

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790799

研究課題名（和文） IL-16 による接触過敏反応の終息と制御性 T 細胞の役割

研究課題名（英文） The role of interleukin-16 and regulatory T cell in contact hypersensitivity.

研究代表者

益田 浩司（MASUDA KOJI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00326232

研究成果の概要：BALB/c マウスに、ハプテンを塗布して用いて接触過敏反応(CHS)をマウスの耳介に惹起させその厚さを測定するとともに、惹起相で炎症局所に浸潤するリンパ球のフェノタイプ（CD4,CD8,CD25）の経時的な変化を免疫組織化学的に解析した。CD25 陽性細胞は 6 時間後より認められたが 24 から 72 時間後にかけて増加傾向が認められた。一方、Foxp3 mRNA の発現を real time RT-PCR で測定したところ、その発現は惹起後 6 時間後より認められ、24 時間後から 72 時間後にかけて強くなった。以上の経過より CHS の惹起相における炎症反応の収束には制御性 T 細胞が関与していることが示唆された。Foxp3 mRNA の発現の推移は耳介の厚さの変化に相関する傾向が見られた。また IL-16 による制御性 T 細胞への影響は認められなかった。

交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,200,000 | 0       | 1,200,000 |
| 2007 年度 | 700,000   | 0       | 700,000   |
| 2008 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総 計     | 2,800,000 | 270,000 | 3,070,000 |

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：IL-16、接触過敏反応、制御性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

接触過敏反応(CHS)は経表皮的にハプテンが取り込まれることによって感作および惹起される、おもに T 細胞により引き起こされる皮膚の炎症反応である。感作相では表皮内に侵入したハプテンをランゲルハンス細胞が取り込み、所属リンパ節へと遊走してナイーブ T 細胞への抗原提示が行われる。感作成

立後にハプテンを再投与した際に CHS の反応が皮疹として認められる惹起相では、従来 CD4 陽性 T 細胞がエフェクター細胞で CD8 陽性 T 細胞は抑制的に働くと考えられてきたが、近年では逆に CD8 陽性 T 細胞が CHS の反応を誘導し CD4 陽性 T 細胞がそれを抑制する役割を持つという報告もみられ議論が分かれている。また抗原によるランゲルハ

ンス細胞の活性化やT細胞の炎症局所への遊走、ハプテンが皮膚に残っていても48-72時間で反応が終息していくことなど、その詳細な病態形成のメカニズムは明らかでなかった。

インターロイキン(IL)-16は、CD4分子のリガンドで、主にリンパ球、肥満細胞、樹状細胞、マクロファージ、好酸球により産生され、細胞表面にCD4を発現したT細胞や単球、肥満細胞、好酸球、樹状細胞を遊走させる働きがある。そのためIL-16は気管支喘息やアトピー性皮膚炎(Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. Masuda K et al. Acta Derm Venerol 2003; 83: 249-253)、遅延型過敏反応において重要な役割を有することが報告されている。本研究者は、マウスの皮膚にハプテンを塗布して代表的な遅延型過敏反応であるCHSを誘導する系において、IL-16はハプテンによるCHSの惹起相だけでなく感作相においても表皮および真皮で産生され、抗IL-16抗体で処理したマウスではCD4陽性T細胞が減少するとともにCHSが増強しており、IL-16は炎症局所にCHSを抑制するCD4陽性T細胞を誘導することにより炎症を終息させる作用を有している可能性があることを報告した(The role of interleukin-16 in murine contact hypersensitivity. Masuda K et al. Clin Exp Immunol 2005; 140: 213-219)。また近年、正常個体には自己反応性T細胞の活動を抑制するCD25陽性CD4陽性T細胞をはじめとした制御性T細胞が存在する事が明らかにされ(Sakaguchi S et al, J Immunol 1995; 155:1151)、免疫 自己寛容の維持に重要であるとされているがCHSにおけるその役割や炎症終息のメカニズムはまだ明らかではない。

## 2. 研究の目的

(1) これまで不明であったCHSにおける制御性T細胞の経時的な動態とそのフェノタイプの詳細な検討、(2) 抗IL-16抗体で処理した際のCHSの反応の推移と制御性T細胞の動態の検討、(3) IL-16を局所投与した場合におけるCHSの反応の推移および制御性T細胞の経時的な動態の検討をおこなう。

IL-16により皮膚に誘導されるCD4陽性T細胞の機能やフェノタイプを詳細に検討することにより、CHSと制御性T細胞との関わりを明らかにするとともに、CHSの炎症終息のメカニズムを解析し接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎などの遅延型過敏反応を介する皮膚疾患の病態研究の発展と、それを応用した新たな治療法の開発に寄与することを目的とする。

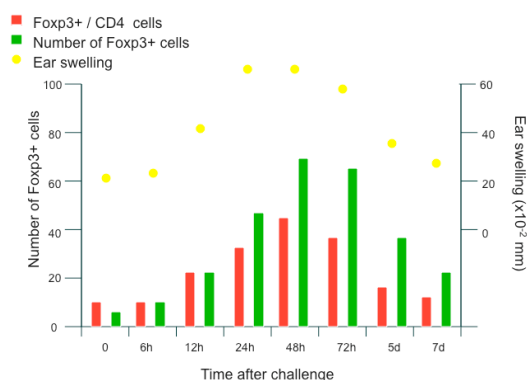
## 3. 研究の方法

本研究はおもにBALB/cマウスに、trinitrochlorobenzene(TNCB)をハプテンとして用いてCHSを惹起させる。(1) CHSを耳介で惹起させその厚さを測定するとともに、惹起相で炎症局所に浸潤するリンパ球のフェノタイプ(CD4, CD8, CD25)の経時的な変化を免疫組織化学的に解析する。さらに、制御性T細胞関連遺伝子としてFoxp3 mRNAの発現や抑制性サイトカインであるIL-6, TGF- $\beta$ についてもreal time RT-PCRで調べる。

(2) CHSを起こしたマウスに経時的にrecombinant IL-16を投与して、その耳介厚を測定するとともに(1)と同様の実験を行い、比較検討を行う。また、抗IL-16抗体を惹起相の前に腹腔内に投与し、惹起後の耳介厚を測定するとともに、(1)と同様の実験を行い、比較検討を行う。また外用ステロイド惹起時に耳介に塗布することでCHSに対する影響を調べた。

## 4. 研究成果

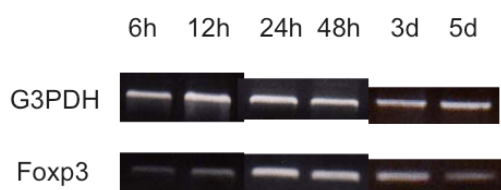
BALB/cマウスに、TNCBをハプテンとして用いて接触過敏反応(CHS)をマウスの耳介に惹起させその厚さを測定するとともに、惹起相で炎症局所に浸潤するリンパ球のフェノタイプ(CD4, CD8, CD25)の経時的な変化を免疫組織化学的に解析した。耳介の厚さは惹起6時間後より肥厚し始め48時間でピークを迎え72時間後より徐々に菲薄化した。浸潤しているリンパ球はまずCD8陽性細胞が6時間後より認められ、その後CD4陽性細胞が12時間後より認められた。CD8陽性細胞は24時間後より徐々に減少し、CD4陽性細胞はさらに増えていた。CD25陽性細胞も6時間後より認められたが24から72時間後にかけて増加傾向が認められた(図1)。



(図1)

一方、Foxp3 mRNAの発現をreal time RT-PCRで測定したところ、その発現は惹起後6時間後より認められ、24時間後から72時

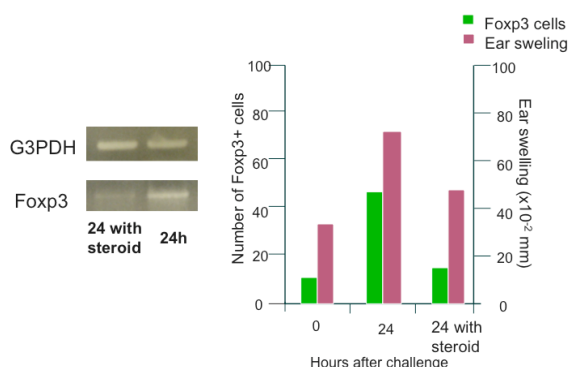
間後にかけて強くなり 5 日後からは減少していた (図 2)。



(図 2)

さらに CHS の抑制性サイトカインである IL-6, TGF- $\beta$  についてもその発現を real time RT-PCR で測定したところ同様に 24 時間後から 72 時間後にかけて強くなり 5 日後からは減少する傾向を認めたが、優位な所見はえられなかった。以上の経過より CHS の惹起相における炎症反応の収束には制御性 T 細胞が関与していることが示唆された。Foxp3 mRNA の発現の推移は耳介の厚さの変化に相關する傾向が見られた。一方抑制性サイトカインである IL-6, TGF- $\beta$  についてはその関与は証明されなかった。抗 IL-16 抗体で処理した際の制御性 T 細胞への影響は特に認められなかった。また IL-16 を耳介や腹腔内にあらかじめ投与しておき CHS を惹起させ炎症の程度や制御性 T 細胞の経時的な動態の検討をおこなったところ、有意な影響は見られなかった。

ハプテン塗布で惹起させる際にステロイド外用剤を塗布しておく、と、耳介の肥厚は減少するが、その際 Foxp3 mRNA の発現も低下していた (図 3)。



(図 3)

あわせて IL-6, TGF- $\beta$  についてもその発現を real time RT-PCR で測定したところ発現量は低下を認めたが優位な所見はえられなかった。また、ハプテンを繰り返し塗布することで作成した Th2 モデルマウスでも、ステロイド外用剤を塗布すると耳介の肥厚は減少するが、その際 Foxp3 mRNA の発現も低下して

いた。以上の結果よりステロイド剤外用による炎症反応の抑制には制御性 T 細胞は関与していない可能性が示唆された。

また、アレルギー疾患や細菌感染防御で重要な役割を果たしている Th17 細胞に関してハプテンの耳介塗布モデルでの、CHS 惹起相における制御性 T 細胞と Th17 細胞の経時的な動態についても検討したが、今のところ明らかな関連は認めない。

## 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 5 件)

①Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Masuda K, Kishimoto S. Erythema-multiforme-like eruption recurring in ultraviolet-exposed skin. *Dermatology* 216:181-183, (2008) 査読あり

②Masuda K, Katoh N, Fukuba K, Shimakura K, Kishimoto S. A case of anaphylaxis to fish and shellfish. *J Dermatol* 35:181-182, (2008) 査読あり

③Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Elevated platelet activation in patients with atopic dermatitis and psoriasis: increased plasma levels of b-thromboglobulin and platelet factor 4. *Allergol Int* 57:391-6, (2008) 査読あり

④Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Masuda K, Kishimoto S. Platelet-derived microparticles and soluble P-selectin as platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. *Clin Immunol*. 2009 in press 査読あり

⑤Masuda K, Katoh N, Mizutani H, Kishimoto S. Anaphylaxis to vitamin B2 added to an energy drink. *Clin Exp Dermatol* in press 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

①Masuda K, Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Soga F, Kishimoto S. The expression of Foxp3+ T cells in the elicitation phase of murine contact hypersensitivity. 68<sup>th</sup> annual meeting of Society for Investigative Dermatology. Los Angeles, California, USA (2007)

②Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Nara T, Soga F, Asai J, Masuda K, Kishimoto S. Topical P2Y12 purinoreceptor antagonists reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. 68<sup>th</sup> annual meeting of Society for Investigative Dermatology. Los Angeles,

California, USA (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

益田 浩司 (MASUDA KOJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00326232

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし