

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19738

研究課題名(和文)皮膚樹状細胞におけるCD326分子の新規機能解析

研究課題名(英文)Analysis of function of CD326 expressed in dermal Dendritic cells

研究代表者

大内 健嗣(OUCHI, TAKESHI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30528419

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): CD326分子は同種親和性を示すカルシウム非依存性の細胞間相互作用に関与する膜タンパクである。CD326はランゲリン陽性真皮樹状細胞に発現し、遊走したリンパ節内において、その発現を増強することを発見した。皮膚樹状細胞サブセット特異的CD326分子ノックアウトマウスを作成し、遺伝子銃、タンパク抗原、アレルギー性接触性皮膚炎モデルを用いた経皮的な免疫応答を検討することで、ランゲリン陽性真皮樹状細胞におけるCD326の機能を解析することを試みた。また、表皮顆粒層におけるCD326の発現を発見し、活性化したランゲルハンス細胞の樹状突起との間に機能的な細胞接着に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): CD326 is a membrane glycoprotein that promotes intercellular adhesion through homophilic interaction. CD326 is expressed at high levels by epidermal Langerhans Cells (LC). Here, we demonstrated that langerin+ dermal dendritic cells (langerin+ dDC) weakly express CD326 on surface. It is also found that langerin+ dDC showed enhanced expression of CD326 in lymph nodes. To study function of CD326 in langerin+ dDC, we developed KO mice in which CD326 is selectively deleted in LC and langerin+ dDC. We explored immunological consequences of lack of CD326 expression on langerin+ dDC by percutaneous immunization assays. We also found that CD326 was expressed at the second layer of stratum granulosum (SG2) layer to seal the intercellular junctions. Activated LC dendrites docking point lost CD326 expression in mice with CD326-deficient LC at SG2. Topically applied biotin penetrated into basal layer in mice with CD326-deficient LCs, suggesting the barrier compromise at LC docking points at SG2.

研究分野：皮膚免疫、皮膚バリア機能

キーワード：CD326 ランゲリン陽性真皮樹状細胞 ランゲルハンス細胞 顆粒層

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 皮膚樹状細胞のサブセットとその機能

ランゲルハンス細胞(LC)が表皮の樹状細胞(DC)と同定されて以来、樹状細胞のプロトタイプとして多くの研究がなされ、ランゲリンはLC特異的なマーカーと考えられてきた。ところが近年、ランゲリンを発現する真皮のDCサブセット(ランゲリン陽性真皮樹状細胞: langerin+ dDC)が新しく発見され、皮膚にはLC、langerin+ dDC、langerin- dDCの少なくとも三つのサブセットが存在することが明らかとなっている。LCが上皮系細胞に特徴的な接着分子(E-cadherin)およびタイトジャンクション関連分子(claudin-1)を発現するのに対し、langerin+ dDCはE-cadherinの接着パートナーであるCD103分子を発現しており、両者は表面マーカーにより区別可能である。2011年、申請者らはLCが経皮的な蛋白抗原を獲得し、抗原特異的なTh2型の液性免疫反応を誘導する事を証明した(Ouchi et al. 2010 JEM)。また、langerin+ dDCは経皮的な抗原に対してTh1型の液性免疫反応を誘導する事が明らかとなっている(Nagao et al. 2009 PNAS)。

### (2) CD326分子と皮膚樹状細胞

CD326分子は、40kDaの細胞接着因子で、同種親和性を示すカルシウム非依存性の細胞間相互作用に参与するI型膜タンパクである。CD326は主に上皮の細胞間に発現し、表皮に在住する皮膚の代表的な樹状細胞であるLCにも高発現することが知られているが、特にLCsにおける機能は不明であった。近年、Udeyらのグループは、CD326分子をランゲリンプロモーター下に特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製し(Gaiser et al. PNAS 2012)、研究代表者はこのマウスにおいて、経皮的な蛋白抗原に対する液性免疫応答、細胞性免疫応答が増強する事を明らかにした(Ouchi et al. JID 2016)。また、langerin+ dDCは真皮においてCD326分子を弱発現し、遊走した皮膚所属リンパ節内においてその発現を増強することを予備実験で確認した。

### (3) 皮膚樹状細胞の接着分子

ここで、各サブセットの特徴を接着分子の観点からまとめた。langerin+ dDCは真皮に在住する血球系細胞ながら、リンパ節遊走後に上皮において重要な役割を果たすCD326分子の発現強度を増強しているのは興味深い。

LC(局在; 表皮に常在し、真皮を遊走) 発現する接着分子; CD326<sup>high</sup>(表皮/真皮/リンパ節)、E-cadherin(表皮/真皮/リンパ節)

Langerin+ dDC(局在; 真皮) 発現する接着分子; CD326<sup>low</sup>(真皮)、CD326<sup>med</sup>(リンパ節)、CD103(真皮/リンパ節)

Langerin- dDC(局在; 真皮) 発現する接着分子; 不明

### (4) 発現接着分子からの仮説

ヘルペス感染症では真皮樹状細胞が抗原を獲得してリンパ節に遊走し、何らかの形でリンパ節の樹状細胞に抗原輸送し、最終的にCD8陽性T細胞を活性化するという図式が認められつつある。このような樹状細胞間相互作用の詳細な分子メカニズムは不明のままである。マウス皮膚の凍結切片を樹状細胞マーカー(CD11c)やランゲリンで染色すると、興味深いことに、真皮に遊走したLC(CD11c+ Langerin<sup>high</sup>)はlangerin+ dDC(CD11c+ Langerin<sup>low</sup>)と密に接していることが観察される。さらに、langerin- dDCも毛嚢内に存在するLCと接触する像がしばしば観察され、局所で樹状細胞サブセットが密に接触し、何らかの作用を及ぼし合っていると考えられる。LCに発現するE-cadherinは同種親和性の強い接着分子であることは有名だが、langerin+ dDCにも発現するCD103分子(別名integrin  $\alpha\epsilon\beta_7$ )とも接着しうる。さらに、LCおよびlangerin+ dDCが発現するCD326分子は前述の通り、同種親和性を示す細胞接着分子である。以上の事からLCおよびlangerin+ dDCは直接的にCD326やE-cadherinを中心とする接着分子を用いて、皮膚および皮膚所属リンパ節内でクロストークを行い、皮膚免疫反応を司っている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

皮膚および皮膚所属リンパ節において各樹状細胞サブセットにおけるCD326分子の発現および局在を明らかにするとともに、経皮免疫応答におけるCD326分子の果たす機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 皮膚・皮膚所属リンパ節における樹状細胞サブセットにおけるCD326分子発現

C57 BL-6マウス皮膚を表皮、真皮に分離した後、それぞれを酵素処理して細胞浮遊液を作成しフローサイトメトリーで解析した。マウスの皮膚所属リンパ節も同様に解析した。

### (2) 共焦点顕微鏡による皮膚樹状細胞サブセットの局在解析

マウスの耳介より採取した皮膚から、チオンアン化アンモニウムにより表皮を剥離し、真皮シートとして抗CD11c、抗CD326、抗CD103抗体を用いた多重染色を行って染色した。

### (3) 電子顕微鏡による皮膚樹状細胞サブセットの局在解析

post-embedding法での免疫電子顕微鏡を施行した。具体的にはC57 BL-6マウスの耳介より採取した皮膚をpost-embedding免疫電顕の基質として使用した。検体を1mm以下程度に切りだし、-190に冷却した液体プロパン中に急速に投入し凍結固定した。-80下でメタノールにより凍結置換を行った。その

後、-60 度で Lowicryl K11M にて樹脂包埋し、紫外線重合によりブロックを作成した。超薄切片を作成したのち、1 次抗体と反応後、15nm 以下の金コロイド標識 2 次抗体を反応させ透過型電子顕微鏡にて観察した。

#### **(4) 骨髄移植による皮膚樹状細胞サブセット特異的 CD326 分子ノックアウトマウス作成**

以下 4 群のマウスを骨髄移植によって作成することを試みた。①野生型マウスに野生型マウスの骨髄を移植(コントロール)、②野生型マウスに LC-CD326 cKO マウスの骨髄を移植、③LC-CD326 cKO マウスに野生型マウスの骨髄を移植、④LC-CD326 cKO マウスに LC-CD326 cKO マウスの骨髄を移植。骨髄移植の結果、langerin+ dDC を含む真皮樹状細胞はドナー由来に置換されるが、表皮内の LC は放射線感受性が低いためレシピエントのままである (Ouchi et al. JEM 2010)。各々の群のマウスは ①LC、langerin+ dDC とともに CD326 を発現、②LCのみが CD326 を発現、③langerin+ dDC のみが CD326 を発現、④LC、langerin+ dDC とともに CD326 を発現しないはずである。

#### **(5) 経皮的な免疫応答解析(遺伝子銃)**

遺伝子銃を用いた経皮的 genetic immunization で LC が抗原特異的 IgG1 産生 (Th2 型液性免疫反応) を誘導し、langerin+ dDC が抗原特異的 IgG2a 産生 (Th1 型液性免疫反応) を誘導することが報告されている (Nagao et al. 2009 PNAS)。一つのアッセイで LC、langerin+ dDC の機能が同時に解析できるため、当研究では特に有用と思われた。具体的には  $\beta$ -galactosidase をコードする E.Coli 由来のプラスミド DNA をコーティングされた金粒子 (pSport-beta-Gal) を用いた。コントロールとして空プラスミド DNA (pcDNA3.1) を用意し、マウスの剃毛した腹部三カ所に、遺伝子銃を用いて免疫を行った。免疫 1 週間後に採血を行い、抗原特異的 IgG1/2b/2c/3 を ELISA 法を用いて測定し、CD326 分子の選択的欠損がこれらの抗原特異的な液性免疫反応に与える影響を解析した。

#### **(6) 経皮的な免疫応答解析(タンパク抗原)**

OVA (chicken ovalbumin) を皮膚に外用した場合、LC によって抗原特異的 IgG1 産生 (Th2 型液性免疫反応) が誘導される事が分かっている (Ouchi et al. 2010 JEM)。そこで、OVA を 1 週間間隔で 2 回、経皮免疫し、抗原特異的 IgG1/IgE を ELISA 法により測定した。

#### **(7) 経皮的な免疫応答解析(アレルギー性接触性皮膚炎モデル)**

アレルギー性接触性皮膚炎は、抗原特異的な遅延型過敏反応であり、あるハプテンが皮膚に初めて接触した際に抗原特異的 T 細胞が活性化される一連の反応である感作相と、感作が成立した個体の皮膚に再び同一のハプテ

ンが塗布され、湿疹反応が誘導される惹起相に分けられる。感作が成立するためには、樹状細胞からナイーブ T 細胞へ抗原情報が伝達される必要がある。ハプテンを用いたアレルギー性接触性皮膚炎の系において、LC は皮膚炎に抑制的に働くことが報告されており (Kaplan et al. 2005 Immunity)、皮膚樹状細胞の機能解析に有用と考えられる。具体的には、アセトンとオリーブ油を 4:1 に混合した溶液に 2,4-Dinitrofluorobenzene (以下、DNFB) の濃度が 0.5% となるように調整し、上記で作成した骨髄移植マウスの剃毛した腹部に 25  $\mu$ l を塗布した (感作)。感作 5 日後に耳介皮膚に 0.2% の DNFB を 10  $\mu$ l 塗布した (惹起)。惹起後 5 日間、耳介皮膚の厚さを経時的に計測し、CD326 分子の選択的欠損がアレルギー性接触性皮膚炎反応に与える影響を解析した。

#### **(8) ハプテンによる樹状細胞遊走能の解析**

表皮に塗布されたハプテンは、表皮内に存在する種々の蛋白質と結合し、ハプテン結合蛋白質を形成し皮膚樹状細胞に取り込まれる。皮膚樹状細胞は取り込んだハプテン結合蛋白質をプロセッシングしつつ、輸入リンパ管を經由して所属リンパ節の T 細胞領域まで遊走する (Enk et al. 1992 PNAS)。リンパ節には定常状態でも一定の割合の皮膚由来樹状細胞が存在するが、ハプテン塗布により皮膚から所属リンパ節への樹状細胞の遊走を観察する事ができる。具体的には、ハプテンとして作用するテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC) をアセトンとフタル酸ジブチルの混合液に溶解し、上記で作成した骨髄移植マウスの剃毛した腹部に塗布した。TRITC を取り込み皮膚からリンパ節へ遊走した樹状細胞は、フローサイトメーターで検出可能である。皮膚樹状細胞の所属リンパ節に到達する時間的推移を観察することで、CD326 分子の選択的欠損がハプテンによる樹状細胞の遊走能に与える影響を解析することが可能である。

#### **(9) 経皮的な寛容免疫応答解析(アレルギー性接触性皮膚炎モデル)**

樹状細胞はアレルギー性接触性皮膚炎の免疫寛容に関わっている。2012 年、Aguero らは DNFB に比べて弱い免疫原性をもつ 2,4-Dinitrothiocyanobenzene (以下、DNTB) が DNFB によるアレルギー性接触性皮膚炎反応に免疫寛容をもたらす事を報告した (Aguero et al. 2012 JCI)。この免疫寛容は DNTB をプロセッシングした LC が、惹起相において抗原特異的 CD8+ T 細胞を不応答化し、ICOS+CD4+Foxp3+ 制御性 T 細胞を活性化することでもたらされるため、皮膚樹状細胞の機能解析に有用であると考えられる。アセトンとオリーブ油を 4:1 に混合した溶液に DNTB の濃度が 1.25% となるように調整し、マウスの剃毛した腹部に 100  $\mu$ l を塗布 (寛容誘導)

し、7日後に0.5%のDNFBを剃毛した背部に25 $\mu$ lを塗布した(感作)。感作5日後に耳介皮膚に0.2%のDNFBを10 $\mu$ l塗布した(惹起)。惹起後5日間、耳介皮膚の厚さを経時的に計測し、CD326分子の選択的欠損が免疫寛容応答に与える影響を解析した。同時に所属リンパ節におけるICOS+CD4+Foxp3+ 制御性T細胞の割合をフローサイトメーターで解析し、CD326分子の選択的欠損が樹状細胞の制御性T細胞誘導に与える影響を解析した。

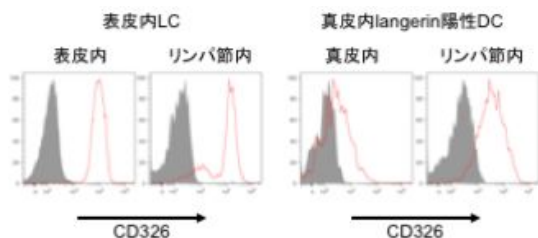
#### (10) 表皮顆粒層におけるCD326分子の発現

現在までCD326分子は毛包における発現が報告されていたが、表皮におけるその発現パターンの解析は不十分であった。そこで、免疫染色を用いて、CD326分子の詳細な表皮における発現パターンを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 皮膚・皮膚所属リンパ節における樹状細胞サブセットにおけるCD326分子発現

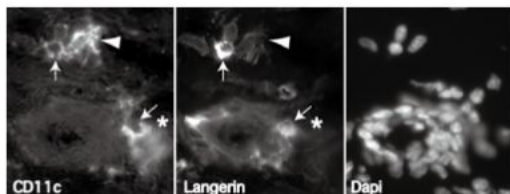
皮膚由来の樹状細胞はLangerin、CD11b、CD103分子の発現パターンによって5種類のサブセットに分類が可能であった。我々はLangerin+ CD11b+ ; LC、Langerin+ CD11b- CD103+ ; langerin+ dDC)に注目した。LCは表皮、真皮、リンパ節内でもCD326分子を強発現していた。Langerin+ dDCは真皮においてCD326分子を弱発現し、遊走した皮膚所属リンパ節内においてその発現を増強することを見出した。



その他の樹状細胞サブセットではCD326分子の発現は認められなかった。

#### (2) 共焦点顕微鏡による皮膚樹状細胞サブセットの局在解析

ランゲリン陽性真皮樹状細胞が毛嚢周囲に多く認められる知見が得られた。



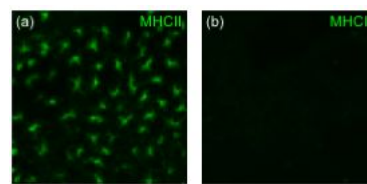
皮膚凍結切片ではCD11c+ Langerin<sup>high</sup> (LC; arrow)とCD11c+ Langerin<sup>low</sup> (langerin+ dDC; arrowhead)が密に接触している。CD11c+ Langerin<sup>negative</sup> (langerin- dDC; \*印)が毛嚢内のLCと接触している。

#### (3) 電子顕微鏡による皮膚樹状細胞サブセットの局在解析

アーチファクトが強い検体不良、および抗体の染色性不良があり、詳細な観察が困難であったため、免疫電子顕微鏡は技術的なハードルが高いことがわかった。しかし、前述の通り共焦点顕微鏡による多重染色で樹状細胞の局在が解析可能であった。

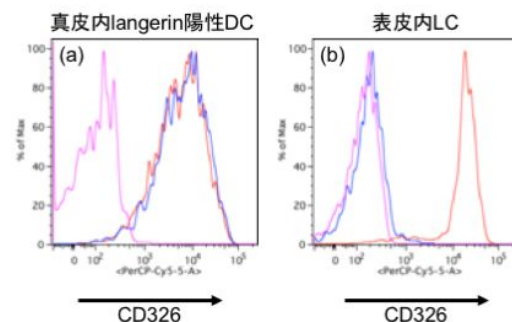
#### (4) 骨髄移植による皮膚樹状細胞サブセット特異的CD326分子ノックアウトマウス作成

骨髄移植の結果、langerin+ dDCを含む真皮樹状細胞はドナー由来に置換され、表皮内のLCは放射線感受性が低いためレシピエントのままではあるはずであった。しかし、今回の実験においてドナー側の表皮内LCの数的減少または完全な欠損が見られ、骨髄移植マウスは経表皮免疫操作による解析に適しないと判断した。



(a) 野生型マウスの表皮MHCII染色像。  
(b) 野生型マウスに野生型マウスの骨髄を移植した表皮のMHCII染色像。MHCII陽性の表皮LCの消失が観察された。

そこで、野生型マウス、CD326分子をランゲリンプロモーター下に特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウス(以下、LC-CD326 cKO)、CD326分子をCD11cプロモーター下に特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウス(以下、DC-CD326 cKO)の3群のマウスを用いることとした。LC-CD326 cKOにおいては、LCにおいてのみCD326分子が欠損し、DC-CD326 cKOにおいては、LCおよびlangerin+ dDC両者からCD326分子が欠損する。とくにこの2群における免疫能の差異を観察することで、特にlangerin+ dDCにおけるCD326分子の役割が解析可能である。

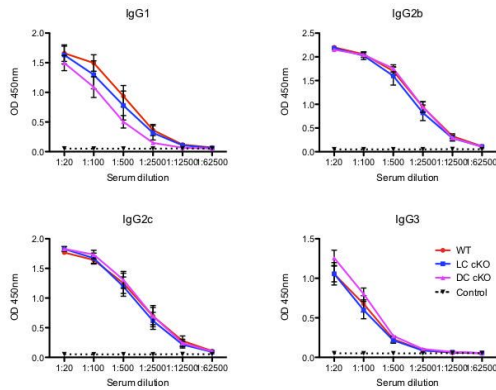


(a) Langerin+ dDCにおけるフローサイトメーターによるCD326発現の解析(赤;野生型、青;LC-CD326 cKO、マゼンダ;DC-CD326 cKO)。  
(b)表皮内LCのCD326発現。(黒;野生型、青;LC-CD326 cKO、マゼンダ;DC-CD326 cKO)。



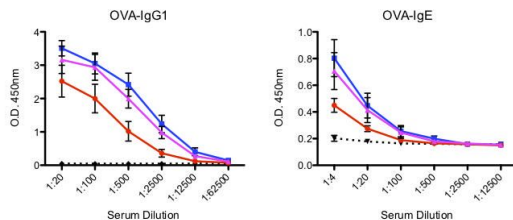
### (5) 経皮的な免疫応答解析 (遺伝子銃)

免疫1週間後に抗原特異的なIgGをELISA法を用いて測定したところ、抗原特異的な液性免疫応答が確認された。抗原特異的IgG1はDC-CD326 cKOにおいて減弱する傾向が見られたが、3群間での免疫応答に明らかな有意差は見られなかった。



### (6) 経皮的な免疫応答解析 (タンパク抗原)

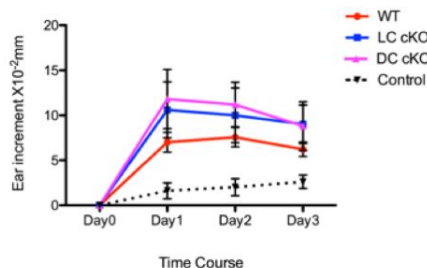
免疫1週間後に抗原特異的なIgGおよびIgEをELISA法を用いて測定したところ、抗原特異的な液性免疫応答が確認された。既報告通り抗原特異的IgG1およびIgEはLC-CD326 cKOで増強していた。DC-CD326 cKOにおいても同様の反応が見られたが、LC-CD326 cKOとDC-CD326 cKOの2群間での免疫応答に明らかな有意差は見られなかった。



赤; 野生型、青; LC-CD326 cKO、マゼンダ; DC-CD326 cKO、点線; コントロール

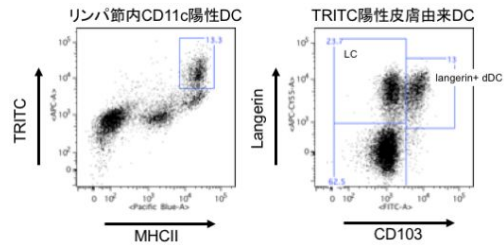
### (7) 経皮的な免疫応答解析 (アレルギー性接触性皮膚炎モデル)

DNFBを用いて、野生型マウス、LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKOにおけるアレルギー性接触性皮膚炎を評価した。LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKOマウスは野生型に比して、アレルギー性接触性皮膚炎反応が亢進する傾向が見られ、これまでに得られた知見と矛盾しない結果であった。LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKO間で明らかなアレルギー性接触性皮膚炎反応の差異は認められなかった。

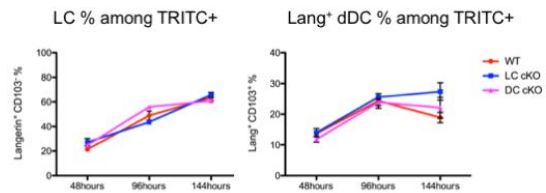


### (8) ハプテンによる樹状細胞遊走能の解析

TRITCを取り込んだ皮膚由来樹状細胞は所属リンパ節において、CD11c+ MHCIIhigh TRITC+の細胞集団に含まれる。この細胞集団をLangerinとCD103で展開すると、Langerin+ CD103- がLC、Langerin+ CD103+ がLangerin+ dDCとしてゲーティングされる。

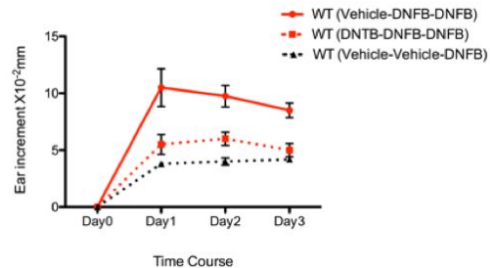


野生型マウスにおいてはハプテン塗布後4日目でLangerin+ dDCの所属リンパ節への遊走がピークとなった。またハプテン塗布後6日目でLCの所属リンパ節への遊走がピークとなり、既知見と矛盾しない所見が確認された。塗布後2・4・6日目の解析において、野生型マウス、LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKOの3群におけるLCおよびLangerin+ dDCの遊走能に有意な差異は認められなかった。

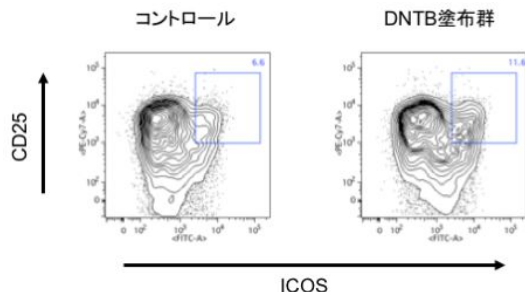


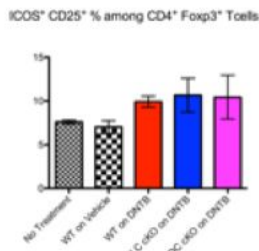
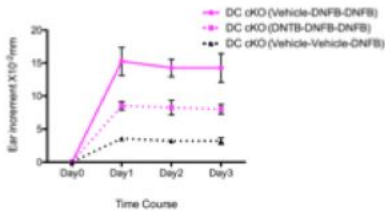
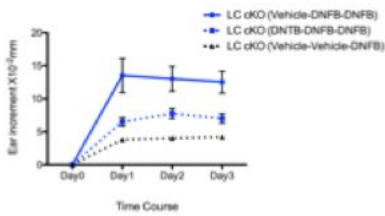
### (9) 経皮的な寛容免疫応答解析 (アレルギー性接触性皮膚炎モデル)

野生型マウスにおいて弱い免疫原性をもつDNTBがDNFBによるアレルギー性接触性皮膚炎反応に免疫寛容をもたらす事が確認され、既報告と矛盾しない結果が得られた。



所属リンパ節内のCD25+ICOS+CD4+Foxp3+制御性T細胞は、DNTBで前処置したマウスにおいて有意に増殖しており、抗原特異的CD8+T細胞を不応答化していることが示唆された。

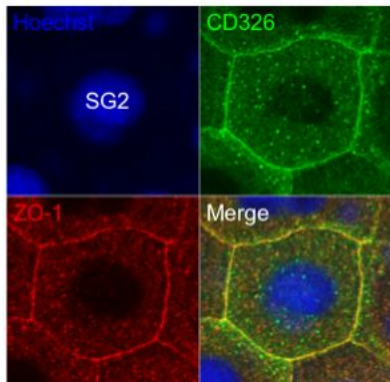




この寛容免疫応答を LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKO において評価した。LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKO 間で明らかなアレルギー性接触性皮膚炎応答の差異は認められなかった。

さらにリンパ節における ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 制御性 T 細胞の割合は LC-CD326 cKO、DC-CD326 cKO 間で有意な差を認めなかった。

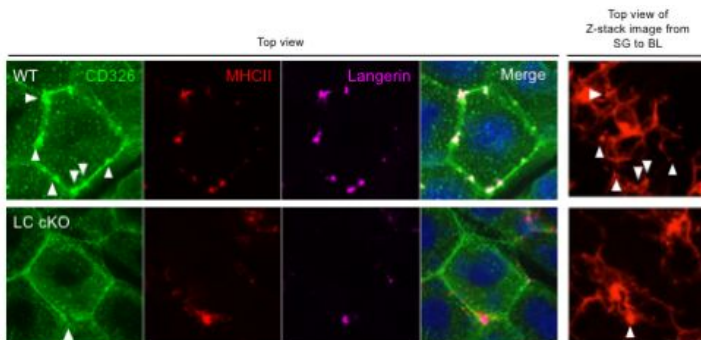
### (10) 表皮顆粒層における CD326 分子の発現



表皮シートを作成して蛍光染色で解析したところ、顆粒層において表皮間をシーリングするように CD326 分子の発現が確認された。

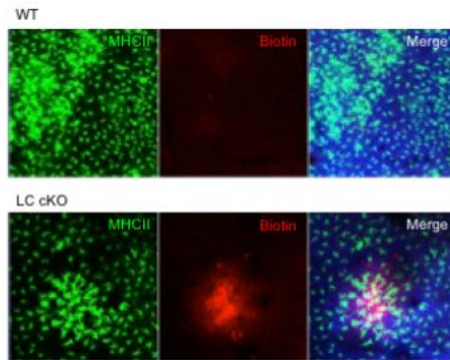
LC は活性化すると顆粒層を超えて角層直下まで樹状突起を伸長することが知られている (Kubo et al. 2009 JEM)。興味深いことに活性化した LC の樹状突起が、顆粒層の表皮細胞とドッキングするポイントで CD326 分子が高発現することが確認され、LC-CD326 cKO においては、ドッキングポイントの CD326 分子の発現が消失していることが確認された。

このように研究を通じて、新規の知見が得られており、今後はより詳細な表皮顆粒層における CD326 分子の発現パターンとその機能を解析する予定である。



テープストリッピングしたマウス表皮を垂直方向から観察した蛍光組織染色。LC-CD326 cKO において活性化した LC の樹状突起と顆粒層における CD326 がドッキングするポイント ( ) で CD326 の発現が消失している。SG ; 顆粒層、BL ; 基底層。

CD326 分子は LC と周囲のケラチノサイトとの間に細胞間橋をつくることが示唆されている (Ouchi et al. 2017 JID)。表皮をテープストリッピングした上で、皮膚表面にタンパク質をビオチン化する Sulfo-NHS-LC-biotin を塗布して表皮を観察したところ、LC-CD326 cKO において活性化したランゲルハンス細胞の集塊に一致して、表皮基底層におけるビオチン化が確認された。



角層のバリアが破綻している箇所から侵入した試薬が、活性化した LC と周囲のケラチノサイトの間の細胞間隙では侵入が食い止められるが、CD326 分子が欠損すると LC と周囲のケラチノサイトの間の細胞間隙が弛緩し、基底層まで試薬が侵入していることが示唆された。

### 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 0 件 )
- [ 学会発表 ] ( 計 0 件 )
- [ 図書 ] ( 計 0 件 )
- [ 産業財産権 ]
- 出願状況 ( 計 0 件 )
- 取得状況 ( 計 0 件 )

### 6 . 研究組織

- (1) 研究代表者  
大内健嗣 (OUCHI, Takeshi)  
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教  
研究者番号 : 30528419
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし
- (4) 研究協力者  
なし