

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591336

研究課題名（和文） 皮膚線維芽細胞によるランゲルハンス細胞の機能調節

研究課題名（英文） Regulation of Langerhans cell function by fibroblasts

研究代表者

多田 弥生 (TADA YAYOI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00334409

研究成果の概要（和文）：死細胞より放出され、免疫系を活性化する danger signal のひとつ、monosodium urate crystal がランゲルハンス細胞の所属リンパ節への遊走を促進し、かつ、接触皮膚炎の反応を増強することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Molecules which are released from dead cells and activate immune systems are called danger signals. We found that one of such danger signals, monosodium urate crystal, induces Langerhans cell migration to the lymph node and augment contact hypersensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：樹状細胞, 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ランゲルハンス細胞(以下LCと略す)は表皮内に存在する抗原提示細胞であり、樹状細胞の範疇に属する。その機能は未だ完全には解明されていないが、これまでの研究では獲得免疫やアレルギーに重要であるとされている。定常状態で表皮内の基底層上層に未熟な状態で存在するLCは、病原体などを含めた外来抗原や皮膚に存在する自己抗原を様々な皮膚炎症の存在下に貪食し、表皮内から真皮内を通過し、リンパ管に入り、所属リンパ節に到着する。遊走中、皮膚の微小環境に存在する炎症細胞から分泌されるTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の刺激を受けて成熟したLCは、所属リンパ節内でNaïve T細胞に抗原提示する。その際、成熟したLC上の表面抗原や分泌サイトカイン

の刺激により、Naïve T細胞はTh1細胞、Th2細胞又はトレランスT細胞へ分化し、皮膚免疫反応の調節やトレランスの誘導に関与すると考えられている。

これまでLCについてなされてきた研究は主にin vitroで行われてきたものである。具体的には、純度10～20%のLCを様々なサイトカインやLCの表面抗原に対するリガンドで刺激し、LCの表面抗原、形態、分泌サイトカインの変化をみるといった研究である。このとき、LCの他には表皮ケラチノサイト(以下KCと略す)が実験系の中に多く混在しており、その影響を否定できなかった。

これに対し、我々はLCの表面に存在するMHC class IIに対する抗体を用いたpanning法により90%以上の純度でBirbeck顆粒を有する

LCを精製する技術を確立しており、これによって、例えばKCが多く産生することが知られているGM-CSFがLCのIL-12産生を抑制することを初めて報告することができた。それまで、LCが蛋白レベルでIL-12の産生を確認できなかったという報告や、産生しても微量である、という報告がほとんどであったことは、いかに混在するKCの影響がLCの研究において重要かということが指摘している。また、同様に真皮線維芽細胞が多く産生するTGF- $\beta$ がCD40 ligationとIFN- $\gamma$ 刺激下にLCのIL-12産生を促進することも報告できた。

この他、*in vitro*の研究では皮膚の抗原提示細胞から確立した樹状細胞のcell line (XS20など) を用いた研究も行われているが (J Immunol;1995;154:2697-705)、本来LCが発現しないCD14を発現していたり、未熟なLCに特異的なBirbeck顆粒の有無についての記載がないなど、LCとの相違点もあり、これらの研究結果がそのままLCに適応できるかどうかはそれぞれ、再検討する必要があると考える。こうした*in vitro*での研究とは別に、近年LCに特異的な表面抗原としてランゲリンが報告されるに至り、ランゲリン遺伝子の調節下にEGFPの発現遺伝子をknock inしたり、さらにこのEGFPにジフテリア毒素に対するreceptorを融合することで、ランゲリン蛋白発現細胞の除去が可能になるなど、*in vivo*での研究が急速に進んできた。こうした研究はこれまで不明であったランゲルハンス細胞が定常状態、または皮膚の炎症の存在下でどういった動きをしているのかを時間を追ってダイナミックにみることを可能にし、さらに、抗原特異的T細胞の誘導へのランゲルハンス細胞の意味づけを可能にした (Immunity;2005;22:643-54, Immunity;2005;23:611-20, J Cell Biol;2005;169:569-76)。これは画期的なことではあるが、一方で、LCが遊走中に接触する様々な細胞との相互作用がこうした*in vivo*での結果にどのような影響を及ぼしているかについては不明のままである。

これまで、LCとLCが遊走中に接触する皮膚線維芽細胞 (以下Fbと略す) との相互作用についての詳細な検討はほとんどなく、あっても、Fbとの共培養においてLCとして用いられているのは低純度のLC (6-20%)、LC類似のcell line、臍帯血中のCD34陽性前駆細胞から誘導した皮膚樹状細胞様細胞などである (J Immunol;1995;154:5128-35, Eur J Immunol;1994;24:2254-7, J Invest Dermatol; 2002;118:450-60)。細胞間相互作用において、各々の分泌タンパク質または膜タンパク質の持つ意味を明らかにするためにはそれぞれ高純度に精製された細胞の精製が不可欠であり、それが困難であることがこうした研究の障害となってきたと考える。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は高純度に精製したLCとFbを用いることにより、LCからFbへの影響とFbからLCへの影響を明らかにし、LCの真皮リンパ管内への遊走の過程で、LCの成熟を調節する、Fb由来の新規のタンパク質を発見することであった。

## 3. 研究の方法

BALB/c マウス皮膚より I-A 抗原を用いた panning 法によって LC を単離し、新生児皮膚の真皮より採取した線維芽細胞と共培養し、LC の細胞表面の共刺激分子の変化をみた。

## 4. 研究成果

BALB/c マウス皮膚より I-A 抗原を用いた panning 法によって LC を単離し、新生児皮膚の真皮より採取した線維芽細胞と共培養し、LC の細胞表面の共刺激分子の変化をみた。結果、線維芽細胞の viability に結果が左右される事がわかった。そこで、死細胞より放出され、免疫系を活性化する danger signal の影響もあると思われ、その影響をまず、検討する事とした。死んだ線維芽細胞より放出され、免疫系を活性化する danger signal の一つに、monosodium urate crystal (MSU) が報告されている (Nature; 2003; 425:516-521) ので、今回は MSU に注目した。

ここで、少し danger signal と MSU について説明する。生体の初期免疫は外来微生物を検知し、それに反応し、最終的にはそれを排除する目的で起こると考えられてきた。外来微生物に由来する初期免疫を惹起する構造は pathogen-associated molecular patterns (PAMP) とされ、LPS, ペプチドグリカン、細菌性リポ蛋白、フラゲリン、核酸などが知られている。PAMP に反応する宿主側のセンサーとしては pattern-recognition molecules (PRMs) があり、PRMs は外来微生物の監視システムとして重要とされている。細胞表面に存在する PRMs のひとつとしては Toll like receptor (TLR) があり、これまで特に詳細に検討されてきた (Cell 124:783-801, 2006)。一方、近年、細胞内に存在する PRMs として nucleotide-binding domain-, leucine-rich repeat (LRR)-containing receptor (NLR) family の存在が明らかになってきた。哺乳類の NLR はこれまで 20 種類以上みついている。こうした NLR のうち、NACHT (Naip-, CIITA, HET-E, telomerase-associated protein 1)-LRR (leucine-rich repeat)-PYD (pyrin domain) の構造からなる NALP family はヒトでは 14 種類あることがわかっている。この中で、NALP3 は ASC, CARDINAL とともに蛋白複合体を形成し、caspase-1 を活性化し、IL-1 $\beta$  や IL-18 を介して全身的な炎症を惹起することがわかっている。さらに、この NALP3 は、

細胞が死んだり障害されたりした場合に細胞内から放出されるATPやMSUなどに反応して炎症を起こすことがわかってきた。このような宿主側の細胞破壊に由来し炎症を惹起する物質はPAMPに対し、danger-associated molecular patterns (DAMP)と呼ばれ、DAMPによって誘導される宿主側の反応はdanger signalと呼ばれるようになった。ATPや尿酸結晶などのDAMPが宿主側の細胞によって認識されるとNALP3はASC, CARDINALとの蛋白複合体であるところのNALP3 inflammasomeを形成する。NALP3 inflammasomeはpro-caspase 1のmaturationを促進し、活性型のcaspase 1とし、caspase 1はpro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18をprocessingし、成熟型のIL-1 $\beta$ 、IL-18を生成し、これらのサイトカインは樹状細胞の成熟や活性化をきたし、血管内皮細胞や線維芽細胞からのIL-6やIL-8の産生を誘導し、さらにはそのIL-8により好中球が遊走するなどして、炎症が惹起されることがわかってきた (Immunity 27:549-59, 2007; Nat Immunol 7: 1250-7, 2006; J Clin Invest 116:2262-71, 2006)。ATPもそのようなDAMPのうちのひとつである (Nature 440:228-32, 2006)。LPSなどのTLRを介したシグナルがあらかじめ細胞に入ると、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18の産生が誘導される。そこにATPからの、そのreceptorであるP2X<sub>7</sub>を介したシグナルが入ると、細胞内から細胞外へカリウムが流出し、細胞内カリウム濃度が低下することにより、NALP3 inflammasomeが形成され、caspase-1の活性化、成熟型IL-1 $\beta$ 、IL-18の生成、炎症の惹起へとつながっていくと考えられている。MSUもATPと同様にDAMPのうちのひとつであるが、その細胞における細胞膜上の刺激受容体はいまだ発見されていないが、細胞膜コレステロール膜における食作用がNALP3 inflammasomeの形成・caspase-1の活性化にいたるメカニズムに関与することが報告されている。

そこで、MSUがLCに及ぼす影響を検討したところ、下記の結果をえた。

- 1) MSUが作用発現に必要な分子群 (NALP3 inflammasomeの形成とcaspase 1)をLCが有していることを確認した。
- 2) MSUがLCの成熟には影響しないが、IL-18分泌を促進することがわかった。
- 3) MSU処理したLCのリンパ節への遊走が促進されることも確認できた。
- 4) MSU処理したLCがIL-18依存性にリンパ節へ遊走促進することをIL-18 KOマウスから採取したLCではMSU処理しても、リンパ節への遊走が促進されないという結果から確認した。

さらに、これらの結果の臨床的意味づけをするため、MSUをマウス表皮に感作物質とともに

に外用したところ、皮膚接触過敏反応が増強された。これはMSUにより、所属リンパ節へのLCの遊走が促進された結果、リンパ節で提示された抗原量が増加したことを考えれば矛盾しない結果であった。以上から、MSUは皮膚免疫反応の増強に関与する可能性が指摘された。

#### 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6件、全て査読有り)

- 1) Takekoshi T, Tada Y, Watanabe T, Sugaya M, Hoashi T, Komine M, Kawashima T, Shimizu T, Hau CS, Asahina A, Yokomizo T, Sato S, Tamaki K. Identification of a novel marker for dendritic cell maturation, mouse transmembrane protein 123. *J Biol Chem*. 285:31876-84, 2010.
- 2) Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, Miyagaki T, Kai H, Saeki H, Shirakata Y, Watanabe S, Tamaki K, Sato S. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 130:1034-9, 2010.
- 3) Kronenberg K, Brosch S, Butsch F, Tada Y, Shibagaki N, Udey MC, von Stebut E. Vaccination with TAT-antigen fusion protein induces protective, CD8(+) T cell-mediated immunity against *Leishmania major*. *J Invest Dermatol*. 130:2602-10, 2010.
- 4) Tada Y, Kanda N, Ohnishi T, Watanabe S. Atypical cutaneous sarcoidosis with diffuse, indurated erythema. *Eur J Dermatol*. 19:639, 2009.
- 5) Tada Y, Kanda N, Haratake A, Tobiishi M, Uchiwa H, Watanabe S. Novel effects of diosgenin on skin aging. *Steroids* 74:504-511, 2009.
- 6) Kanda N, Shibata S, Tada Y, Nashiro K, Tamaki K, Watanabe S. Prolactin enhances basal and IL-17-induced CCL20 production by human keratinocytes. *Eur J Immunol*. 39:996-1006, 2009.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田 弥生 (TADA YAYOI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00334409

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし