

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659528

研究課題名(和文)新規モデルマウスを用いた肥満細胞や好塩基球のアトピー性皮膚炎における役割の解明

研究課題名(英文)Role of mast cells and basophils in the development of atopic dermatitis

研究代表者

宮地 良樹 (Miyachi, Yoshiki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30127146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：循環する肥満細胞と表現され肥満細胞の代用としか考えられてこなかった好塩基球が、近年、ある状況下でTh2分化を誘導する重要な働きを担うことが明らかになった。しかしながら、アトピー性皮膚炎の様な皮膚免疫における好塩基球の役割は明らかにされていない。そこで申請者は好塩基球を特異的に欠損できるマウス(Bas TRECK Tgマウス)を用いることにより、アトピー性皮膚炎における好塩基球の役割を解明した。好塩基球はハプテンやペプチド抗原刺激に対して抗原提示を行い、Th2を誘導し、アトピー性皮膚炎の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The relative contributions of basophils and dendritic cells in Th2 skewing to foreign antigen exposure remain unclear. Here we report the ability of basophils to induce Th2 polarization upon epicutaneous sensitization with different antigens using basophil conditionally depleted Bas TRECK transgenic mice. Basophils are responsible for Th2 skewing to haptens and peptide antigens, but not protein antigens in vivo. Consistent with this, basophils cannot take up or process ovalbumin protein in significant quantities, but present ovalbumin peptide to T cells for Th2 differentiation via major histocompatibility complex class II. Intriguingly, basophils promote Th2 skewing upon ovalbumin protein exposure in the presence of dendritic cells. Taken together, our results suggest that basophils alone are able to induce Th2 skewing with haptens and peptide antigens but require dendritic cells for the induction of Th2 for protein antigens upon epicutaneous immunization.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：アレルギー 皮膚科学

## 1. 研究の背景と目的

アトピー性皮膚炎の発症機序は慢性の抗原曝露による結果、免疫反応の Th2 シフトが主な原因と考えられてきた。加えて近年、バリア機能不全が重要な原因の一つと考えられ、申請者らは、アトピー性皮膚炎の新規モデルマウスとしてフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスを確立した (Moriaga CS, Miyachi Y et al, *Am J Pathol*, 2010)。しかしながら、実際のアトピー性皮膚炎の誘発におけるエフェクター細胞の同定という重要課題は明らかにされたとは言いがたい。また、近年の幾つかのマウスモデルにおいて T 細胞や B 細胞を欠損した Rag マウスのバックグラウンドでも激しい皮膚炎症状を呈する事から、現在肥満細胞や好塩基球といった自然免疫を担う細胞の役割が注目されている。

ところが、従来の機能解析に用いられてきた肥満細胞欠損モデルである W/W<sup>v</sup> マウスもしくは Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> マウスは c-kit 遺伝子に変異のあるマウスであり、これらマウスは肥満細胞の欠損のみならず、メラノサイトや一部の造血幹細胞の欠損も認められる。更に、先天的に肥満細胞が欠損しており、他の免疫細胞による代償機序が作用している可能性も考えられる。そのため、肥満細胞自身の機能を評価するには必ずしも適切ではなく、実際矛盾をはらんだ結果が多く世に出回っている。

また、「循環する肥満細胞」と表現され肥満細胞の代用としか考えられてこなかった好塩基球が、近年、ある状況下で Th2 分化を誘導する重要な働きを担うことが明らかになった。しかしながら、アトピー性皮膚炎の様な皮膚免疫における好塩基球の役割は明らかにされていない。

そこで申請者らは細胞特異的に発現するプロモーター領域にジフテリアトキシン受容体 (DT-R) を導入することにより、肥満細胞もしくは好塩基球を特異的に欠損できるマウス (Mas TRECK Tg マウス、もしくは Bas TRECK Tg マウス) を世界に先駆けて開発した (Otsuka A, Miyachi Y et al, *PLoS One*, 2011;6(9):e25538. 理化学研究所横浜、久保允人博士との共同研究)。本マウスを用いることにより、アトピー性皮膚炎における肥満細胞もしくは好塩基球の役割を解明し、さらにその基礎研究成果を病態制御に応用する事を本研究の目的とする。

## 2. 研究方法

肥満細胞特異的欠損マウス (Mas TRECK Tg マウス) および好塩基球特異的欠損マウス (Bas TRECK Tg マウス) を用いて、接触皮膚炎モデルにおける肥満細胞もしくは好塩基球の役割を解明する。

次に既存のアトピー性皮膚炎モデルであるハプテン反復塗布モデル、もしくは Ovalbumin occlusive dressing technique (OVA ODT) モデルを用いて、炎症反応の違いを検討するとともに Mas TRECK Tg マウスもしくは Bas TRECK Tg マウスと flaky tail マウスを掛け合わせたマウスを用いて炎症局所での浸潤細胞、サイトカインプロファイル、更には所属リンパ節での細胞構成の違いを検証する。

### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は、遺伝子組換え生物などの使用の規制による生物多様性の確保に関する法律と京都大学組換え DNA 実験安全管理規定に従って行う。

マウスを使用する実験は、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管などに関する基準」に記載されている方法により、また、京都大学大学動物実験及び飼育倫理審査にて承認されたプロトコル (承認番号 080150) に則り遂行する。遺伝子改変動物の取り扱いにおいては、第二種使用等拡散防止措置確認申請を行い、そのプロトコルに従って研究を遂行する。

臨床検体を用いる研究では、京都大学の医の倫理委員会に申請し承認を得ており (承認番号 E778 番)、研究に参加していただく作業には文書および口頭で今回の研究内容についての説明を行い、承諾書 (検体の取り扱い・個人情報保護の保護・解析結果の公表・解析後の検体の取り扱い、協力した場合の利益・不利益などに関する項目など) を得た後に研究を遂行した。

## 3. 研究結果

IL-4 遺伝子のイントロン 2 に存在する HS 領域は好塩基球特異的に IL-4 遺伝子発現を制御する領域であることが知られる。上記の細胞特異的遺伝子発現システムを用いて、理研・久保允人博士らはジフテリアトキシン受容体 (DT-R) を挿入した好塩基球特異的 DT-R Tg マウス (Basophil-specific enhancer mediated Toxin REceptor mediated Conditional cell Knock out (TRECK) systems; Bas TRECK) を作製した。この Bas TRECK Tg マウスに DT 500ng を腹腔内

投与を行うと、好塩基球が除去されることがフローサイトメトリーにて確認された。Bas TRECK Tg マウスを DT 処理後、好塩基球のみ除去された状態で接触皮膚炎を誘導したところ野生型に比べ接触皮膚炎反応は同程度であった。したがって好塩基球は接触皮膚炎の病態には関与していないことになる。

前述したハプテン反復塗布モデルにおいて Bas TRECK Tg マウスを DT 処理すると、野生型に比べ耳介の厚さが次第に減弱していくことが示された。また、このハプテン反復塗布モデルでは炎症のピークが、接触皮膚炎でみられる 24 時間～48 時間から早期の 6 時間へと移行することが知られているが、Bas TRECK Tg マウスでは炎症のピーク時の耳介の厚さも減弱していた。すなわち、ハプテン反復塗布モデルでは好塩基球が重要な働きをすることが明らかになった。アトピー性皮膚炎モデルとしてはハプテン反復塗布モデルだけでなく、OVA アルブミン蛋白を経皮的に感作し続ける OVA-occlusive dressing technique (ODT) モデルも知られている。毛剃りしたマウスの背部に OVA 蛋白を数日間密封貼付し、それを 2 週間以上繰り返す事で、OVA 特異的 Ig がマウスにおいて上昇する。また、OVA 蛋白を貼付した部位には皮膚炎が誘導され、組織学的にはアトピー性皮膚炎に近い事が報告されている。このモデルを用いて、Bas TRECK Tg マウスにて検討したところ、ハプテン反復塗布モデルとは異なり皮膚炎、OVA 特異的 IgG1 とともに野生型マウスと同レベルであることが明らかとなった。

さらに我々は OVA アルブミン蛋白を腹腔内から全身投与する事で Th2 反応を誘導するマウスモデルを用いて検討した。経皮感作モデルと同様に、野生型マウスと Bas TRECK Tg マウスにおいて OVA 特異的 IgG1 が同レベルであった。しかしながら、抗原を OVA アルブミンペプチド抗原に変えて検討を行ったところ、野生型に比べて Bas TRECK Tg マウスでは OVA 特異的 IgG1 が有意に減少していた。

以上の結果は抗原の種類により、好塩基球の免疫応答における役割が異なることを示唆し、Th2 誘導における樹状細胞との役割の分担があることを想起させる。

反復塗布モデルにおける所属リンパ節での好

塩基球

定常状態においてリンパ節内には好塩基球は存在しない事が知られている。実際、c-kit<sup>+</sup>CD200R3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup>IgE<sup>+</sup>の好塩基球の存在はリンパ節で確認できなかった。しかしながらハプテン反復塗布を行った所属リンパ節では、好塩基球が認められた。さらにこの好塩基球の細胞表面には MHC class 分子に加え共刺激分子である CD40, CD80, CD86 分子が発現している。ナイーブ T 細胞が Th2 タイプに分化する際、上記の分子に加え IL-4 が重要となってくる。そこで我々は monensin を用いて所属リンパ節に存在する細胞における IL-4 細胞内染色を試みた。その結果、所属リンパ節に集簇した好塩基球の一部は IL-4 を産生していた。更に、ハプテン反復塗布を行なった皮膚所属リンパ節では、好塩基球と T 細胞が隣接している像を免疫染色で確認した。これらのことより、ハプテン反復塗布モデルでは所属リンパ節に集簇した好塩基球が T 細胞の Th2 分化に関与している事が示唆された。

好塩基球と T 細胞の細胞内カルシウムイメージング

ここで実際に好塩基球が、抗原提示を行ない T 細胞にシグナルを与えるかについて検討した。T 細胞の細胞内カルシウム濃度を指標に、細胞内カルシウム濃度上昇とともに蛍光強度が増加する Fluo-8 (緑色) で染色した DO11.10 (卵白アルブミン特異的 TCR Tg) マウス由来のナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を TRME (赤色) で染色した骨髄由来好塩基球を共培養し顕微鏡下で観察した。すると、タンパク抗原存在下ではナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞内のカルシウム上昇は見られなかったのに対し、ペプチド抗原存在下では細胞同士の接着に伴いナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞内のカルシウム上昇が認められ、ペプチド抗原存在下は、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化する作用があることが示された。このことは好塩基球がペプチド抗原存在下において T 細胞に適切な刺激を伝える事を示唆する。

好塩基球の抗原プロセッシング能

以上の結果を総合すると、好塩基球はタンパク抗原存在下では T 細胞の Th2 分化に関与しないが、ハプテンもしくはペプチド抗原存在下で

はT細胞のTh2分化に関与していることが示唆される。我々は抗原の種類による好塩基球の役割の違いが、好塩基球の抗原プロセッシング能によるものではないかと仮説を立て、細胞内で取り込み切断される事で蛍光能を有する DQ-OVAを用いて検討を行った。予想にたがわず、骨髓由来樹状細胞は十分な量の DQ-OVA を取り込みプロセッシングしたのに対し、骨髓由来好塩基球は十分な抗原の取り込みをプロセッシングできなかった。

このことから、好塩基球はハプテンもしくはペプチド抗原に対しては抗原提示を行いTh2細胞への分化誘導を行えるが、タンパク抗原に対してはプロセッシング能の欠如からTh2分化誘導が行えないことが示唆された。

#### 4. 研究発表

##### 論文発表

1. Otsuka A, Nakajima S, Kubo M, Egawa G, Honda T, Kitoh A, Nomura T, Hanakawa S, Sagita Moniaga C, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Miyachi Y, Kabashima K. 2013. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun* 4: 1739
2. Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. 2014. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J Allergy Clin Immunol* 133: 139-46 e1-10
3. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. 2014. IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *J Invest Dermatol* (in press)
4. Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. 2013. Prostaglandin E2-EP3 axis in fine-tuning excessive skin inflammation by restricting dendritic cell functions. *PLoS One* 8: e69599
5. Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Nakamizo S, Arita M, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. 2014. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (in press)