

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790801
 研究課題名（和文） 皮膚樹状細胞の免疫制御における新しい役割の解明に関する研究
 研究課題名（英文） The investigation for a new role of cutaneous dendritic cells in an immune regulation
 研究代表者
 福永 淳 (FUKUNAGA ATSUSHI)
 神戸大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：10467649

研究成果の概要（和文）：皮膚癌発症の危険因子であり、臨床的に炎症性皮膚疾患治療に使用されている紫外線(UVB)の皮膚免疫抑制に与える影響をマウスで検討した。マウスにおいてはUVBによる免疫抑制は皮膚樹状細胞の1つのサブタイプである表皮ランゲルハンス細胞がリンパ節へ遊走することにより生じていることを明らかにした。さらに真皮に存在する皮膚樹状細胞である真皮樹状細胞が人の接触皮膚炎に相当するマウス接触過敏反応の誘導に必須の役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The immune suppressive effect of UVB, which is a risk factor of skin cancer onset and is used as a remedy of skin inflammatory diseases, was studied. UVB-induced immune suppression was induced by the migration of epidermal Langerhans cells into lymph nodes. In addition, dermal dendritic cells located in the dermis were essential to induce the contact hypersensitivity response corresponding human contact dermatitis.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚樹状細胞、表皮ランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞、接触過敏反応、紫外線免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

表皮ランゲルハンス細胞(LC)はこれまで皮膚免疫誘導の中心的役割を果たすと考えられてきた。しかし最近の研究からLCが免疫誘導ではなく逆に免疫制御(抑制)に働く可

能性が示唆されている。本研究の目的は皮膚樹状細胞(LC、真皮樹状細胞)の免疫誘導・制御における新しい働きについて検討することである。

(1) ① LCは表皮に分布する樹状細胞(DC)

で、外界からの免疫応答に重要な役割を果たすと考えられている。古典的には LC は接触過敏反応 (CHS) のような皮膚の免疫誘導に必須であると考えられてきた。近年膜貫通型のレクチンであるランゲリンが LC に特異的に発現していることが発見され、この分子を用いて LC 欠損マウスが3つの研究グループにより作成された。このマウスを用いた CHS の検討では増強した研究グループからは LC が免疫抑制性の特徴を有している可能性が示唆されている。これは LC が CHS のような Th1 型の皮膚免疫誘導において必須と考えられてきた過去の説とは相対する仮説で興味深しかし LC が免疫誘導性、免疫制御性のどちらの働きを担うかは論争上にあるといえる。

② 太陽光中の紫外線 (UV) が皮膚癌発症の第一の危険因子であることは既知の事実である (Boring C.C. et al. Cancer J Clin 42, 19-38, 1992) 上に、UV 照射が Th2 反応を誘導し免疫抑制因子として働くことが知られている。また UV 照射療法は Th1 型の炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬治療に特に有用である。UV による免疫抑制が UV 照射療法の有用性に関わっていると考えられているが、皮膚 DC がどのようにその作用機序には関与しているかは不明である。

(2) 真皮樹状細胞はその名の通り真皮に存在する樹状細胞である。LC がランゲリンという特異的マーカーを有するのは対照的に、真皮樹状細胞は特異的マーカーを有さず分離するのが困難であるため皮膚免疫研究において注目されてこなかった。最近になり LC 欠損マウスにおいて CHS や gene-gun 療法による経皮的免疫誘導が生じることが報告されており (Stoecklinger A. et al. J Immunol 179, 886-893, 2007)、応募者は LC よりむしろ真皮樹状細胞が Th1 型の経皮的免疫誘導において主要な役割を果たすと仮説を立てている。

2. 研究の目的

(1) マウス UV 免疫抑制モデルにおける LC の免疫抑制性特性の検討

UVB による局所免疫抑制モデルを利用し、UV 照射後ハプテンで経時的に感作を行い、CHS の抑制を観察する。この CHS の抑制と UV 照射にてリンパ節に遊走した LC 数との相関を調べる。UV 照射にてリンパ節へと遊走した LC の成熟、同細胞の *in vitro* での T 細胞増殖に与える影響を調べる。さらに遊走した LC を未処置のマウスに転嫁し、*in vivo* での転嫁後のマウスでの CHS を調べる。LC 欠損マウスにおける UV 免疫抑制を観察する。UV 照射にてリンパ節へと遊走した LC のリンパ節内での局在を調べ、他のリンパ球との相互関係を調べる。

(2) CHS モデルにおける真皮樹状細胞と LC

の免疫誘導能の比較検討

CHS モデルを利用し、ハプテン塗布後にリンパ節へと遊走した真皮樹状細胞や LC の *in vitro* での T 細胞増殖に与える影響を調べる。さらにハプテンにより遊走した真皮樹状細胞と LC を未処置のマウスに転嫁し、同じハプテンで CHS を観察し、どちらの細胞が *in vivo* で CHS を有効に誘導出来るかを調べる。

(3) 自然発症皮膚炎モデルにおける皮膚 DC を用いた治療、発症予防効果の検討

自然発症皮膚炎モデル NC/Nga および DS-Nh マウスを用いて、UV もしくはハプテンにてリンパ節へと遊走した皮膚 DC (LC もしくは真皮樹状細胞) を *in vivo* に投与し、発症の予防もしくは発症した病変を治療できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス UV 免疫抑制モデルにおける LC の免疫抑制性特性の検討

マウスへの broad-band UVB の照射後の表皮、所属リンパ節における LC の分布を経時的に観察する。UV にてリンパ節に遊走した LC の成熟について I-A (MHC-class II), CD80, CD86 などの分子の発現に着目して調べる。UV 照射後にリンパ節へと遊走した LC と真皮樹状細胞をそれぞれ回収し、*in vitro* にて CFSE でラベルした OT-II マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と Ovalbumin323-339 ペプチドで共培養することにより CD4 陽性 T 細胞の増殖を観察する。UV 照射後にリンパ節へと遊走した LC と真皮樹状細胞をそれぞれ回収し、未処理のマウスに転嫁し、数日後に転嫁した部位と同部位にハプテンによる感作を行い CHS を観察する。この実験により *in vivo* でのこれら2種類の細胞の免疫反応に与える影響を観察できる。さらに LC 欠損マウスにおいて UV 免疫抑制が生じるかを観察する。リンパ節の凍結切片を作製し、リンパ節内での LC の局在を明らかにする。その後ランゲリンとその他の細胞性マーカーで多重染色を行い UV 照射後の LC と他の細胞の相互関係を調べる。

(2) CHS モデルにおける真皮樹状細胞と LC の免疫誘導能の比較検討

FITC により遊走させた真皮樹状細胞 (ランゲリン陰性 FITC 陽性 CD11c 陽性細胞) と LC (ランゲリン陽性 FITC 陽性 CD11c 陽性細胞) を回収し、*in vitro* にて CFSE でラベルした OT-II マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と Ovalbumin323-339 ペプチドで共培養することにより CD4 陽性 T 細胞の増殖を観察する。この実験系がうまく働かない時は異なるハプテンである DNFB で遊走させた真皮樹状細胞と LC をリンパ節から回収し、DNBS 存在下

で未感作マウスから回収した T 細胞と共培養し細胞増殖を観察する。FITC によりリンパ節へと遊走した真皮樹状細胞と LC を回収し、未処置のマウスに転嫁し、FITC で耳介腫脹反応を惹起することで *in vivo* でのそれぞれの細胞の抗原提示細胞としての機能を観察する

(3) 自然発症皮膚炎モデルにおける皮膚 DC を用いた治療、発症予防効果の検討
UV 療法が臨床的に有効であるアトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎を発症する自然発症皮膚炎モデル NC/Nga および DS-Nh マウスを用いて、その発症前と発症後に UVB 照射を行ない、その効果を判定する。さらに UV にて遊走した LC もしくは真皮樹状細胞を野性型マウスから回収し、NC/Nga および DS-Nh マウスに移入することで発症予防や発症後の治療に有効であるかを検討する。

4. 研究成果

(1) マウス UV 免疫抑制モデルにおける LC の免疫抑制性特性の検討
マウス紫外線照射免疫抑制モデルにおいて表皮ランゲルハンス細胞の免疫抑制性特性の検討を行った。UVB を照射後表皮ランゲルハンス細胞は経時的に減少し、所属リンパ節では経時的に増加した。同時に接触過敏反応はランゲルハンス細胞の所属リンパ節での増加と相関して経時的に抑制された。そのため紫外線照射後のリンパ節から表皮ランゲルハンス細胞と真皮樹状細胞を回収し未処理のマウスに転嫁したところ表皮ランゲルハンス細胞を転嫁したマウスでのみで接触過敏反応が減弱した。ランゲリン-DTR-EGFP マウスを入手し、一時的にランゲルハンス細胞欠損状態を作製した後に Broadband UVB を照射しその後接触過敏反応を観察したところ、表皮ランゲルハンス細胞が欠損したマウスでは接触過敏反応の抑制が生じないことが観察された。これらの観察より紫外線照射後においては真皮樹状細胞ではなく表皮ランゲルハンス細胞が免疫制御を効率的に誘導できる細胞として働く事が示唆された。

(2) CHS モデルにおける真皮樹状細胞と LC の免疫誘導能の比較検討
FITC は接触過敏反応を誘導できるハプテンとしての側面と蛍光色素として細胞の動態を観察するのに役立つ側面を有する。この FITC をマウスに塗布し所属リンパ節へと遊走した真皮樹状細胞とランゲルハンス細胞の抗原提示細胞としての役割を OVA ペプチドと OT-II マウス CD4 陽性 T 細胞との共培養で観察した。ランゲルハンス細胞と比較して真

皮樹状細胞は有為に CD4 陽性 T 細胞の増殖を促した。さらに PAF 欠損マウスではハプテン塗布後のランゲルハンス細胞の遊走が減弱する一方真皮樹状細胞の遊走は正常であること、このマウスでの接触過敏反応が正常であることを観察した。以上の結果より接触過敏反応の誘導においてはランゲルハンス細胞よりも真皮樹状細胞が必須の役割を果たすことが証明できた。

(3) 自然発症皮膚炎モデルにおける皮膚 DC を用いた治療、発症予防効果の検討
この研究内容に関しては現在 NC/Nga マウスを入手し、紫外線照射がその皮膚炎誘導モデルを抑制できるか検討を行なっている。

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 2 件)

① Fukunaga A, Horikawa T, Ogura K, Taguchi K, Xijun Y, Funasaka Y, Takeda M, Nakamura H, Yodoi J, Nishigori C. Thioredoxin Suppresses the Contact Hypersensitivity Response by Inhibiting Leukocyte Recruitment during the Elicitation Phase. *Antioxid Redox Signal*. 2009;6: 1227-1235. 査読有り

② Fukunaga A, Khaskhely NM, Sreevidya CS, Byrne SN, Ullrich SE. Dermal dendritic cells, and not langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J Immunol*. 2008;180:3057-3064. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 福永 淳、接触皮膚炎を制御する 2 つの皮膚樹状細胞サブセット、第 39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2009 年 11 月 5 日～8 日 産業医科大学

② Atsushi Fukunaga, Tatsuya Horikawa, Kanako Ogura, Kumiko Taguchi, Xijun Yu, Yoko Funasaka, Masafumi Takeda, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Chikako Nishigori Thioredoxin Suppresses the Contact Hypersensitivity Response by Inhibiting Leukocyte Recruitment during the Elicitation Phase.

日本研究皮膚科学会第 34 回年次学術大会・総会 2009 年 12 月 4 日～6 日 JAL リゾートシーホークホテル福岡

③ Ono R, Dien S, Masaki T, Fukunaga A,
Nishigori C, Yodoi J
DNA damage and repair : Suppressive effect
of administration of human recombinant
thioredoxin on inflammation and apoptosis
of murine skin induced by ultraviolet B
irradiation
15th International Congress on
Photobiology 2009, 6, 18~23 Germany

④ 福永淳、アトピー性皮膚炎と紫外線療法
第 108 回日本皮膚科学会総会 2009 年 4 月
24 日~26 日 福岡国際会議場

⑤ Atsushi Fukunaga, Noor M. Khaskhley,
Coimbatore S, Sreevidya, Stephen E.
Ullrich.
Langerhans cells serve as
immunoregulatory cells by activating NKT
cells.
International Investigative Dermatology
2008 2008, 5, 14~17 国立京都国際会館

⑥ Atsushi Fukunaga, Noor M. Khaskhley,
Coimbatore S. Sreevidya, Stephen E.
Ullrich
Langerin expressing skin dendritic cells
serve as immunoregulatory cells by
activating NKT cells
The 10th International Symposium on
Dendritic Cells 2008, 10, 1~5 神戸

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 淳 (FUKUNAGA ATSUSHI)
神戸大学大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 10467649