

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19790808

研究課題名(和文) NO および NOS の接触皮膚炎における生理的意義とその役割の解明

研究課題名(英文) THE ROLE OF NO AND NOS IN CONTACT HYPERSENSITIVITY

研究代表者

杉田 和成 (SUGITA KAZUNARI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412647

研究成果の概要：

iNOS は皮膚炎症に関与することが示唆されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。そこで、代表的な炎症性皮膚疾患の1つである接触皮膚炎モデルを用いて、iNOS が皮膚免疫応答において負に制御する因子であることを示す。iNOS 抑制剤を投与したマウスでは有意に接触過敏反応が亢進した。その機序は皮膚樹状細胞のアポトーシス抑制や遊走能亢進を介して起こることを明らかにした。こうした iNOS の樹状細胞調節機構解明の成果は炎症性皮膚疾患制御への糸口となる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	600,000	0	600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	450,000	2,550,000

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：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) や一酸化窒素合成酵素 (NOS) の皮膚疾患への関与が示唆されているものの、NO や誘導型 NOS (iNOS) が、いかなるメカニズムで皮膚炎症に関与するのかについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 接触皮膚炎モデルにおける NO および NOS のケラチノサイト、ランゲルハンス細胞における役割の解明。
(2) ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞の NOS 発現の包括的解明。

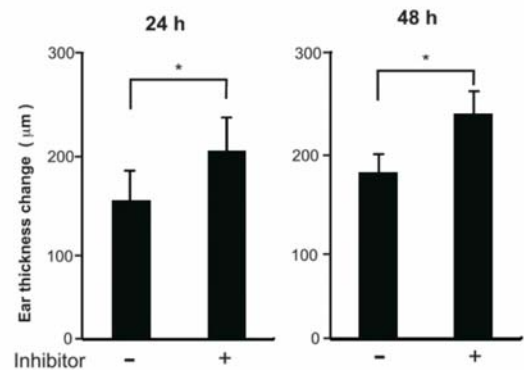
3. 研究の方法

- (1) 抗 iNOS 抗体を用いて、マウスケラチノサイト、ランゲルハンス細胞を染色。
- 次に、iNOS inhibitor 処理群と非処理群で以下の検討を行った。
- (2) 培養ケラチノサイト中のサイトカインを ELISA 法で測定。
- (3) マウス接触過敏反応モデルを用いた耳翼腫脹の解析。
- (4) FITC を用いたランゲルハンス細胞遊走能の検討。
- (5) 表皮細胞浮遊液中のランゲルハンス細胞共刺激分子発現の検討。
- (6) ランゲルハンス細胞の CCL21 に対するケモタキシスアッセイ。
- (7) ランゲルハンス細胞のアポトーシスの検討。
- (8) ハプテン塗布後のランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の iNOS 発現の差異。

4. 研究成果

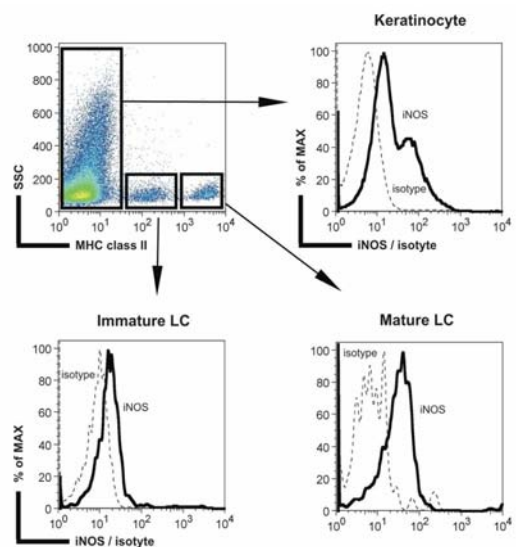
iNOS inhibitor 投与群では接触過敏反応が有意に亢進した (図 1)。フローサイトメトリにて、ケラチノサイトおよびランゲルハンス細胞の iNOS 発現を確認した (図 2)。iNOS inhibitor は培養ケラチノサイト中の TNF, IL-1 α , GM-CSF の産生に影響を与えなかった。接触過敏反応が亢進したメカニズムとして、ランゲルハンス細胞の遊走能の亢進 (図 3) (図 4) が考えられた。但し、iNOS inhibitor は表皮細胞浮遊液中のランゲルハンス細胞の共刺激分子発現には影響をおよぼさなかった (図 5)。加えて、表皮細胞浮遊液に LPS 添加下で、iNOS inhibitor 処理群では有意にランゲルハンス細胞のアポトーシスが減少した (図 6)。さらに、ハプテン塗布後のランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の iNOS 発現を検討したが、真皮樹状細胞でより高発現であった (図 7)。

以上の検討から、接触過敏反応において iNOS はランゲルハンス細胞の遊走や生存に関与し、免疫応答を負に制御する因子であることが明らかになった。



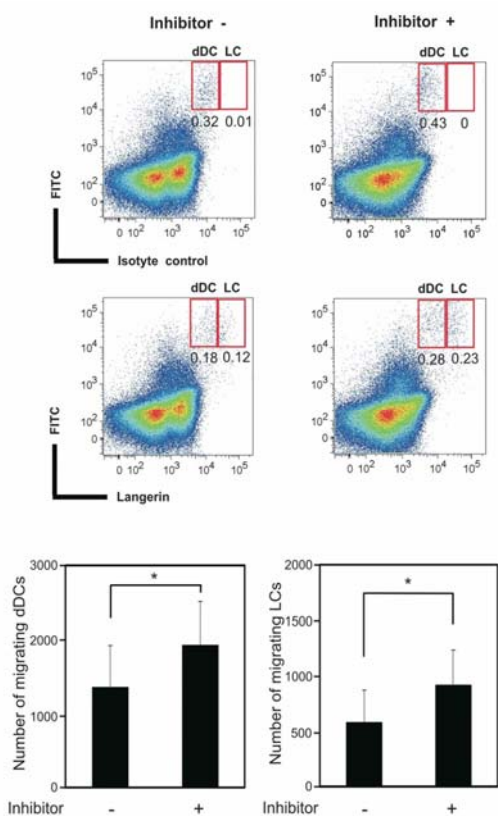
<図 1>

DNFB で感作したマウス接触皮膚炎モデルにおいて、iNOS inhibitor を投与すると、惹起後、24 時間、48 時間とも有意に耳翼腫脹が亢進した。

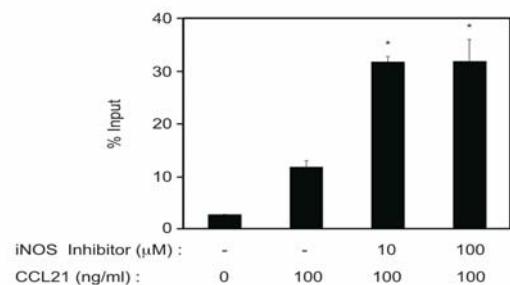


<図 2>

ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞とも iNOS を発現し、ランゲルハンス細胞においては、mature なランゲルハンスがより高発現であった。

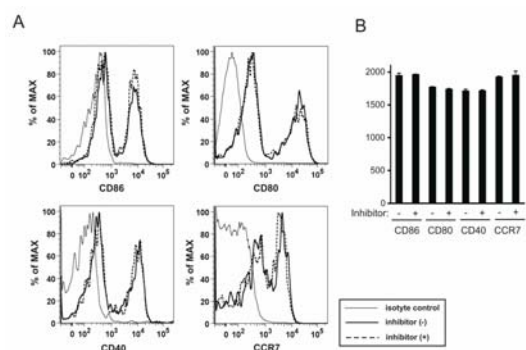


<図 3>
 マウス腹部に FITC を塗布し、所属リンパ節に遊走したランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞数を検討した。iNOS inhibitor 投与によりランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の遊走が亢進した。

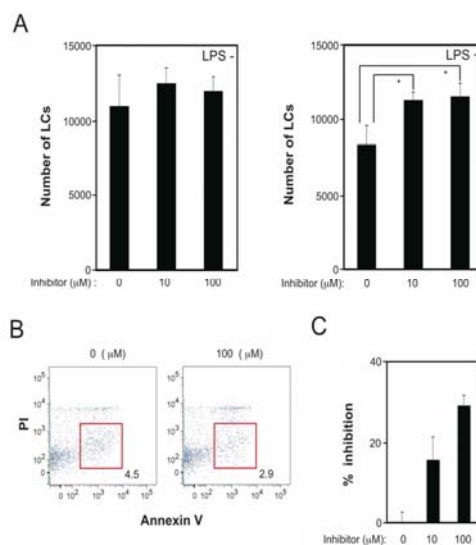


<図 4>
 iNOS inhibitor 処理群ではランゲルハンス細胞

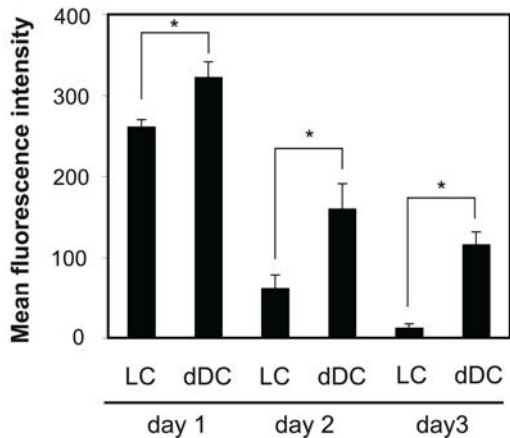
胞の CCL21 に対するケモタキシスが有意に亢進した。



<図 5>
 表皮細胞浮遊液に iNOS inhibitor を添加しても、ランゲルハンス細胞上の共刺激分子発現や CCR7 発現には影響を及ぼさなかった。



<図 6>
 表皮細胞浮遊液に LPS を添加し、ランゲルハンス細胞のアポトーシスについて調べた。LPS を添加することでランゲルハンス細胞数が減少するが、iNOS inhibitor を加えることで、その減少を抑制できる。そのメカニズムとしてランゲルハンス細胞のアポトーシスが有意に抑制されたことが考えられた (PI-AnnexinV+細胞数、図 6 B, C)。



<図 7>

マウス腹部に FITC を塗布した。塗布後 24、48、72 時間における、所属リンパ節に遊走したランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞の iNOS 発現を検討した。真皮樹状細胞において iNOS 発現が高く、時間経過とともにその発現は低下した。

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 6 件)

① 杉田和成 Inducible nitric oxide synthase regulates dendritic cell migration and contributes to contact hypersensitivity. The 10th International

Symposium on Dendritic cell
平成20年10月2日 神戸市

② 杉田和成 皮膚炎症とNO 第346回日本皮膚科学会福岡地方会 平成20年9月28日 北九州市

③ 杉田和成 Inducible nitric oxide synthase promotes migration of epidermal Langerhans cell. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 平成19年11月21日 東京

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 和成 (SUGITA KAZUNARI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：40412647

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者