

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19790410

研究課題名（和文）マウス接触性過敏反応におけるエストロゲンによるエフェクターリンパ球の機能増強

研究課題名（英文）Estrogen promotes the activity of effector memory lymphocytes in mouse contact hypersensitivity

研究代表者

坂崎 文俊 (SAKAZAKI FUMITOSHI)

摂南大学・薬学部・助手

研究者番号：90309378

研究成果の概要：女性ホルモンが接触アレルギーを増悪化する機構を解明するため、アレルギー反応で生じるリンパ球の増殖を検討した。マウスに女性ホルモンである 17 $\beta$ -estradiol を 3.2  $\mu$ g 投与し、感作物質を塗布して 7 日後、血液中のリンパ球を解析した。またリンパ球を培養して培養液中に 17 $\beta$ -estradiol を添加した。その結果、17 $\beta$ -estradiol はリンパ球の一種であるメモリーリンパ球を増加させることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	900,000	0	900,000
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	420,000	2,720,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：接触性過敏反応、女性ホルモン、リンパ球、メモリー細胞、エフェクターメモリー細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年アレルギー疾患の増加が問題となっており、その原因を疾病予防的観点から解明し対策を講じることが重要である。アレルギー疾患が増加している原因として環境アレルゲンの増加の他に、環境汚染物質の毒性によってヒトの免疫バランスが破綻する可能性が危惧されている。医薬品の免疫毒性作用を評価するためには、医薬品として用いるのに十分な量だけ当該物質を実験動物に投与して、動物に生じる異常によって *in vivo* 免疫毒性評価ができる。しかし環境汚染物質の *in vivo* 免疫毒性評価は医薬品の *in vivo* 免疫毒性

評価とは異なり、投与量と観察期間を適切に設定することが難しく、ほとんど行われていない。

免疫増強作用を有する可能性のある環境汚染物質の1つに、内分泌攪乱化学物質が考えられる。免疫機能には性差があり性周期や妊娠によって免疫関係疾患の症状が変化することがある。その要因の1つとして17 $\beta$ -estradiolの関与が考えられ、内分泌攪乱化学物質の多くは17 $\beta$ -estradiol作用を有することから、17 $\beta$ -estradiolによる免疫修飾作用メカニズムが解明されれば、内分泌攪乱化学物質による免疫毒性に関する研究に大きく貢献することが期待

される。しかし 17 $\beta$ -estradiol による詳細な免疫修飾作用機構については未解明な点が多い。

性周期のうちの卵胞期に接触性皮膚炎が増強されるという報告事例があることから、当研究室では、接触性皮膚炎のモデルであるマウス耳介接触性過敏反応に着目し、17 $\beta$ -estradiol の前投与による増強作用機構を検討してきた。これまでにを行った研究成果では、17 $\beta$ -estradiol が接触性過敏反応の初期段階および治癒段階の浮腫を増強すること、および耳介において interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、interleukin(IL)-18 および inducible nitric oxide synthase の発現量を増大させることを見出された。

また、17 $\beta$ -estradiol による IL-18 の発現増大は、背部皮膚に接触性過敏反応の感作を行ってから 7 日後、惹起前の耳介においても認められた。リンパ節では認められなかった。免疫組織染色の結果、IL-18 の発現部位は血管の存在する真皮であった。このとき耳介では全く炎症が起きておらず、感作部位から離れている。これらのことから、17 $\beta$ -estradiol の IL-18 発現増強作用には炎症の発生後に全身の皮膚に移行する細胞、すなわちエフェクターメモリーリンパ球が関与している可能性が示された。

そこで、17 $\beta$ -estradiol がエフェクターメモリーリンパ球の機能や移動を促進している可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

17 $\beta$ -estradiol のエフェクターメモリーリンパ球に対する細胞およびその機能の増強を検討する。

感作したマウスの脾臓細胞から皮膚に移行するエフェクターメモリーリンパ球とリンパ節に移行するセントラルメモリーリンパ球とを分離してそれぞれの存在比を測定し、17 $\beta$ -estradiol がエフェクターメモリーリンパ球の細胞数を増加させることを検証する。17 $\beta$ -Estradiol がリンパ球の増殖を促進しアポトーシスを抑制することを通じてエフェクターメモリーリンパ球を増加させることを検証するため、マウス脾臓から分離したエフェクターメモリーリンパ球を培養し、培養液に 17 $\beta$ -estradiol の暴露を行う。

## 3. 研究の方法

(1) *in vivo* において 17 $\beta$ -estradiol 投与がメモリーリンパ球の存在比に及ぼす影響の検討

3 週齢の雌性 BALB/c マウスから卵巣を摘出し、100  $\mu$ L のオリーブオイルに溶解した 3.2  $\mu$ g 17 $\beta$ -estradiol を皮下注射した。マウスの背側を剃毛して 3% 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (OXA) を 50  $\mu$ L 塗布してマウスを感作した。7 日間飼育後、腹部大静脈から血液を 100  $\mu$ L 採取し、溶血および洗浄後、

FITC 標識抗 CD45RA 抗体、PE 標識抗 CCR7 抗体および PE-Cy5 標識抗 CD8 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで計数した。

(2) *in vitro* において 17 $\beta$ -estradiol 投与がメモリーリンパ球の存在比に及ぼす影響の検討

無処理マウスおよび E2 投与マウスからそれぞれ脾臓細胞を採取し、concanavalin A 存在下で培養を行った。無処理マウスの脾臓細胞には 17 $\beta$ -estradiol を曝露あるいは不曝露の 2 つの条件で実験を行った。4 日後の細胞を回収してエチジウムブロマイド蛍光光度法で細胞数を測定した。また、FITC 標識抗 CD45RA 抗体、PE 標識抗 CCR7 抗体および PE-Cy5 標識抗 CD8 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで計数した。

## 4. 研究成果

(1) *in vivo* において 17 $\beta$ -estradiol 投与がメモリーリンパ球の存在比に及ぼす影響の検討

メモリー CD8<sup>+</sup>リンパ球の指標となる CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の表面抗原タンパク質を有する細胞を計数した結果、17 $\beta$ -estradiol 投与群における存在比が非投与群における存在比よりも大きかった (Fig. 1a)。

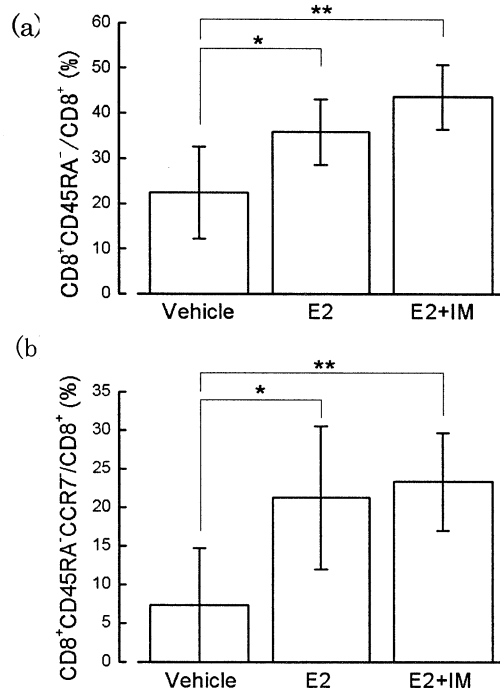


Fig. 1 感作 7 日後の血液中 CD8<sup>+</sup>リンパ球におけるメモリーリンパ球およびエフェクターメモリーリンパ球の存在比

(a) メモリーリンパ球

(b) エフェクターメモリーリンパ球

Vehicle, 対照群

E2, 17 $\beta$ -estradiol 投与群

E2+IM, 17 $\beta$ -estradiol+インドメタシン投与群

またエフェクターメモリーCD8+リンパ球の指標となる CD8+ CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>の表面抗原タンパク質を有する細胞を計数した結果、17β-estradiol 投与群における存在比が非投与群における存在比よりも大きかった(Fig. 1b)。17β-Estradiol はナイーブ CD8+リンパ球が抗原刺激を受けてメモリーCD8+リンパ球に分化する反応、あるいはセントラルメモリーCD8+リンパ球からエフェクターメモリーCD8+細胞への分化を促進して、エフェクターメモリーCD8+リンパ球を増加させることによって OXA の2回目塗布後の接触性過敏反応を増大させる可能性が示唆された。

さらに、インドメタシンを腹腔内投与した結果、メモリーリンパ球およびエフェクターメモリーリンパ球の存在比は低下しなかった(Fig. 1)。17β-Estradiol がエフェクターメモリーリンパ球の存在比を増加させる現象がインドメタシンによって阻害されなかったことから、17β-Estradiol のアレルギー増強作用はプロスタグランジン類を介していないことが示唆された。

### (3) *in vitro* において 17β-estradiol 投与が脾臓細胞の増殖に及ぼす影響の検討

17β-Estradiol がリンパ球に直接作用してエフェクターメモリーリンパ球を増加させたのか、他の細胞を介して間接的に増加させたのかを検討するため、マウスから脾臓を摘出し、リンパ球を採取して培養を行い、培養液中に 17β-Estradiol を添加した(Fig. 2)。リンパ球を concanavalin A で刺激して増殖させたところ、E2 投与マウスのリンパ球および 17β-Estradiol を曝露したリンパ球の増殖が促進された。

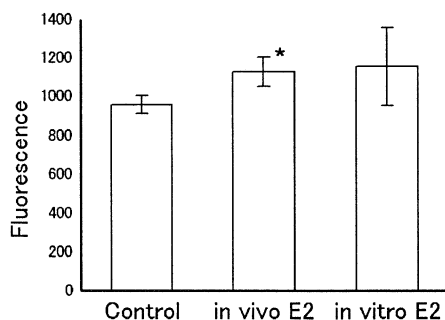


Fig. 2 脾臓細胞を Concanavalin A 刺激下で培養したときの増殖におよぼす 17β-estradiol の影響

in vivo E2…17β-Estradiol 投与マウスの脾臓細胞

in vitro E2…無投与マウスの脾臓細胞の培養液中に 17β-estradiol を曝露したもの

(4) *in vitro* において 17β-estradiol 投与がメモリーリンパ球の存在比に及ぼす影響の検討  
さらに増殖したリンパ球に含まれるセントラルメモリー細胞およびエフェクターメモリー細胞の存在比をフローサイトメトリーで測定した。その結果を Fig. 3 に示す。ナイーブ細胞およびセントラルメモリー細胞の存在比は 17β-estradiol 曝露の有無によらず同程度であったが、エフェクターメモリーリンパ球は 17β-estradiol 曝露によって増加することが見出された。

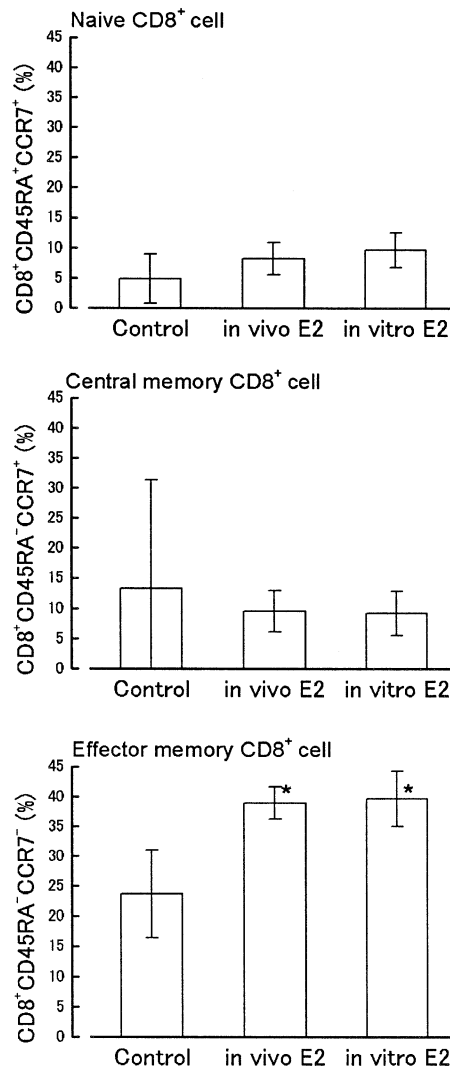


Fig. 3 培養した脾臓細胞におけるナイーブリンパ球、セントラルメモリーリンパ球およびエフェクターメモリーリンパ球の存在比

in vivo E2…17β-Estradiol 投与マウスの脾臓細胞

in vitro E2…無投与マウスの脾臓細胞の培養液中に 17β-estradiol を曝露したもの

(5) 考察

接触性過敏反応を  $17\beta$ -estradiol が増強する反応において、感作7日後の末梢血液中におけるエフェクターメモリーリンパ球の存在比が増加していることが明らかになった。ナイーブリンパ球は抗原を提示されて活性化すると、セントラルメモリーリンパ球に分化し、次いでエフェクターメモリーリンパ球に分化する。セントラルメモリーリンパ球からエフェクターメモリーリンパ球への分化を調節する機構については明らかではないため、 $17\beta$ -estradiol がどのような作用機構を介してエフェクターメモリーリンパ球を増加させたのかは不明であり、今後の研究が必要である。

Fig. 2 に示すように、無投与マウスの脾臓細胞に  $17\beta$ -estradiol を曝露して細胞数を検討した結果では、対照よりも細胞数が多い傾向が認められたが統計的有意差がなかった。一方、Fig. 3 に示すように、同条件で培養した細胞のエフェクターメモリーリンパ球の存在比を検討した結果では、対照よりも  $17\beta$ -estradiol を曝露した方がエフェクターメモリーリンパ球の存在比が統計的有意に大きい結果が得られた。 $17\beta$ -Estradiol がリンパ球におよぼす影響を検討する際に、リンパ球全体を評価するよりもエフェクターメモリーリンパ球を評価する方が鋭敏な結果が得られることが明らかになった。

以上、 $17\beta$ -estradiol はマウス接触性皮膚炎の感作段階においてエフェクターメモリーリンパ球の存在比を増加させること、その作用は *in vitro* においても確認できたことが明らかになった。環境汚染物質の及ぼす免疫毒性を評価するための *in vitro* 評価系を構築する上で重要な知見が得られたものと考えられる。

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 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 坂崎文俊, 荻野泰史, 城下 恵, 上野 仁, 中室克彦,  $17\beta$ -Estradiol がマウス接触性過敏反応時のメモリーリンパ球におよぼす影響、環境ホルモン学会 第11回研究発表会、2008年12月14日、東京

2. 坂崎文俊, 荻野泰史, 城下 恵, 上野 仁, 中室克彦,  $17\beta$ -Estradiol を投与したマウスにおける末梢血中メモリーリンパ球の増加、フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2008年10月18日、熊本

3. 坂崎文俊, 松尾真理, 知念尚恵, 上野 仁, 中室克彦, マウス接触性過敏反応の感作段階における  $17\beta$ -estradiol の増強作用、フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2007年11月1日、大阪

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂崎 文俊 (SAKAZAKI FUMITOSHI)

摂南大学・薬学部・助手

研究者番号: 90309378

(2)研究分担者

(3)連携研究者