

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09777

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎におけるToll様受容体の役割の解明とそれに基づく新治療法の開発

研究課題名(英文) Toll-like receptor 3 increase chronic contact hypersensitivity induced by repeated application of haptens.

研究代表者

嶋岡 理沙 (Mineoka, Risa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80464585

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)：TLR3ノックアウトマウス(Tlr3 KO)と、Wild Typeマウス(WT)の腹部をハプテンで感作した後、耳介に2日毎にTNCBを反復塗布して慢性接触皮膚炎を誘発した。Tlr3KOマウスでは慢性接触皮膚炎の反応が減弱され、遅延型反応から即時型反応への反応形態の移行が遅くなった。また、血清のtotal IgEや、組織中のIL-4、IL-10、IL-33等の炎症性サイトカインの発現が減少した。これらの結果より、TLR3のシグナルは、アトピー性皮膚炎で見られるような慢性のアレルギー性炎症の進展に関与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests that Toll-like receptor (TLR)-3 signaling is involved in non-infectious inflammatory reactions. The exact role of TLR3 in AD remains to be defined. The purpose of this study was to investigate the role of TLR3 in chronic contact hypersensitivity reactions induced by repeated elicitation, resembling the features of AD. Wild-type (WT) and Toll-like receptor 3 knockout (Tlr3 KO) mice were sensitized, and chronic contact hypersensitivity reactions were elicited in their ear skin via repeated application of a hapten, 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) or oxazolone. The Tlr3 KO mice exhibited less ear swelling, less leukocyte infiltration into the skin, and lower serum total IgE levels than WT mice after hapten challenge. The Tlr3 KO mice also displayed lower expression levels of inflammatory cytokines in their TNCB-treated ear skin than WT mice. The results showed that TLR3 deficiency suppressed the development of chronic contact hypersensitivity reactions.

研究分野：皮膚科学、アレルギー学

キーワード：アトピー性皮膚炎 Toll様受容体

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚は外界に接する臓器であり、さまざまな病原体と接する機会があり、自然免疫が病原体の初期認識に重要な役割を果たしている。自然免疫では病原体固有に存在する構造、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識し、哺乳類では Toll-like receptor (TLR) が PAMPs を認識する主な受容体であることが知られている。近年、ウイルス由来二本鎖 RNA を認識する TLR3 はウイルス感染だけでなく、アレルギー性疾患や薬疹、創傷治癒への関与も明らかにされてきている。最近、我々は TLR3 がアレルギー性および刺激性接触皮膚炎を増強させることを報告した。

アトピー性皮膚炎は痒痒を伴う湿疹病変が増悪と寛解を繰り返す慢性の皮膚疾患であり、その病態形成には皮膚のバリア機能異常と免疫反応異常が関わっていると考えられている。アトピー性皮膚炎患者では、溶連菌やブドウ球菌による伝染性膿痂疹などの細菌感染症、単純ヘルペス感染が広範囲に拡大するカポジ水痘様発疹症などのウイルス感染症をしばしば合併し、それに伴い湿疹病変が悪化することを経験する。したがって病原体に対する自然免疫がアトピー性皮膚炎の病態に関与している可能性が推測される。

### 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎のような皮膚の慢性炎症においても TLR3 が深く関与している可能性を考え、慢性接触皮膚炎における TLR3 の役割について解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

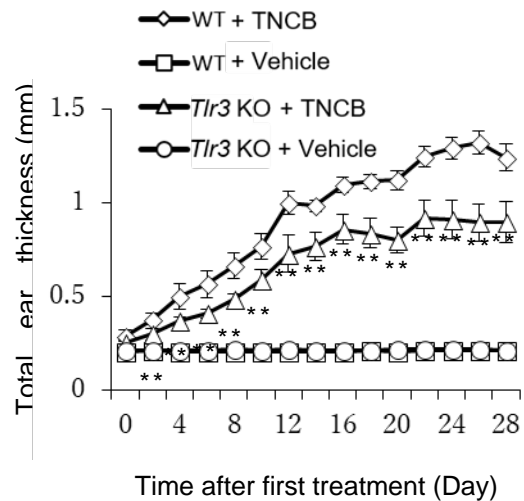
TLR3 ノックアウトマウス (Tlr3 KO) と、Wild Type マウス (WT) の腹部をハプテン (2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene : TNCB) で感作した後、耳介に 2 日毎に TNCB を反復塗布して慢性接触皮膚炎を誘発した。両群マウスの耳介厚の経日変化を day30 まで測定した。また、day0, 8, 14, 20, 28 には誘発後の耳介腫脹厚の経時変化を測定した。そして、day8, 30 に耳介組織と血清を採取し、耳介の組織所見、浸潤細胞数、血清 total IgE、組織中のサイトカインである interleukin (IL) -33, IL-4, IL-10, IL-2, interferon (IFN)  $\gamma$  を評価した。

### 4. 研究成果

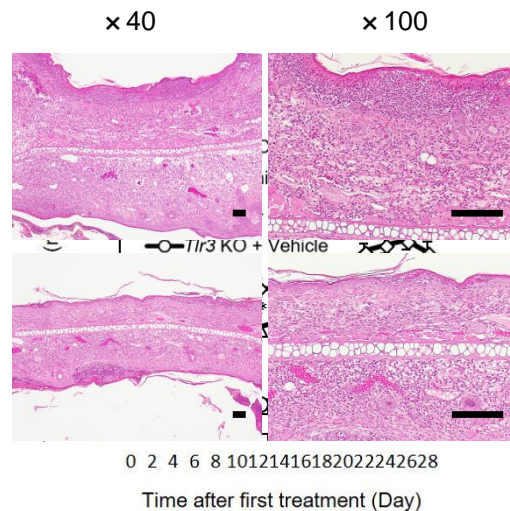
マウスの耳介厚の経日変化を比較したところ、WT で著しく増加したのに対し、Tlr3 KO では有意に抑制された。また、day0, 8, 14, 20, 28 における経時的な耳介の腫脹パターンを比較したところ、Tlr3 KO では遅延型 (Th1 優位型) から即時型 (Th2 優位型) への移行が WT よりも遅かった。腫脹パターンの差は day8 において顕著であった。また、day8, 30 における耳介組織の病理所見を比較すると、いずれの時点においても表皮の肥厚、組織の

浸潤細胞数ともに WT に比べ Tlr3 KO で抑制されていた。

#### < 耳の肥厚 >



#### < 皮膚炎の組織学的所見 >



血清の total IgE を測定したところ、day0 では両群に差はなかったが、day8 では WT に比較して Tlr3KO で有意に抑制されていた。Day30 では両群とも著明に上昇し、差を認めなかった。

アレルギー性皮膚炎に関与するサイトカインの発現を、day8 の耳介組織においてリアルタイム PCR で評価した。Th1 サイトカインとして、IFN- $\gamma$ 、IL-2、Th2 サイトカインとして、IL-4、IL-10、IL-13、IL-33、TSLP を測定した。Tlr3KO の耳介組織における IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 の mRNA 発現は、ハプテン塗布 3h、6h 後に有意に抑制されていた。IL-2、IL-13 の mRNA 発現は、有意差はなかったが Tlr3KO において抑制される傾向にあった。また、IL-33 の mRNA 発現は Tlr3KO において 0h では有意に上昇していたが、6h では有意に抑

制されていた。さらに、IL-33 の耳介組織における蛋白量を ELISA で測定したところ、Tlr3KO では WT に比較し抑制されていた。また、培養したヒト角化細胞を Poly(I:C)を用いて TLR3 刺激したところ、IL-33 の mRNA 発現が上昇した。

以上の結果をまとめると、Tlr3KO マウスでは慢性接触皮膚炎の反応が減弱され、遅延型反応から即時型反応への反応形態の移行が遅くなった。また、血清の total IgE や、組織中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-33 等の炎症性サイトカインの発現が減少した。これらの結果より、TLR3 のシグナルは、アトピー性皮膚炎 (AD) で見られるような慢性のアレルギー性炎症の進展に参与していることが考えられた。

TLR3 は上皮細胞や線維芽細胞、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、T 細胞等に発現していることが知られているが、我々の過去の報告より TLR3KO マウスと WT マウスのマクロファージや樹状細胞、肥満細胞、リンパ球の機能に差はなく、今回の AD マウスモデルにおいてもケラチノサイトや線維芽細胞の TLR3 シグナルがアレルギー性炎症の進展に参与していることが考えられた。

IL-33 は主に上皮細胞から産生され、Th2 細胞や好酸球、肥満細胞を介して 2 型反応を誘導するサイトカインである。近年 AD における IL-33 の関与や、IL-33 がフィラグリンの発現を抑制し皮膚のバリア機能を低下させる等の報告があり、IL-33 は AD の炎症反応において重要な役割を担っていることが考えられる。今回の研究で、TLR3KO マウスにおける耳介組織中の IL-33 の mRNA 発現や蛋白レベルは抑制され、また IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 等のサイトカインの発現も抑制されていた。さらにヒト角化細胞の TLR3 刺激により IL-33 の産生が誘導された。これらの結果より、TLR3 のシグナルは皮膚からの IL-33 放出を介して慢性アレルギー性炎症に参与している可能性が推察された。

TLR3 のシグナルは AD の様な慢性アレルギー性皮膚炎の進展に深く関与しており、TLR3 は AD の新たな治療標的となり得る可能性があると考えられた。

#### 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 1 件)

Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N. Toll-like receptor 3 increase chronic contact hypersensitivity induced by repeated application of hapten. J Dermatol Sci 2017, 88, 184-191. 査読有

##### [学会発表](計 2 件)

Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M,

Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N. Toll-like receptor 3 increase chronic contact hypersensitivity induced by repeated application of hapten. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Sendai, Japan, 2016.

Tamagawa-Mineoka R. The role of Toll-like receptor 3 in allergic and nonallergic skin inflammation. 2nd International Stevens-Johnson Syndrome Symposium. Kyoto, Japan, 2017.

##### [図書](計 1 件)

Tamagawa-Mineoka R, et al. Springer. Skin Stress Response Pathways, 2016, 235.

##### [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

嶋岡 理沙 (MINEOKA, Risa)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：80464585

##### (2) 研究分担者

上田 真由美 (UETA, Mayumi)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：60398386

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )