

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591650

研究課題名(和文) ライブイメージングを用いたアトピー性皮膚炎病態解析と新規病態制御因子の同定

研究課題名(英文) Live imaging analysis of cutaneous immune responses

研究代表者

本田 哲也 (Honda, Tetsuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40452338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎病態制御因子として、脂質メディエーターの一種であるレゾルビンE1(RvE1)を同定した。RvE1は皮膚樹状細胞の動態を抑制した。その結果リンパ節でのT細胞への抗原提示や皮膚でのT細胞への抗原提示能が低下し、T細胞活性が障害され、皮膚炎の抑制効果がみられた。RvE1は樹状細胞上のロイコトリエン受容体シグナルを阻害することでCdc42, Rac1の活性を障害し、その結果アクチン形成を阻害することでその動態を制御していた。以上より、RvE1はアトピー性皮膚炎を含む皮膚アレルギー性疾患に対し、新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Resolvin E1 (RvE1) is a lipid mediator derived from 3 polyunsaturated fatty acids that exerts potent anti-inflammatory roles in several murine models. Anti-inflammatory mechanism of RvE1 in acquired immune responses has been attributed to attenuation of cytokine production by dendritic cells (DCs). In this study, we newly investigated the effect of RvE1 on DC motility using a contact hypersensitivity (CHS) model and found that RvE1 impaired DC motility in the skin using two-photon microscopy. RvE1 attenuated T cell priming in the draining lymph nodes and effector T cell activation in the skin, leading to the reduced skin inflammation in CHS. On the other hand, leukotriene B4 (LTB4) induced actin filament reorganization in DCs and increased DC motility by activating Cdc42 and Rac1 via BLT1, which was abrogated by RvE1. Our results suggest that RvE1 attenuates cutaneous acquired immune responses by inhibiting cutaneous DC motility possibly through LTB4-BLT1 signaling blockade.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 皮膚樹状細胞 脂質メディエーター

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎は Th2 型細胞や樹状細胞など種々の免疫細胞が複雑に絡み合い病態を形成している。しかし、アトピー性皮膚炎病変部において、それら免疫細胞がどのような動態を示すかは明らかではなかった。

(2) また細胞の動態はその機能と密接に関係するが、それら細胞の動態と機能の制御因子についても明らかではなかった。

2. 研究の目的

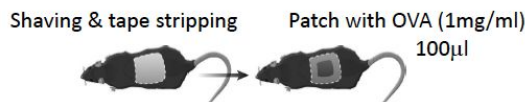
(1) アトピー性皮膚炎病変部における Th2 細胞、及び樹状細胞の動態とその機能制御因子を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウスアトピー性皮膚炎モデルを用い、Th2 細胞の動態を多光子励起顕微鏡にて生体イメージングを試みた。

(2) マウスアトピー性皮膚炎モデルとして、卵白アルブミン (OVA) の貼付による誘導を試みた。

(3) OVA を含ませたガーゼを 4 日間密封貼付、3 日間開放を 1 サイクルとし、計 5 サイクルの誘導を行った。



(4) Th2 細胞の動態を検討するため、蛍光標識した OTII 細胞 (OVA に反応する受容体をもつ CD4T 細胞) をマウスに移入し、アトピー性皮膚炎の誘導を行った。また in vitro で Th2 細胞に誘導した OTII 細胞をマウスに移入する adoptive transfer 実験も施行した。

(5) 皮膚炎誘導後、炎症部位での移入 T 細胞の観察を試みた。

(6) 皮膚樹状細胞の動態を観察するため、ハプテン塗布によるアトピー性皮膚炎誘導を行った。

(7) 皮膚樹状細胞の可視化のため、皮膚樹状細胞が蛍光標識されたマウス (CD11cYFP マウス) を用いた。

(8) ハプテン塗布前後の皮膚樹状細胞動態を多光子励起顕微鏡にて観察した。

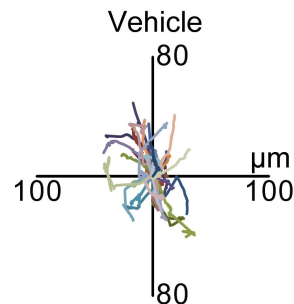
(9) 皮膚樹状細胞動態・機能制御因子として抗炎症性脂質メディエーターの一種であるレゾルビン E1 (RvE1) に着目し、RvE1 投与前後での樹状細胞動態と機能を解析した。

4. 研究成果

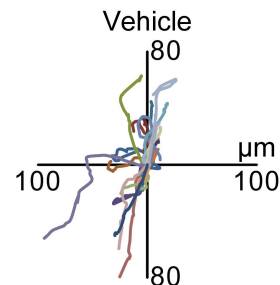
(1) OVA 貼付によるアトピー性皮膚炎モデルにおける、Th2 細胞の動態を多光子顕微鏡で観察を試みたが、in vivo 及び in vitro 誘導 Th2 細胞ともに、皮膚浸潤が予想外に少なく、安定した結果を得ることが困難であった。

(2) よって皮膚樹状細胞に主に着目し、ハプテン塗布アトピー性皮膚炎モデルにてその動態と機能制御因子について解析した。

(3) 皮膚樹状細胞における定常状態およびハプテン塗布後における動態を、二光子励起顕微鏡をもちいた生体イメージングにて比較した。定常状態においても、樹状細胞は活発な活動性をしめした。(下図)



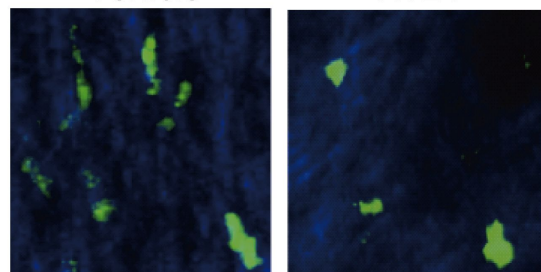
(4) ハプテン塗布後はその移動距離が増加し、動態が変化する様子が観察された(下図)



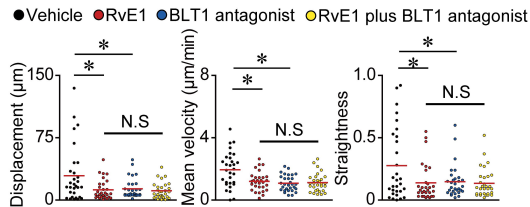
(5) 文献的に RvE1 による樹状細胞機能制御が示唆されていたため、RvE1 投与による樹状細胞動態変化について、更に生体イメージングにて検討した。Vehicle 投与群では樹状細胞は紡錘形など様々な形態をとり活発に運動していた。しかし、RvE1 投与後約 30 分後より、皮膚樹状細胞の動態が変化し、遊走能が徐々に低下した。また球状の形態をとる細胞が多くみられた。

Vehicle

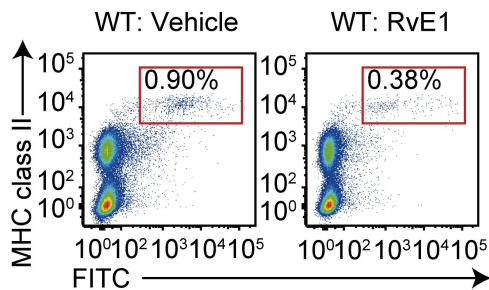
RvE1



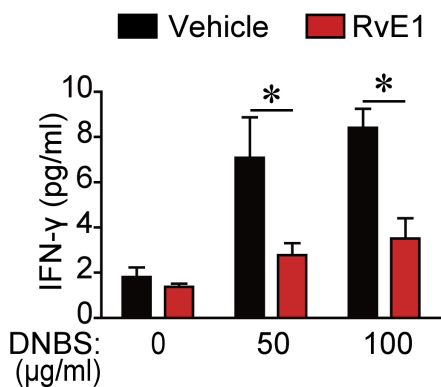
(6) RvE1 の効果を定量的に検討したところ、移動距離、移動速度とも有意に源弱していた。細胞の生存率は変わらず、毒性による影響は否定的であった。さらに、その効果は BLT1(脂質メディエーターの一種であるロイコトリエンの受容体)の阻害効果であることが確認された(次図)



(7) これらの RvE1 の効果が、ハプテン塗布による皮膚樹状細胞のリンパ節遊走に対する影響を調べた。蛍光ハプテンである FITC を皮膚に外用し、24 時間後に所属リンパ節中の FITC 陽性樹状細胞の数について検討した。皮膚から遊走した FITC 陽性の樹状細胞数は、Vehicle 投与群にくらべ、RvE1 投与群にて有意に源弱していた(下図赤枠)

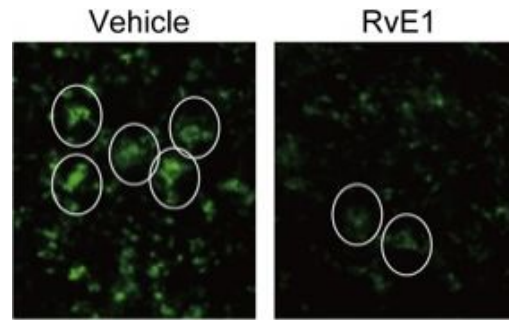


(8) この遊走能の低下が、実際に免疫反応に影響するかどうかを検討するため、ハプテン感作後の抗原特異的 T 細胞の機能について解析をおこなった。ハプテンである DNFB を感作し、5 日後に所属リンパ節を採取し、水溶性ハプテンである DNBS で3日間培養を行った。そして、抗原特異的 T 細胞活性の指標である IFN- γ について ELSIA にて測定した。RvE1 投与群では、vehicle 投与群にくらべ抗原特異的 T 細胞の誘導が有意に低下しており、ハプテンによる感作成立が著しく障害されることが示された(下図)。

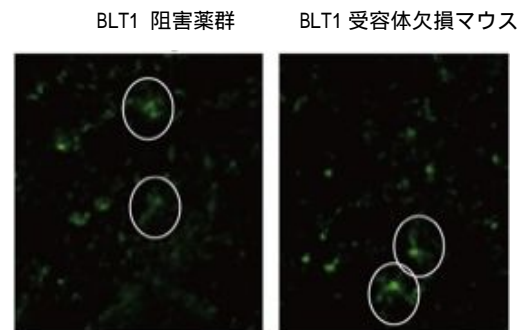


(9) 以上のことから、RvE1 は接触皮膚炎感作相において免疫制御作用をもつことが証明された。一方、我々はこれまでの研究により、皮膚樹状細胞は、接触皮膚炎の炎症惹起部位においては cluster を形成し、抗原特異的 T 細胞の活性を誘導していることを見いだしてきた。よって、次に炎症部位での cluster 形成に対する RvE1 の作用を検討した。

(10) RvE1 処理により、皮膚樹状細胞の cluster 形成は数、大きさともコントロールに比べ優位に抑制された。(下図)



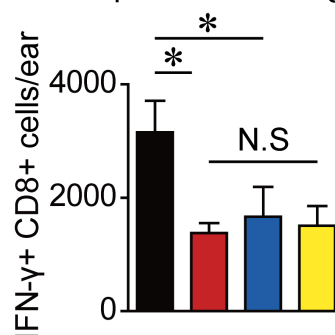
(11) 更に、BLT1 の阻害薬、及び、BLT1 受容体欠損マウスを用いても、同様に樹状細胞 cluster 形成が阻害されていた。



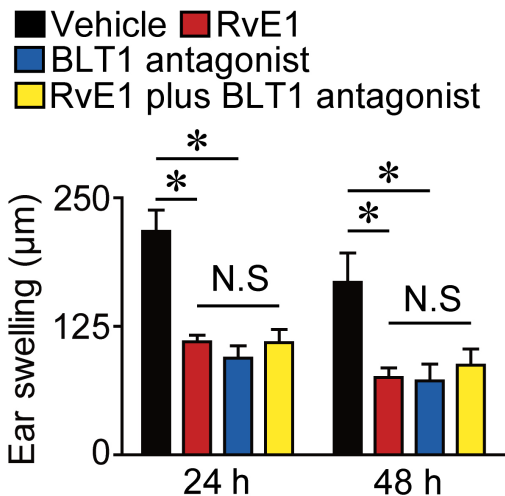
(12) また RvE1 投与群、BLT1 阻害薬投与群、及び、BLT1 受容体欠損マウスにおいて、いずれもコントロール群にくらべ、惹起時の接触皮膚炎反応、抗原特異的 T 細胞の活性化は有意に低下していた。

抗原特異的 T 細胞の活性化

■ Vehicle ■ RvE1
■ BLT1 antagonist
■ RvE1 plus BLT1 antagonist



接触皮膚炎反応



(13) すなわち、RvE1 は BLT1 シグナルを制御し、樹状細胞の運動性を制御することで、接触皮膚炎の惹起相においても免疫制御機能を発揮することが明らかとなった。

(14) 我々は次に、どのようなメカニズムで BLT1 受容体が樹状細胞の運動性を制御するかについての検討を行った。

(15) 細胞運動にはアクチン形成が必須であるため、アクチン形成に対する RvE1 及び BLT1 受容体の作用メカニズムについて、in vitro にて検討を行った。

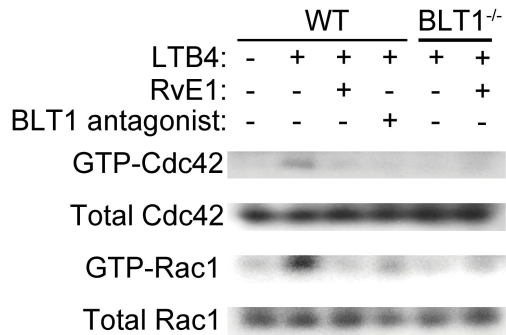
(16) 骨髄細胞を 10 日間培養し、骨髄由来樹状細胞を誘導した。その後、ロイコトリエンにて樹状細胞の BLT1 受容体を刺激し、アクチン形成に対する作用を検討した。アクチン形成の評価は、免疫染色、及び、フローサイトメトリーにて行った。その結果、ロイコトリエン刺激によりたアクチン形成が誘導された。また RvE1 を事前に処理しておくことで、ロイコトリエンによるアクチン形成誘導は阻害された。

(17) すなわち、ロイコトリエン-BLT1 受容体シグナルは、樹状細胞のアクチン形成に促進的に作用することで、樹状細胞の運動性を促進していることが推測された。

(18) アクチン形成には Cdc42, Rac, Rho といった分子の活性化が重要である。よって、これらの分子の活性に対するロイコトリエンの作用及び RvE1 の作用を、ウエスタンブロットリング法にて検討した。

(19) ロイコトリエンによる BLT1 刺激により、Cdc42, Rac1 の活性が誘導された。そしてその誘導は RvE1 処理により完全に阻害された。(下図)一方、ロイコトリエンは Rho

の活性化には影響を及ぼさなかった。



(20) 以上の結果より、ロイコトリエンは皮膚免疫において樹状細胞動態を促進することで免疫反応誘導に貢献していることが示された。また RvE1 はロイコトリエン受容体シグナルを阻害することで免疫制御機能を発揮することが示された。

(21) 従来、RvE1 の抗炎症作用、免疫抑制作用は、好中球浸潤抑制作用や、樹状細胞からのサイトカイン産生制御によるものと主に考えられてきた。

(22) 本研究は、ライブイメージング解析を導入することで、RvE1 の新たな免疫制御機構の解明に貢献したと考えられる。

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 1 件)

Honda T, Kabashima K. Leukotrienes as key mediators and amplifiers in allergic inflammation: insights from the bench and clinic. *Experimental Dermatology*. (2014) 23, 95-96.

[学会発表](計 1 件)

Yu Sawada, Tetsuya Honda, Kenji Kabashima In vivo imaging reveals that leukotriene B4-BLT1 signaling promotes DC function in skin via Cdc42/Rac1 pathways for an induction of acquired cutaneous immune responses.

44th ESDR 2014 年 9 月 10 日~13 日 コペンハーゲン

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 哲也 (HONDA TETSUYA)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：40452338