

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860369

研究課題名(和文) TSLP応答性樹状細胞が表皮の性状変化に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of TSLP-responsive dendritic cells on the allergic reaction in the skin

研究代表者

大森 深雪 (Omori-Miyake, Miyuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30462667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の病変表皮で高発現するサイトカインTSLPに应答する皮膚樹状細胞サブセットの同定を行い、ヘルパーT(Th)細胞の機能分化における役割、TSLPの発現により産生されたTh細胞由来サイトカインが表皮の性状変化におよぼす影響について検討した。成果として、TSLPに应答する樹状細胞サブセットは少なくとも5集団存在する可能性が示唆され、一部はTh2サイトカインを産生するTh細胞への分化を促進する作用を持つことが明らかになった。また、Th2サイトカインの産生は、表皮ケラチノサイトでいくつかの転写因子の発現の誘導や活性化をもたらすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have been identifying subsets of dendritic cells that were capable of migrating into skin-draining lymph nodes from the skin where a cytokine thymic stromal lymphopoietin, TSLP, was expressed. The results indicated that at least five subsets of TSLP-responsive dendritic cells could potentially exist. The co-culture between TSLP-responsive subsets of dendritic cells and TSLP-receptor deficient naive helper T cells resulted in the finding that one subset of dendritic cells could prime helper T cells into Th2 cytokine-producing Th2 cells. The cytokines produced by these helper T cells could induce the expressions and/or activation of transcription factors in epidermal keratinocytes, the events that may be associated with disruption of homeostasis of epidermis of atopic dermatitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー 樹状細胞 表皮ケラチノサイト

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎などのアレルギー疾患は、Th2 サイトカインの産生亢進を共通の特徴とする。なかでも、アトピー性皮膚炎では乾燥と掻痒を伴う皮膚病変を認めるが、表皮ではその構造や性状がTh2 サイトカインによって変化することが明らかになりつつある。アトピー性皮膚炎の病態形成には、様々な免疫細胞の関与が報告されている。しかし、皮膚に暴露された抗原を樹状細胞がいかに認識し、所属リンパ節へと移動してTh2 サイトカインを産生するヘルパーT (Th2) 細胞への機能分化を誘導するかについては不明な点が多い。皮膚には複数種の樹状細胞サブセットが存在する。皮膚の樹状細胞サブセットの機能に関してはマウスの実験モデルを用いて明らかにされつつあるが、統一された分類のストラテジーはなく研究グループによって様々である。

アレルギー疾患の局所で高発現を呈するサイトカインのひとつとして、TSLP が知られている。アトピー性皮膚炎患者の病変表皮ではTSLP が高発現し、TSLP を表皮で発現させた遺伝子改変マウスにおいてはTh2 サイトカインの産生亢進を伴う皮膚炎が起こる。TSLP の標的細胞として樹状細胞が既知であることから、本研究では、“TSLP 応答性の特定の皮膚由来樹状細胞サブセットが皮膚所属リンパ節へと移動して、Th2 サイトカイン産生細胞の集積を誘導する”という仮説を立て研究を行った。実際、本研究申請当初に行った予備実験では、表皮および真皮に存在する樹状細胞の表面マーカーを発現する樹状細胞が、TSLP の発現と共に皮膚所属リンパ節へ集積することが確認された。しかし、TSLP 応答性の樹状細胞サブセットがどのような表面マーカーにより分類可能で、どのサブセットがTh2 サイトカインの産生亢進をもたらすかについては未知であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) アレルギーの増悪因子であるサイトカイン TSLP に応答してリンパ節へと移動する樹状細胞サブセットの同定と作用機序、(2) TSLP 応答性樹状細胞によって誘導されるTh細胞の機能分化、(3) Th細胞由来サイトカインによってもたらされる表皮ケラチノサイトの性状変化について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

目的(1)については、TSLP を表皮で高発現する遺伝子改変マウス(K5-TSLP Tg マウス)を用いて、TSLP 発現以降の皮膚由来樹状細胞サブセットの経時的分布解析を行った。また、野生型マウスおよびTSLP 受容体欠損マウスにタンパク抗原投与を行い、TSLP 受容体依存的に皮膚所属リンパ節へと移動した樹状細胞サブセットの同定、野生型マウ

スおよびTSLP 受容体欠損マウスへの蛍光ハプテン塗布後、TSLP 受容体依存的に皮膚所属リンパ節へと移動した樹状細胞サブセットの同定をフローサイトメトリーにより行った。

目的(2)については、TSLP 応答性の樹状細胞と、特定のタンパク抗原特異的なT細胞受容体を発現したTSLP 受容体欠損ナイーブTh細胞をそれぞれ磁気分離装置およびセルソーターを用いて純化し、両者をタンパク抗原の存在下で一定期間共培養した。抗原特異的なTh細胞の機能分化誘導能は、細胞増殖とサイトカイン産生により評価した。

目的(3)については、TSLP の高発現により産生されるTh細胞由来サイトカインのうち、IL-4 およびIL-13 が惹起する表皮ケラチノサイトの性状変化に着目し、プロテオミクスによるIL-4あるいはIL-13 応答性のシグナル分子の同定と、IL-4 およびIL-13 共通の標的転写因子と会合するシグナル分子の同定を試みた。また、同定した分子について、

siRNA によるノックダウンを表皮ケラチノサイトで行い、IL-4 およびIL-13 によっておこる表皮ケラチノサイトの性状変化との関連性を検証した。性状変化の指標としては、先行研究の成果として2014年に出版した*KRT1* 遺伝子および*KRT10* 遺伝子を対象とした(M. Omori-Miyake et al.; *J Invest Dermatol*)。さらに、IL-4 およびIL-13 共通の標的転写因子が直接的に*KRT1* 遺伝子および*KRT10* 遺伝子の発現を調節している可能性を検討するために、*in silico* 解析による発現調節部位候補の検索とクロマチン免疫沈降を行った。

### 4. 研究成果

(1) K5-TSLP Tg マウスではドキシサイクリン投与によりTSLP の発現を誘導できるが、2週間以上のドキシサイクリン投与を行うと血中にTSLP が循環してしまう。一方、皮膚に常在する樹状細胞サブセットは、投与する抗原の種類やサブセットによりリンパ節への移動のタイミングが様々であることが報告されている。本研究では、4、7、10日間のドキシサイクリン投与を検討し、最終的に7日間のドキシサイクリン投与を行ったK5-TSLP Tg マウスを用いて、フローサイトメトリーによる樹状細胞サブセットの存在頻度をコントロールマウスと比較することとした。その結果、TSLP の表皮での発現に伴って少なくとも5つの樹状細胞サブセットが皮膚所属リンパ節に集積することが明らかになった。また、蛍光標識したタンパク抗原の皮下投与後に蛍光を発する樹状細胞を皮膚所属リンパ節で解析したところ、少なくとも2つのサブセットがTSLP 受容体依存的に増加していることが明らかとなった。

蛍光ハプテン塗布後に蛍光を発する樹状細胞を皮膚所属リンパ節で解析したところ、少なくとも2つのサブセットがTSLP 受容体

依存的に増加していることが明らかとなった。また、本研究で分類した樹状細胞サブセットには少なくとも5色以上の多重染色が必要であることがスペックの異なるフローサイトメーターを用いた解析により明らかになった。

(2) 解析に用いた皮膚所属リンパ節の TSLP 応答性樹状細胞サブセットの頻度は1%未満と低いいため、磁気分離装置により樹状細胞全体(約3%の存在頻度)をエンリッチした後、セルソーターで純化することとした。樹状細胞サブセットを効率的に分取する方策として、ドキシサイクリン投与した K5-TSLP Tg マウスを用いることとした。共培養に供した集団はいずれも抗原提示に必要な MHC クラス II を比較的高く発現しているにも関わらず、一部のサブセットでのみ Th 細胞の増殖と培養上清中へのサイトカイン産生を認めた。サイトカイン産生の定量はマルチプレックスキットを用いて行い、Th 細胞に関連する13項目(IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN-gamma, TNF-alpha)を検討したが、検討した集団では、Th2 細胞に関連する IL-4, IL-13, TNF-alpha および Th1 細胞に関連する IFN-gamma の発現を認めた。一方、Th17 細胞および Th22 細胞に関連するサイトカイン産生は検出できなかった。

(3) 表皮における TSLP がもたらした Th2 サイトカイン産生細胞が皮膚へ浸潤した際に担いする役割として、表皮ケラチノサイトの増殖・分化・細胞死について検討する予定であったが、先行研究において、Th2 細胞由来サイトカインによる表皮ケラチノサイトの構造分子の発現低下と細胞間連携の脆弱化という作用が見出されたことから、分化途上で発現する構造分子 Keratin-1 および Keratin-10 に特に着目して、検討することとした。まず、Th2 サイトカインである IL-4 あるいは IL-13 により発現が増加するシグナル分子の探索を行った。サイトカインで刺激した表皮ケラチノサイトからタンパク質を抽出し、2次元電気泳動により分離した。無刺激な表皮ケラチノサイトから抽出したタンパク質の泳動パターンと重ねることにより、IL-4 あるいは IL-13 が発現を増加させるタンパク質断片をゲルから切り出し nanoLC-MS/MS により同定した。マスコットサーチにより候補となったタンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロットで発現を確認した結果、SerpineB3 であることが判明した。先行研究において、IL-4 あるいは IL-13 による Keratin-1 および Keratin-10 の発現低下は、IL-4 および IL-13 受容体シグナルの下流に位置する転写因子 STAT6 依存的に起こることが明らかになった。よって、STAT6 と会合するシグナル分子の探索を続けて行った。IL-4 で一定時間刺激した表皮ケラチノサイトから抽出したタンパク質を、STAT6 に対する抗体を用いて免疫沈降し、1次元電気

泳動したバンドを切り取り nanoLC-MS/MS により同定した。その結果、二つのタンパク質が同定され、確かに STAT6 と会合することが確認された。siRNA により SerpinB3 の発現をノックダウンして、KRT1 遺伝子および KRT10 遺伝子の IL-4 による発現低下における関連性を検討した。その結果、SerpineB3 は関連していないことが示唆された。の同定で候補となったタンパク質はいずれも表皮ケラチノサイトで恒常的に発現するタンパク質であったことから、siRNA によるノックダウンは未試行である。転写因子 STAT6 は DNA 結合部位を含むタンパク質であり、リン酸化すると核内移行することが知られていることから、核内移行した STAT6 が DNA に結合し KRT1 遺伝子および KRT10 遺伝子の発現を直接的に制御する可能性を検討するために、*in silico* 解析を行った。重要なゲノム情報は種を超えて保存されていることが多いため、様々な進化段階の動物から *Krt1* 遺伝子および *Krt10* 遺伝子周辺のゲノム情報を入手し、動物間で比較したところ、複数の保存されているゲノム領域が見出された。の結果を参考にしつつ、報告されている何通りかの STAT6 の結合モチーフから KRT1 遺伝子および KRT10 遺伝子周辺に位置する DNA 結合部位の候補を絞り込み、STAT6 に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降により結合の可能性を検討した。その結果、結合の可能性のある箇所がいくつか見出された。

研究設備環境の都合で期間内に検討できなかった項目が一部あり、現在なお進行中の研究もあるが、一連の研究を通して、本研究の仮説とした“Th2 細胞分化を誘導する TSLP 応答性樹状細胞サブセット”は確かに存在するであろうことが示唆された。TSLP 応答性樹状細胞サブセットの Th 細胞への作用機序が明らかになれば、Th2 サイトカインの産生亢進を伴うアレルギー反応を制御できる可能性が生まれる。また、皮膚に集積した Th2 サイトカイン産生細胞によって起こる表皮の構造的脆弱化の機構が明らかになれば、破綻した局所の細胞の性状を正常化できさらなる外来抗原の侵入を防ぐことができるかもしれない。本研究の各項目を収束させるべく、今後も研究を進行する予定である。

## 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)

[学会発表](計3件)

大森深雪, 三宅力, 戸塚亜美, 常深祐一郎, 川島眞, 八木淳二. (標題) Possible underlying molecular interactions that regulate the attenuation of keratin-1 and keratin-10 proteins by IL-4 and IL-13 in human atopic dermatitis: *in silico* analysis of KRT1 and KRT10 genes. 第38

回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生  
化学会大会合同学会. 2015 年 12 月 1 ~  
4 日 (兵庫県神戸市)

大森 深雪, 八木 淳二. (標題) An  
attenuated expression of keratin-10 by  
IL-4 in epidermal keratinocytes: in silico  
analysis and in vitro assay of KRT10  
genomic regions. 第 44 回日本免疫学会学  
術集会. 2015 年 11 月 18 ~ 20 日 (北  
海道札幌市)

Miyuki Omori-Miyake, Hiroshi Watarai,  
Steven F. Ziegler, Junji Yagi. (標題) The  
quest for a new gating strategy: an  
identification of thymic stromal  
lymphopoietin-responsive subsets of  
dendritic cells in mice. 14<sup>th</sup> International  
Workshop on Langerhans Cells. 2015 年  
11 月 5 ~ 8 日 (京都府京都市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大森 深雪 (OMORI-MIYAKE MIYUKI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30462667