

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590442

研究課題名（和文）皮膚感作部位からリンパ節に浸潤する細胞による Th2 応答確立メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of mechanism underlying Th2-dominant immune response based on cells migrated from sensitized skin

研究代表者 戸村 道夫 (TOMURA MICHIO)

京都大学医学研究科・准教授

研究者番号：30314321

研究成果の概要（和文）：アレルギー性皮膚炎において Th2 優位な免疫応答が誘導されるメカニズムを解析するために、当研究では定常状態及び皮膚のタンパク質感作部位から所属リンパ節に移行する樹状細胞サブセットの移動と感作抗原運搬の時間空間的な制御を解析した。その結果、CD103⁺真皮樹状細胞が、定常状態で皮膚及び所属リンパ節で一番速い速度で入れ替わっており、更に皮膚への物理的な刺激により3日間以上の持続的な移行数増加と抗原運搬を担うことを見出した。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the mechanism underlying establishment of Th2-dominant immune response in allergic skin dermatitis, we attempted to determine spatiotemporal regulation of movement and antigen-carry of dendritic cell subsets migrated from skin to the draining lymph node. We found that particularly CD103⁺ dermal dendritic cells replaced rapidly in skin and lymph node, and were responsible for enhanced continuous migration for more than 3 days and exogenous protein antigen carry after mechanical stress of skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	4,400,000	1,020,000	5,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：アレルギー・免疫関連疾患

1. 研究開始当初の背景

アトピー性疾患や喘息などアレルギー疾患の克服は人類の大きな課題の一つである。アレルギー疾患では Th2 タイプの免疫応答が優位になるため、Th2 タイプ誘導メカニズムの解析がされてきたが、正常状態から Th2 タイプの慢性期に至るメカニズムの全体像は未だ不明である。

その理由を我々は以下のように考察した。

生体は動的平衡状態を保ちながら時間・空間・数量的にも緻密に制御された統合システムと考えられ、免疫系も例外ではない。そこで、免疫応答メカニズムを明らかにするためには、免疫系を一つの統合された高次機能システムとして理解する必要がある。そのためには、従来の *in vitro* 解析に、*in vivo* での免疫細胞の時間・空間・数量的な制御の情報を加えて、免疫応答のメカニズムを明らかにすることが必

須である。しかし、上記の概念を「アレルギー性皮膚炎では Th2 優位になるメカニズム解明」に当てはめてみると、今までの解析は皮膚への Th2 細胞の集積や T 細胞-抗原提示細胞相互作用におけるサイトカインの作用等断片的であり、生体レベルでの時間・空間・数量的な制御の情報不足は明らかである。我々は、免疫細胞の時間・空間・数量的な制御機構の解明が免疫応答の新しい概念を開くと考えたが、理想的な評価系が存在しなかったため、正常及び免疫応答下の任意のタイミングで、免疫細胞の臓器内での入れ替わりと、臓器間の移行を解析出来る *in vivo* 免疫細胞動態評価系を独自に確立した (Tomura M, *Pro Nat Acs Sci USA*, 2008)。そして、接触性皮膚炎モデルを用い、皮膚炎症部位から所属リンパ節に移行する活性化制御性 T 細胞が皮膚炎終息に重要であることを示した (Tomura M, *J Clin Invest*, 2010)。この結果は、「免疫応答中に皮膚免疫応答部位から所属リンパ節に移行する細胞が免疫応答の質の決定に重要であること」を示している。従って、皮膚からのタンパク質感作によって Th2 有意な免疫応答が成立するメカニズムを理解するためには、定常状態からアレルギー性皮膚炎成立過程における感作部位から所属リンパ節に移行する細胞の時空的制御及び機能を明らかにする必要があると我々は考えた。

2. 研究の目的

当研究では、独自に確立した免疫細胞の *in vivo* 動態解析技術を駆使し、正常時、及びタンパク質抗原持続感作時において、感作部位から移行する細胞の種類の同定、これら細胞の時間空間的な制御、並びに機能を明らかにすることにより、タンパク質の持続皮膚感作が Th2 優位な免疫応答を成立させるメカニズムを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Th2 優位なアレルギー性慢性疾患が誘導されるモデルには、OVA 皮膚頻回感作モデル (*J.Clin.Invest.* **101**, 1614, 1998, Spergel et.al) を用いた。

(2) 細胞の時間空間的な制御の解析には、紫光の照射で緑が赤色に変わる光変換蛍光タンパク質“カエデ”を発現するマウス (カエデマウス) を用いた (図 1)。カエデマウスの皮膚感作部位 (OVA パッチにより感作) である背部皮膚を光照射し皮膚に存在する細胞をマークした。一定時間後に皮膚照射部位、及び所属リンパ節から細胞を分離、各種蛍光標識抗体により染色後フローサイトメトリーで解析した。目的の細胞を分画し、皮膚での細胞の入れ替わり、及び、皮膚からリンパ節

に移行したマークした細胞を検出した。さらに皮膚からリンパ節に移行した細胞のリンパ節での入れ替わり、及び、リンパ節からの移出を調べるために、*inguinal LN* を光照射し一定時間後にリンパ節を摘出、細胞を調製し同様に解析した。

(3) 物理的ストレス時における皮膚樹状細胞の移動及び抗原運搬の時間空間的な制御を解析するために、背部皮膚をスコッチテープでストリッピング (d0) し Alexa633 標識 Ob albumin (A647-OVA) in PBS を塗布した。図 1 に示すタイミングで塗布部位を光照射して 24 時間後に、所属リンパ節を解析した。

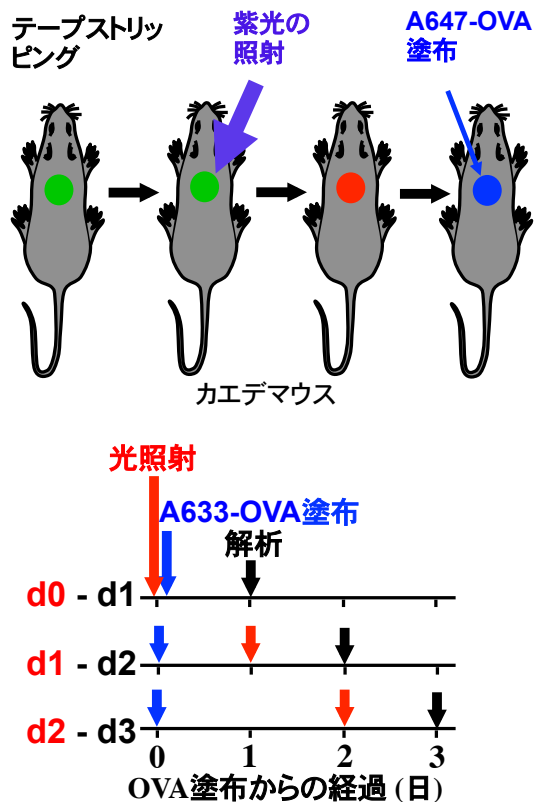


図 1 カエデマウスを用いた、皮膚感作部位からの細胞移動と抗原運搬の時間・空間的な制御の解析

4. 研究成果

(1) OVA 皮膚頻回感作モデルにおいて、感作部位からリンパ節に移行する細胞の解析：カエデマウスの背部皮膚に OVA を頻回感作した後、感作部位を光照射して細胞をマーキングした。そして、24 時間後に所属リンパ節である *brachial LN* におけるマークした細胞をフローサイトメトリーで検出した。その結果、OVA 感作群では、コントロールの PBS 処理群に比べ、マークされた樹状細胞、非制御性及び制御性 CD4T 細胞に加え Th2 誘導に重要と考えられる好酸球が検出された。

(2) 皮膚からリンパ節への好酸球移行

好酸球の所属リンパ節への移行が OVA 感作特異的かどうかを明らかにするために、非刺激の皮膚から所属リンパ節への好酸球の移行を調べた。その結果、非刺激においてもマークした好酸球が所属リンパ節で検出されたが、その頻度は感作した皮膚に比べ低かった。従って、皮膚に存在する好酸球は定常状態においても所属リンパ節に移行しており、その移行は皮膚への OVA 持続感作による増加することが分かった。

(3) 正常状態における皮膚樹状細胞の生体内動態

前述のように皮膚への持続的な抗原感作が、皮膚から所属リンパ節に移行する樹状細胞の動態を特に増加させることが示された。そこで皮膚樹状細胞に着目し解析を進めた。正常状態では表皮のランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞は大きく、CD103⁺及び CD103⁻に分けられる(図2)。そこで、これら皮膚樹状細胞サブセットの正常状態における皮膚及びリンパ節における入れ替わり、皮膚から所属リンパ節への移動、及びリンパ節から他の臓器への移行と多面的な動態解析を行った。その結果、正常状態において、皮膚樹状細胞の各サブセットは各々、独自の速度で入れ替わり及び移動しており、その速度は、CD103⁻真皮樹状細胞 > CD103⁺真皮樹状細胞 > 表皮ランゲルハンス細胞の順であること、しかし、これらの皮膚樹状細胞はリンパ節に移行後は下流のリンパ節にはほとんど移行せずリンパ節内で2-5日程度で細胞死に至っていることが分かった(図2)。

(4) 物理的ストレス時における皮膚樹状細胞の移動及び抗原運搬の時間空間的な制御

そこで更に、OVA 皮膚頻回感作モデルと同様、皮膚に物理的なストレスを与えたときの皮膚の樹状細胞、及び樹状細胞による感作抗原の皮膚から所属リンパ節への運搬の時間空間的な制御を明らかにすることにした。OVA 皮膚頻回感作モデルと同様、皮膚をテープストリッピングした後、A647-OVA を塗布した。図1に示すプロトコールにより光照射し翌日に所属リンパ節を解析した。その結果、テープストリッピングによって3日以上、持続的な樹状細胞移行の増加と抗原の運搬の増加が認められた。そして、これらは特にCD103⁻真皮樹状細胞が担っていることを明らかにした。今後、これら感作タンパク抗原を運搬した細胞のTh2細胞誘導について解析する予定である。

また、テープストリッピング翌日には、抗原を運搬した皮膚でマークされた真皮樹状細胞が所属リンパ節で検出されたが、2日以降には、感作抗原が皮膚でマークされていない樹状細胞で認められた。この結果は、感作

抗原を皮膚から移行した樹状細胞から受け取ったリンパ節内に存在する樹状細胞がT細胞活性化を担っている可能性を示している。頻回感作過程における、これら抗原提示細胞のTh2誘導の解明も重要であると考えられる。

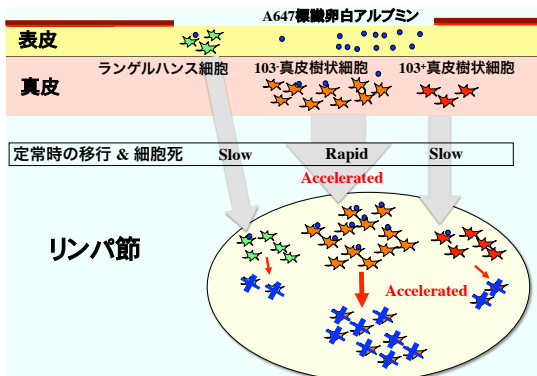


図2 皮膚樹状細胞の定常状態における所属リンパ節への移行と、OVA 皮膚頻回感作モデルと同様、皮膚を物理的な刺激(テープストリッピング)とタンパク質抗原塗布時の細胞移動と抗原運搬。

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)

[学会発表] (計12件)

招請講演

- ① 戸村 道夫: 「Approach to understand immune system based on spatiotemporal regulation of immune cells in the entire body」東京慈恵会医科大学、第38回日本微小循環学会総会2013.2.8-9
- ② 戸村 道夫: 「新規機能可視化蛍光タンパク質を用いた免疫応答の可視化」千里ライフサイエンスセンター、大阪、千里ライフサイエンスセミナー D4 細胞の“こころ”を生きた個体で観察する----- 蛍光生体イメージングの最前線, 2013.1.23
- ③ 戸村 道夫: 「スペクトル型セルアナライザーを用いた次世代免疫研究最前線」神戸国際会議場、神戸、第41回日本免疫学会、ランチョンセミナー, 2012, 12, 5-7.
- ④ 戸村 道夫: 「色変換蛍光タンパク質「カエデ」発現マウスを用いた全身レベルの免疫細胞動態解明による免疫系の理解」日本医科大学 橘桜会館、東京、第36回日本リンパ学会総会、シンポジウム, 2012.6.29.
- ⑤ 戸村 道夫: 「免疫応答と分子イメージング」北海道大学、札幌、日本薬学会第132年会特別シンポジウム、免疫応答制御分子研究の最前線, 2012.3.30【国内会議】
- ⑥ 戸村 道夫: 「新規機能性蛍光タンパク質による免疫応答の4Dイメージング」北海道大学、札幌、日本薬学会第132年会 日本

薬科機器協会ワークショップ 2012. 3. 30.

- ⑦ Michio Tomura : 「Monitoring cell migration in skin in vivo, using mice expressing "Kaede" Protein : Implications for barrier research.」 Waterville Valley Resort, New Hampshire, USA, Gordon Research Conferences : Barrier Function of Mammalian Skin, 2011.8. 7-12

一般講演

- ① Michio Tomura, Akihiro Hata, Kenji Kabashima, Osami Kanagawa : 「 Visualization of skin-derived DC dynamics by photoconvertible protein "KikGR" mice.」 京都国際会議場, 23th 日本樹状細胞研究会 2013. 5. 17.
- ② Michio Tomura, Kenji Kabashima, Osami Kanagawa: 「Rapid replacement by apoptosis in the draining lymph nodes sustains dynamics of skin-migratory dendritic cells in the steady state.」 Hynes Convension Center, Boston, USA, 99th Annual meeting of the American association of immunologist. 5/4-5/8, 2012.
- ③ Michio Tomura, Kenji Kabashima, Osami Kanagawa. : 「 Rapid replacement by apoptosis in the draining LN sustains dynamics of skin-migratory dendritic cells in steady state.」 京都大学芝蘭会館, 3rd Synthetic Immunology, 2012. 5. 18-19.
- ④ 戸村 道夫「免疫応答の可視化に向けて : 4D イメージングの試み」日光東照宮晃陽苑、日光シンポジウム 2011.12.17-18.
- ⑤ Michio Tomura, Kenji Kabashima, Osami Kanagawa : 「 Dynamic movement of dendritic cells under physiological condition.」 幕張メッセ、千葉、第 40 回日本免疫学会学術集会、2011. 11. 27-29.

[その他]

ホームページ等

http://www.ak.med.kyoto-u.ac.jp/group_research/tomuraG.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

戸村 道夫 (Tomura Michio)

京都大学医学研究科・准教授

研究者番号 : 30314321

(2)連携研究者

梶島 健司 (Kabashima Kenji)

京都大学医学部・准教授

研究者番号 : 00362434

金川 修身 (Kanagawa Osam)

明石市民病院

研究者番号 : 70391919