

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791255  
 研究課題名（和文）CCR7 リガンドがマウスランゲルハンス細胞の Th2 ケモカイン産生に及ぼす影響  
 研究課題名（英文）The effects of CCR7 ligands on Th2 chemokine production by mouse Langerhans cells  
 研究代表者  
 藤田 英樹（FUJITA HIDEKI）  
 東京大学・医学部附属病院皮膚科・講師  
 研究者番号：10323544

研究成果の概要（和文）：ランゲルハンス細胞（LC）を含め樹状細胞が皮膚からリンパ節へ異動する最重要なケモカインである CCL19 および CCL21 は LC からの Th2 ケモカインである CCL17 の産生を増強し、LC への Th2 細胞の遊走を増加させることで Th2 反応の促進に関わることが示唆された。LC はアトピー性皮膚炎のような Th2 疾患の病態において重要な役割を果たす抗原提示細胞と考えられており、これらの疾患におけるケモカインをターゲットとした治療戦略を考える上で有意義な結果である。

研究成果の概要（英文）：CCL19 and CCL21 are chemokines which are pivotal for Langerhans cells in their migration from the skin to the draining lymph nodes. We found that CCL19 and CCL21 enhance the production of CCL17, which is known to be a Th2-type chemokine, indicating that CCL19 and CCL21 augment the Th2-type immune response mediated by LCs through the recruitment of Th2 cells. Considering the critical roles of LCs in the pathophysiology of inflammatory skin diseases including atopic dermatitis, our results may provide new insights into the chemokine-targeted therapies for such diseases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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

キーワード：皮膚炎症・再生学

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞の一種であるランゲルハンス細胞（LC）は皮膚免疫反応の制御において中心的な役割を果たす抗原提示細胞である。病原体などの外来抗原を捕捉し、表皮内から真皮内を通過し、リンパ管を通してリンパ節に移動して T 細胞に抗原提示を行う。この遊走の過程では LC 上に発現するケモカイン受容体である CCR7 とそのリガンドである CCL19 および CCL21 の相互作用が必須である。LC 自身も活性化によりケモカインを産生するが、研究代表者らは LC が特に CCR4 を受容体とする Th2 タイプケモカイン（CCL17 および CCL22）

の産生能に非常に優れていることを既に明らかにしている。CCR7 のリガンドである CCL19 と CCL21 には本来のケモカインとしての細胞走化性に加えて細胞の生存、エンドサイトーシス、成熟、T 細胞活性化などの樹状細胞の重要な機能を修飾する作用があることが知られているが、CCL19 および CCL21 が LC の機能に与える影響は報告されておらず、さらにこれらが LC を含め樹状細胞からのケモカイン産生にどのような影響を与えるかは全く不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は LC をリンパ節へ誘導するケモカインである CCR7 リガンド(CCL19, CCL21)による LC からの Th2 ケモカイン(CCL17, CCL22)産生制御を明らかにすることであった。

## 3. 研究の方法

ランゲルハンス細胞 (LC) の細胞表面抗原である MHC class II に対する抗体を用いた panning 法により BALB/c マウス皮膚より 95%以上の純度で LC を精製し、これを実験に用いた。

(1) 精製直後の新鮮未熟 LC および 24 時間無刺激下培養後の成熟 LC を用い、RT-PCR 法にて LC の CCR7 発現を検討した。

(2) CCL19 および CCL21 に対するケモタキシスアッセイを行い、LC の CCR7 が機能的であるかどうかを検討した。

(3) 新鮮 LC を無刺激下、CCL19 存在下、または CCL21 存在下に 48 時間培養し、ELISA 法にて培養上清中の CCL17 の濃度を測定し、CCL19 および CCL21 が LC からの Th2 ケモカイン産生にどのような影響を与えるかを検討した。

(4) また、一般に CCR7 を含めケモカイン受容体は G 蛋白質共役型受容体であるため、CCL19 および CCL21 の作用が GTP 結合蛋白質依存性情報伝達系を介しているかを検討するため、GTP 結合タンパク質阻害薬である pertussis toxin を用いて、CCL19 および CCL21 の作用の阻害実験を行った。

## 4. 研究成果

(1) ランゲルハンス細胞(LC)における CCR7 の発現: 単離直後の新鮮 LC および 24 時間培養して成熟させた LC における CCR7 の発現を RT-PCR 法にて検討したところ、新鮮 LC ではその発現は認めなかったが、成熟 LC では強い発現が認められた (図 1)。

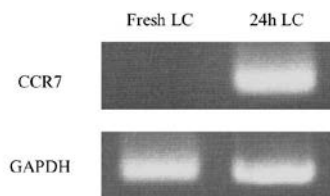


図 1 新鮮 LC (Fresh LC) および 24 時間培養して成熟させた LC (24h LC) における CCR7 の発

現 (RT-PCR 法)。GAPDH をコントロールとした。

(2) CCL19 および CCL21 に対する LC のケモタキシスを検討したところ、新鮮 LC はこれらケモカインに対し遊走を示さなかったが、成熟 LC はこれらのケモカインに対し共に 10 nM の濃度をピークとして濃度依存性に走化性を示した (図 2)。

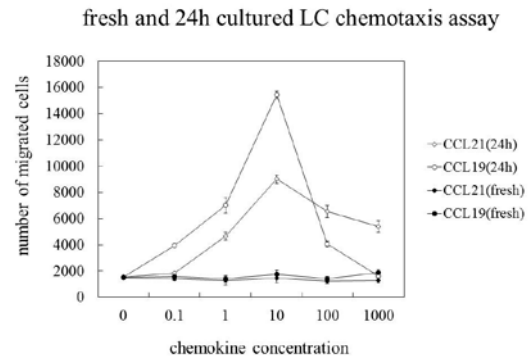


図 2 CCL19 および CCL21 に対する新鮮 LC (Fresh LC) および 24 時間培養して成熟させた LC (24h LC) の走化性 (ケモタキシスアッセイ)

またこの走化性は GTP 結合タンパク質阻害薬である 100 ng/ml の pertussis toxin の前処理で完全に抑制されたことより (図 3)、CCL19 および CCL21 の LC の走化性に対する作用は G 蛋白質共役型受容体を介したものであることが示唆された。

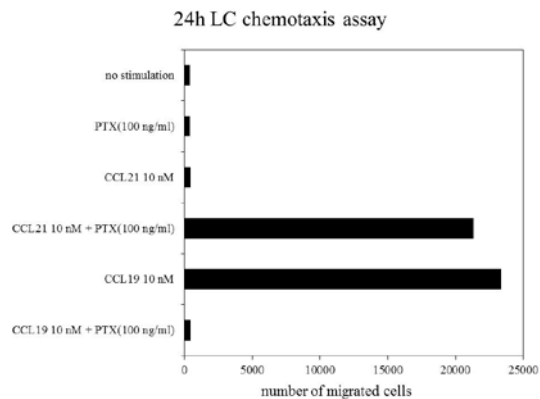


図 3 pertussis toxin (PTX) 前処理の CCL19 および CCL21 依存性の LC の走化性に対する影響 (ケモタキシスアッセイ)。24 時間培養後の成熟 LC を 30 分間 100 ng/ml の PTX 存在下あるいは非存在下に培養し、その後ケモタキシスアッセイを行った。

(3) CCL19 および CCL21 が LC からの CCL17 産生の及ぼす影響を検討したところ、CCL19 および CCL21 共に LC からの CCL17 産生を 10 nM の濃度をピークとして濃度依存性に増強した (図 4)。

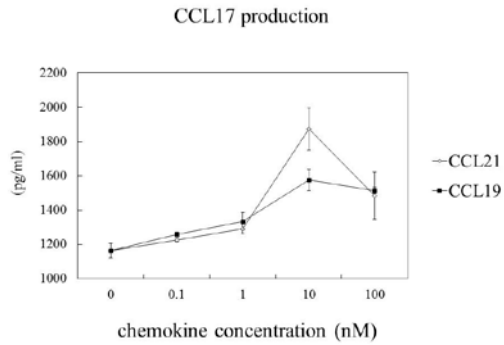


図 4) CCL19 および CCL21 が LC からの CCL17 産生の及ぼす影響。新鮮 LC を単離し、各濃度の CCL19 あるいは CCL21 の存在下に 48 時間培養後、培養上清を回収し、ELISA 法にて培養上清中の CCL17 濃度を測定した。

さらに、この CCL17 産生増強効果は 100 ng/ml の pertussis toxin (PTX) の前処理で完全に阻害されたことから (図 5)、CCL19 および CCL21 の LC からの CCL17 産生に対する作用は G 蛋白質共役型受容体を介したものであることが示唆された。

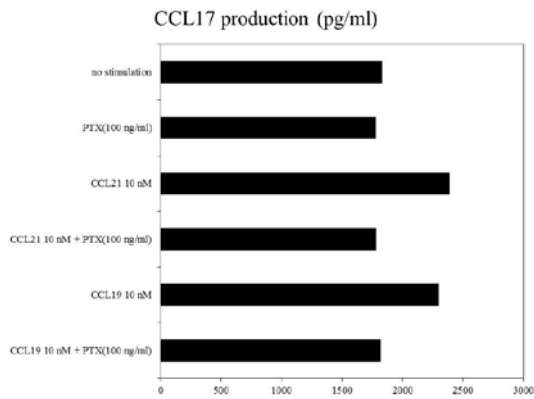


図 5) pertussis toxin (PTX) 前処理の CCL19 および CCL21 の LC からの CCL17 産生増強作用に及ぼす影響。単離直後の新鮮 LC を 30 分間 100 ng/ml の PTX 存在下あるいは非存在下に培養し、その後 CCL19 および CCL21 の存在下に 48 時間培養後、培養上清を回収し、ELISA 法にて培養上清中の CCL17 濃度を測定した。

以上より、よって、CCL19 および CCL21 が LC 上に発現する CCR7 を介して LC からの Th2

ケモカイン (CCL17) の産生を増強し、LC への Th2 細胞の遊走を増加させることで Th2 反応の促進に関与することが推測される。今回得られた結果はアトピー性皮膚炎の様な Th2 疾患におけるケモカインをターゲットとした治療戦略を考える上で重要であると考えられる。今後は、もう一つの Th2 ケモカインであり、CCL17 と受容体として CCR4 を共有する CCL22 産生への CCL19 および CCL21 が及ぼす影響についても検討が必要である。

#### 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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田英樹 (FUJITA HIDEKI)

東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 10323544

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：