

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19790810

研究課題名（和文） 植皮部における接触皮膚炎感作抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文） Investigation on the mechanism underlying suppression of contact hypersensitivity in grafted skin.

研究代表者

吉木 竜太郎 (YOSHIKI RYUTARO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30412646

研究成果の概要：皮膚科および形成外科領域において植皮術は手術などで欠損した皮膚をふさぐのにしばしば用いられる方法のひとつである。植皮を行われた部分では、いわゆる「かぶれ」が成立しにくいことを我々皮膚科医はしばしば経験していたが、その詳しい機序はわかっていなかった。今回の研究において、植皮部では皮膚の防衛機能の一つを担っている「ランゲルハンス細胞」の機能が変化し、「かぶれ」を起こしにくくする細胞を誘導することが明らかとなった。

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：皮膚科学

キーワード：接触皮膚炎、植皮、免疫抑制、ランゲルハンス細胞、調節性 T 細胞、RANKL、

IL-10

1. 研究開始当初の背景

通常ある個体が、ある物質に感作された場合、その同じ個体が再び同一の物質に接触した場合に生じる反応をアレルギー性皮膚炎と呼ぶ。抗原に感作される場合に重要であるのが、表皮に存在する Langerhans 細胞（以下 LC と略）と呼ばれる抗原提示能を有した樹状細胞である。通常、ハプテンである PCI などが皮膚表面に塗布されると、LC では表皮内で

ケラチノサイトとの間で強固な接着を行っていた E-カドヘリンの発現が減少または消失するとともに活性化され、遊走を始める。LC は表皮から真皮、そして真皮内リンパ管へ入りこみ、リンパ管を介して所属リンパ節へと遊走する。この間 LC は成熟した樹状細胞として、所属リンパ節の T 細胞領域に到達し、naïve T 細胞への抗原提示をするとされている。これ以降、同様のハプテンが皮膚に接触

すると、感作相と同様の LC の活性化、所属リンパ節への遊走が起こり、memory T 細胞への抗原刺激が行われる。皮膚ケラチノサイトでは種々のサイトカインが放出され、T 細胞が皮膚へ浸潤し接触皮膚炎の状態が出現する。ところが、全層植皮部では接触皮膚炎が成立しにくいことが経験的に知られており、この現象はマウス接触過敏症でも認められ、感作の抑制が全身皮膚に起こるのではなく、植皮部のみに生じるという実験結果を我々は得ている。しかし、植皮部における LC の動態、および植皮部 LC の抗原提示能、所属リンパ節での免疫学的役割については全く解明されていない。

近年では抗原提示を行い、感作の成立のみに関与するとされていた LC の機能について、抑制系に働きかける regulatory DC の存在や、自己免疫疾患の抑制に関与する regulatory T 細胞などがハプテンに対する感作の不成立、免疫寛容に大きく関わっていることが徐々に解明されつつある。植皮部とは、外科的侵襲の加わった部位でありなおかつ正常の皮膚構造を有している部位である。皮膚という最大の免疫防御組織においてこの植皮という操作が何らかの免疫学的変調を生じさせるということは想像に難しくなく、なかでも植皮部での regulatory DC, regulatory T 細胞を誘導する場が生じていることを申請者は仮定し、研究を行った。

2. 研究の目的

皮膚科領域では、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎など多くのアレルギー疾患が存在する。外用、内服治療が第 1 選択となるが、長期間にわたる加療が必要であり、患者にかかる経済的負担、通院などの肉体的負担も大きい。そこで申請者は植皮部における感作抑制機序の解明を第 1 の目的とし、いずれは植皮という外科的操作を利用したアレルギー性疾患の加療を最終的な目的とする。平成 19 年度の科研費交付期間内に以下の 3 つを明らかにすることを目的とした。

(1) 植皮部 LC, dermal DC, ケラチノサイト、ファイブプロラストといった皮膚構成成分の動態および感作時の生理学的活性の解明 (平成 19 年度)

(2) 植皮部 LC および dermal DC が所属リンパ節で未感作リンパ球に及ぼす影響の解明 (平成 19 年度)

(3) 植皮部感作によるアレルギー性疾患のコントロールの試み (平成 20 年度)

3. 研究の方法

平成 19 年度

(1) マウス植皮部における LC 数および dermal DC の経時的変化

麻酔薬 (ドルミカム、ケタミンの混合溶液) をマウスへ腹腔内投与し、全身麻酔をかけた後、背部皮膚を全層で採皮、遊離植皮片を採取する。この植皮片を同マウスの背部に縫着し、固定のためにグリセリンを浸した綿球を用いてさらに圧迫固定を行う。植皮術後 1、3、5、7 日目に植皮片を採取。採取した植皮片をアンモニウムチオシアネート溶液中で 30 分インキュベートし表皮シートを作成する。表皮シートは classII、Langerin で蛍光染色し植皮後のランゲルハンス細胞の経時的な形態学的変化、数量の変化を蛍光顕微鏡で観察、計測する。

申請者はすでに、植皮後 7 日目の LC が正常と比較しその数が減り、球型の形態へと変化することを確認している。この植皮部におけるランゲルハンス細胞の減少が、遊走によるものなのか、アポトーシスなどの細胞死によるものなのか、また遊走であれば所属リンパ節へと遊走するのかを検討するために、表皮シート作成と同時に、それぞれのマウスから所属リンパ節と脾臓を摘出し、それぞれから細胞浮遊液を作成。classII、Langerin で蛍光染色しフローサイトメーターでリンパ節および脾臓にある LC と dermal DC の絶対数および各臓器における割合を測定する。植皮がきっかけとなって LC, dermal DC が遊走しているならば、脾臓もしくは所属リンパ節での LC, dermal DC など抗原提示細胞の数が増加していることが予想される。また、細胞死が生じているかを確認するために、植皮部表皮シートを 7-AAD で蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で観察する。

(2) 植皮部の LC およびその他の皮膚構成細胞からの経時的なサイトカイン量測定

植皮の生着にも様々な炎症性サイトカインが関与し、毛細血管や線維芽細胞の増殖などの、いわゆる創傷治癒過程を経て生着すると考えられる。しかし、完全に血流から遮断されるという生物学的に非常にシビアな環境における創傷治癒過程では、通常と異なり、サイトカインプロファイルやその放出レベルにおいて何らかの変調が生じていることが考えられる。申請者は植皮部における LC が、非常に多量の IL-10 を産生し、この IL-10 産生 LC が、抗原特異的な regulatory T 細胞を誘導しやすい場を形成することまで見出している。しかしなぜ植皮を行うと LC が耐量の IL-10 を産生するのか詳細はまだ不明である。また、真皮内に存在する抗原提示細胞である dermal DC についても、抗原感作時におけるその機能についても評価が必要であ

る。そこで、植皮環境における細胞要素が LC に及ぼす影響を植皮片から採取した LC、dermal DC、角化細胞、線維芽細胞から放出されるサイトカイン量について着目、それを測定し、それぞれが及ぼしあう影響について評価を行う。

植皮片をまずトリプシン処理し、表皮細胞と真皮層とに分離する。表皮細胞中における LC のマーカーである CD11c で磁気標識を行い、MACS (Magnetic Cell Sorting) で LC とそれ以外の成分 (ケラチノサイト) に分離する。真皮細胞は LC、ケラチノサイト、真皮細胞を凍結処理し、それぞれから m-RNA を抽出。RT-PCR で IL-1 α 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、5、10、12 の発現レベルを測定する。これを植皮後 1, 3, 5, 7 日目の植皮片で行う。さらにハプテンでありなおかつ蛍光標識に用いられる FITC を植皮部へ塗布することで抗原提示細胞である LC と dermal DC を所属リンパ節へと遊走させ、これを LC 特異的に発現している Langerin で蛍光標識し、それぞれの組成、数をフローサイトメーターで測定する。また、フローサイトメーターのセルソーティング機能を用いて Langerin 陽性細胞 (LC) と Langerin 陰性細胞 (dermal DC) とに分離し、それぞれの細胞が所属リンパ節でどのようなサイトカイン産生を行っているか、動揺にして RT-PCR にて測定を行う。

(3) 植皮部 LC の抗原提示能およびリンパ球増殖活性の検証

植皮部表皮細胞から抽出した LC と抗原 (PC 1) を接触させておく。また、あらかじめ未感作マウスからリンパ球浮遊液を採取し、PC 1 を抗原提示している LC とともに 24 時間培養し、そのリンパ球増殖活性を RI 法で計測する。前述のように我々は植皮部 LC が多量の IL-10 を産生するという実験結果を得ている。IL-10 は regulatory T 細胞の増殖および作用に重要であるとされていることから、PC 1 特異的な regulatory T 細胞が誘導されることが予想され、さらに抗原特異的なメモリー T リンパ球の増殖抑制が生じることが予想される。

平成 20 年度

(4) IL-10 産生 LC 移植による感作抑制の検証およびその局在部位の検討

植皮部に存在する IL-10 産生 LC を、表皮細胞から MACS を用いて単離し RI で標識する。これをナイーブマウスに投与し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に RI 標識された IL-10 産生 LC の局在を皮膚、リンパ節、脾臓について評価を行う。また、PC 1 を背部皮膚へ塗布し感作を行い、その 5 日後に耳介へ PC 1 を塗布することで惹起させる。この場合、IL-10

の影響で感作の抑制が生じ、それに続く惹起反応の低下が予想されるが、IL-10 産生 LC がリンパ節、皮膚、脾臓のどこに局在し、どのくらいの期間存在するかを調べる。

(5) 皮膚過敏反応モデルマウスに対する植皮を用いた脱感作の検証

当研究の最終的な目的は、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、喘息などの様々なアレルギー疾患に対する植皮を用いた根本的な治療、つまり脱感作を誘導することにある。まずはこれらアレルギー反応性疾患の中でも最も作成の簡便な接触性皮膚炎モデルマウスに対する脱感作の誘導を目的に検証を行う。

まずはマウス腹部皮膚を剃毛し、ハプテンを塗布することで感作を行う。5 日後、感作が成立したマウスの背部皮膚に全層植皮を施行。これまでの実験で最も脱感作が成立しやすいと考えられる時期に植皮片へハプテンを塗布する。さらにその 5 日後に耳介へ同ハプテンを塗布し惹起反応を起こさせ、24 時間後の耳介の厚さを測定することで接触皮膚炎反応の強度を評価する。

4. 研究成果

(1) 植皮後のマウスに生じる接触皮膚炎感作層の抑制は、抗原を植皮部局所において生じる。

植皮マウスに生じる接触皮膚炎感作層の抑制が、植皮部に感作することで生じるのか、植皮を施したマウスの全身に生じるのか検討した。A.未感作のマウス、B.感作のみ行ったマウス、C.植皮部に感作したマウス、D.植皮を行い、植皮部以外に感作したマウスに対し、感作から 5 日目に耳介へ同ハプテンを塗布。24 時間後の耳介の腫脹を測定した。植皮部に感作したマウスでは、植皮しないマウスと比較して有意に耳介の腫脹が低下した。また、植皮を行い、植皮部以外に感作したマウスでは耳介の腫脹抑制は見られなかった (Figure 1.)。

以上の結果から、植皮マウスにおける感作の抑制は、植皮部に感作した場合においてのみ生じることが明らかとなった。

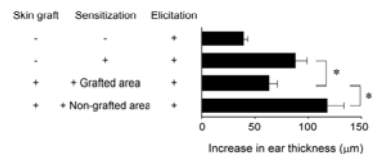
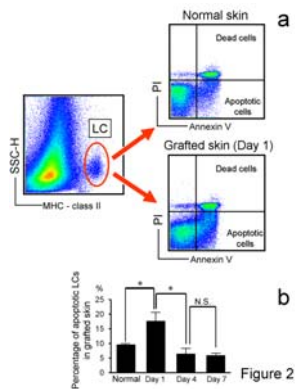


Figure 1

(2) 植皮部ではランゲルハンス細胞がアポトーシスを起こす。

ランゲルハンス細胞は抗原提示細胞とし

て所属リンパ節へ遊走し、ナイーブリンパ球を抗原特異的リンパ球へ誘導するとされていた。そこで、植皮部におけるランゲルハンス細胞の変化を検討した。植皮後7日目に植皮片から表皮シートを作成し、抗MHC-class II蛍光抗体で染色。蛍光顕微鏡下で観察した。コントロールでは単位面積当たりのランゲルハンス細胞は800~1000個/mm²であるのに対し、植皮編では200~300個/mm²と著明に減少していた。また、形態的にも樹状突起が消失し、円形に近い形へと変化していた。さらに、植皮後1日目、4日目、7日目の植皮片より表皮細胞浮遊液を作成し、抗MHC-class II抗体、Annexin Vとpropidium iodideで蛍光染色し植皮片でのアポトーシスに陥る細胞を検討した。すると植皮後1日目に有意なランゲルハンス細胞のアポトーシスを認めた (Figure 2.)。この結果より、植皮によりランゲルハンス細胞がアポトーシスに陥り、植皮片での数が減少することがわかった。



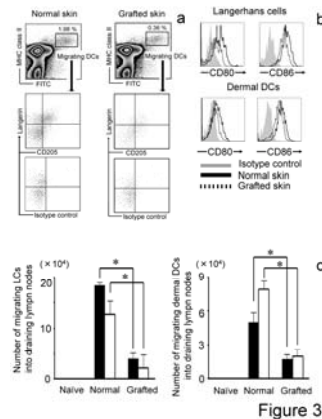
(3) 植皮後においてもランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞は遊走能および抗原提示機能を失わない。

植皮部に残存した抗原提示細胞の遊走能および抗原提示機能を評価するため、植皮片に蛍光色素でありかつハプテンとしての機能を有するFITCを塗布し、24時間後所属リンパ節を採取。リンパ節浮遊液をフローサイトメーターで検討した。Naiveマウスにおいては遊走してきた抗原提示細胞はMHC-class II^{high}, FITC⁺としてプロットされる。さらに、遊走してきた抗原提示細胞の文革をランゲルハンス細胞のマーカートのひとつであるCD205でプロット展開することで遊走してきた抗原提示細胞をランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞に分けて検討した。

Naiveマウスと比較すると植皮部にFITCを塗布した場合でも所属リンパ節への抗原提示細胞の遊走が見られたが、その数は有意に低下していた (Figure 3. a,c)。また、所属リンパ節に遊走したランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞に対して抗原提示に必要であると

される共刺激分子であるCD80, CD86の発現についても見当を行った。すると naive、無処置マウスいずれの場合でも遊走する抗原提示細胞で共刺激分子の発現が認められた (Figure 3. b)。

以上の結果より、植皮部においても残存する抗原提示細胞の所属リンパ節への遊走能力は保たれており、さらに抗原提示機能も有していることが明らかとなった。

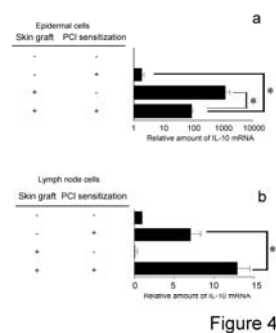


(4) 植皮部表皮ではIL-10が増加する。

IL-10は調節性T細胞を介した接触皮膚炎抑制機序に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、植皮部からmRNAを抽出し、IL-10の発現をリアルタイムPCR法で検討した。

植皮後7日目の表皮からは著明かつ有意なIL-10の増加がみとめられ、感作によりその量は減少した (Figure 4. a)。また、同様に所属リンパ節におけるIL-10の発現を検討すると、植皮部に感作することで正常皮膚に感作する場合と比較すると有意なIL-10の増加を認めた (Figure 4. b)。

以上の結果から、植皮により表皮ではIL-10を産生する細胞が増え、感作をすることでそのIL-10産生性細胞が所属リンパ節へ遊走する可能性が示唆された。



(5) 植皮後ランゲルハンス細胞はIL-10 産生能力を発現する。

上記4で確認された植皮片における IL-10 産生性細胞のサブセットを確認するため、密度勾配遠心法と磁気標識選別法を用いて植皮片をランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞に分離。それぞれを 24 時間培養し培養液中のサイトカインを cytometric beads array 法で解析した。

植皮後表皮の CD11c+細胞 (ランゲルハンス細胞) からは naïve マウスから得られ表皮 CD11c+細胞と比較すると有意な IL-10 産生を認めた。同様に植皮部ケラチノサイトからも有意な IL-10 産生が見られた (Figure 5.)。さらに植皮片ケラチノサイトからは IL-6, TNF- α の産生増加も認めたが、これは植皮後の創傷治癒過程で産生されたものであると考えられた。

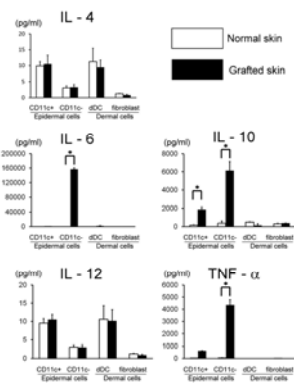


Figure 5

(6) 植皮部感作により、調節性T細胞が誘導され、抗原特異的な接触皮膚炎感作層の抑制を生じるようになる。

これまでの結果で、①植皮部抗原提示細胞は遊走能と抗原提示機能を有している、②植皮部に感作をすることで表皮における IL-10 産生が減少し、所属リンパ節では逆に IL-10 産生が増加する、③植皮によりランゲルハンス細胞は IL-10 を産生するようになることが解明された。以上から、**植皮部 IL-10 産生性ランゲルハンス細胞が所属リンパ節へ遊走し、抗原特異的調節性 T 細胞を誘導する場を提供する**という仮説を立てた。

そこで、植皮後 7 日目のマウスに PC1 で感作しその 5 日目に所属リンパ節を採取。CD4+CD25+細胞と CD4+CD25-細胞をそれぞれ naïve マウスへ経静脈的に移植。移植 24 時間後に PC1 または DNFB を用いて接触皮膚炎反応を検討した。

植皮マウスを PC1 で感作して得られたリンパ球全てを移植したマウスと植皮マウスから得られた CD4+CD25+細胞を移植したマウスでは PC1 に対する接触皮膚炎反応は低下し、それぞれの間で有意差は見られなかった。また、植皮マウスの CD4+CD25-細胞を移植したものでは接触皮膚炎反応の低下は見られな

かった。さらに、植皮マウスを PC1 で感作し、CD4+CD25+を移植したマウスにおいて DNFB に対する接触皮膚炎反応は低下しなかった (Figure 6.)

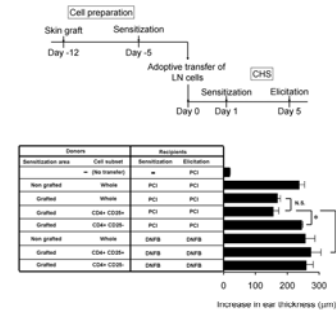


Figure 6

以上の結果から、植皮部に感作することで抗原特異的調節性T細胞が誘導され、それにより抗原特異的な接触皮膚炎感作の抑制が生じることが明らかとなった。

(7) RANK-RANKL相互作用によりランゲルハンス細胞はIL-10 を産生するようになる。

紫外線照射部位ではケラチノサイトから RANKL が発現し、ランゲルハンス細胞上に発現している RANK と相互作用することで調節性 T 細胞が誘導されることが知られている。植皮部でも同様の機序が生じていると考え、植皮部片を抗 RANKL 抗体で染色し蛍光顕微鏡で観察すると、表皮において RANKL の発現を認めた (Figure 7. a)。また、recombinant RANKL を表皮細胞浮遊液に加え、24 時間培養後のランゲルハンス細胞中の IL-10 をフローサイトメーターで検討すると、RANKL を加えないものと比較して有意な IL-10 産生増加を認めた (Figure 7. b)。

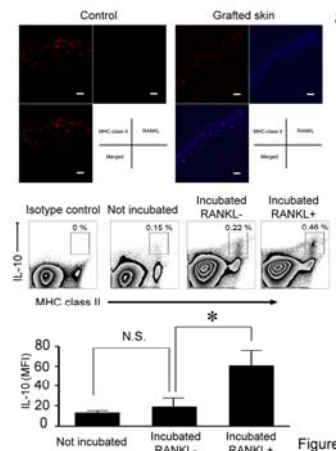


Figure 7

以上の結果より植皮により表皮細胞から

RANKL が発現。ランゲルハンス細胞上に発現する RANK との相互作用によりランゲルハンス細胞が IL-10 を産生するようになるという機序が明らかとなった。

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)

① IL-10-producing Langerhans Cells and Regulatory T cells are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin.

Yoshiki R., Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T and Tokura Y
J Invest Dermatol. (2009)129, 705-713
(査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

① 第 38 回日本免疫学会総会 (2008 年 12 月 1 日～3 日、京都)

RANKL from Apoptotic Keratinocytes And IL-10-producing Langerhans Cells Play Critical Roles for UVB Induced Immunosuppression.

Yoshiki R., Kabashima K, Sugita K and Tokura Y

② The 10th International Symposium on Dendritic Cells (October 1-5, 2008, Kobe)

RANKL from Apoptotic Keratinocytes And IL-10-producing Langerhans Cells Play Critical Roles for UVB Induced Immunosuppression.

Yoshiki R., Kabashima K, Sugita K and Tokura Y

③ The 5th International Investigative Dermatology (May 14-17, 2008, Kyoto)

Increased epidermal RANKL of grafted skin induces IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells tolerogenic for contact hypersensitivity.

Yoshiki R., Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T and Yoshiki Tokura

④ 第 30 回日本光医学・光生物学会 (2008 年 7 月 11 日～13 日、島根県)

低用量 UVB 照射による皮膚樹状細胞の変

化

吉木竜太郎 杉田和成 梶島健治 戸倉新樹

⑤ 第 34 回皮膚かたち研究学会 (2007 年 11 月 3 日、鳥取県)

低用量 UVB 照射による皮膚樹状細胞の機能及び形態変化

吉木竜太郎 杉田和成 梶島健治 戸倉新樹

⑥ 37th Annual ESDR Meeting (September 5-8, 2007, Zurich, Switzerland)

Increased epidermal RANKL of grafted skin induces IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells tolerogenic for contact hypersensitivity.

Yoshiki R., Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T and Yoshiki Tokura

⑦ 日本研究皮膚科学会 第 31 回年次学術大会・総会 (2006 年 5 月 31 日～6 月 2 日、京都)

経植皮膚部感作による接触過敏症の低反応性における制御性 T 細胞の介在

吉木竜太郎 杉田和成 新健治 島内隆寿 梶島健治 戸倉新樹

[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]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉木 竜太郎 (YOSHIKI RYUTARO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30412646

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし