

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791104

研究課題名（和文） 紫外線照射による皮膚樹状細胞を介した免疫抑制機序の解明

研究課題名（英文） Investigation on the mechanism underlying suppression of contact hypersensitivity in UVB irradiated skin.

研究代表者 吉木竜太郎 (YOSHIKI RYUTARO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30412646

研究成果の概要（和文）：紫外線照射した皮膚に抗原を塗布すると抗原特異的調節性 T 細胞が誘導され接触皮膚炎が成立しないが、調節性 T 細胞誘導の詳細な機序は不明であった。今回の研究において、紫外線照射部位では接触皮膚炎成立に重要であるとされるランゲルハンス細胞の機能が変化し、所属リンパ節において抗原特異的調節性 T 細胞を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The underlying mechanism of local immunosuppression by ultraviolet ray irradiation has not been fully elucidated so far. In this study, we discovered that OX40 ligand and interleukin-10 producing Langerhans cells play a crucial role in inducing antigen-specific regulatory T cells.

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：紫外線、免疫抑制、皮膚樹状細胞、調節性 T 細胞、インターロイキン 10、OX40 リガンド、RANKL、ケラチノサイト

1. 研究開始当初の背景

乾癬・アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患に対して紫外線照射療法が奏効する。このように紫外線照射による皮膚における免疫学的変調は光免疫学の中心的な課題であり、解明されるべきテーマとして世界的に研究されてきた。

ある物質に接触感作された後、同一の物質に接触惹起した反応をアレルギー性接触皮膚炎と呼ぶ。抗原に感作される場合、表皮に存在する Langerhans 細胞（以下 LC

と略）や、真皮に存在する真皮樹状細胞（dermal dendritic cell；以下 dDC と略）と呼ばれる抗原提示能を有した皮膚樹状細胞が重要な役割を果たす。通常、抗原が皮膚表面に塗布されると、LC は E-カドヘリンの発現を失い、活性化され、遊走を始める。LC は表皮から真皮、そして真皮内リンパ管へ入り、リンパ管を介して所属リンパ節へと遊走する。さらに、LC は成熟した樹状細胞として、所属リンパ節の T 細胞

領域に到達し、naïve T 細胞への抗原提示をする。この感作の成立後、同様の抗原が皮膚に接触すると、感作相と同様、LC の活性化が起こり、memory T 細胞への抗原刺激が行われる。ケラチノサイトは、感作に際し種々のサイトカインを放出し、LC の成熟化を促す。

ところが、紫外線照射部位では接触皮膚炎が成立せず、さらにこの現象には抗原特異的調節性 T 細胞、regulatory T 細胞（以下 Treg と略）が所属リンパ節で誘導されることが明らかとなっている。しかし、紫外線照射部位にハプテンを塗布することで抗原特異的 Treg が誘導される機序に関し、明確な機序は未だ明らかになっていない。

表皮にはもう一つの樹状細胞として $\gamma\delta$ T cell（以下 $\gamma\delta$ T と略）が存在し、また最近になり dDC も Langerin(+)dDC と Langerin(-)dDC の2つのサブセットが存在することが判明した。しかし、接触皮膚炎反応におけるこれらの細胞の詳細な役割は未だ解明されていなかった。

これまで抗原提示・感作の成立に positive に関与するとされていた LC が、抑制系を担う regulatory DC（以下 DCreg と略）としての機能を持ち、ハプテンに対する感作の不成立、免疫寛容に大きく関わっていることが最近明らかになってきた。これまでに LC を特異的に除去されたマウスを用いた実験において、LC が接触皮膚炎の感作および惹起に重要でないとする報告や、LC を除去するとむしろ接触皮膚炎反応が増強するという報告がなされている。

申請者はマウス全層植皮部における抗原特異的接触皮膚炎感作相の抑制に関する研究を行ってきた。そのなかで、マウス全層植皮部では LC がケラチノサイト上の RANKL と相互作用し IL-10 を産生するようになることを見出した。IL-10 は Treg 誘導に非常に重要なサイトカインであり IL-10 産生性 LC が所属リンパ節へ遊走することにより、抗原特異的 Treg が遊走される可能性について報告した。そこで、植皮後の皮膚に限らず、皮膚にとって特殊な環境下では、LC が Treg を誘導する機能を獲得する、つまり DCreg としての機能を発現する可能性を想定した。

以上より皮膚という外界に常にさらされておりかつ最大の免疫防御組織において紫外線照射という行為が皮膚に何らかの免

疫学的変調を生じさせるということを考え、なかでも紫外線照射により皮膚において DCreg を誘導する場が生じていることを申請者は仮定し研究を行った。

2. 研究の目的

皮膚科領域では、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎など多くのアレルギー疾患が存在する。外用、内服治療が第1選択となるが、前述のごとく特定の疾患に関しては紫外線照射も適応となる。しかし、長期間にわたる加療が必要であり、患者にかかる経済的負担、通院などの肉体的負担も大きい。そこで申請者は紫外線照射部位における Treg 誘導機序の解明を第1の目的とし、効果的な DCreg および Treg 誘導方法を確立することでアレルギー性疾患の治療への応用につなげることを最終的な目的とした。平成 21、22 年度の科研費交付期間内に以下の3つを明らかにすることを目的とした。

(1)紫外線照射部位および非照射部位における LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、ケラチノサイト、dDC の動態および機能の解明

(2)紫外線照射部位における LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、ケラチノサイト、dDC が相互に与えあう影響と接触皮膚炎感作相に及ぼす影響の解明

(3)regulatory DC の効果的な誘導方法の解明とそれを用いたアレルギー性疾患のコントロールの試み

3. 研究の方法

紫外線照射部位および非照射部位における LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、ケラチノサイト、dDC の動態および機能の解明

紫外線 (UVB) をマウス腹部へ照射後皮膚およびハプテン塗布前後の皮膚を採取。コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ溶液に浮遊させ皮膚細胞浮遊液を作成する。作成した皮膚細胞浮遊液は抗 MHC-class II 抗体、 $\gamma\delta$ T 細胞受容体抗体、抗 CD103 抗体、抗 Langerin 抗体で蛍光染色することでフローサイトメーター上に LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、Langerin(+)dDC、Langerin(-)dDC がプロット表示される。表皮細胞浮遊液をフローサイトメーターのセルソーティング機能を用いて LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、Langerin(+)dDC、Langerin(-)dDC、ケラチノサイトに分離する。これらの細胞を凍結処理し、m-RNA を抽出、定量的 PCR 法で遺伝子発現量を

比較検討する。

紫外線照射前後における LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、ケラチノサイト、dDC の相互作用

上記で得られた結果をもとにそれぞれの発現遺伝子に対する阻害物質（中和抗体、ペプチド、siRNA など）や作働物質（リコンビナント蛋白）を用い、皮膚における LC、 $\gamma\delta$ T 細胞、Langerin(+) γ dDC、Langerin(-) γ dDC の役割を検討するとともに、各細胞の機能を抑制または活性化させることがそれぞれの細胞同士の相互作用にどのような影響を与えるかを検討する。

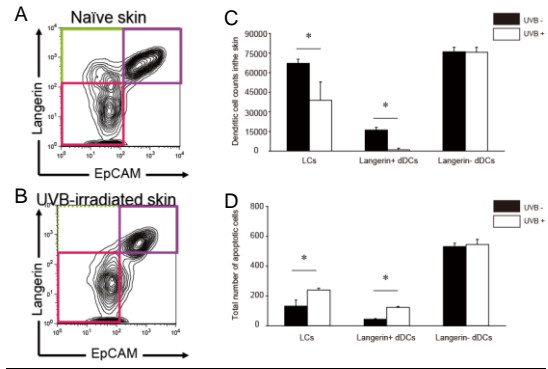
紫外線照射以外の手段を用いた効果的な regulatoryDC および Treg の誘導

in vitro で誘導された regulatory DC をハプテン化し、naïve マウスの腹腔内に投与。同時に同ハプテンを腹部皮膚へ塗布し、感作を行う。5 日後耳介へ同ハプテンを塗布し惹起反応を起こさせ、24 時間後の耳介の厚さを測定することで接触皮膚炎反応が DCreg を投与していないものと投与したものとで強度に差が見られないか評価する。

4. 研究成果

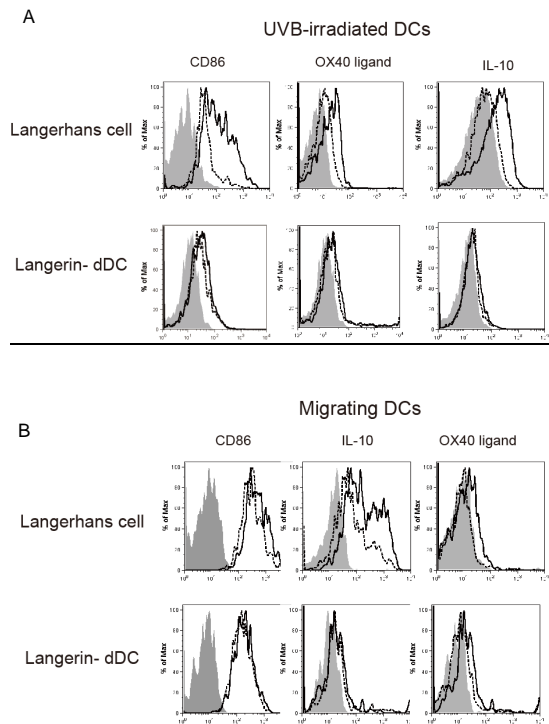
(1)紫外線照射後の皮膚ではランゲリン陽性真皮樹状細胞はアポトーシスに陥り、消失する。

紫外線照射後の皮膚において樹状細胞の分布に変化が生じるのか検討してみた。マウス腹部をバリカンにて剃毛後、紫外線（UVB, 100mJ/cm²）を照射し 24 時間後の皮膚をトリプシン、コラゲナーゼで処理し細胞浮遊液を作成。MHC-class II、Langerin、EpCAM で蛍光染色しフローサイトメトリーにて解析を行った。無処置のマウス樹状細胞はランゲルハンス細胞が右上の分画へ、ランゲリン陽性真皮樹状細胞が左上の分画へ、ランゲリン陰性真皮樹状細胞は左下の分画へとプロットされる（図A）。紫外線照射後の皮膚ではランゲリン陽性真皮樹状細胞が消失することが判明した（図B、C）。これは紫外線照射後にランゲリン陽性真皮樹状細胞がアポトーシスに陥ることで皮膚から消失することが明らかとなった（図D）。



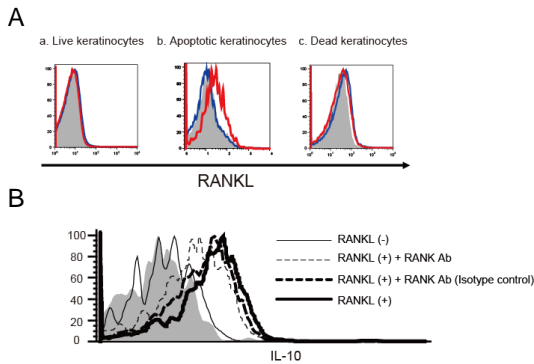
(2)紫外線照射によりランゲルハンス細胞は成熟し、IL-10 産生と OX40 リガンドの発現が起こる。

紫外線照射後、皮膚に残存する樹状細胞の機能を検討するためこれらを樹状細胞活性化のマーカーである CD86、さらに Treg 誘導に重要であるとされる IL-10、OX40 ligand の発現を検討した。すると、紫外線照射後のランゲルハンス細胞では CD86、OX40 ligand の発現増強と細胞内 IL-10 産生の亢進が認められたが、ランゲリン陰性真皮樹状細胞ではこのような現象は見られなかった（図A）。また OX40 ligand の発現と細胞内 IL-10 の産生能力はランゲルハンス細胞が抗原とともに所属リンパ節へ遊走した後も保持されていた（図B）。これらの結果より、紫外線照射後のランゲルハンス細胞が所属リンパ節において IL-10 を産生し、Treg 誘導に有利な環境を形成することが考えられた。



(3) RANK-RANKL 相互作用によりランゲルハンス細胞は IL-10 を産生するようになる

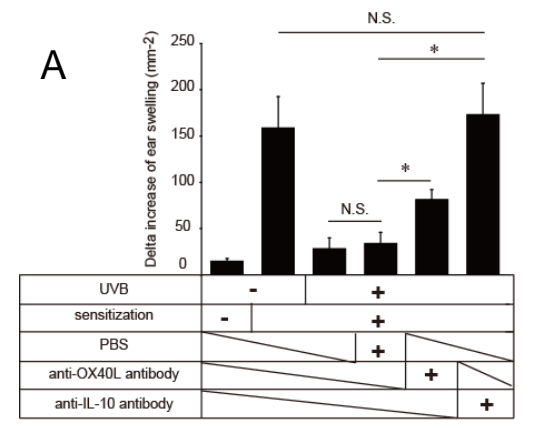
ランゲルハンス細胞が紫外線照射によりどのようにして IL-10 産生能力を獲得するのか検討した。以前我々はケラチノサイトからの RANKL とランゲルハンス細胞上に存在する RANK とが結合することでランゲルハンス細胞から IL-10 産生することを報告した。そこで紫外線照射後のケラチノサイトでもどのような細胞が RANKL を発現するのか検討した。紫外線照射後のケラチノサイトをフローサイトメーターにより、生細胞、死細胞およびアポトーシスに陥っている細胞とにわけ、それらの細胞上の RANKL を調べてみたところ、アポトーシスに陥るケラチノサイトからより強く RANKL の発現が認められた (図 A-b)。そこで RANKL とランゲルハンス細胞を共培養し、ランゲルハンス細胞内 IL-10 量を測定してみたところランゲルハンス細胞からの IL-10 産生が亢進していた。また、この IL-10 産生亢進は RANK-RANKL の結合を阻害することで低下した (図 B)。以上より、紫外線照射後アポトーシスに陥るケラチノサイトから RANKL が発現し、ランゲルハンス細胞上の RANK と相互作用を起こすことでランゲルハンス細胞から IL-10 の産生が怒ることがわかった。



(4) 紫外線照射後のマウスに IL-10 中和抗体または OX40 ligand のブロッキング抗体を投与すると紫外線による免疫抑制効果が減弱する。

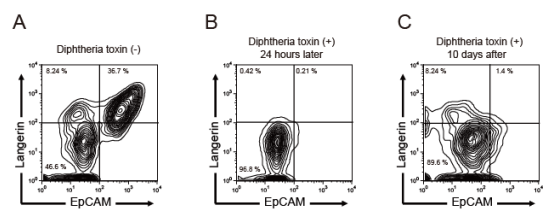
IL-10 および OX40 ligand の紫外線免疫抑制効果を検討するため、紫外線照射後(day1)から抗原感作の前日まで(day5)毎日 IL-10 中和抗体もしくは OX40 ligand ブロッキング抗体を投与したマウスで接触皮膚炎反応を検討した。すると OX40 ligand ブロッキング抗体を投与したマウス、IL-10 中和抗体を投与したマウスいずれにおいても紫外線免疫抑制効果が減弱した (図 A)。この減弱の度合いは IL-10 中和抗体を投与したマウスで最も強く、OX40 ligand ブロッキング抗体を投与した場合はその半分程度であった。以上より紫外線による免疫抑制効果には

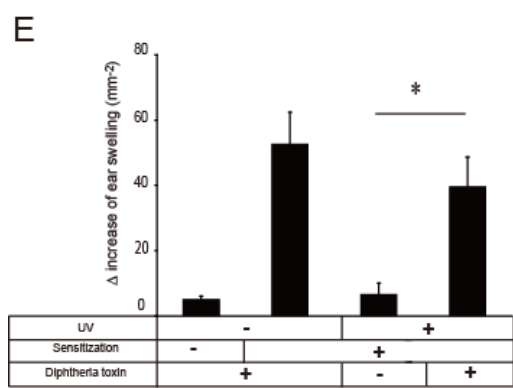
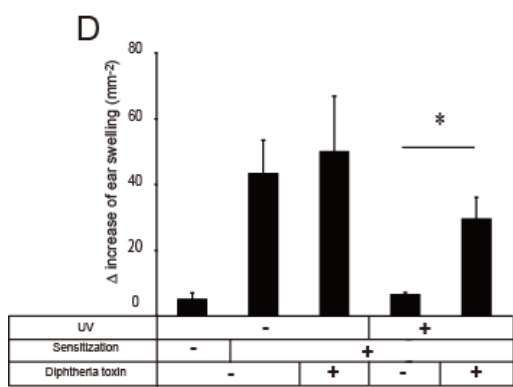
IL-10 および OX40 いずれも関与しているが、特に IL-10 の効果が強いことがわかった。



(5) ランゲルハンス細胞を除去したマウスでは紫外線による抗原特異的免疫抑制が消失する。

ランゲルハンス細胞による紫外線免疫抑制効果をより明らかにするため、ジフテリアトキシン投与によりランゲリン陽性細胞を特異的に除去できるマウス (Langerin-DTR EGFP マウス) を用いて接触皮膚炎反応を検討した。Langerin-DTR EGFP マウスにジフテリアトキシンを投与すると、24 時間後にはランゲリン陽性細胞であるランゲルハンス細胞とランゲリン陽性真皮樹状細胞が完全に消失する (図 A, B)。この状態で紫外線照射後の接触皮膚炎反応を検討したところ、ランゲリン陽性細胞が存在しない状態では紫外線特異的免疫抑制反応が見られないことがわかった (図 D)。また、ジフテリアトキシン投与から 10 日目の皮膚ではランゲリン陽性真皮樹状細胞のみ再分布することが知られている (図 C)。そこでランゲルハンス細胞は存在せず、ランゲリン陽性真皮樹状細胞とランゲリン陰性真皮樹状細胞のみが存在する状態で同様に接触皮膚炎反応を検討してみたところ、ランゲルハンス細胞が存在しない状態ではやはり紫外線特異的免疫抑制反応は見られなかった (図 E)。以上より紫外線による免疫抑制反応にはランゲルハンス細胞のみが重要であることが明らかとなった。





以上の結果より、紫外線照射後アポトーシスに陥るケラチノサイトから発現するRANKLとランゲルハンス細胞上のRANKが相互作用を起こし、ランゲルハンス細胞がIL-10を産生するようになり、このIL-10産生性ランゲルハンス細胞が所属リンパ節において調節性T細胞を誘導することで抗原特異的免疫抑制反応を誘導することが明らかとなった。

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)

① R Yoshiki, K Kabashima, J Sakabe, K Sugita, T Bito, M Nakamura, B Malissen, Y Tokura The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression
Journal of Immunology: 査読有: 184, 2010, 5670-5677

[学会発表] (計4件)

① Ryutaro Yoshiki, Kenji Kabashima, Jun-ichi Sakabe, Kazunari Sugita, Toshinori Bito, Motonobu Nakamura and Yoshiki Tokura. Local UVB-induced immunosuppression is mediated

by IL-10 producing and OX40L-positive mature Langerhans cells. 14th International Congress of Immunology, 2010年8月24日、神戸

② Ryutaro Yoshiki, Kenji Kabashima, Jun-ichi Sakabe, Kazunari Sugita, Toshinori Bito, Motonobu Nakamura and Yoshiki Tokura Local UVB-induced immunosuppression is mediated by IL-10-producing and OX40L-positive mature Langerhans cells. 第34回日本研究皮膚科学会学術大会、2009年12月4日、福岡

③ Ryutaro Yoshiki, Kenji Kabashima, Jun-ichi Sakabe, Kazunari Sugita, Toshinori Bito, Motonobu Nakamura and Yoshiki Tokura Local UVB-induced immunosuppression is mediated by IL-10-producing and OX40L-positive mature Langerhans cells. 39th European Society of Dermatological Research, 2009年9月10日、ブタペスト、ハンガリー

③ 吉木竜太郎、椋島健治、坂部純一、杉田和成、尾藤利憲、中村元信、戸倉新樹。UVB照射時における皮膚樹状細胞の機能変化
第31回光医学光生物学会、2009年7月24日、大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉木竜太郎 (YOSHIKI RYUTARO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30412646

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし