

平成 21 年 4 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591295

研究課題名 (和文)

マウス接触皮膚炎モデルでの炎症発症機序における ASK-1 の関与

研究課題名 (英文)

The role of ASK-1 in the pathogenesis of murine contact dermatitis

研究代表者

相場 節也 (AIBA SETSUYA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80159269

研究成果の概要：

細胞内 Redox の異常と p38 mitogen activated protein kinase の活性化とをつなぐ分子としてよく知られている ASK-1 分子のノックアウトマウスを用いて、ハプテン塗布後の樹状細胞の活性化ならびに所属リンパ節への遊走における ASK-1 分子の重要性を明らかにした。また、この結果は、我々がこれまで提唱してきた接触皮膚炎の感作相における細胞内 redox 変化と p38 MAPK の活性化の役割を示唆する結果であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：ランゲルハンス細胞、樹状細胞、接触皮膚炎、ハプテン、ASK-1,

1. 研究開始当初の背景

接触過敏症反応(contact hypersensitivity reaction, CHS)は、ヒトにおける接触皮膚炎のマウスモデルとして古くから研究が進められてきている。CHSの作用機序は、大別してハプテンの塗布から抗原特異的エフェクター細胞が形成されるまで(抗原感作相)と、抗原をチャレンジして耳介の腫脹を起こす炎症期(炎症惹起相)とに区別される。特に感作相においては、ハプテンが何らかのメカニズムを用いて樹状細胞を活性化し、活性化

された樹状細胞が所属リンパ節へ遊走しナイーブT細胞を抗原特異的に刺激すると考えられてきた。しかし、化学物質が樹状細胞により刺激をうけるメカニズムは、かならずしも明らかにされていない。私たちは、これまでに、ハプテンによる樹状細胞の活性化に、ハプテンによる細胞内チオール基の酸化、それに続くp38 mitogen activated protein kinaseの活性化が重要な役割をはたしていることを明らかにしてきた。しかし、近年、樹状細胞の活性化には、ハプテンなどの化学物

質によりストレスを受けた表皮細胞からの danger signal が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。Danger signal には、細胞が放出する ATP、尿酸、HMGB-1 などが知られている。そこで、感作相における樹状細胞の活性化のメカニズムをさらに明らかにする目的で、細胞内の酸化ストレスと p38 MAPK の活性化の橋渡しをする分子である Ask-1 のノックアウトマウスを用いて接触皮膚炎における Ask-1 の役割を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

接触皮膚炎の感作相における樹状細胞活性化における Ask-1 の役割の解明

3. 研究の方法

(1) ハプテン塗布後の表皮内ランゲルハンス細胞の動態の解析

ASK-1^{-/-}マウスと wild type マウスの耳介にハプテン (DNFB, TNCB, FITC など) を外用し、24, 48 時間後に表皮シートを作製し、蛍光色素標識抗体 [免疫活性表面抗原 (CD40, CD80, CD86, classII)、免疫調節性表面抗原 (B7-H1, PD-L2)、Langerin など] で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。また、得られた表皮から single cell suspension を作製し、上記の抗体で染色後、フローサイトメトリーで抗原の発現程度を定量した。

(2) ハプテン塗布後の樹状細胞の動態の解析
次に、蛍光色素であるハプテン (FITC ないし TRITC) を ASK-1^{-/-} マウスと wild type マウスとの体幹部に塗布し、経時的に所属リンパ節を採取しリンパ節内の蛍光色素陽性細胞を CD11c 抗体で染色しフローサイトメトリーをもちい FITC 陽性細胞数を計測した。また、その際同時に CD40, CD86 などの共刺激分子の発現も検討した。

(3) 培養樹状細胞を用いたハプテン刺激後の ASK-1^{-/-}マウスと wild type マウスの応答性の違い

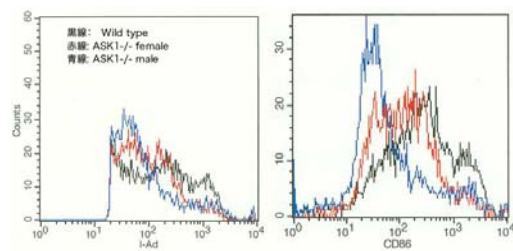
in vivo で見いだされた ASK-1^{-/-}マウスと wild type マウスのハプテンに対する応答性の違いを明らかにする目的で、骨髓由来樹状細胞を GM-CSF と IL-4 を用いて誘導し、それらの樹状細胞を NiCl₂, DNCB などのハプテンで刺激し表面マーカー (CD40, CD80, CD86, classII) の違いを flow cytometry で観察した。

4. 研究成果

(1) ハプテン刺激に対する ASK-1^{-/-}マウス表皮ランゲルハンス細胞の低応答
マウス耳介皮膚にハプテンを塗布し、経時的に表皮ランゲルハンス細胞を Ia 抗体で染色

したところ、wild type マウスでは、経時的に表皮内ランゲルハンス細胞の数が減少したのに対し、ASK-1^{-/-}マウスでは、その減少が観察されなかった。また、表皮内ランゲルハンス細胞の樹状細胞の活性化マーカーの一つである Ia 抗原と CD86 分子の発現を flow cytometry にて観察したところ ASK-1^{-/-}マウスで Ia 抗原、CD86 分子の発現増強の低下が認められた。

図 1. Wild type マウスと ASK-1^{-/-}マウス表皮ランゲルハンス細胞のハプテン塗布後の Ia 抗原、CD86 分子の発現



(2) ASK-1^{-/-}マウスにおけるハプテン塗布後の所属リンパ節における樹状細胞数の減少
次に、腹部にハプテンを塗布した後、経時的に所属リンパ節の樹状細胞数を計測したところ、ASK-1^{-/-}マウスにおいて所属リンパ節に遊走してくる樹状細胞の低下が明らかとなった。

表 2. ハプテン塗布後の所属リンパ節の総細胞数と樹状細胞数の比較

TNCB	Total (x 10 ⁷)	CD86+CD11C+
+/+ A/O	3.8	1259
+/+ TNCB	2.72	1584
-/- A/O	2.2	2380
-/- TNCB	5.2	1005
DNFB	Total (x 10 ⁷)	CD86+CD11C+
+/+ A/O	1.28	67
+/+ DNFB	2.4	188
-/- A/O	1.92	30
-/- DNFB	5.04	80

また、樹状細胞の CD80 分子、CD86 分子、Ia 抗原の発現低下も ASK-1^{-/-}マウスにおいて認められた。

表 2. ハプテン塗布後の所属リンパ節における樹状細胞の%と表面マーカーの発現比較

mice	処置	CD11c+CD86+ (%)	Mean (CD86)
+/+	A/O	4.6	24
	DNFB	6.4	73
-/-	A/O	5	23
	DNFB	4	23

mice	処置	Iab+CD86+ (%)	Mean (Ia)
+/+	A/O	26	105
	DNFB	29	115
-/-	A/O	29	85
	DNFB	24	83

mice	処置	CD11c+ CD80+ (%)	Mean (CD80)
+/+	A/O	4	71
	DNFB	6.9	117
-/-	A/O	5.6	69
	DNFB	24	82

(3) ASK-1^{-/-}マウス培養樹状細胞における樹状細胞成熟促進と刺激に対する反応性の増強

次に、マウスの骨髄より造血幹細胞を採取し、それを GM-CSF と IL-4 の存在下に培養し骨髄由来樹状細胞に分化させた。これら樹状細胞に NiCl₂、DNFB を添加し、樹状細胞の成熟を wild type マウスと ASK-1^{-/-}マウスとで比較したところ、予想外に ASK-1^{-/-}マウスで樹状細胞の成熟抑制促進とハプテン刺激後の反応性の増強が認められた。

表 3. 培養樹状細胞におけるハプテン刺激後の CD86 分子の発現の比較

Exp 1.	+/+		-/-	
	(%)	Mean	(%)	Mean
Non-treated	46	30	68	59
100 μM NiCl ₂	51	31	69	68
300 μM NiCl ₂	68	64	69	79
DNBS 1 mM	40	24	57	47
DNBS 3 mM	47	39	60	61

Exp 2.	+/+		-/-	
	(%)	Mean	(%)	Mean
Non-treated	70	105	74	99
100 μM NiCl ₂	66	81	78	205
300 μM NiCl ₂	80	150	74	176
DNBS 1 mM	66	97	71	148
DNBS 3 mM	73	146	82	249

(4) まとめと考察

以上の結果より、ハプテン刺激後の樹状細胞の活性化における ASK-1 分子の重要性が明らかになった。ASK-1 分子は、細胞内の redox 変化と p38 MAPK の活性化とをつなぐ分子であることから、この研究結果は、ハプテンによる樹状細胞の活性化に redox 変化が重要な役割をはたしていること、また、p38 MAPK がそれを樹状細胞の活性化に結びつけるシグナル分子であることが示唆された。

一方、培養樹状細胞においては、in vivo の観察と全く異なった結果が得られた。この原因に関しては、現在、検討中である。

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 7 件)

- ① Sasaki Y, Ohtani T, Ito Y, Mizuashi M, Nakagawa S, Furukawa T, Aiba S (2009) Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. *Int Arch Allergy Immunol* 148:239-250. (査読有り)
- ② Ohtani T, Mizuashi M, Nakagawa S, Sasaki Y, Fujimura T, Okuyama R, Aiba S (2009) TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* 126:485-499. (査読有り)
- ③ Ohtani T, Memezawa A, Okuyama R, Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, Aiba S (2009) Increased Hyaluronan Production and Decreased E-Cadherin Expression by Cytokine-Stimulated

Keratinocytes Lead to Spongiosis Formation. *J Invest Dermatol*. 126:1412-1420. (査読有り)

- ④ Hirota M, Suzuki M, Hagino S, Kagatani S, Sasaki Y, Aiba S, et al. (2009) Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocytic cell line THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate. *J Toxicol Sci* 34:139-150. (査読有り)
- ⑤ Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S (2008) Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 158:1256-1263. (査読有り)
- ⑥ Sasaki Y, Aiba S (2007) Dendritic cells and contact dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33:27-34.
- ⑦ Aiba S (2007) Dendritic cells: importance in allergy. *Allergol Int* 56:201-208.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Saito R, Ohara H, Numata M, Tada M, Aiba S. (2008 年 5 月 15 日) Search for biomarkers to evaluate immunotoxicity of chemicals by gene expression analysis. International Investigative Dermatology 2008.
- ② Kagatani S, Sasaki Y, Mizuashi M, Suzuki M, Hirota M, Itagaki S, Aiba S. (2008 年 5 月 15 日) The decrease of cell-surface thiols in dendritic cells treated by chemicals augments their CD86 expression, a possible role in CD maturation by haptens. International Investigative Dermatology 2008.
- ③ Fujimura T, Okuyama T, Hideka T, Ito Y, Aiba S. (2008 年 5 月 15 日) Profiles of Foxp3+ regulatory T-cells (Tregs) in Bowen's disease and squamous cell carcinoma. International Investigative Dermatology 2008.
- ④ Aiba S. (2007 年 8 月 22 日) The molecular basis of skin sensitization -How do haptens stimulate the immune system?. 6Th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.
- ⑤ Kagatani S, Sasaki Y, Mizuashi M, Hirota M, Aiba S (2007 年 8 月 22 日) Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated dendritic cells. 6Th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.
- ⑥ Suzuki M, Hirota M, Hagino S, Itagaki H,

Aiba S (2007 年 8 月 22 日) Construction of decision tree of in vitro sensitization assay using changes of cell surface thiols as biomarker (SH test). 6Th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.

- ⑦ Hirota M, Suzuki M, Hagino S, Kagatani S, Sasaki Y, Aiba S. (2007 年 8 月 22 日) Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated THP-1 cells. 6Th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences.
- ⑧ Aiba S. (2007 年 6 月 3 日) Dendritic cells as a biosensor. The 15th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology.
- ⑨ Fujimura T, Ito Y, Aiba S. (2007 年 5 月 9 日) A synthetic Nod2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys (L18) and IFN-beta synergistically stimulate the maturation of dendritic cells with augmented IL-12 production and suppress the growth of established B16F10 melanoma. 68th Annual Meeting, The Society for Investigative Dermatology.
- ⑩ Hidaka T, Fujimura T, Ito Y, Aiba S. (2007 年 5 月 9 日) The immunohistological demonstration of cutaneous CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in psoriasis, spongiotic dermatitis, and mycosis fungoides. 68th Annual Meeting, The Society for Investigative Dermatology.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相場 節也 (AIBA SETSUYA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80159269

(2) 研究分担者

大谷 朋之 (OHTANI TOMOYUKI)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：20400319
佐々木 喜教 (SASAKI YOSINORI)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：60431566

