

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 1日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2010～2011
 課題番号： 22791067
 研究課題名（和文） 骨髄移植モデルを用いた GVHD および接触皮膚炎の病態解明
 研究課題名（英文） Analyzing the mechanism of graft-versus-host disease and contact hypersensitivity using bone-marrow transfer technique

研究代表者

江川 形平（GYOHEI EGAWA）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：50511812

研究成果の概要（和文）：

遺伝子改変マウスと骨髄移植テクニックの組み合わせにより、任意のタイミングで皮膚樹状細胞をサブセット毎に除去可能なマウスモデルを作成した。本モデルを用いて接触皮膚炎惹起に皮膚樹状細胞が不可欠であること、および、ランゲルハンス細胞が抑制的な役割を持つこと明らかにした。また、移植片対宿主病（GVHD）研究の新たなマウスモデルとなる Involucrin-mOVA マウスを作成した。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the antigen presenting capacity of skin dendritic cell (DC) subset by subset-specific depletion using CD11c-DTR and Langerin-DTR mice in combination with bone marrow chimeric techniques. Depletion of Langerhans cells alone in the elicitation phase induced a prolonged contact hypersensitivity (CHS) response, whereas CHS response was almost diminished when both LCs and dermal DCs were depleted. We also developed new research model for graft-versus-host disease (GVHD), Involucrin-mOVA mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、抗原提示、接触過敏反応、移植片対宿主反応

1. 研究開始当初の背景

表皮に存在するランゲルハンス細胞は、抗原提示細胞として様々な皮膚免疫反応に関わる。従来、接触過敏反応における経皮感作の成立に必須の存在であると考えられてきたが、近年、ランゲルハンス細胞を感作時に除去しても経皮感作が成立することや、ランゲルハンス細胞を生まれながらに欠損する

マウスでは接触過敏反応が増強することが報告された。また一方で、紫外線照射によりランゲルハンス細胞を除いたマウスにおいて移植片対宿主（graft-versus-host: GVH）反応が抑制されるとの報告がなされた。これによりランゲルハンス細胞はGVH反応において促進的役割を担っていると考えられている。このようにランゲルハンス細胞は、従来

考えられてきたように画一的に働く細胞ではなく、周辺環境によって様々な役割を担うものであることが明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子改変マウスと骨髄移植を組み合わせた新しい実験モデルを用いて、接触過敏反応の惹起相、および GVH 反応におけるランゲルハンス細胞を中心とした皮膚樹状細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄キメラマウスの作成

皮膚の樹状細胞は大きく表皮のランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞に分けられ、真皮樹状細胞は Langerin 発現の有無によってさらに 2 群に分けられる。ジフテリアトキシン (DT) の投与により、Langerin 発現細胞や CD11c 発現細胞をそれぞれ除去可能なマウス (Langerin-DTR マウス、CD11c-DTR マウス) は既に報告されているが、Langerin-DTR マウスではランゲルハンス細胞と Langerin 陽性真皮樹状細胞の 2 つのサブセットが消失してしまうこと、一方 CD11c-DTR マウスで皮膚樹状細胞が消失する量の DT を投与すればマウスが死亡してしまうこと、などの問題点が指摘される。

我々は、これらの問題点を解決するために骨髄移植の方法を組み合わせたモデルを考案した。ランゲルハンス細胞は放射線照射に耐性であることから、Langerin-DTR マウスをレシピエント、野生型マウスをドナーとして骨髄移植を行うと、ランゲルハンス細胞のみに DTR を発現するマウスが得られる。同様に、Langerin-DTR マウスをレシピエント、CD11c-DTR マウスをドナーとした組み合わせ、あるいは野生型をレシピエント、CD11c-DTR マウスをドナーとした組み合わせで骨髄移植を行うことで、それぞれ皮膚の樹状細胞全てに DTR を発現するマウス、真皮樹状細胞のみに DTR を発現するマウスが得られる (図 1)。これらのマウスを用いて、接触過敏反応惹起相における皮膚樹状細胞のサブセット毎の役割を検討する。

(2) GVH 反応実験モデルの作成

Involucrin プロモーター下に細胞膜結合型卵白アルブミン (mOVA) を発現する Involucrin-mOVA マウスを作製した。Involucrin は表皮の角化に伴って発現される表皮特異的なタンパクの一つである。このマウスに OVA 特異的 T 細胞受容体を発現する OT-I マウス由来 CD8 陽性 T 細胞を移入することで、実験的に GVH 反応を誘導することが可能である。さらに Involucrin-mOVA マウスと Langerin-DTR マウスを交配することにより、

GVH 反応の誘導時におけるランゲルハンス細胞の役割を検討する。

	LC	L+dDC	L-dDC
CD11c-DTR	○	○	○
Langerin-DTR	○	○	-
野生型 ← 骨髄移植 CD11c-DTR	-	○	○
Langerin-DTR ← 骨髄移植 CD11c-DTR	○	○	○
Langerin-DTR ← 骨髄移植 野生型	○	-	-

図 1: 骨髄移植モデルで除去可能となる皮膚樹状細胞サブセット

4. 研究成果

(1) 接触過敏反応惹起相における皮膚樹状細胞の役割

骨髄キメラの作成により得られたマウスにあらかじめ DT を投与し、ハプテン (DNFB) で感作した T 細胞を移植後、耳介に同じハプテンを塗布し皮膚炎を誘導した (養子移植免疫モデル)。その結果、全ての皮膚樹状細胞が存在しないマウスでは接触過敏反応の惹起が著明に抑制された (図 2)。一方でランゲルハンス細胞のみを除去した場合には皮膚炎が遷延した (図 3)。これによりランゲルハンス細胞が接触皮膚炎の惹起相において、炎症の収束に働いている可能性が示唆された。

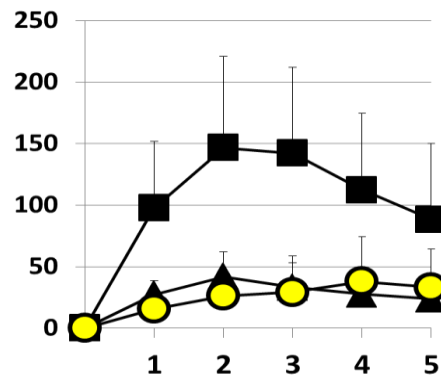


図 2: 全ての皮膚樹状細胞除去マウスにおけるハプテン塗付後の耳介圧厚変化
■: DT 処理なし、●DT 処理あり、▲未感作 T 細胞を移植したコントロール群

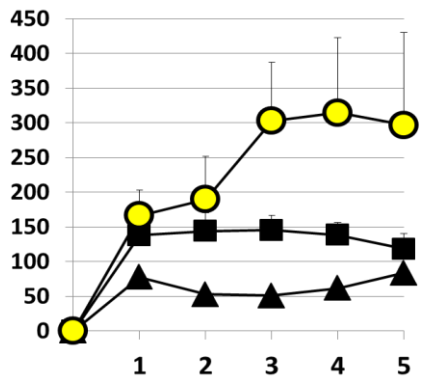


図3：ランゲルハンス細胞除去マウスにおけるハプテン塗付後の耳介厚変化

■：DT処理なし、●DT処理あり、▲未感作T細胞を移植したコントロール群

(2) 実験的GVH反応の誘導

Involucrin-mOVAマウスにOT-I由来T細胞を移植したところ、およそ7日目に著明な皮膚炎、脱毛、結膜浮腫を認めた(図4)。皮膚の病理像では、表皮内および表皮直下の著明なT細胞の浸潤、および表皮角化細胞の壊死像を認め、GVHDの病理像に類似した所見が得られた(図5)。これにより、新しいGVH反応の実験モデルが確立された。現在Langerin-DTRマウスと交配し、ランゲルハンス細胞を除いた状態でこのGVH様反応がどのように変化するかを検討している。

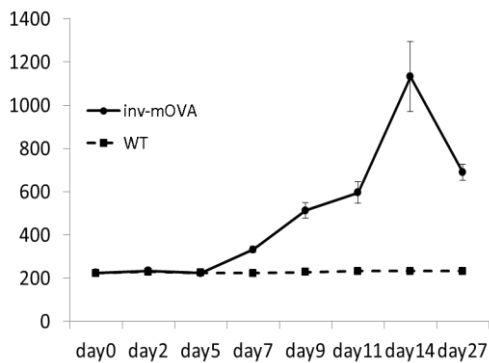


図4：OT-Iマウス由来T細胞移植後の耳介厚変化

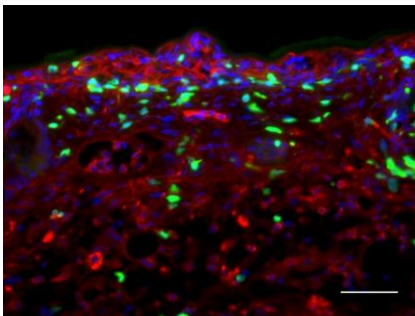


図5：表皮直下に浸潤したOT-Iマウス由来T細胞(緑)

今回の研究によって①皮膚樹状細胞サブセットの研究に有用なマウスの作成法、および、②新しいGVH反応実験モデル、が確立された。またこれらを用いて、皮膚樹状細胞が接触過敏反応惹起相における皮内での抗原提示に必須であること、ランゲルハンス細胞が炎症の収束に働いていることが示された。今後、これらの現象がどのようなメカニズムに基づいているのかを検証する。

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12件)

①江川形平, 椛島健治, Skin as a peripheral lymphoid organ: Revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissue (SALT), Journal of Investigative Dermatology, 査読有, Vol.131, 2178-2185, 2011

②江川形平, 本田哲也, 谷崎英昭, 土居博美, 宮地良樹, 椛島健治, In vivo imaging of T cell motility in the elicitation phase of contact hypersensitivity using two-photon microscopy, Journal of Investigative Dermatology, 査読有, Vol.131, 977-979, 2011

③本田哲也, 中島沙恵子, 江川形平, 椛島健治, 他3名, Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of contact hypersensitivity, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 査読有 Vol.125, 1154-1156, 2010

④C. Moniaga, 江川形平, 椛島健治, 他3名, Flaky-tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with Dermatophagoides pteronyssinus extract, American Journal of Pathology, 査読有 Vol.176, 2385-2393, 2010

[学会発表] (計7件)

①夏秋洋平, Clarification of the role of cutaneous dendritic cell subsets in the elicitation phase of contact hypersensitivity response, 日本研究皮膚科学会, 2011年12月10日, 京都国際会館

②江川形平, Intercellular space of keratinocytes is a migratory pathway for Langerhans cells, International workshop on Langerhans cells, 2011年11月3日, オーストラリア, インズブルック

③江川形平, Spatiotemporal T cell motility in the elicitation phase of contact hypersensitivity using two-photon microscopy, 日本研究皮膚科学会, 2010年12月23日, 和歌山県民文化センター

④江川形平、マウスアトピー性皮膚炎モデルとヒトの病態との関連性、日本アレルギー学会秋季学術大会、2010年11月5日、東京国際フォーラム

⑤江川形平、The spatio-temporal analysis of T cell behavior in contact hypersensitivity response、Annual meeting of Society for Investigative Dermatology、2010年5月5日、アメリカ、アトランタ

[図書] (計1件)

江川形平,他、中外医学社、ファーストステップ皮膚免疫学、2011、99-105

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江川 形平 (EGAWA GYOHEI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50511812

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

椛島健治 (KABASHIMA KENJI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00362484

(4) 研究協力者

夏秋洋平 (NATSUAKI YOHEI)
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：なし