

平成 21 年 4 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790811

研究課題名（和文） 皮膚免疫におけるリンパ管の役割

研究課題名（英文） Function of lymphatics in cutaneous immunity

研究代表者

菅谷 誠 (SUGAYA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 90334408

研究成果の概要：

皮膚免疫におけるリンパ管の役割を、接触皮膚炎とケモカインの産生の二つの面から検討した。リンパ管に異常のあるマウスでは接触皮膚炎が増強しているが、主に惹起相に原因があり、リンパ管が炎症反応を鎮静化させる排水溝として重要であることが示唆された。またリンパ管に異常があっても、感作部位である皮膚において抗原提示が行われている証拠は得られず、樹状細胞の遊走もしくは抗原の所属リンパ節への流入が遅延していることが示唆された。リンパ管内皮細胞からの CCL21 の発現制御に関しては、oncostatin M が Erk のリン酸化を介して CCL21 産生の増強を増強することが示された。Erk のリン酸化を阻害する MAPK inhibitor を抗原感作 24 時間前に注射したところ、接触皮膚炎が減弱したことから、接触皮膚炎の治療に有効である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：免疫、皮膚、リンパ、内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

リンパ管はこれまで末梢組織の老廃物や組織中に遊走した白血球の単なる通り道としか考えられていなかった。しかし最近になって、リンパ管は種々の刺激に応じてその透過性を

変化させたり、接着分子やケモカインの発現を介して白血球や癌細胞の移動を能動的に制御していることが明らかになってきた。リンパ管及びその主たる構成要素であるリンパ管内皮細胞の機能を解析することは、様々な皮膚疾患や癌の転移のメカニズムを理解し、治

療につなげる上で非常に重要である。

2. 研究の目的

リンパ管の皮膚免疫における役割を *in vivo* の系と *in vitro* の系の2方面から解析することを目的とした。*In vivo* の系では、リンパ灌流に異常のあるマウスを用い、接触皮膚炎におけるリンパ灌流の役割の解析をより深めることとした。2007年までの研究で、リンパ灌流に障害があるマウスのほうが野生型マウスよりも接触皮膚炎反応が強くなることが判明していた。これは接触抗原がDNFBでもFITCでも同様であり、以上の結果は完全に予想を覆すものであった。接触抗原塗布後の所属リンパ節を確認すると、リンパ灌流に障害があるマウスでは抗原を持った樹状細胞はほとんど認められなかった。このことは抗原を保持した樹状細胞が皮膚からリンパ節へ移動することが、接触皮膚炎反応に必ずしも必須ではないどころか、むしろ反応を抑制する系を誘導してしまう可能性を示している。そこで、リンパ灌流に障害が接触皮膚炎反応に及ぼす影響を、様々な角度から検討することにした。

一方 *in vitro* の系においてはリンパ管内皮細胞からのCCL21産生の機序についてより深く検討することを目的とした。近年、研究者らはリンパ管内皮細胞のCCL21産生に oncostatin Mが重要であることを明らかにした。CCL21はリンパ節のT細胞領域の細胞やリンパ管内皮細胞が発現しており、ナイーブT細胞や樹状細胞のリンパ節への遊走に重要なケモカインである。一方、oncostatin Mは活性化したT細胞や樹状細胞が産生することが知られている。炎症反応が惹起されると、活性化したT細胞や樹状細胞からの oncostatin Mがリンパ管からのCCL21の産生を亢進し、より抗原提示細胞のリンパ節への遊走を促し、より多くのT細胞が活性化されるというポジティブループができると予想される。 oncostatin M の属するIL-6ファミリーの代表的サイトカインであるIL-6、oncostatin M、IL-31でリンパ管内皮細胞を刺激し、CCL21産生の機序を検討した。

3. 研究の方法

In vivo の系は、まず抗原で感作したリンパ球をリンパ灌流に異常のあるマウス及び野生型マウスに移入し、接触皮膚炎を惹起した。接触皮膚炎反応の評価は耳の厚さの他、病理組織学的検討を行った。次にクロトンオイルによる一次刺激反応におけるリンパ灌流の役割を検討した。さらに抗原感作後に経時的に感作部位、所属リンパ節を採取し、組織学的検討を行った。最後に感作部位を抗原塗布した後、一定時間経過してから切除し、接触皮膚炎の強さが変化するか検討した。

In vitro の系はリンパ管内皮細胞をIL-6、oncostatin M、IL-31で刺激し、CCL21の産生をmRNA、蛋白レベルで確認した。またこれらのサイトカインで活性化される細胞内刺激伝達系を調べた。次に細胞内刺激伝達系を阻害する薬剤を用い、CCL21の産生が阻害できるか検討した。最後に胞内刺激伝達系阻害剤を実際のマウスに注射し、CCL21産生が抑制できるか、また接触皮膚炎反応が阻害できるか検討した。

4. 研究成果

In vivo の系では、抗原で感作したリンパ球をリンパ灌流に異常のあるマウス及び野生型マウスに移入したところ、リンパ灌流に異常のあるマウスに移入したほうが接触皮膚炎が強かった。一方、リンパ球の感作をするマウスに関しては、リンパ灌流に異常のあるマウスを用いても野生型を用いても、顕著な差は生じなかった。従ってリンパ灌流の異常は接触皮膚炎の惹起相において重要であることが判明した。またクロトンオイルによる一次刺激反応も、リンパ灌流に障害のあるマウスの方が増強していた。これらの結果は炎症の種類には関係なく、リンパ管が炎症反応を鎮静化させる排水溝として重要であることを示唆している。また抗原で感作した後の所属リンパ節では、野生型マウスではT細胞の増殖が盛んで、リンパ濾胞構造が崩れていたが、リンパ灌流に異常のあるマウスではリンパ濾胞が保たれていた。そこで皮膚において抗原提示が行われている可能性を考え、感作部位を経時的に検討したが、野生型マウスとリンパ灌流に異常のあるマウスとでは大きな差はなく、リンパ濾胞構造や抗原提示を受けて増殖している細胞も検出できなかった。感作相に

において抗原塗布24時間後に塗布部の皮膚を除去したところ、野生型マウスでは接触皮膚炎は減弱しなかったが、リンパ灌流に異常のあるマウスでは減弱していた。抗原塗布48時間後に抗原塗布部を除去した場合は、リンパ灌流に異常のあるマウス、野生型マウスいずれも接触皮膚炎反応は減弱していなかった。従って野生型マウスでは感作1日以内に樹状細胞がリンパ節に遊走して感作が成立するが、リンパ灌流に異常のあるマウスでは、樹状細胞の遊走、もしくは抗原のリンパ節への流入が遅れていて1日から2日かかることが示唆された。以上よりリンパ管に異常がある場合でも、リンパ節において抗原提示が行われており、皮膚において抗原提示が行われている可能性は低いと考えられた。

*In vitro*の系ではリンパ管内皮細胞を種々のサイトカインで刺激し、樹状細胞のリンパ節への遊走に重要なCCL21の発現制御を検討した。IL-6ファミリーであるIL-6、oncostatin M、IL-31のうち、oncostatin Mだけがリンパ管内皮細胞からのCCL21産生を増強した。またシグナル伝達の解析では、oncostatin MによるErkのリン酸化が、IL-6、IL-31と比べて著しく強く、またErkのリン酸化を阻害する薬剤（MAPK inhibitor）によってリンパ管内皮細胞からのCCL21産生の増強が抑制された。次に*in vivo*においてもMAPK inhibitorが有効であるかを検討した。MAPK inhibitorをマウスの皮膚に注射し、24時間後にmRNAを抽出したところ、CCL21 mRNAの発現が減弱していた。また抗原感作24時間前にMAPK inhibitorを注射したところ、接触皮膚炎が減弱した。以上よりMAPK inhibitorを抗原感作部位に投与することは、接触皮膚炎の治療に有効である可能性が示された。

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 4 件)

Yokobayashi H, Sugaya M, Miyagaki T, Kai H, Minatani Y, Tamaki T: Serum chemokine levels in a case of angio-oedema associated with eosinophilia. *British*

Journal of Dermatology **159**: 738-40, 2008. 査読有

Shibata S, Saeki H, Tsunemi Y, Kato T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K: IL-17F single nucleotide polymorphism is not associated with psoriasis vulgaris or atopic dermatitis in the Japanese population. *Journal of Dermatological Science* **53**: 163-5, 2009. 査読有

Kato T, Tsunemi Y, Saeki H, Shibata S, Sekiya T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K: Interferon-18 gene polymorphism -137 G/C is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris but not with atopic dermatitis in Japanese patients. *Journal of Dermatological Science* **53**: 162-3, 2009. 査読有

Miyagaki T, Sugaya M, Kagami S, Nakashima H, Ishiura N, Watanabe R, Ohmatsu H, Fujita H, Yazawa N, Kadono T, Fujimoto M, Saeki H, Tamaki K: Increased CCL1 levels in the sera and blister fluid of patients with bullous pemphigoid. *Journal of Dermatological Science* **54**: 45-7, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Sugaya M, Kuwano Y, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kakinuma T, Kadono T, Okochi H, Blauvelt A, Tamaki K: Impaired migration of dendritic cells and enhanced contact sensitivity responses in transgenic mice with lymphatic dysfunction. 国際研究皮膚科学会、2008年5月14日～17日、国立京都国際会館

〔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

菅谷 誠 (SUGAYA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334408

(2)研究分担者

(3)連携研究者