

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 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791072

研究課題名（和文） 皮膚炎症を制御する多彩な因子に関する研究

研究課題名（英文） The investigation for various factors which regulates cutaneous inflammation

研究代表者

福永 淳 (ATSUSHI FUKUNAGA)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10467649

研究成果の概要（和文）：ナローバンドUVB照射によりマウス接触過敏反応が抑制され、その抑制には表皮ランゲルハンス細胞が必須であることを証明した。ヒトリコンビナントチオレドキシン塗布によりマウス接触過敏反応や一次刺激性皮膚炎反応が抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：The contact hypersensitivity response was suppressed by narrowband UVB irradiation. Epidermal langerhans cells were indispensable for this suppression. In addition, the application of human recombinant thioredoxin inhibited contact hypersensitivity response and a primary irritant dermatitis.

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：紫外線、接触皮膚炎、チオレドキシン、NKT細胞、制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の治療としてステロイド外用剤が主に使用されているが、その症状は再燃する傾向があり長期の使用により副作用が生じることや症状が重篤な場合はステロイド治療に抵抗性を示す場合があり、既存の治療法に加えて新たな治療法の開発が期待されている。このような背景から皮膚炎症を制御する因子に関する研究を行うことは炎症性皮膚疾患へ

の新規の治療法や効果的で副作用の少ない治療法の開発のためにも重要な研究課題である。そこで本研究では実験的に接触過敏反応(CHS)を抑制することができる紫外線(UV)やチオレドキシン(TRX)と皮膚樹状細胞(DC)(ランゲルハンス細胞(LC), 真皮樹状細胞)、制御性T細胞(Treg)、NKT細胞との関連に関する検討を行う。

(1) 皮膚DCは接触皮膚炎など皮膚炎症性

疾患の免疫誘導に重要な役割を果たすことが知られている (Fukunaga A et al. J Immunol. 2008;180:3057-64)。一方近年になり表皮に存在する LC が免疫誘導ではなく免疫制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている (Loser K et al. Nat Med. 2006;12:1372-9)。また免疫制御に重要な役割を果たす制御性 T 細胞 (Treg) や NKT 細胞の炎症性皮膚疾患との関連に関しても新しい知見が得られてきている (Goodmann WA et al. J Immunol. 2009;183:3170-6, Balato A et al. J Invest Dermatol. 2009;129:1628-42)。UV は皮膚癌発症の危険因子であるが、炎症性皮膚疾患の治療法として頻繁に利用されている。近年になり、311nm がピーク波長である narrow-band UVB (NB-UVB) 療法がその簡便性もしくは有用性のために乾癬、アトピー性皮膚炎、尋常性白斑などの炎症性皮膚疾患治療に頻用されている。しかし narrow-band UVB 療法は broad-band UVB 療法と比較し発癌性が高いとする研究がなされており (Kunisada M et al. J Invest Dermatol. 2007;127:2865-71)、より副作用の少ない効果的な照射方法の確立が重要課題である。

(2) TRX は好中球浸潤と炎症性サイトカイン macrophage migration inhibitory factor (MIF) を抑制する抗炎症性蛋白質で、研究代表者は TRX を過剰発現させた TRX トランスジェニックマウスでは皮膚炎反応が抑制される事、ヒトリコンビナント TRX (rTRX) の惹起前の腹腔内投与により CHS 反応が抑制される事を報告している (Fukunaga A et al. Antioxid Redox Signal 2009;6:1227-35)。

研究代表者はこれまで LC や真皮樹状細胞などの皮膚 DC の免疫誘導・制御における役割、CHS 反応を制御する SHPS-1, CD47, TRX, 血小板活性化因子 (PAF) などの分子に関する研究を行なってきた。今回の研究においては NB-UVB 療法における皮膚 DC、Treg、NKT 細胞の役割を CHS モデルを利用して明らかにする。また全身投与と比較して副作用が少なく実用的と考えられる rTRX 外用療法の皮膚炎症における効果を検討し、その奏功機序を分子・細胞レベルで検討する。

2. 研究の目的

全皮膚科受診患者の約 50% を占める炎症性皮膚疾患治療の代表的治療法としてステロイド外用療法と光線療法がある。しかしこれらの治療に抵抗を示す重篤で難治な症例が存在する背景から、新規の治療法開発と既存治療法の作用機序の解明は重要な研究課題である。近年になり簡便性・有効性のため頻用されるようになった代表的な光線療法である narrow-band UVB 療法の奏功機序を皮膚樹状細胞 (ランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞)、制御性 T 細胞、NKT 細胞などの細胞群に着目し明らかにする。また我々が接触過敏反応を腹腔内投与により抑制できることができたことを証明した抗炎症性蛋白質であるチオレドキシンを用いた炎症性皮膚疾患への外用療法の効果の検討を行い、炎症性皮膚疾患への新規治療法として開発をすすめる基盤とする。

3. 研究の方法

(1) NB-UVB 照射によるマウス CHS 反応抑制効果、皮膚 DC 局在への影響の検討

NB-UVB 照射は BB-UVB と同様に CHS モデルでの局所免疫抑制を誘導することが C3H/HeN マウスにおいて報告されている。我々は後に使用する遺伝子操作マウスのバックグラウンドが C57BL/6 マウスであることを考慮して、野生型マウスとして C57BL/6 マウスを用いて NB-UVB 照射における CHS モデルでの局所免疫抑制が生じるかを調べる。

NB-UVB をマウスの背部に 1, 3, 10kJ/m² 照射しその 1, 3, 7 日後に照射した部位と同じ部位にハプテンを用いて感作を行い、その 6 日後に耳介にハプテンを塗布することで耳介腫脹反応を観察する。この実験により C57BL/6 マウスにおける免疫抑制を誘導できる適切な NB-UVB 照射量と時間的タイミングを決定する。

上記実験で決定した NB-UVB 照射量を用いて、マウスの耳介もしくは背部に照射を行いその後表皮 LC や真皮樹状細胞の皮膚における数的経時的変化をランゲリン、CD11c, CD103 (Bursch LS et al. J Exp Med. 2007;204:3147-56) などのマーカーを用いて免疫組織染色もしくは FACS で解析する。さらに所属リンパ節での表皮 LC や真皮樹状細胞の数的経時的変化を FACS を用いて観察す

る。

(2) NB-UVB 照射後の免疫抑制誘導における皮膚 DC の役割の検討

マウス皮膚 DC は表皮 LC, ランゲリン陽性真皮樹状細胞, ランゲリン陰性真皮樹状細胞に分類されることが知られている。Langerin-DTR マウスをジフテリア毒素で処理すると一時的に表皮 LC のみを欠損した状態、ランゲリン陽性真皮樹状細胞と表皮 LC 両者を欠損させた状態を作ることができる。それぞれの状態での NB-UVB 照射による免疫抑制反応を CHS モデルを用いて野生型マウスと比較することで NB-UVB 照射で誘導される免疫抑制にどの皮膚 DC が重要であるかを検討する。さらに Langerin-DTR マウスで NB-UVB 照射後の所属リンパ節もしくは脾臓におけるサイトカインの発現レベルを real-timePCR 法、FACS により確認する。

(3) NB-UVB 照射後の Treg の変化の検討

BB-UVB 照射や PUVA 療法後には Treg が増加し免疫制御に役割を果たすことが知られているが、NB-UVB 照射後の免疫抑制における Treg の役割は明らかではない。NB-UVB 療法における Treg の役割を明らかにするために、野生型マウスに NB-UVB を照射し所属リンパ節での Treg の割合、機能的変化を検討する。さらに Langerin-DTR マウスにおいて一時的に表皮 LC のみを欠損した状態を作製した後に NB-UVB を照射し Treg の割合の変化を検討することで表皮 LC の NB-UVB による Treg 誘導における役割を明らかにする。

(4) NB-UVB 照射後の免疫抑制誘導における NKT 細胞の役割の検討

NKT 細胞は NK 細胞のマーカーである CD161 (NK1.1) や CD94 だけでなく限られたレパートリーの T 細胞受容体 α/β を発現している点で NK 細胞と区別され、非古典的抗原提示分子である CD1d によって提示される糖タンパクを認識する細胞群である。CD1d と限定された糖タンパク質により活性化された NKT 細胞は IFN- γ や IL-4 といったサイトカインを放出することで後天性免疫反応に影響を与え、Treg と並んである条件下では免疫

制御に重要な役割を果たす。BB-UVB 照射による免疫抑制が NKT 細胞を介して生じ、マウスにおける紫外線発癌に NKT 細胞が重要な役割を果たすことが知られている。NKT 細胞が欠損している Ja281K0 (knotck out) マウスを用いて、NB-UVB を照射した後にハプテンを用いて感作、惹起を行なうことで耳介腫脹反応の変化を野生型マウスと比較する。NB-UVB 照射後の所属リンパ節もしくは脾臓におけるサイトカインの発現レベルを real-timePCR 法、FACS により確認する。NKT 細胞欠損マウスにおける Treg の割合を NB-UVB 照射前後で比較することにより NKT 細胞と Treg の相互作用に関して調べる。以上のことで NB-UVB 照射後の免疫抑制における NKT 細胞の役割を明らかにする。

以上の NB-UVB 照射後の免疫抑制に関する研究により各細胞レベルでの NB-UVB 奏功機序が明らかとなり、より効率的で副作用の少ない照射方法の確立に寄与することができると考えている。

(5) マウスを用いた皮膚炎モデルにおけるチオレドキシソール外用療法の開発・検討

研究代表者はヒトチオレドキシソールを過剰発現させた TRX トランスジェニックマウスで CHS 反応やクロトンオイルによる一次刺激性皮膚炎が減弱することを報告した。さらに CHS 反応の感作相ではなく惹起相もしくはクロトンオイル塗布前に rTRX を腹腔内投与することにより CHS 反応や一次刺激性皮膚炎が減弱することを確認している。臨床的に皮膚科医が診察する炎症性皮膚疾患は、感作の過程ではなく炎症が惹起される時もしくはされた後の状態を観察しているため、CHS 反応という惹起相もしくは一次刺激性皮膚炎に対しての治療法の実践的に必要である。このためアレルギー性接触皮膚炎のモデルである CHS 反応だけでなく一次刺激性皮膚炎に対して rTRX の腹腔内投与が炎症反応惹起を抑制したことは臨床的にも意義深いと考えられる。しかし薬剤の投与方法として外用療法が実践的で簡便であり全身的副作用の少ないことが想定されるため、rTRX を各種基剤に混合し CHS 反応、クロトンオイルによる一次刺激性皮膚炎抑制に対する効果を判定する。rTRX を混合するの

に適した基剤が判明すれば、rTRX塗布後のrTRXの局在を皮膚、血中などで免疫組織染色・ELISAなどを用いて測定することで全身的影響を観察する。さらに皮膚への炎症細胞(好中球、T細胞)浸潤、アトピー性皮膚炎との関与が示唆されている macrophage migration inhibitory factor(MIF) 発現、8-oxo-deoxyguanosineなどのDNA損傷に着目し、rTRX外用療法的作用機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) NB-UVB 照射によるマウス CHS 反応抑制効果、皮膚 DC 局在への影響の検討
C57BL/6 マウスにおいてNB-UVB照射により容量、時間依存性に DNFB による CHS 反応を抑制することを確認した。次に NB-UVB 照射により表皮ランゲルハンス細胞が表皮内から容量、時間依存性に減少することを確認した。さらに NB-UVB 照射後にマウス所属リンパ節で表皮ランゲルハンス細胞を含むランゲリン陽性皮膚樹状細胞が有意に増加したことを確認した。

(2) NB-UVB 照射後の免疫抑制誘導における皮膚 DC の役割の検討
表皮ランゲルハンス細胞を一時的に欠損させることができる Langerin-DTR マウスを用いて NB-UVB 照射による CHS 抑制が生じるかを検討した。Langerin-DTR マウスでジフテリア毒素を投与して表皮ランゲルハンス細胞が欠損した状態では NB-UVB 照射による CHS の抑制効果は消去された。
以上の結果より表皮ランゲルハンス細胞による免疫抑制・制御を介して各種炎症性皮膚疾患に NB-UVB 療法が有効である可能性が示唆された。

(3) NB-UVB 照射後の Treg の変化の検討
NB-UVB 照射後にマウス所属リンパ節での制御性 T 細胞の割合の増加は認められず、NB-UVB照射後にCHS反応を惹起した皮膚においても制御性 T 細胞の割合の増加は認められなかった。

(4) NB-UVB 照射後の免疫抑制誘導における NKT 細胞の役割の検討
NB-UVB 照射による CHS 反応は NKT 細胞欠損マウスでは確認されなかった。

(5) マウスを用いた皮膚炎モデルにおけるチオレドキシン外用療法の開発・検討
クロトンオイルの外用による耳介腫脹反応は

基剤中に溶解されたrTRXの塗布により有為に抑制された。CHS反応も惹起相前でのrTRX塗布により有為に抑制された。クロトンオイル塗布やCHSで上昇する皮膚でのMIFの発現をrTRX外用は抑制した。またrTRXは炎症のない状態では表皮内に残存しているが、炎症が生じた状態では真皮まで到達することを確認した。

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 5 件)

①Kozaru T, Fukunaga A, Taguchi K, Ogura K, Nagano T, Oka M, Horikawa T, Nishigori C. Rapid Desensitization with Autologous Sweat in Cholinergic Urticaria. 査読あり *Allergol Int.* 2011;60:277-81.

②Fukunaga A, Khaskhely NM, Ma Y, Sreevidya CS, Taguchi K, Nishigori C, Ullrich SE. Langerhans Cells Serve as Immunoregulatory Cells by Activating NKT Cells. 査読あり *J Immunol.* 2010;185:4633-40

③Sreevidya CS, Fukunaga A, Khaskhely NM, Masaki T, Ono R, Nishigori C, Ullrich SE. Agents that reverse UV-induced immune suppression affect DNA repair. 査読あり *J Invest Dermatol.* 2010;130:1428-37.

④Fukunaga A, Nishiyama S, Shimizu H, Nagai H, Horikawa T, Mori A, Inoue N, Sasaki K, Nishigori C. Non-occupational allergic contact dermatitis from 2-N-octyl-4-isothiazolin-3-one in a Japanese mattress gel-sheet used for cooling. 査読あり *Contact Dermatitis.* 2010;62:317-8.

⑤Fukunaga A, Hatakeyama M, Taguchi K, Shimizu H, Horikawa T, Nishigori C. Aspirin-intolerant chronic urticaria exacerbated by cutaneous application of a ketoprofen poultice. 査読あり *Acta Derm Venereol.* 2010;90:413-5

[学会発表] (計 3 件)

① Kumiko Taguchi, Atsushi Fukunaga, Kanako Ogura, Chikako Nishigori. The role of cutaneous dendritic cells in narrowband UVB-induced immunosuppression.

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

② Atsushi Fukunaga, Tatsuya Horikawa, Kanako Ogura, Kumiko Taguchi, Xijun Yu, Yoko Funasaka, Masafumi Takeda*, Hajime Nakamura**, Junji Yodoi***, Chikako Nishigori (*Cardiovascular Medicine, **Experimental Therapeutics, Kyoto Univ., ***Biological Responses, Kyoto Univ.)

Both the elicitation phase of contact hypersensitivity response and irritant dermatitis are suppressed by administration of thioredoxin.

2010 SID Annual Meeting

③ Kanako Ogura, Atsushi Fukunaga, Shuntaro Oniki, Hiroshi Nagai, Hideki Okazawa, Takashi Matozaki, Chikako Nishigori, Tatsuya Horikawa

Rho kinase pathway regulates contact hypersensitivity response by regulating DC migration through SHPS-1.

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 淳 (ATSUSHI FUKUNAGA)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10467649