

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 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890093

研究課題名（和文）皮膚樹状細胞の定常状態・各刺激時におけるリアルタイム動態解析

研究課題名（英文）Real time kinetic analysis of the skin dendritic cells in the steady state and various stimulus conditions.

研究代表者

谷崎 英昭 (TANIZAKI HIDEAKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90586653

研究成果の概要（和文）：

皮膚における免疫応答の多様性を決定する因子については未だ不明な点が多く、特に外的刺激に対する免疫応答に関与する分子の同定とその役割の解明を本研究の目的とした。

申請者らは、定常状態、tape strip などの比較的弱い刺激、蛍光標識ハプテン塗布時の経時的な皮膚樹状細胞の動態を Langerin-eGFP マウスを用いて観察し、in vivo リアルタイムイメージング法を確立した。また Th1・Th2 型に分化培養した T 細胞を静脈内に投与することで皮膚免疫細胞の動態評価を可能にし、皮膚における細胞遊走を可視化し検討することに成功した。

(Egawa et al JID 2011 Apr)。更に、細胞骨格制御分子 Rho ファミリーの 1 つである mDia1 が、皮膚樹状細胞の貪食、遊走、接着、免疫シナプスの形成に必須の役割を果たすことを示し、さらに、本システムを障害させると接触皮膚炎反応の形成が成立しないことを見出し、報告した (tanizaki et al Blood 2010 Dec)。

研究成果の概要（英文）：

The factors that determine the diversity of the immune response in the skin is still largely unknown. The purpose of this study was to elucidate its role and identification of molecules involved in the immune responses, especially against external stimuli.

We observed the dynamics behavior of dendritic cells of the skin using a Langerin-eGFP mouse over a period of time in the steady state, a relatively weak stimulus such as tape strip, and applied fluorescence-labeled hapten and established the real-time imaging method in vivo.

In addition, we have made it possible to evaluate the dynamics and cell migration of immune cells in the skin after that we transfer intravenously differentiated and cultured T cells into type Th1 and Th2 T cells (Egawa et. Al. JID 2011 Apr).

And more, we have shown that mDia1, which is one of the cytoskeletal molecules in the Rho family, play an essential role in the phagocytosis, migration, adhesion of skin dendritic cells, and immune synapse formation with the another immune cells, such as immunological synapse.

Finally, we reported that the contact dermatitis response is not formed at the time of

the failure of this system (tanizaki et. al. Blood 2010 Dec)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：皮膚樹状細胞、ランゲルハンス細胞、mDia

1. 研究開始当初の背景

免疫システムの最大の特徴は、多数の免疫細胞が体中を動き回り、相互に作用し合う時空間的動的に複雑なシステムである。従来、皮膚免疫細胞の動態制御は、in vitro あるいは経時的な二次元の組織所見から推測されてきた。

近年新たな細胞観察方法として注目されてきている2光子励起顕微鏡を用いた「リアルタイムイメージング」システムの確立は、皮膚樹状細胞の皮膚からリンパ管までの遊走プロセスの包括的解明、皮膚樹状細胞と他の免疫担当細胞との相互作用とその意義の解明、惹起時の抗原提示細胞の同定に活用できるものと考えられ、皮膚接触皮膚炎モデルやUVB照射時など様々な皮膚炎モデルに応用できるものと期待されていた。

2. 研究の目的

皮膚免疫応答において、皮膚抗原提示細胞として重要な役割を果たす表皮ランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の詳細な動態観察を可能とする方法の確立を目指した。

その中でも、細胞運動の制御が「細胞の分化」および「組織内で細胞が担う機能」にも密接に関わることを解明し、運動能力の高い細胞群に関わる生命現象を理解することは、組織内における運動の制御メカニズムの基礎

的解析が極めて重要であると考え、皮膚樹状細胞において細胞運動に関わるアクチン制御機構が果たす役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

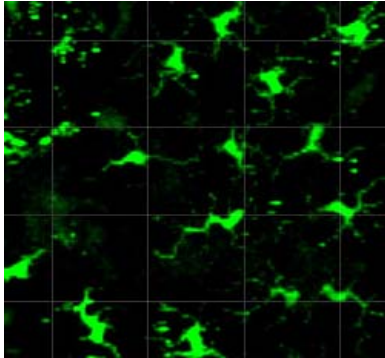
リンパ節内におけるリンパ球の動態解析で培ったデータを元に、皮膚における免疫反応の皮膚内イメージング法を確立し、動画解析ソフトを用いて細胞をトラッキング、パラメーター化し、動態の詳細を各条件下で比較検討した。特に、抗原取り込み時などに特徴的な樹状突起部の動きに関して、従来では不可能であったZ軸方向の動態解析を加え評価を行った。

皮膚接触皮膚炎モデルにおけるシステムの包括的解析を、細胞骨格の制御分子であるRhoファミリーに着目して、遺伝子欠損マウスや特異的阻害剤を適宜用いて検討を行った。

4. 研究成果

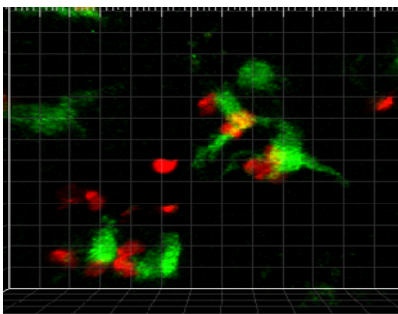
申請者らは、Langerin-eGFP マウスを用いて定常状態、tape stripなどの比較的弱い刺激に加え、蛍光標識された様々な分子量のハプテン塗布後から経時的に皮膚樹状細胞の動態を観察し、皮膚免疫における in vivo リアルタイムイメージン

グを行うための基盤づくりを行った。また、皮膚免疫と全身免疫のクロストークの可能性を検証するため、Th1・Th2型に分化培養した T 細胞を adaptive transfer することで皮膚免疫細胞の動態評価を可能にし、定常状態における皮膚内細胞遊走・細胞浸潤を可視化し評価した (Egawa et. al. JID 2011 Apr)。



(図：Langerin-eGFP マウスにおいて皮膚で観察される GFP 陽性細胞を示す。ハプテン塗布時には、樹状突起を長く伸ばして活性化された樹状細胞の挙動が観察された)

また、細胞骨格制御分子 Rho ファミリーの 1 つである mDia1 が、皮膚樹状細胞の貪食、遊走、接着、所属リンパ節内における免疫シナプスの形成に必須の役割を果たすことを示し、さらに、本システムを障害させると接触皮膚炎反応の形成が成立しないことを見出し、ランゲルハンス細胞の皮膚免疫における制御機構の一端について報告した (Tanizaki et. Al. Blood 2010 Dec)。



(図：膝窩リンパ節内における標識・感作後に遊走した骨髄由来培養樹状細胞 (緑) と標識した T 細胞 (赤) の接着の様子。最長 8 時間

までの連続撮影を行って接着の様子を観察した)

今回明らかとした樹状細胞の機能制御機構の解明は、皮膚樹状細胞の皮膚からリンパ管までの遊走プロセスの包括的解明、皮膚樹状細胞と他の免疫担当細胞との相互作用とその意義の解明、惹起時の抗原提示細胞の同定など、従来明らかにすることが困難とされてきた問題に直接アプローチすることが可能となり、アトピー性皮膚炎をはじめとする炎症性皮膚疾患の治療や樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫の有効性の向上にも貢献することが期待できるものと考えている。

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 3 件)

① Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, (以下 6 名), Kabashima K. Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. **J Dermatol Sci.** 2011; 61: 144-7.

DOI: 該当なし

② Egawa G, Honda T, Tanizaki H, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. In vivo imaging of T-cell motility in the elicitation phase of contact hypersensitivity using two-photon microscopy. **J Invest Dermatol.** 2011; 131: 977-9.

DOI: 該当なし

③ Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, (以下 10 名), Kabashima K. Rho-mDia1 pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. **Blood.** 2010; 116: 5875-84.

DOI: 該当なし

[学会発表] (計 2 件)

- ① 第 20 回日本樹状細胞研究会
2011 年 7 月 1 日
定常状態・抗原刺激時における
Langerhans 細胞の in vivo imaging
- ② 第 35 回日本研究皮膚科学会
2010 年 12 月 3 日
Analysis of skin Langerhans cells
behavior under the various conditions
using in vivo live imaging

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷崎 英昭 (TANIZAKI HIDEAKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 90586653