

平成23年3月31日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591335
 研究課題名（和文） Thサブセット1・2・17の偏りがアトピー性皮膚炎の病態へ及ぼす影響の解明
 研究課題名（英文） The role of the bias in Th-subset 1/2/17 on pathogenesis of atopic dermatitis.
 研究代表者
 大塚 藤男（OTSUKA FUJIO）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
 研究者番号：10092157

研究成果の概要（和文）：

最近の研究の進歩によりアトピー性皮膚炎や接触性皮膚炎の病態として、表皮のバリア機構破綻という物理生化学的側面と、アレルギーという免疫学的側面があることが明らかになった。特に、アトピー性皮膚炎の免疫学的異常とヘルパーT細胞サブセットのTh1/Th2アンバランス、あるいは最近その存在が明らかとなったTh17の関連性は、アトピー性皮膚炎の病態を解明する上で重要であり、本研究では、最近、第3のThサブセットとして自己免疫疾患やアレルギー疾患への関与が注目されているTh17がアトピー性皮膚炎の病態にどのように関わっているかを個体レベルで明らかにした。Th17の分化は転写因子ROR \cdot tによって規定されている。そこで、本研究ではROR \cdot tを過剰遺伝子導入した血液幹細胞をマウス個体に骨髄移植し、Th17の分化がどのように変化するか解析した。その結果、再構成された後の末梢血Th17細胞は、コントロールと比べて増加した。しかし、アレルギー性接触皮膚炎はむしろ抑制された。これは、Treg細胞も増加しており、この抑制効果によるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies demonstrated that both impaired skin barrier function and allergic immunological property are important aspects of the pathogenesis of atopic dermatitis and contact dermatitis. However, the role of Th17 cells in the pathogenesis of contact dermatitis is not clear. In this study, we investigated the role of Th17 cells in allergic contact dermatitis. The hematopoietic stem cells which constitutively overexpress ROR \cdot t were transplanted to irradiated mice and artificial allergic dermatitis was induced to the mice. The dermatitis in the transplanted mice was suppressed compared to the control mice. These findings indicate that constitutive overexpression of ROR \cdot t results in the increase of Th17 cells, but suppressed allergy due to the increase of Treg cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎・Th細胞

1. 研究開始当初の背景

Th17細胞はIL17を産生する新しいヘルパーT細胞として同定され、炎症や自己免疫に重要な役割を果たしている。Th17細胞は、TGF \cdot とIL6の組み合わせでナイーブCD4陽性細胞から分化し、IL23は、Th17細胞の維持と増殖に関わっている。一方、TGF \cdot はFoxp3陽性レギュラトリーT細胞(Treg細胞)の分化と維持にも関わっている。すなわち、炎症増強の方向に働くTh17細胞を誘導すると、炎症を抑えるTreg細胞も同時に誘導されてくる。ただし、IL6はTreg細胞の分化を抑止するので、TGF β とIL6の組み合わせでは、Th17細胞の誘導が優位に起こる。ROR \cdot tはレチノイドレセプター関連核内レセプターファミリーの一員であり、TGF β とIL6によるTh17細胞の分化過程で特異的に誘導されるためTh17細胞の分化を決定づける転写因子であると考えられている。実際、ナイーブCD4T細胞においてROR \cdot tを過剰発現させるとTh17細胞への分化が促進される。さらに、TGF β はROR \cdot tとFoxp3の両方の発現を誘導できることもわかっている。最近の研究では、ROR \cdot t発現細胞の全てがTh17細胞であるわけではなく、半分以上のROR \cdot t発現細胞がTreg細胞として働くIL10産生性Foxp3陽性レギュラトリーT細胞であることが示された。これらの結果は、ROR \cdot tによる血液幹細胞からT細胞への分化誘導がより複雑な過程であることを示唆している。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえて、本研究では、ROR \cdot tのTh細胞分化における役割を明らかにするため、マウス血液幹細胞にROR \cdot tを導入し恒常的に過剰発現させ、同系マウスに骨髄移植して、ROR \cdot t過剰発現によるT細胞分化の変化をin vivoにて解析した。

3. 研究の方法

(1) マウス

アロタイプがLy5.1のC57BL/6を用いた。全てのマウスを用いた実験は、筑波大学の動物実験ガイドラインに従い、筑波大学動物実験審査委員会の承認を得て行った。

(2) DNAベクター

マウスROR \cdot tの全長cDNAをLy5.1マウス胸腺由来のcDNAライブラリーからRCRを用いてクローニングした。ROR \cdot tの全長cDNAをpCR2.1ベクターにサブクローニングし、さらにレトロウイルスベクターpGCDNsamにサブクローニングした。トランケートされ、生理活性を持たない神経成長因子レセプター(NFGR)cDNAをROR \cdot t cDNAの下流に接続した。(図1a)

図1a

(3) 細胞培養

Jurkat細胞は10%FCS添加のRPMI1640培地で培養した。ベクターを遺伝子導入した細胞はG418で選択した。

(4) 骨髄幹細胞への遺伝子導入

アロタイプLy5.1マウスから、c-kit陽性・リネージマーカー陰性の骨髄幹細胞(KL細胞)を採取した。さらにKL細胞に上記ROR \cdot tを組み込んだ発現ベクターを遺伝子導入した。ROR \cdot tベクターの導入は、NFGRに対するFACSにより確認した。

(5) Ly5.1マウスに対する骨髄移植

Ly5.1マウスに対し、5.5GyのX線照射を行い、上記ROR \cdot tベクターを遺伝子導入したKL細胞を 5×10^3 個/匹で尾静脈より骨髄移植した。

(6) 細胞内サイトカイン産生のFACS解析
脾臓細胞をそれぞれマグネット抗CD8、B220、Mac-1、Ter-119、Gr-1抗体で処理することによりCD4陽性細胞を得た。CD4陽性細胞は50ng/ml PMA + ionomycinで4時間処理した後FITC-抗CD4抗体とインキュベートした。さらに細胞は、BD Cytotfixにて固定した後、PE-抗IL-17抗体で染色した。一方、細胞内IL-5、IFN γ 、Foxp3の染色のため、細胞は固定後、それぞれのFITC抗体で染色し、FACS解析した。

(7) 人工的接触皮膚炎の導入

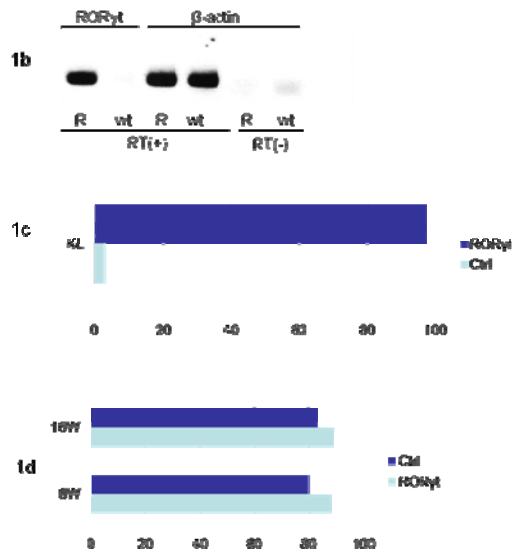
アセトンで希釈した0.5%DNFBを剃毛したマウス腹部に塗布し、当日、翌日にフットパッドにも局注した。5日目に0.3%DNCBを両耳介に塗布した。コントロールとしてDNCBを含まないアセトンを同様に塗布した。1日目と6日目に両耳介の厚さを電子ノギスにより測定し、反応の強さとした。

4. 研究成果

RT-PCRによりROR \cdot t cDNAを挿入したベクターは脾臓細胞に導入されていることが確認された(図1b)。KL細胞へのROR \cdot t遺伝子導入効率は95%に達した(図1c)。ROR \cdot tの骨髄幹細胞の増殖と分化に対する影響を解析するために、ROR \cdot tを導入した骨髄幹細胞を同系マウスに骨髄移植した。意外にもROR \cdot tを恒常的に発現している骨髄幹細胞は、骨髄移植の8週間および16週間でも高いドナーキメラリズムを維持していた

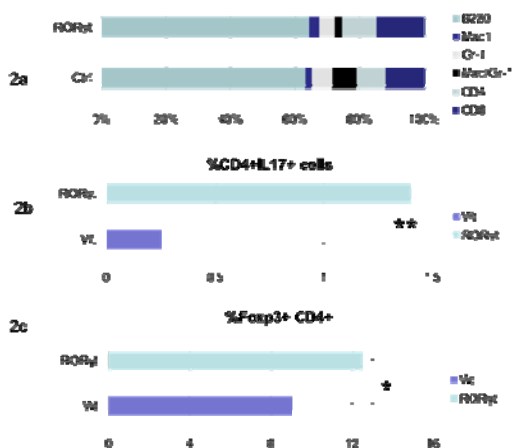
(図 1 d)。

図 1 b ~ d



また、ROR・t 骨髄幹細胞移植マウスでは、コントロールとほぼ同じ比率で B 細胞、T 細胞、顆粒球/マクロファージが存在していた (図 2 a) しかし、Th 細胞の内訳を解析すると、CD4 陽性 IL17 陽性の Th17 細胞と CD4 陽性 Foxp3 陽性の Treg 細胞はコントロールに比べて有意に ROR・t 骨髄幹細胞移植マウスで増加していた。(図 2 b、c)

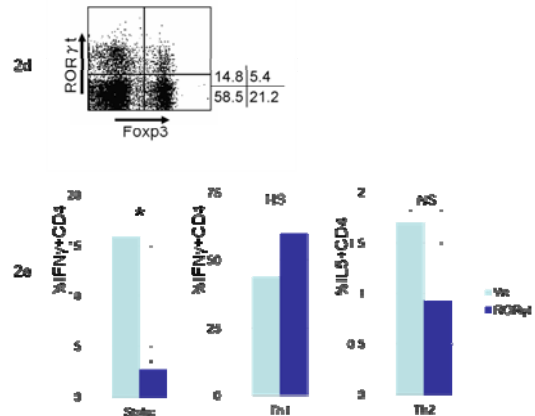
図 2 a ~ c



また、ROR・t 骨髄幹細胞移植マウスは 16 週間の観察期間中自己免疫疾患を発症しなかった。ROR・t 骨髄幹細胞移植マウスにおいて Th1、

Th2 の分化を解析した。ROR・t 骨髄幹細胞移植マウスでは CD4 陽性ナイーブ T 細胞で IFN・陽性 Th1 細胞への分化はコントロールマウスより少なかった (図 2 左)。IL12 刺激下での IFN・陽性 Th1 細胞への分化 (図 2 中央)、および IL4 存在下での IL5 陽性 Th2 細胞への分化はコントロールマウスと比較して統計学的有意差はなかった。

図 2 d ~ e

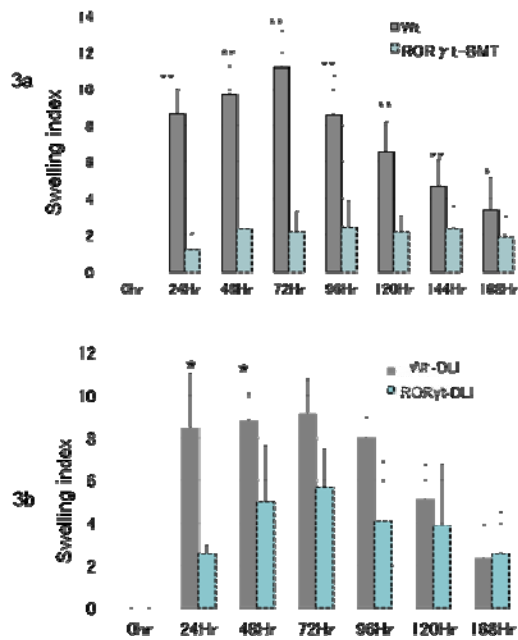


これらの結果は、ROR・t の血液幹細胞レベルでの強制発現は、Th17 細胞だけではなく Treg 細胞への分化も促進するが、Th1 細胞と Th2 細胞への分化には影響を与えないことを示唆している。

Foxp3 陽性細胞が Treg 細胞として機能しているかどうかを検証するために、ROR・tBMT マウスに DTH のモデルである接触性皮膚炎を惹起した。ハプテンである DNFB を剃毛した腹部とフットパッドに塗布して感作し、5 日後に DNFB を耳介にチャレンジした。コントロールマウスでは、72 時間後に耳介腫脹がピークとなり、接触性皮膚炎が惹起された。一方、ROR・tBMT マウスではほとんど耳介の腫脹は観察されなかった (図 3 a)。

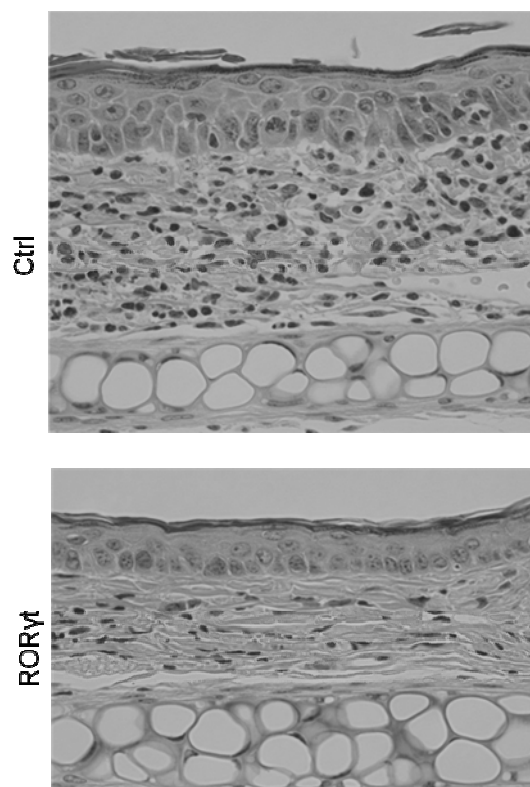
上記で観察された免疫抑制が、Treg 細胞のように他個体に移入できるかどうかを確認するために、レシピエントである B6 マウスはコントロールまたは ROR・tBMT マウスの CD4 陽性脾細胞に移入され、接触性皮膚炎を惹起した。その結果、ROR・tBMT マウス由来 CD4 陽性脾細胞は接触性皮膚炎を抑制した (図 3 b)。

図 3 a ~ b



ROR γ tBMT マウスにおける接触性皮膚炎の抑制を組織学的に確認された (図4)。

図4



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 17 件)

1. Fujisawa Y, Yanagisawa K, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Extension of a malignant tailgut cyst to a subcutaneous space in the buttock. Eur J Dermatol. 査読有 2010;20(6):788-91.
2. Nakamura Y, Ishitsuka Y, Nakamura Y, Xu X, Hori-Yamada E, Ito M, Onizawa S, Kawachi Y, Otsuka F. Modified gluteal-fold flap for the reconstruction of vulvovaginal defects. Int J Dermatol. 査読有 2010 ;49(10):1182-7.
3. Kawachi Y, Ikegami M, Takase T, Otsuka F. Chronically recurrent and disseminated tinea faciei/corporis--autoinoculation from asymptomatic tinea capitis carriage. Pediatr Dermatol. 査読有 2010 ;27(5):527-8.
4. Nakamura Y, Nakamura Y, Hori E, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Complete long-term response of angiosarcoma of the scalp with cervical lymph node metastases treated with a combination of weekly and monthly docetaxel. Br J Dermatol. 査読有 2010; 163(6):1357-8.
5. Fujisawa Y, Ito M, Nakamura Y, Furuta J, Ishii Y, Kawachi Y, Otsuka F. Perforated ischiogluteal bursitis mimicking a gluteal decubitus ulcer in patients with spinal cord injury: report of 2 cases. Arch Dermatol. 査読有 2010; 146(8):932-4.
6. Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Superimposed segmental dermatitis with chronic prurigo. Eur J Dermatol. 査読有 2009; 19(4): 337-340..
7. Fujisawa Y, Ishitsuka Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F.

- Metastatic squamous cell carcinoma of the buttock treated with chemoradiation using cisplatin and 5-fluorouracil. *J Am Acad Dermatol*. 査読有 2009; 60(2): 355-7.
8. Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, Kawachi Y, **Otsuka F**, Onodera M. The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. *Exp Dermatol*. 査読有 2009; 18(4): 396-403.
 9. Fujisawa Y, Ito S, Mori K, Kawachi Y, **Otsuka F**. Combined therapy of selective embolization followed by surgery in a case of giant arteriovenous malformation in the buttock. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 査読有 2009; 62(5): 127-8.
 10. Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, **Otsuka F**. Epidermal pseudocarcinomatous hyperplasia with underlying epidermal growth factor-producing cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 査読有 2009; 23(2): 181-3
 11. Nakamura Y, Nakamura Y, Hori E, Furuta J, Ishii Y, Takahashi T, Kawachi Y, **Otsuka F**. Tumor lysis syndrome after transcatheter arterial infusion of cisplatin and embolization therapy for liver metastases of melanoma. *Int J Dermatol*. 査読有 2009; 48(7): 763-7.
 12. Fujisawa Y, Furuta J, Kawachi Y, **Otsuka F**. Deep plantaris ulceration secondary to the topical treatment of wart with glutaraldehyde. *J Dermatol*. 査読有 2009; 36(11): 618-619.
 13. Kawachi Y, Xu X, Taguchi S, Sakurai H, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Furuta J, Takahashi T, Itoh K, Yamamoto M, Yamazaki F, **Otsuka F**: Attenuation of UVB-Induced Sunburn Reaction and Oxidative DNA Damage with No Alterations in UVB-induced Skin Carcinogenesis in *Nrf2* Gene-Deficient Mice. *J Invest Dermatol*, 査読有 2008; 128: 1773-1779
 14. Kawachi Y, Koike Y, Kano T, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, **Otsuka F**: Paraneoplastic dermatomyositis triggered and exacerbated by oral 5-fluorouracil administration. *Eur J Dermatol*, 査読有 2008; 18: 195-196
 15. Fujisawa Y, Takahashi T, Enomoto H, Nakamura Y, Kawachi Y, **Otsuka F**. A case of proximal-type epithelioid sarcoma which showed positive reactivity to fibroblast growth factor receptor2-IIIb isotype. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 査読有 2008; 22: 1372-1373
 16. Kawachi Y, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Takahashi T, **Otsuka F**. Epidermal pseudocarcinomatous hyperplasia with underlying epidermal growth factor-producing cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 査読有 2008; 23: 181-183
 17. Fujisawa Y, Nakamura Y, Takahashi T, Kawachi Y, **Otsuka F**. Penile preservation surgery in a case of extramammary Paget's disease involving the glans penis and distal urethra. *Dermatol Surg*. 査読有 2008; 34: 823-830.
 18. Nakamura Y, Kawachi Y, Furuta J, **Otsuka F**. Severe local skin reactions

to interferon beta-1b in multiple sclerosis - improvement by deep subcutaneous injection. Eur J Dermatol. 査読有 2008; 18: 579-582.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 藤男 (OTSUKA FUJIO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号 : 10092157

(2) 研究分担者

川内 康弘 (KAWACHI YASUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授

研究者番号 : 00272196

(3) 連携研究者

藤澤 康弘 (FUJISAWA YASUHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号 : 70550193