

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791076  
 研究課題名 (和文) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の役割  
 研究課題名 (英文) The function of newly identified lymphoid cell ectopically expressing keratin 5  
 研究代表者：小豆澤 宏明 (AZUKIZAWA HIROAKI)  
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：10379240

研究成果の概要(和文)：我々はケラチン5を発現する新規リンパ球系細胞を解析することでその特徴を明らかにした。この細胞は、骨髄でのB細胞の分化過程であるCommon lymphoid precursorの段階で、一過性にケラチン5を発現し、末梢のリンパ組織では発現していないことがわかった。またこの細胞を単離したものをを用いて、抗原提示能を検討したところ、形質細胞様樹状細胞に匹敵する高い抗原提示能力を持っていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To study the role of ectopic epidermal auto-antigen expression, K5-Cre x CAG-CAT-EGFP double transgenic mice that express enhanced green fluorescence protein (GFP) under the control of keratin 5 promoter were employed. Unexpectedly, GFP<sup>high</sup> cells distinct from migratory DC were found not only in skin-draining LN, but also in mesenteric LN, spleen, peripheral blood and bone marrow, indicating that bone marrow-derived circulating cells express keratin 5. Interestingly, GFP<sup>high</sup> cells strongly expressed MHC class II and were enriched from selected CD45R (B220) + and IgD- population. GFP<sup>high</sup> cells crosspresented ovalbumin (OVA) as well as immature B cells and pDC *in vitro*, whereas GFP<sup>high</sup> cells and immature B cells, but not pDC, presented OVA to CD4 T cells. These results indicate that immature B cell-like circulating lymphoid cell is an antigen-presenting cell having a unique characteristic to express ectopic self-antigen.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

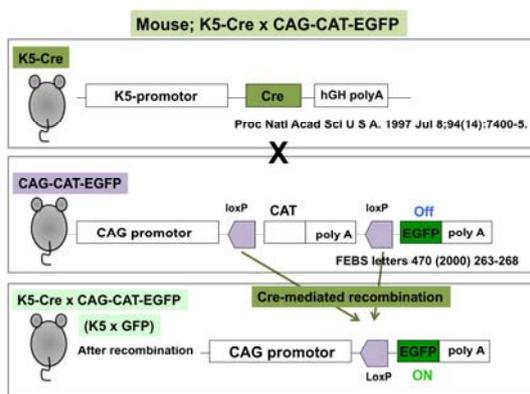
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚自己免疫疾患、樹状細胞、動物モデル、抗原提示細胞、未熟B細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで組織特異的抗原を発現する細胞は特定の臓器と自己反応性T細胞の成熟を回避する胸腺での発現が知られていたが、最近の研究でリンパ節や脾臓といった二次リンパ組織で組織特異的抗原を発現する“第3の細胞”の存在が報告された。最近、我々は表皮自己抗原をリンパ組織で発現している細胞を見つけ、これまでの報告とは異なった細胞表面マーカーの発現がみられたことからこれまで報告のない新規のリンパ球系細胞分画であることがわかった。

(2) 我々はこれまでに皮膚自己抗原が骨髄由来の抗原提示細胞により CD8<sup>+</sup>T細胞に提示されることで、CD8<sup>+</sup>T細胞の活性化が起こり、皮膚ケラチノサイトのアポトーシスを起こす病態について動物モデルを樹立して明らかにした。この動物モデルは重症薬疹の病態を解明する貴重な情報を提供した。我々は、皮膚表皮のモデル自己抗原としてケラチン5プロモーター下に膜結合型ニワトリ卵白アルブミン(OVA)を発現するトランスジェニックマウス(K5-mOVA)を作製し、皮膚表皮からの抗原輸送、抗原提示を解析してきた。表皮に発現した自己抗原は骨髄由来の抗原提示細胞により、皮膚所属リンパ節でMHC class I上に提示されており、これをCD8<sup>+</sup>T細胞が認識すると、それらは速やかに活性化、分裂し、皮膚へ浸潤、表皮ケラチノサイトのアポトーシスを誘導することを報告した。本研究ではケラチン5プロモーター下に Green Fluorescent Protein (GFP)を発現するトランスジェニックマウス K5xGFP とニワトリの卵白アルブミン(OVA)を発現するトランスジェニックマウス K5-mOVAを用いることで、表皮抗原の発現と抗原提示を視覚的にも、免疫反応としてもとらえることを可能にしている。



## 2. 研究の目的

(1) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の細胞表面分子、遺伝子発現、サイトカイン産生などの特徴を解析する。

(2) 表皮自己抗原を発現する新規リン

パ球系細胞の抗原提示能と自己免疫疾患への関与について明らかにする。

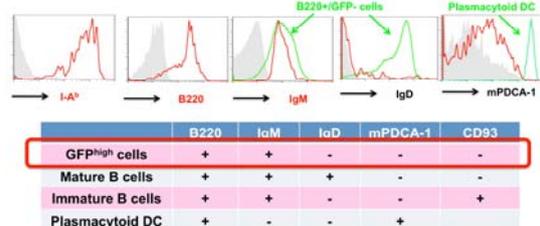
## 3. 研究の方法

(1) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の特徴解析には、視覚的解析として Cell sorter で単離した細胞を cytopspin によりスライドガラスに貼り付け、免疫染色を行うとともに、細胞が発する GFP 蛍光とともに蛍光顕微鏡を用いて解析した。さらに、フローサイトメトリーでの細胞外抗原(リンパ球細胞表面マーカー、MHC, 補助刺激分子, ケモカイン受容体など)の発現を解析した。

(2) 表皮自己抗原を発現する新規リンパ球系細胞の抗原提示能、免疫惹起能については全くわかっていないため、表皮抗原特異的な免疫反応については K5-GFP と K5-mOVA のダブルトランスジェニックマウスを作製し、MHC class I および class II へ OVA 抗原が提示されているか検討した。OVA 抗原特異的な T 細胞として CD8<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup> T 細胞受容体トランスジェニックマウス OT-I と OT-II を用いた。対照として、表皮自己抗原を抗原提示する樹状細胞の抗原提示能との比較を行った。in vitro の実験では T 細胞の分裂、活性化を、in vivo では T 細胞の移入実験により、homing、活性化について検討した。

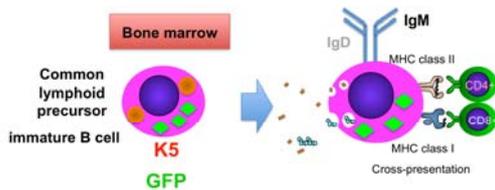
## 4. 研究成果

(1) K5xGFPマウスのリンパ組織における GFP 陽性細胞は、IgD陰性、IgM陽性、B220陽性、mPDCA-1陰性で未熟B細胞に似た新規リンパ球系細胞分画であることがわかり、この細胞と従来のB細胞との遺伝子発現の違いをマイクロアレイで比較したところ、通常のB220陽性のB細胞との比較では大きな違いはなかったが、未熟B細胞に近い遺伝子発現であることが確認できた。しかし、従来の未熟B細胞とは異なりCD93陰性であることから、上皮系細胞に特徴的なタンパクを発現するのみならず、これまで知られているB細胞の段階のいずれにも該当しない新規分画であることが明らかとなった。

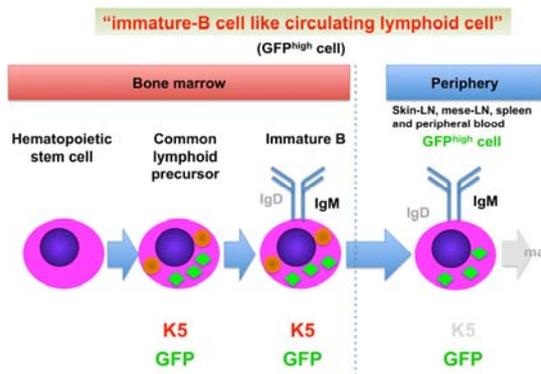


(2) この新規のリンパ球系細胞に、in vitro でOVAタンパク質を加えてCD8 あるいはCD4陽性T細胞と共培養して抗原提示能をとる、こ

の細胞はPlasmacytoid Dendritic Cell (pDC)に匹敵する高いcross-presentationをすることがわかった。K5xGFPとK5-mOVAのトリプルトランスジェニックマウスより単離した、リンパ節や脾臓の新規リンパ球系細胞は意外にも、OVA抗原を発現あるいは抗原提示していなかった。



(3) さらなる検討で、この細胞は骨髄での B リンパ球系の分化段階である common lymphoid precursor の段階で、一時的にケラチン5を発現することがわかった。



〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① [Azukizawa H.](#), Doehler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, Autenrieth I, Katayama I, Rieman M, Weih F., Berberich-Siebelt F, Lutz MB. Steady state migratory Rel-B<sup>+</sup> Langerin<sup>+</sup> dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011 in press. 査読有り
- ② [小豆澤宏明](#), 中毒性表皮壊死症 (TEN) の発症機序、*Journal of Environmental Dermatology and Cutaneous Allergology*, 4(3):137-142, 2010 査読有り
- ③ [Broom JK](#), [Lew AM](#), [Azukizawa H](#), [Kenna TJ](#), [Leggatt GR](#), [Frazer IH](#). Antigen-specific CD4 cells assist CD8 T-effector cells in eliminating keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 130(6):1581-9, 2010 査読有り
- ④ [Lutz MB](#), [Döhler A](#), [Azukizawa H](#). Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells. *Immunol*

- Cell Biol. 88(4): 381-6, 2010 査読有り
- ⑤ [De Kluyver RL](#), [Moritz L](#), [Harris CA](#), [Azukizawa H](#), [Frazer IH](#). Antigen-specific CD8 T cells can eliminate antigen-bearing keratinocytes with clonogenic potential via an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Invest Dermatol.* 130(7):1841-8. 2010 査読有り
- ⑥ [Henri S](#), [Poulin LF](#), [Tamoutounour S](#), [Arduin L](#), [Guilliams M](#), [de Bovis B](#), [Devillard E](#), [Viret C](#), [Azukizawa H](#), [Kissenpfennig A](#), [Malissen B](#). CD207<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med.* 207(1) 189-206, 2009 査読有り.

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① [Hanafusa T](#), [Azukizawa H](#), [Katayama I](#): Immature B cell-like circulating lymphoid cells express keratin 5 ectopically and present exogenous antigen comparable to plasmacytoid dendritic cell 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 3-5 December, 2010 Wakayama
- ② [Hanafusa T](#), [Azukizawa H](#), [Katayama I](#): Immature B cell-like circulating lymphoid cells express keratin 5 ectopically and present exogenous antigen comparable to plasmacytoid dendritic cell 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic cells in Fundamental and Clinical Immunology 26-30 September, 2010 Lugano
- ③ [Henri S](#), [Tamoutounour S](#), [Poulin LF](#), [Azukizawa H](#), [Kissenpfennig A](#), [Malissen B](#): CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> DDCs cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of LCs. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic cells in Fundamental and Clinical Immunology 26-30 September, 2010 Lugano
- ④ [Hanafusa T](#), [Azukizawa H](#), [Katayama I](#). Immature B cell-like circulating lymphoid cells express keratin 5 ectopically and present exogenous

antigen comparable to plasmacytoid  
dendritic cell 14<sup>th</sup> International  
Congress of Immunology 22-27 August,  
2010 Kobe

- ⑤ 小豆澤宏明:皮膚科研究の最前線 皮膚  
免疫・アレルギーの進歩 皮膚樹状細胞  
の役割について 第109回日本皮膚科  
学会総会 2010年4月16-18日 大阪
- ⑥ Ectopic expression of keratin 5 in  
lymphoid cell Hanafusa T, Azukizawa H,  
Katayama I 日本研究皮膚科学会総会  
博多 2009年12月4-6日
- ⑦ Ectopic expression of keratin 5 in  
lymphoid cell Azukizawa H, Hanafusa T,  
Katayama I 日本免疫学会総会 2009年  
12月2-4日 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小豆澤 宏明 (AZUKIZAWA HIROAKI)  
大阪大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10379240

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: