーシスに陥った角化細胞を貪食しにくいことを確認した。Cytochalasin D を投与した貪食阻害状態にある LC 正常マウスでは UVB 誘導性皮膚炎症は遷延したが、LC 欠損マウスでは UVB 誘導性皮膚炎症は遷延しにくかった。以上の結果により、LC が UVB 照射によりアポトーシスに陥った角化細胞を貪食することが UVB 誘導性皮膚炎症の遷延を抑制に重要な働きをもつことが示唆された。

下記に本研究から得られた UV 皮膚炎症の終息における LC の果たす役割を図示する。



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9件)

Kawakami Y, Gokita M, Fukunaga A, Nishigori C. A refractory case of adrenergic urticaria successfully treated with clonazepam. *J Dermatol*. 2015;42:635-7. 査読あり

Hatakeyama M, Fukunaga A, Washio K, Ogura K, Yamada Y, Horikawa T, Nishigori C. Addition of lafutidine can improve disease activity and lead to better quality of life in refractory cholinergic urticaria unresponsive to histamine H1 antagonists. *J Dermatol Sci*. 2016;82:137-9. 査読あり

Tajima S, Fukunaga A, Nishigori C. A case of atorvastatin-induced solar urticaria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2016;32:317-319. 査読あり

Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Fukunaga A, Yamaguchi T, Emoto T, Yodoi K, Matsumoto T, Nakajima K, Kita T, Takeda M, Mizoguchi T, Hayashi T, Sasaki Y, Hatakeyama M, Taguchi K, Washio K, Sakaguchi S, Malissen B, Nishigori C, Hirata KI. Ultraviolet B Exposure Prevents Atherosclerosis by Regulating Immuno-inflammatory Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:66-74. 査読あり

Washio K, Fukunaga A, Hatakeyama M, Oda Y, Ogura K, Horikawa T, Nishigori C. Clinical characteristics in cholinergic urticaria with palpebral angioedema: report of 15 cases. *J Dermatol Sci*. 2017;85:135-137. 査読あり

Fukunaga A, Tajima S, Sasayama T, Tanaka K, Takahashi Y, Nishigori C. Hypothalamic-pituitary germinoma presenting as generalized hypohidrosis. *Eur J Dermatol*. 2017;27:297-299. 査読あり

Hayashi T, Sasaki N, Yamashita T, Mizoguchi T, Emoto T, Amin HZ, Yodoi K, Matsumoto T, Kasahara K, Yoshida N, Tabata T, Kitano N, Fukunaga A, Nishigori C, Rikitake Y, Hirata KI. UVB Exposure Inhibits Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Expanding CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T cells. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(9). pii: e007024. doi: 10.1161/JAHA.117.007024. 査読あり

Hatakeyama M, Fukunaga A, Washio K, Taguchi K, Oda Y, Ogura K, Nishigori C. Anti-inflammatory Role of Langerhans Cells and Apoptotic Keratinocytes in UVB-induced Cutaneous Inflammation. *J Immunol*. 2017;199:2937-2947. 査読あり

ランゲルハンス細胞と紫外線-炎症制御における役割- 西日本皮膚科 80巻 2号 P 97-101, 2018年(総説) 査読なし

〔学会発表〕(計8件)

Atsushi Fukunaga, Shinji Tsuchiyama, Kasumi Lee, Chikako Nishigori, Takahiko Horiuchi The relationship between complement levels and disease activity in Japanese nine cases with hereditary angioedema caused by an inherited deficiency of C1-inhibitor (HAE-C1-INH) HAE Global Conference 2016 発表場所:マドリッド(スペイン)

Atsushi Fukunaga, Michihiro Hide, Hae-Sim Park, Atsushi Igarashi, Young-Min Ye, Tae-Bum Kim, Akiko Yagami, Joo Young Roh, Jae-Hyun Lee, Yuko Chinuki, Sang Woong Youn, Soo-Keol Lee, Naoko Inomata, Jeong-Hee Choi, Hiroyuki Fujita, for the POLARIS clinical study group Efficacy and safety of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria: results from a Phase III study in Japan and Korea (POLARIS study) 4th Eastern Asia Dermatology Congress 発表場所:幕張(千葉県)

Mayumi Hatakeyama, Atsushi Fukunaga, Ken Washio, Kumiko Taguchi, Chikako Nishigori Antiinflammatory role of Langerhans cells and apoptotic keratinocytes in UVB-induced cutaneous inflammation 日本研究皮膚科学会第40回年次学術大会・総会 発表場所:岡山(岡山)

Khalil S, Hide M, Park HS, Igarashi A, Ye YM, Kim TB, Yagami A, Roh JY, Lee JH, Chinuki Y, Youn SW, Lee SK, Inomata N, Choi JH, Fukunaga A, Wang J, Matsushima S, Greenberg S Efficacy and safety of omalizumab in Japanese and Korean patients with chronic spontaneous/idiopathic (CIU/CSU) urticaria Results from the Phase III POLARIS study 2017 AAD Annual Meeting 発表場所:オーランド(アメリカ)

Atsushi Fukunaga, Shinji Tsuchiyama, Kasumi Lee, Chikako Nishigori, Takahiko Horiuchi The relationship between complement levels and disease

activity in Japanese cases with hereditary angioedema with C1-inhibitor (C1INH) gene mutation. 2017 SID Annual Meeting 発表場所:ポートランド(アメリカ)

Michihiro Hide, Atsushi Fukunaga, Junichi Maehara, Fumiyasu Yamamoto, James Hao, Moshe Vardi, Jennifer Schranz, Yuji Nomoto A Phase III Open-Label Study of Icatibant for Acute Attacks in Japanese Patients With Type I/II Hereditary Angioedema. The EAACI Congress 2017 発表場所:ヘルシンキ(フィンランド)

佐々木 直人、林 友鴻、福永 淳、錦織 千佳子、山下 智也、平田 健一、力武 良行 紫外線照射による動脈硬化抑制効果の検討 第39回日本光医学・光生物学会 発表場所:名古屋(愛知)

佐々木 直人、溝口 泰司、福永 淳、錦織 千佳子、山下 智也、平田 健一、力武 良行 紫外線照射は制御性T細胞の誘導を介して心筋梗塞の予後を改善させる 第39回日本光医学・光生物学会 発表場所:名古屋(愛知)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 淳 (Fukunaga, Atsushi)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10467649

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

畠山 真弓 (Hatakeyama Mayumi)
鷲尾 健 (Washio Ken)