

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790785  
 研究課題名（和文） ハプテンによる樹状細胞活性化のメカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism for dendritic cell maturation by haptens  
 研究代表者 水芦 政人 (MIZUASHI MASATO)  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：20400369

研究成果の概要（和文）：ハプテンによる樹状細胞活性化の過程において細胞表面のチオール基が変化するかどうかを検討するため、ヒト単球由来樹状細胞を代表的ハプテンであるdinitrochlorobenzene(DNCB), NiCl<sub>2</sub>, formaldehyde, 一時刺激性物質SDSで刺激したところ、細胞内レドックスと細胞表面チオール基の変化が相関することを示す結果が得られ、さらにハプテン刺激による樹状細胞活性化にER stress、血小板から放出されるCD40 ligandも関与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether sensitizers oxidize cell surface thiols of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). All the sensitizers that we examined decreased cell surface thiols on MoDCs. Our data suggest that the oxidation of cell surface thiols have some role in triggering DC maturation by sensitizers. In addition, we also suggest that both ER stress and CD40 ligand derived from platelets are related to DC maturation by sensitizers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：樹状細胞、ハプテン、チオール基、ER stress、血小板、CD40 ligand

## 1. 研究開始当初の背景

【学術的背景：解明の遅れている化学物質に対する免疫反応の解析】

私たち皮膚科医は、日常診療の中で接触皮膚炎、薬疹など化学物質に対する免疫応答が原

因となる皮膚疾患を数多く経験している。しかし、近年、toll-like receptorやNod1/Nod2などのような病原微生物を認識する分子が同定され、それに引き続くシグナル伝達の解明も著しく進んでいる感染免疫に対し、単純化学物質に対する免疫反応である接触皮膚炎における化学物質認識機構にかんしては、以前多くの未解決の問題を残している。私たちの研究室でも、これまでに、アレルギー性接触皮膚炎の感作過程を中心に、ハプテン塗布により表皮ランゲルハンス細胞が活性化すること1)2)3)、ハプテンによるランゲルハンス細胞の活性化が、ヒト培養樹状細胞を用いても再現可能であること4)5)6)、樹状細胞のハプテンによる活性化には、p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) のリン酸化が必須であること7)などを明らかにしてきた。また、これらの一連の研究成果をもとに開発された単球由来THP-1細胞のCD86、CD54発現の変動を指標にした皮膚感作性物質評価法は、現在、世界的にその有用性が検討されている8)。私も、ハプテンによるp38 MAPKのリン酸化に細胞内redoxの変化が関与していること9)を明らかにした。

1) Aiba S, Tagami H. *Br J Dermatol* 111:507, 1984, 2) Aiba S, Katz SI. *J Immunol.* 145: 2791, 1990, 3) Ozawa H, et al. *J Invest Dermatol.* 106: 441, 1996, 4) Aiba S, et al. *Eur J Immunol.* 27: 3031, 1997, 5) Manome H, et al. *Immunology.* 98: 481, 1999, 6) Aiba S, et al. *Immunology.* 101: 68, 2000, 7) Aiba S, et al. *J Invest Dermatol.* 120: 390, 2003, 8) Ashikaga T, et al. *Toxicol in vitro.* 16:711, 2002, 9) Mizuashi M, et al. *J Invest Dermatol.* 124: 579, 2005

しかし、以上の一連の研究により、いまだ解明されていないいくつかの問題点も浮き彫りにされた。

## 2. 研究の目的

(1) ハプテンによる樹状細胞表面チオール基の酸化と樹状細胞の活性化

2002年、Filomeniらにより(1)、細胞表面のチオール基の酸化が、細胞内にシグナルを導入し p38 MAPK の活性化、さらには、ある種の細胞にアポトーシスを誘導することが報告された。そこで、本研究では、まず、ハプテンにより樹状細胞表面のチオール基の酸化がひき起こされているのか、否か、また、細胞膜を透過せず、細胞内に侵入することの

ないチオール基酸化試薬(Cu-phnanthrolin)により、樹状細胞が活性化するか否かを検討する。次図は、Cu-phnanthrolin による、樹状細胞表面 SH 基の減少、p38 MAPK のリン酸化、CD86 分子の発現増強を示す。

1) Filomeni et al: Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.* 17:64, 2003

(2) ハプテンによる樹状細胞活性化におけるER stressの関与

小胞体に糖鎖修飾阻害、グルコース飢餓、ジスルフィド結合阻害、虚血のようなストレスが加わり小胞体内で折りたたみ不全の蛋白質(unfolded protein)が蓄積すると(ER stress)、細胞はそれを感知し、1)分子シャペロンの誘導、2)翻訳抑制、3)蛋白分解促進、4)ask-1の活性化とアポトーシスの誘導を引き起こす(1, 2)。私たちは、代表的ハプテンを用いてredox不均衡と樹状細胞活性化との関連を明らかにしてきた。しかし、ER stressは、そのシグナルの下流にp38 MAPKが存在することから、ハプテンによる樹状細胞の活性化にER stressが関与していることも予想される。予備実験ではあるが、皮膚科臨床でも使用するハプテンであるdiphencypropeneがER stressを誘導することを認めている。

1) Rutkowski DT et al: A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004 14:20-28. 2) Nishitoh H, et al. Ask1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002 16:1345-55

(3) ハプテンによる樹状細胞活性化におけるCD40-CD40 ligand interaction

2000年、Moodycliffeらにより(1)、ハプテン塗布後の樹状細胞の所属リンパ節への遊走が、CD40 ligand 欠損マウスにおいて著しく障害されることが報告された。しかし、この研究やその後の研究においても、皮膚におけるCD40 ligandがどの細胞に由来するのかは明らかにされていない。そこで、本研究においては、血小板に着目し、ハプテンにより血小板からCD40 ligandが放出されないか、また、血小板と樹状細胞の共培養系において、ハプテンによりCD40 ligandを介した樹状細胞の活性化が起らないかを検討する。

1) Moodycliffe AM et al: CD40-CD40ligand

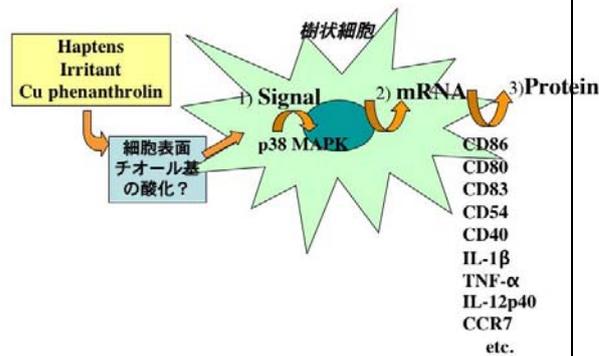
interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes, J Exp Med, 191:2011, 2000

### 3. 研究の方法

(1) ハプテンによる樹状細胞表面チオール基の酸化と樹状細胞の活性化

①樹状細胞の細胞表面チオール基ならびに活性化 p38 MAPK の定量

ヒト単球由来樹状細胞(健康人ボランティアの末梢血より得られた単球を GM-CSF と IL-4 により培養して誘導する)を代表的ハプテンである dinitrochlorobenzene, NiCl<sub>2</sub>, formaldehyde, 一次刺激性物質 SDS、さらに、膜非透過チオール基酸化試薬である Cu phenanthroline で刺激し、15分、30分、1時間、2時間後に回収し、チオール基結合蛍光標識試薬である Alexa fluor 488 C5 maleimide (AFM) で染色する。また、被験物質を処理した後に、細胞を固定後、膜透過処理を施し、anti-phospho-p38 MAPK 抗体で染色する。染色後、陽性細胞数、蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定する。被験物質の濃度設定は MTT アッセイによる IC<sub>50</sub> に基づいて決定する。



② 膜非透過チオール基酸化試薬による樹状細胞の活性化

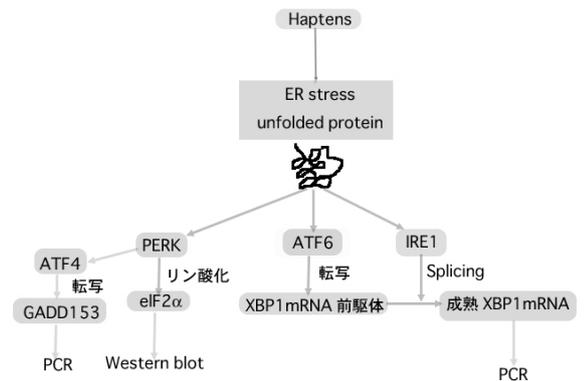
次に、膜非透過チオール基酸化試薬である Cu phenanthroline でヒト培養樹状細胞を刺激し、樹状細胞の活性化を CD40、CD54、CD80、CD83、CD86、HLA-DR の発現を指標に検討する。また、刺激後の樹状細胞より RNA を回収し real-time PCR により IL-1b, TNF-a, IL-12p40, CCR7 などの mRNA の発現を解析する。

同時に培養上清も回収し、対応する蛋白の定量を ELISA にて行う。

(2) ER stress の評価

種々の化学物質で処理したヒト培養樹状細胞(健康人ボランティアの末梢血より得られた単球を GM-CSF と IL-4 により培養して誘導する)より RNA を抽出して、①GADD153 mRNA の発現を real time PCR にて定量する、②XBP-1 mRNA の splicing の有無を PCR 産物の塩基数の違いにより評価する。また、同時に③蛋白質を抽出し eIF2a のリン酸化をリン酸化特異抗体により検討する。コントロールとして、ER stress を誘導することの知られている tunicamycin, thapsigargin, dithiothreitol に関して、同様の解析を行う。また、これらの刺激が樹状細胞を活性化するかも合わせて検討する。

(3) ハプテン刺激による血小板からの CD40 ligand の放出と樹状細胞の活性化



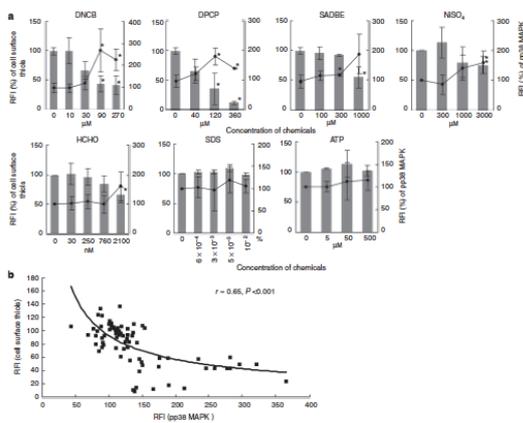
①健康人よりクエン酸緩衝液を用いて採血し、遠心を繰り返すことにより濃縮血小板浮遊液を作成する。その浮遊液に種々の濃度のハプテン、および、陽性コントロールとして thrombin の刺激を加えて培養上清中の CD40 ligand を ELISA にて定量する。

②単球由来樹状細胞および血小板と単球由来樹状細胞の共培養系に、ハプテン、あるいは、thrombin を加えて樹状細胞の活性化を上記の方法により比較する。

### 4. 研究成果

我々はこれまでに、接触皮膚炎感作過程

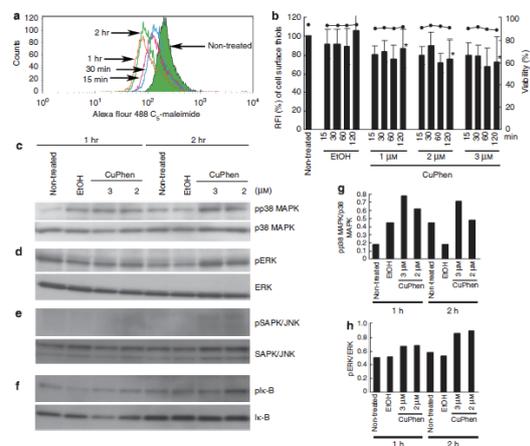
における樹状細胞の活性化にp38 mitogen activated protein kinase (MAPK)の活性化が重要であること、さらにその上流の刺激として細胞内レドックスの変化が関与することを報告した。一方で、最近細胞内レドックスの変化と細胞表面チオール基の酸化還元状態が関連することが報告された。そこで、ハプテンによる樹状細胞活性化の過程においても細胞表面のチオール基が変化するかどうかを検討するため、ヒト単球由来樹状細胞を代表的ハプテンであるdinitrochlorobenzene(DNCB), NiCl<sub>2</sub>, formaldehyde, 一時刺激性物質SDSで刺激し、2時間後に細胞表面のチオール基結合蛍光標識であるAlexa fluor 488 C5 maleimide (AFM)とanti-phospho-p38MAPK抗体で染色してフローサイトメトリーで陽性細胞数、蛍光強度を測定した。被験物質の濃度設定はIC<sub>50</sub>に基づいて決定した。その結果、ハプテンであるDNCB, NiCl<sub>2</sub>, formaldehydeにより、生存率50~100%の濃度で細胞表面のチオール基は有意に減少した。一方SDSでは細胞表面のチオール基の有意な減少は認められなかった。また、その結果はp38 MAPKのリン酸化と相関が認められた。



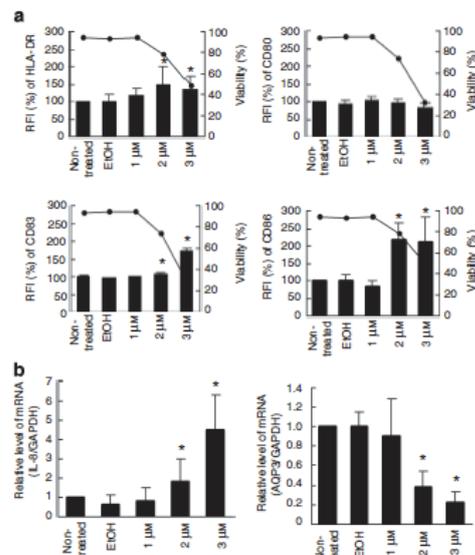
この結果は私たちが既に報告した細胞内レドックスの変化と一致する結果で

あり、細胞内レドックスと細胞表面チオール基の変化が相関することを示すものであった。

次に、細胞表面チオール基の減少が樹状細胞の活性化に与える影響を検討するため、膜非透過チオール基酸化試薬であるo-phenanthroline copper complex (CuPhen)でヒト単球由来樹状細胞を刺激したところ、細胞表面のチオール基の減少とp38 MAPKのリン酸化に加えて、樹状細胞の活性化が認められた。

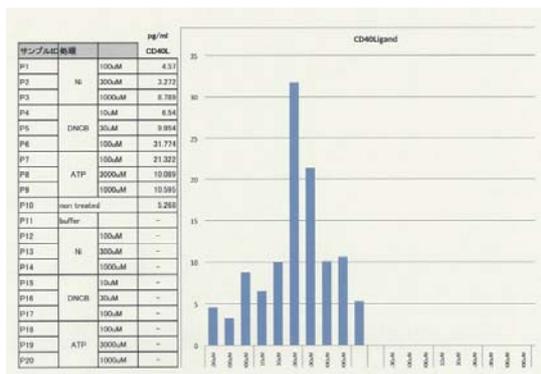


具体的には樹状細胞が発現しているCD83, CD86, HLA-DRなどの共刺激分子の発現の上昇がフローサイトメトリーで確認され、



刺激後の樹状細胞から回収したRNAを用いたreal-time PCRによりIL-8のmRNAの発現の上昇とアクアポリン3のmRNAの発現低下が認められた。

ハプテンによる樹状細胞活性化の過程において血小板から放出されるCD40 ligandが関与しているかどうかを検討するため、健常人よりクエン酸緩衝液を用いて採血し、遠心を繰り返すことにより得られた濃厚血小板浮遊液を、代表的ハプテンであるdinitrochlorobenzen(DNCB), NiCl<sub>2</sub>と、danger signalであるATPで刺激し、培養上清中のCD40 ligandをQuantikine CD40 ligand immunoassyで測定した。そうすると、無刺激の状態での培養上清中のCD40 ligandが5.3 pg/mlであったのに対し、1000 μM NiCl<sub>2</sub>で刺激した場合は8.8 pg/ml, 30 μM DNCBで刺激した場合は10.0 pg/ml, 100 μM DNCBで刺激した場合は31.8 pg/ml, 100 μM ATPで刺激した場合は21.3pg/mlであり、ハプテンまたはdanger signalの刺激により、血小板からのCD40 ligandの放出が増加した。



次に、血小板と樹状細胞のinteractionを明らかにするために、単球系cell-lineであるTHP-1にIL-1βとIL-8のpromotorの下流にルシフェラーゼを導入したcell-lineの確立を行った。現在それらの細胞は単独でDNCBやNiCl<sub>2</sub>などのハプテン刺激に対してreporter活性の亢進を認めており、今後

はこのcell-lineを使用して血症板とのinteractionを検討していく予定である。

## 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 1件)

1. Kagatani S, Sasaki Y, Hirota M, Mizuashi M, Suzuki M, Ohtani T, Itagaki H, Aiba S. Oxidation of Cell Surface Thiol Groups by Contact Sensitizers Triggers the Maturation of Dendritic Cells. *J Invest Dermatol.* 130(1); 175-183; 2010. 査読あり.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水芦 政人 (MIZUASHI MASATO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400369

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：