

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 3月31日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791097

研究課題名（和文） 表皮角化細胞の獲得免疫前抗原応答

研究課題名（英文） A response of pre-immune system of epidermal keratinocytes

研究代表者：小林 美和 (KOBAYASHI MIWA)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00341503

研究成果の概要（和文）：

接触皮膚炎では獲得免疫応答が働いており、表皮角化細胞も役割を果たしていることが分かっているが、免疫反応がどのように始まるのかは明らかでなかった。本研究では、表皮角化細胞が他の細胞の影響なしに、物理的刺激だけで炎症を引き起こしうることを、ナノマテリアルである二酸化チタンの結晶を利用して示した。チクチクしたものが触れた後に痒く赤くなることがあるが、これは皮膚の細胞1つ1つでも起こっている反応である。

研究成果の概要（英文）：

The acquired immunity controls contact dermatitis, and it is known that the epidermal keratinocytes play a part in that. However, it is not clear how the immune reaction of the contact dermatitis starts. This study showed that the epidermal keratinocytes, without other immune cells, are able to cause inflammation by mechanical irritation of nanomaterial TiO₂. We often have dermatitis by irritation of prickly thing, interestingly, the same response occurs in individual epidermal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学・皮膚炎症・再生学

キーワード：表皮角化細胞、自然免疫、ナノマテリアル、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

外界との境界にある表皮が、より原始的に生体防御の最前線の役割を果たすことについて、これまで多くのことが分かってきた。1つは、角質による物理的なバリアであり、もう1つは近年盛んに研究が行われている表皮自然免疫である。一方で、より高次の防御反応としての獲得免疫については、接触皮膚炎モデルの研究により、樹状細胞の抗原認識に始まる免疫反応の各段階が明らかにされてきている。しかしながら、樹状細胞が抗原を認識する際の「きっかけ」が何なのかは、いまだに明確な説明がされていない。現在、炎症性メディエーターの存在下では真皮樹状細胞が抗原として認識し免疫応答へ導き、炎症がない場合はランゲルハンス細胞が免疫寛容へ導くことも分かって来た。つまり、接触過敏反応の最初のステップにおいて炎症の有無が重要であるが、では何が炎症を起こしたのかと考えた場合に表皮角化細胞が無視できなくなってきた。現在は、①皮膚に外来抗原に触れると、②表皮角化細胞がTNF- α 、IL-1, PGE $_2$ などの炎症性メディエーターを産生し、③ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞の活性を促すと考えられているが、なぜ表皮角化細胞が炎症性メディエーターを産生するのか、という①と②の間が分からないままになっているのである。一方、以前より継続している表皮角化細胞のケモカイン産生能についての研究から、好中球や好酸球を遊走させる炎症性ケモカインと、リンパ球や樹状細胞に働きかける免疫系ケモカインの両者を角化細胞が産生することも分かっている。これらの結果を受けて、表皮角化細胞は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする重要な細胞であると位置づけられている。

すでに、人工的に作られた強力なハプテン

としての抗原である TNCB が、表皮ケラチノサイトの NLR 関連遺伝子発現に影響していることが報告されており、自然免疫と獲得免疫の関連が示唆されている。自然免疫と獲得免疫の双方向性な関係が明らかにされている中で、獲得免疫系のモデルとも言える接触皮膚炎においても表皮自然免疫が関わるのか、もしそうであれば、イニシエーターとしての角化細胞がどのように関わっているのかを調べたい。

2. 研究の目的

接触皮膚炎における皮膚での最初の反応を考えるため、刺激性接触皮膚炎のモデルとして細胞障害性物質の影響をみるため、以下の検討を行った。

- (1) 表皮角化細胞のみで炎症を起こすための反応が生じるのか。
- (2) その反応に炎症に関わる因子が影響するのか。

3. 研究の方法

刺激性接触皮膚炎のモデルとして、化学的に安定しているが、細胞障害性がある物質を用いることとした。二酸化チタンは、その形状により、細胞への影響の大小があることが知られており、主に気道構成細胞への障害性について検討されている。その中で、化粧品や顔料に含まれている球状のチタンは細胞障害性が少ないが、針状のチタンには毒性があることが分かっている。

そこで、培養表皮角化細胞に、針状結晶チタンまたは球状結晶チタンを添加し、それぞれの刺激が表皮角化細胞に与える影響を検

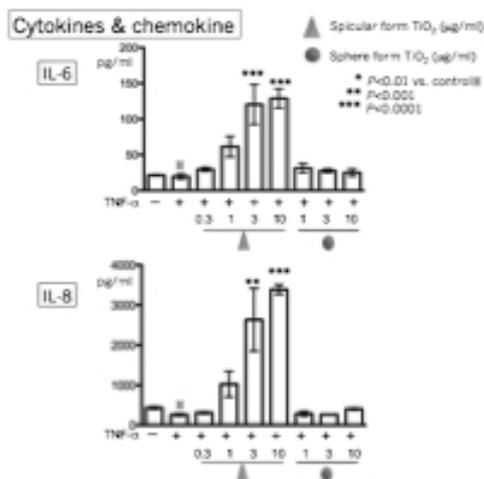
討した。

- (1) サイトカイン/ケモカインの産生にどの程度の変化が生じるのかを定量的に検討する。特に、樹状細胞の活性化に関わるメディエーターである TNF- α , IL-1, GM-CSF などに焦点を当てる。一方で、自然免疫反応に関わる IL-8, IL-6 抗菌ペプチドの産生についても同時に検討した。
- (2) 培養表皮角化細胞に添加し、すでに確立している培養表皮角化細胞の自然免疫関連タンパク発現を遺伝子レベルでみる。検討する自然免疫関連タンパクとして、NALP3 inflammasome に注目し、NALP3, ASC, Caspase-1 の mRNA 量を real-time PCR で解析した。

4. 研究成果

- (1) 培養上清中に産生された炎症性サイトカイン/ケモカインの産生量変化

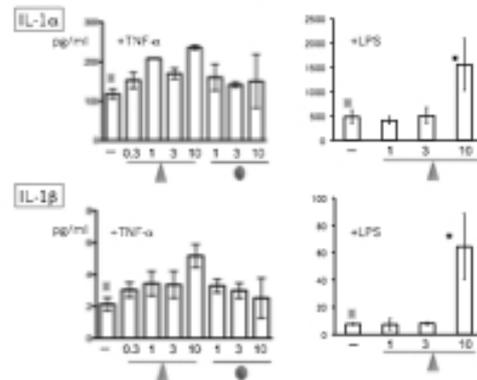
針状結晶チタンによる刺激で、炎症



性サイトカインの IL-6, 好中球遊走因子ケモカインの IL-8 の産生が亢進していた。一方、球状結晶チタンで

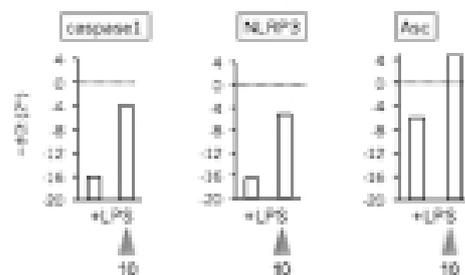
は、産生量に有意な変化は見られなかった。

樹状細胞の活性化に関わる IL-1 は、TNF- α およびLPSによる前処置を施した際に、針状結晶チタンで IL-1 α , IL-1 β ともに産生量が増加する傾向が見られた。



- (2) 表皮角化細胞の inflammasome 関連遺伝子の発現量変化

針状結晶チタンによる刺激では LPS による前処置を加えると、Caspase 1, NALP3, Asc の mRNA 発現が亢進していた。一方、球状結晶チタンによる刺激では、mRNA 発現に有意な変化は見られなかった。



以上のことより、化学的に安定な物質であってもその形状により表皮角化細胞に直接炎症反応を惹起させることができることが確認された。また、針状構造と球状構造の違いは、針状構造は鋭利である、というだけで

なく、細胞との接触面の圧力の違いと考えることもできる。

一方で、球状結晶のチタンでは、表皮角化細胞による炎症を誘導しないことが分かり、化粧品などに用いられるナノマテリアルとして、安全性を確認することとなった。

また、炎症性サイトカイン、ケモカイン産生は、他の細胞、すなわち免疫に関わるランゲルハンス細胞やリンパ球が影響しない状態において、表皮角化細胞のみで産生亢進が完結していることが分かる。刺激性接触皮膚炎は、物理的刺激が表皮角化細胞に加わるといふ、極めて原始的な刺激からスタートしうることが分かった。また、炎症に関連する基本的なサイトカインである TNF- α 、あるいは、自然免疫反応に関わる LPS の影響下では、物理的刺激による炎症がより起こりやすい、という可能性も示唆された。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ①. 小林美和, 二酸化チタンの表皮角化細胞に対する細胞傷害性の評価. 第 29 回産業医科大学学会総会. 2011 年 10 月 18 日 ラマツイーニホール 福岡県北九州市
- ②. Miwa Kobayashi. Spicular form titanium dioxide induces IL-1 alpha /beta production of keratinocytes. 第 35 回日本研究皮膚科学会総会学術大会. 2010 年 12 月 3 日. 和歌山県民文化会館 和歌山市

[6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 美和 (KOBAYASHI MIWA)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：00341503

(2) 研究協力者

坂部 純一 (SAKABE JUNICHI)
産業医科大学皮膚科学 大学院生