

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791123

研究課題名(和文)表皮gdT細胞の解析ツールの開発および機能解析

研究課題名(英文)Development of analysis tools for epidermal gdT cells, and its functional analysis

研究代表者

志村 絵理 (SHIMURA, ERI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30586342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：表皮に存在する T細胞であるDETCs (dendritic epidermal T cells)はこれまで創傷治癒、皮膚癌、接触性皮膚炎といった皮膚疾患において重要な役割を担っている可能性が示されてきた。しかし、DETCsの詳細な機能について、未だ不明瞭な部分が多い。

本研究は、DETCsに特化した解析ツールの開発とその機能解析を目的とし、DETCs特異的に発現する遺伝子の探索を行った。また一方で、接触性皮膚炎におけるDETCsの役割について明確にすることを試みた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies suggested that DETCs (dendritic epidermal T cells) which present in the epidermis of mouse skin plays an important role in skin diseases such as wound healing, skin cancer and contact hypersensitivity. However, the precise role of DETCs in these skin diseases is poorly understood.

We searched for candidate genes that expressed DETCs-specific manner, aiming to establish of an analysis tool that is specialized in the detection of DETCs and to elucidate the function of DETCs. On the other hand, we attempted to elucidate the function of DETCs in contact hypersensitivity.

研究分野：皮膚免疫

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：表皮gdT細胞 皮膚免疫 接触性皮膚炎 gdT細胞 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

マウスの表皮には、ランゲルハンス細胞 (Langerhans cell:LCs 図1のgreenの細胞) および表皮 T細胞(dendritic epidermal T cells:DETCs 図1のredの細胞)が存在しており、いずれも樹状突起をのびた状態で分布している。これまで、皮膚免疫応答はLCsや真皮樹状細胞を中心に説明されてきており、その背景でCD11c-DTR (Immunity. 2002; 17:211-220)マウス、Langerin-DTR (Immunity. 2005; 22:643-654, J Cell Biol. 2005; 169:569-576) マウス、Langerin-DTA (Immunity. 2005; 23:611-620)マウス等、これら細胞の解析を目的とした複数の遺伝子改変マウスの構築とその解析が大きく寄与してきた。

その一方で、DETCsについても皮膚免疫応答における役割が議論されてきている。これまでに移植片対宿主反応に伴う皮膚炎症、創傷治癒、皮膚癌、接触性皮膚炎において重要な役割を担っている可能性が示され (J.Exp.Med,1996,183,1483-1489,Science,2002,296,747-749/J.Immunol.,172,3573-3579,2004/Science,2001,294,605-609/J.Invest.Dermatol.,2002,119,137-142/J Exp Med., 2002, 195,855-867)、表皮 $\gamma\delta$ T細胞の機能を明確にすることは、皮膚組織を介した全身的な免疫応答の分子機構を理解する上で非常に重要であると考えられた。しかしながら、実際、DETCsは未だ不明な部分が非常に多い。また、マウスのDETCsに相当する細胞が本当にヒトの皮膚で存在しないのかどうか明確になっていないため、ヒトでの治療に応用可能か否かも不明瞭である。

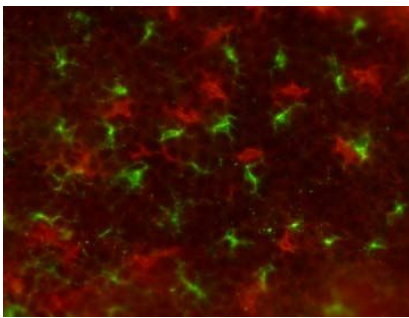


図1: 表皮シートをMHC class II (Green) および CD3e(Red)の抗体を用いて染色

DETCsについて不明な部分が多い原因として、DETCsの解析に有用な遺伝子改変マウスや手法が存在しないことが挙げられる。

既存の報告においては、TCR遺伝子欠損マウスを用いた解析結果から、DETCsの機能を考察しているものが多い。しかしながら、TCR遺伝子欠損マウスではDETCs以外の

T細胞の欠損も起こることから、DETCsに関する一定の理解は得られるものの、DETCsのみに限定して解析することが困難である。

また、定常状態のDETCsはTCR鎖(V5)をマーカーとし、フローサイトメトリー(FACS)での検出が可能である一方、活性化状態にあるDETCsはTCRの発現が低下する為、検出にFACSを利用することができないこともDETCsの解析が困難とする一因である。

これら問題点を払拭し、DETCsを解析するには、新規DETCsマーカーの特定をはじめ、DETCsに特化した解析手法の構築が必要と考えられた。

2. 研究の目的

DETCsの機能解析およびDETCs解析ツールの構築を目指し、DETCsのマーカーとなる遺伝子を同定することが本研究の目的である。また一方で、ヒトではマウスのDETCsに相当する細胞は存在しないとされてきたが、正確に評価した報告が無いため、同定した遺伝子について、ヒトでの発現を調べることで、DETCsに相当する細胞の有無を検討することも目的とする。

3. 研究の方法

DETCs特異的に発現する遺伝子の探索
DETCsに特化した解析ツールの構築にあたり、DETCs特異的に発現する遺伝子の同定が必要不可欠である。同定した遺伝子をマーカーとすることで、DETCsの検出が可能になり、またDETCs欠損マウスやレポーターマウスの構築が可能となる。

脾臓、腸管、皮膚からそれぞれT細胞を単離し、マイクロアレイ解析を行った。得られた解析結果およびランゲルハンス細胞の遺伝子情報をもとに、DETCsのみに発現する候補遺伝子を選出した。その後、DETCsから抽出したmRNAを用いて、候補遺伝子それぞれの発現をRT-PCRにより確認した。

接触性皮膚炎におけるDETCsの機能解析
DNFB(dinitro fluorobenzene)を用いて接触性皮膚炎を誘導した耳翼表皮サンプルについて、DETCs特異的なTCRであるV5の発現をリアルタイムPCRで検出し、DETCsの割合を評価した。同様に、Oxazoloneを用いて慢性的な皮膚炎を誘導した場合についても解析を行った。

RAG2欠損マウスに野生型マウスの脾臓細胞を移入し、DETCsは表皮に存在しないが、他の免疫細胞は存在する状況を構築し、DNFBを用いた接触性皮膚炎について耳翼の肥厚を野生型マウスおよびRAG2欠損マウスと比較した。

4. 研究成果

DETCs特異的に発現する遺伝子の探索
マイクロアレイ解析により脾臓、腸管、皮膚の各T細胞およびランゲルハンス細胞の遺伝子情報をもとに、サブトラクションによりDETCsのみに発現する候補遺伝子500遺

伝子を得た。その後、非特異的に検出された遺伝子を除くため、表皮ケラチノサイトから調整した mRNA を用いて、候補遺伝子について RT-PCR を行った。この RT-PCR によって検出される遺伝子を DETCs 特異的に発現する候補遺伝子から外していき、123 遺伝子まで候補遺伝子を絞り込んだ。

これら候補遺伝子の内訳はタイトジャンクション等の皮膚組織の構造や細胞骨格の形成に関するもの、細胞膜表面受容体、サイトカインやケモカイン等の液性因子、転写因子であった。特に、細胞膜表面受容体および転写因子に関しては、脳で発現が高いとされる遺伝子が多いことが明らかとなった。

今後更に DETCs 特異的遺伝子の絞り込みを行う。一方、同定した遺伝子について、ヒトの皮膚組織における発現の有無を検討し、DETCs に相当する細胞がヒトにて存在するか解析を試みる。

接触性皮膚炎における DETCs の機能解析 DNFB を用いた接触性皮膚炎において、急性炎症の惹起 24 時間後に DETCs の割合が炎症を誘導していない耳翼(vehicle)に比べて減少することが明らかとなった(図 2)。同様に、Oxazolone の反復塗布によって炎症を慢性化させた場合においても DETCs の割合に減少が認められた(図 3)。

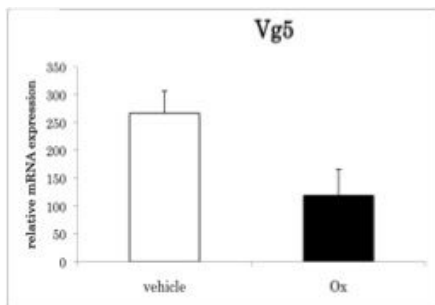


図 2: DNFB を用いた接触性皮膚炎(急性炎症)の耳翼サンプルについて Vg5 の mRNA の発現を Real-time PCR で検討

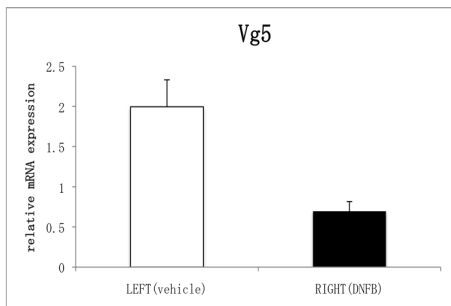


図 3: Oxazolone を用いた接触性皮膚炎(慢性炎症)の耳翼サンプルについて Vg5 の mRNA の発現を Real-time PCR で検討

この結果から、接触性皮膚炎の炎症局所から、DETCs が真皮やリンパ節へ移動している可能

性が考えられることから、今後、接触性皮膚炎における DETCs の動態について解析を予定している。

一方、DETCs の接触性皮膚炎における役割を解析するため、野生型マウスの脾臓細胞を RAG2 欠損マウスへ移入し、DETCs が表皮にいない状況を構築した。

このマウスへ DNFB を用いて接触性皮膚炎を誘導し、耳翼の厚さにより炎症を評価したところ、野生型マウスに比べ優位に腫れが抑制されていた(図 4)。

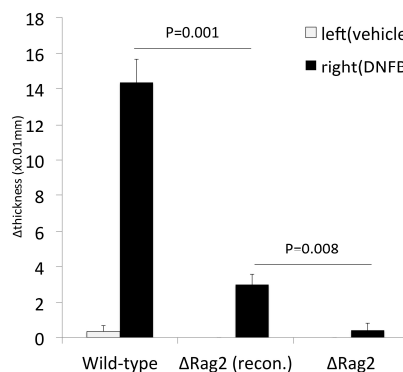


図 4: DNFB を用いた接触性皮膚炎(急性炎症)における耳翼の肥厚

この結果は、TCR 遺伝子欠損マウスを用いた接触性皮膚炎では、野生型に比べ接触性皮膚炎が悪化するという既存の報告(J Exp Med., 2002, 195,855-867)とは異なる結果であった。従って、皮膚免疫応答における DETCs の機能を正確に理解する為には DETCs のみを欠損させたマウスの解析が必要と考えられた。

今後 の研究を進め、同定した DETCs 特異的遺伝子をターゲットとし、DETCs 欠損マウスおよび DETCs レポーターマウスの作成を試みる。これらマウスの解析により、DETCs の機能を明確にすることを旨とする。

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 4 件)

Shibui A, Shimura E, Nambu A, Yamaguchi S, Leonard WJ, Okumura K, Sugano S, Sudo K, Nakae S, Th17 cell-derived IL-17 is dispensable for B cell antibody production, Cytokine, 査読有り, 59(1),2012,108-14, doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.018. Epub 2012 Apr 13.

Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y,

Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S., Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma, Journal of Immunology, 査読有り, 189(7),2012,3641-52,URL:http://www.jimmunol.org/content/189/7/3641.long

Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP, Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion, circulation, 査読有り, 124, 2011,S187-S196, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014852.

Shibui A, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Shiraishi C, Sato Y, Okumura K, Sugano S, Hozumi N, Nakae S., Alteration of immune responses by N-acetylglucosaminyltransferase V during allergic airway inflammation, 査読有り, 60,2011,345-54, doi: 10.2332/allergolint.10-0A-0283.Epub 2011 Apr 25.

[学会発表](計3件)

SHIMURA Eri, Regulation of contact hypersensitivity by interleukin-21, 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年12月13日、幕張メッセ(千葉市)

SHIMURA Eri, Regulatory roles of IL-21 receptor in contact hypersensitivity, 第41回日本免疫学会学術集会, 2012年12月5日、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル

SHIMURA Eri, The role of IL-21 receptor in contact hypersensitivity, 第40回日本免疫学会学術集会, 2011年11月27日、幕張メッセ(千葉市)

[図書](計2件)

Eri SHIMURA, Susumu Nakae, Role of IL-17 in contact hypersensitivity, J Environ Dermatol Cutan Allergol, 6(5), 2012, 417-426,

志村絵理・中江進, 北隆館, アレルギーの臨床, 2011年, p22-27

6. 研究組織

(1)研究代表者

志村 絵理 (SHIMURA, Eri)

順天堂大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号: 30586342

(3)研究協力者

中江 進 (NAKAE, Susumu)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 60450409

須藤 カツ子 (SUDO, Katsuko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50126091

須藤 一 (SUTO, Hajime)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90286740