

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790683

研究課題名（和文）皮膚で産生される TARC の皮膚炎における役割の解析

研究課題名（英文）The effect of TARC produced by epidermal keratinocytes on cutaneous inflammation

研究代表者

常深 祐一郎（TSUNEMI YUICHIRO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00361478

研究成果の概要：

これまでの研究で作成したケモカイン TARC(CCL17)を表皮で強発現するトランスジェニックマウス(CCL17-Tg マウス) (このマウスではアトピー性皮膚炎(AD)類似の反応が起きることが確認されている)を利用し、ADにおけるCCL17の役割を検討した。本研究では特に創傷治癒・リモデリングにおけるCCL17の関与に注目した。CCL17-Tgマウスでは表皮で産生されたCCL17が、線維芽細胞に作用して増殖を促進し、またNGF産生を亢進させ、その一部は肥満細胞にも作用し、これらの総和として創傷治癒を促進していると考えた。ADでは血清中CCL17やNGF濃度が上昇し、慢性病変では苔癬化(創傷治癒の一過程であるリモデリングの一種である)が生じる。よってADの苔癬化にCCL17がNGFを介して関与している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、ケモカイン、CCL17、創傷治癒、苔癬化、リモデリング、nerve growth factor、肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)ケモカインは、免疫や炎症反応において、様々な白血球の遊走や活性化を司っているペプチドの一群である。Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CC

chemokine ligand (CCL)17は、CCケモカインの1つで、CC chemokine receptor (CCR) 4のリガンドである。CCR4は、おもにTh2細胞、好塩基球に発現しており、これらの細胞の遊

走に 関与 している。CCR4 は また、macrophage-derived chemokine (MDC) (CCL22) の 受容 体 だ る。CCL17 と CCL22 は、Th2 細胞 を 選 択 的 に 炎 症 部 位 に 動 員 す る こ と に よ っ て、Th2 タ イ プ の 反 応 に 重 要 な 役 割 を 担 っ て いる。また、皮 膚 向 性 の リ ン パ 球 は、cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) と い う 分 子 を 発 現 し て お り、こ れ が 皮 膚 の 炎 症 局 所 で 発 現 が 増 強 し て いる E-selectin と 相 互 作 用 し、皮 膚 へ の 浸 潤 が お こ る と 考 え ら れ て いる。そ し て CLA 陽 性 の 皮 膚 向 性 T 細胞 は CCR4 を 発 現 し て いる こ と が 知 ら れ て いる。

(2) ア ト ピ ー 性 皮 膚 炎 (atopic dermatitis=AD) は、Th2 優 位 な 状 態 が 特 徴 だ る が、CCL17 と CCL22 は 病 変 部 に CCR4 陽 性 Th2 細胞 を 遊 走 さ せ る こ と に よ り Th2 タ イ プ の 反 応 を 引 き 起 こ し、AD の 病 態 に 重 要 な 役 割 を 果 た し て いる と 考 え ら れ て いる。

(3) AD を は じ め と す る 湿 疹 ・ 皮 膚 炎 に お い て、皮 膚 で 発 現 す る CCL17 の 関 与 と そ の 機 序 が 明 ら か に な れ ば、湿 疹 ・ 皮 膚 炎 の メ カ ニ ズ ム の 解 明 の 一 助 に な る と と も に、CCL17 の 阻 害 剤 を は じ め と し て、湿 疹 ・ 皮 膚 炎 の 治 療 薬 の 新 規 開 発 に つ な が る と 考 え ら れ る。

2 . 研 究 の 目 的

(1) 表 皮 角 化 細胞 (ケ ラ チ ノ サ イ ト) に よ っ て 産 生 さ れ る CCL17 の 意 義 を 明 ら か に す る た め、表 皮 基 底 層 に 発 現 す る keratin 14 の プ ロ モ ー タ ー 支 配 下 に、表 皮 で CCL17 を 恒 常 的 に 強 発 現 す る ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク (transgenic=Tg) マ ウ ス を 作 成 し た (以 下 CCL17-Tg マ ウ ス)。

(2) こ れ ま で の 研 究 で、こ の マ ウ ス で は、AD に 似 た 状 態 が み ら れ、こ う い っ た AD の 病 態 に CCL17 が 関 与 し て いる こ と が 示 唆 さ れ た。

(3) さ ら に 研 究 の 過 程 で、CCL17-Tg マ ウ ス で

は、創 傷 治 癒 が 促 進 し て いる 可 能 性 が で き た。

(4) 本 研 究 で は CCL17-Tg マ ウ ス で は、創 傷 治 癒 が 促 進 し て いる こ と を 確 認 し、そ の 機 序 を 明 ら か に す る こ と を 目 的 と す る。具 体 的 に は、ケ ラ チ ノ サ イ ト に よ っ て 産 生 さ れ た CCL17 が ど の 細胞 に 作 用 し、ど の よ う な サ イ ト カ イ ン や ケ モ カ イ ン が 誘 導 さ れ る の か を 検 討 す る。

(5) AD を は じ め と す る 湿 疹 ・ 皮 膚 炎 の 慢 性 病 変 で は 苔 癬 化 と い わ れ る 1 種 の 皮 膚 の リ モ デ リ ン グ が 起 こ る が、リ モ デ リ ン グ は 創 傷 治 癒 の 1 過 程 だ る の で、CCL17-Tg マ ウ ス に お け る 創 傷 治 癒 の 機 序 の 解 明 は、湿 疹 ・ 皮 膚 炎 の 苔 癬 化 の 過 程 で の CCL17 の 役 割 を 解 明 す る こ と に も な る。

3 . 研 究 の 方 法

(1) 表 皮 で CCL17 を 恒 常 的 に 強 発 現 す る ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク (CCL17-Tg) マ ウ ス (background は C57BL/6) (Tsunemi Y et al. Eur J Immunol 36: 2116-27, 2006) を 用 い て、創 傷 治 癒 お よ び そ れ に か か わ る 因 子 を non-Tg マ ウ ス と 比 較 し た。

(2) 具 体 的 な 解 析 方 法 は 「4. 研 究 成 果」 の 項 目 で、順 に 結 果 と 共 に 示 す。

4 . 研 究 成 果

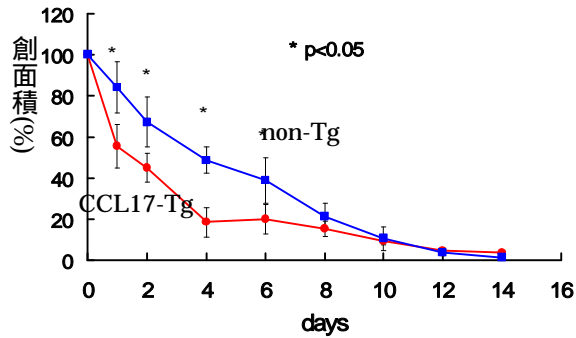
(1) 創 傷 治 癒 速 度 の 検 討

創 傷 治 癒 の モ デ ル は 過 去 の 報 告 に 従 い 作 成 し た (Yates CC et al. Am J Pathol 2007; 171:484-95.)。

CCL17-Tg マ ウ ス と non-Tg マ ウ ス の 背 部 を 剃 毛 し た 後、剪 刀 に て 直 径 1.5cm の full-thickness wound を 作 成 し た。

創 部 を デ ジ タ ル カ メ ラ で 経 時 的 に 撮 影 し、画 像 ソ フ ト を 用 い て 創 部 の 面 積 を 測 定 し た。(結 果) day1,2,4,6 に て、CCL17-Tg マ ウ ス の 方 が non-Tg マ ウ ス と 比 較 し て 有 意 に 創 面

積の縮小がみられた。

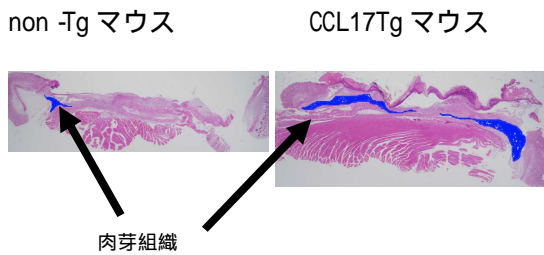


(2) 創傷治癒部位の組織の比較

創部を周囲を含めて切除し、組織標本を作成した。

(結果) day4

CCL17-Tg マウスの方が広範囲に肉芽組織が形成されている。



(結果) day7

CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスに明らかな差はない。

創下床全体に肉芽組織が広がっている。肉芽組織には線維芽細胞が多数みられる。

(結果) day10

CCL17-Tg マウスと non-Tg マウスに明らかな差はない。

肉芽組織の辺縁から膠原線維で置換されている。

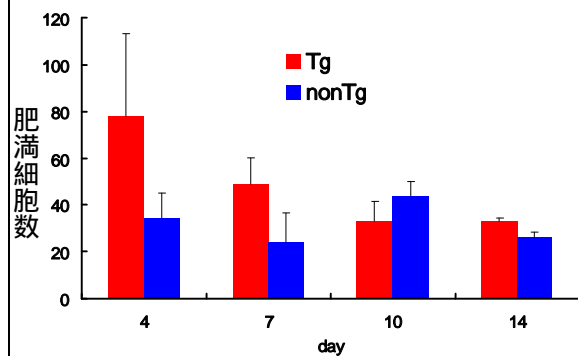
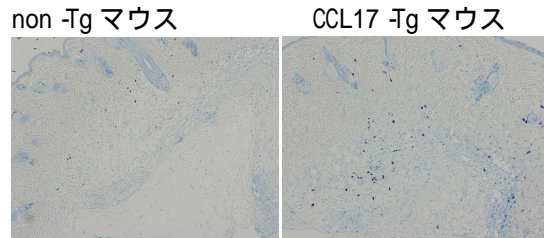
(3) 創傷治癒部位での肥満細胞数

創傷治癒進行部位の組織をトルイジンブルー染色し、肥満細胞を計測した。

(結果)

創部周囲には肥満細胞がみられる。

肥満細胞数は day4,7 において CCL17-Tg マウスの方が多い。

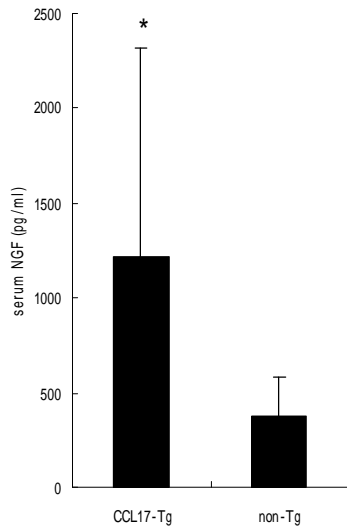


(4) 血清 NGF 値

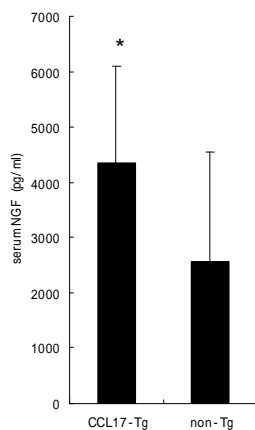
血清 NGF 値を ELISA (Mouse NGF Sandwich ELISA Kit, ChemiKine, Millipore) で測定した。

(結果) CCL-17Tg マウスでは、non-Tg マウスと比較して conventional 環境下でも、SPF 環境下でも、血清 NGF 濃度が有意に上昇していた。

conventional 環境下



SPF 環境下



(5) ケラチノサイト、線維芽細胞における CCR4 発現の検討

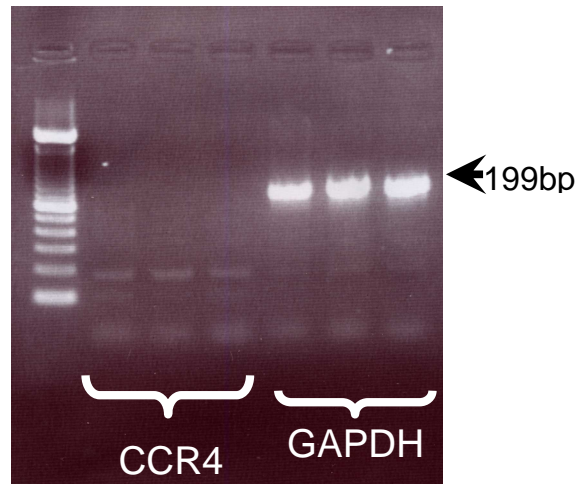
表皮で産生された CCL17 の作用する細胞の候補として、ケラチノサイトと線維芽細胞に CCR4 が発現しているかを、RT-PCR にて mRNA レベルで検討した。

C57BL/6 マウス (non-Tg マウス) よりケラチノサイト、線維芽細胞を採取した。

ケラチノサイトはあらかじめ panning で Langerhans 細胞を除去したものをを使用した。

(結果)
ケラチノサイトは CCR4 mRNA を発現していない。

線維芽細胞では CCR4 mRNA の発現がみられた (199bp の band)。



(6) NGF 産生細胞の検討

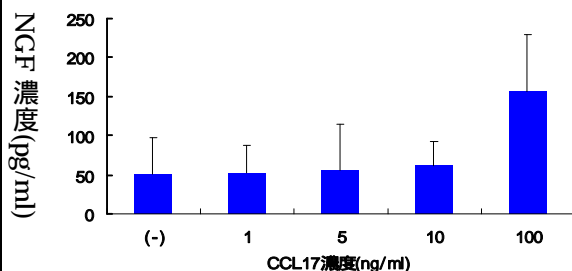
CCL17-Tg マウスにて血清 NGF が高値であることから、ケラチノサイト、線維芽細胞からの NGF の産生が亢進しているかを検討した。

ケラチノサイト、線維芽細胞の培養液に CCL17 を添加し、24、48、72 時間後の培養上清中の NGF 濃度を ELISA にて測定した。

(結果)

ケラチノサイト：培養上清中 (48 時間後) の NGF は測定感度以下であった。

線維芽細胞：CCL17 濃度 100ng/ml において培養上清 (72 時間後) の NGF 濃度が増加していた。



(7) CCL17 の線維芽細胞増殖への影響の検討
創傷治癒の結果から、CCL17 が線維芽細胞に作用して創傷治癒が促進される可能性が示唆された。

線維芽細胞の増殖に対する CCL17 の作用を検討するために、proliferation assay を行

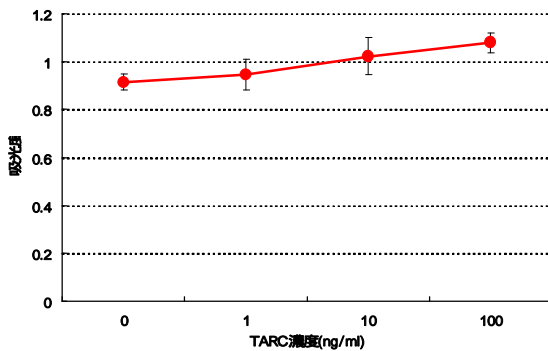
った。

線維芽細胞を細胞数 1×10^4 /well、CCL17 濃度 0,1,10,100ng/ml の培地にて 72 時間培養し、BrdU を添加してさらに 24 時間培養した後、Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric, Roche)を用いて、ELISA 法にて増殖の際に取り込まれた BrdU を測定した。

(結果)

Non-Tg マウス由来の線維芽細胞は CCL17 濃度によって増殖に変化はなかった。

CCL17-Tg マウス由来の線維芽細胞では CCL17 濃度の上昇にともなって増殖能の亢進が見られた。



(8) 結果のまとめ

創傷治癒において CCL17-Tg マウスの方が non-Tg マウスと比較して速やかに創部面積が縮小した。

創部面積の差は主に受傷後早期(day1-4)にみられた。

組織では day4 では CCL17-Tg マウスの方が肉芽組織の進展がより広範囲であった。Day7 以降は著明な差はなかった。

創部周囲の肥満細胞数は day4,7 において CCL17-Tg マウスの方が多かった。

CCL17-Tg マウスでは血清 NGF が増加していた。

ケラチノサイトは CCR4 mRNA を発現せず、CCL17 存在下でも非存在下でも NGF を産生しなかった。

線維芽細胞は CCR4 mRNA を発現し、CCL17 濃度 100ng/ml 中で NGF 産生が増加した。

non-Tg マウス由来の線維芽細胞では CCL17 刺激によって増殖能に変化はなかった。

CCL17-Tg マウス由来の線維芽細胞では CCL17 濃度の上昇に伴って増殖能が亢進した。

(9) 結果に対する考察

創傷治癒は以下のように時期により分類されている。

・急性炎症期

血小板の凝集、血液凝固機構、血管収縮により止血され、フィブリン塊を形成する。フィブリン塊に好中球やマクロファージなどの炎症細胞が浸潤する。

・肉芽組織形成期

線維芽細胞、マクロファージを主体とした肉芽組織が形成され、新生血管が増生する。

・癒痕期

増生した膠原線維が再配列し、創面は再生した表皮で被覆される。

(Singer AJ et al. N Engl J Med 1999; 341: 738-46. Werner S et al. Physiol Rev 2003; 83: 835-70.)

CCL17-Tg マウスは non-Tg マウスと比較して、肉芽が形成されはじめる時期において、創傷治癒が促進していた。それ以降では、差がみられなかった。

このことから、CCL17-Tg マウスにおいて急性炎症期から肉芽組織形成期で創傷治癒が促進していることが示唆される。これに CCL17 による線維芽細胞の増殖亢進が関与している可能性がある。

NGF は以下のように創傷治癒に重要である。

・角化細胞、線維芽細胞、肥満細胞、T細胞、血管内皮細胞などは NGF を産生し、かつその受容体を発現している。

・NGF はこれらの細胞の増殖、活性化、遊走、各種 growth factor の産生を促進する。

(Kawamoto K, Matsuda H. Prog Brain Res 2004; 146: 369-84. Nithya M, Suguna L, Rose C. Biochim Biophys Acta 2003; 1620: 25-31. Matsuda H, et al. J Exp Med 1998; 187: 297-306.)

・マウスの皮膚に創傷を作製すると、血清中並びに創傷局所の NGF 濃度が増加する。

・NGF を創傷局所に投与すると、上皮化が促進され、肉芽組織の増加、細胞外基質の密度が上昇するなど、創傷治癒が促進される。

(Matsuda H, et al. J Exp Med 1998; 187: 297-306.)

・randomized trial で NGF の局所投与によって、褥瘡の治癒が証明されている。

(Landi F, et al. Ann Intern Med 2003; 139: 635-41.)

これらをふまえると、CCL17-Tg マウスの血清で上昇している NGF が創傷治癒に関与している可能性があり、その産生源として線維芽細胞が考えられる。

肥満細胞は創傷治癒において重要である。また、NGF は肥満細胞の分化や増殖、活性化に重要な stem cell factor に似た作用を有する。

(Artuc M, et al. Exp Dermatol 1999; 8: 1-16. Micera A, et al. Cytokine Growth Factor Rev 2007; 18: 245-56.)

CCL17-Tg マウスでは、創傷治癒局所での肥

満細胞数が non-Tg マウスと比較して増加しており、創傷治癒を促進している可能性がある。また、線維芽細胞によって産生された NGF が肥満細胞を増殖、活性化させていることが考えられる。

創傷治癒、リモデリング、苔癬化は以下のようにとらえられる。

・リモデリングは創傷治癒の最終過程であるが、創傷治癒と関連して NGF はリモデリングに関わっている。(Diegelmann RF, Evans MC. et al. Front Biosci 2004; 9: 283-9. Micera A et al. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14: 369-74. Bonini S, et al. Int Arch Allergy Immunol 1999; 118: 159-62.)

・AD では血清中 NGF 濃度は上昇している。(Toyoda M, et al. Br J Dermatol 2002; 147: 71-9.)

・AD では、CCL17 が皮膚部局所、血清中で増加し、その病態に重要な役割を果たしている。(Saeki H, Tamaki K. et al. J Dermatol Sci. 2006; 43: 75-84.)

・AD の慢性病変では苔癬化が生じるが、苔癬化は 1 種のリモデリングである。(Leung DY. J Allergy Clin Immunol 1995; 96: 302-18)

これらの背景と本研究の結果を総合すると、表皮で産生された CCL17 が NGF を介して、AD の苔癬化に関与している可能性がある。

non-Tg マウス由来の線維芽細胞では CCL17 によって増殖は変化しなかったが、CCL17-Tg マウス由来の線維芽細胞では CCL17 添加にて増殖が亢進した。CCL17-Tg マウスの線維芽細胞では、CCL17 に対する反応性が変化している可能性がある。

創傷治癒を促進するケモカインとしてヒトでは、

IL-8/CXCL8, GRO-1/CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL2, MDC/CCL22

などが報告されている。

(Spiekstra SW et al. Wound Repair Regen 2007; 15: 708-17. Gillitzer R, Goebeler M. J Leukoc Biol 2001; 69: 513-21. Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Vascular 2007; 15: 350-5.)

今回の研究の結果より、CCL17 は創傷治癒に関与していると考えられる。これまで CCL17 と創傷治癒についての報告はなく本研究が初めてである。

(10) 結論・総括

CCL17-Tg マウスでは表皮で産生された CCL17 が、線維芽細胞に作用して増殖を促進し、また NGF 産生を亢進させ、その一部は肥満細胞にも作用し、これらの総和として創傷治癒を促進している。

表皮で産生された CCL17 が AD の苔癬化(リ

モデリング)に関与している可能性がある。

CCL17 を創傷治癒の治療薬として利用することや、CCL17 やその受容体である CCR4 の阻害剤を、苔癬化の治療、予防として利用できる可能性がある。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常深 祐一郎 (TSUNEMI YUICHIRO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00361478

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐伯 秀久 (SAEKI HIDEHISA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 80235093

(4) 研究連携者

加藤 豊章 (KATO TOYOAKI)
東京大学・医学部附属病院

柴田 彩 (SHIBATA SAYAKA)
東京大学・医学部附属病院