

論文の内容の要旨

論文題目 CCL27 トランスジェニックマウスの解析

指導教員 玉置邦彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 鑑慎司

皮膚は人体の最外層を形成する臓器である。外界との境界であるバリアとして機能するとともに、外界との間で免疫応答をする器官でもある。表皮、真皮、皮下組織に分けられ、表皮はケラチノサイトよりなり、ランゲルハンス細胞、メラノサイトを含む。真皮は線維芽細胞、血管内皮細胞、樹状細胞、肥満細胞などからなる。さらに炎症時にはリンパ球、マクロファージ、好酸球、好中球などが浸潤する。これらの細胞は互いにサイトカインやケモカインを産生して相互に作用する。ケラチノサイトは分化しながら上昇し、基底層、有棘層、顆粒層、角層となって最後は垢として脱落する。ランゲルハンス細胞は表皮に存在する樹状細胞の一種で、強力な抗原提示能を有する。皮膚で抗原を取り込み、処理して、所属リンパ節でナイーブ T 細胞に抗原提示し、感作リンパ球を生み出す。

ケモカインは免疫および炎症反応において、様々な白血球の遊走や活性化を司っているペプチドの一群である。免疫や炎症反応の起きている場所への各種の白血球の選択的動員は、それぞれの種類の白血球に選択的に受容体が発現していることによる。ここで CD4 helper T 細胞はサイトカイン産生プロファイルによって 2 つに分けられる。Th1 細胞は IFN- γ や IL-2 を産生し、細胞性免疫に関与している。一方、Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 および IL-13 を産生し、液性免疫やアレルギー疾患に関与している。そして Th1 細胞と Th2 細胞はそれぞれ異なったケモカイン受容体を発現している。

Cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) /CC chemokine ligand (CCL) 27 は CC ケモカインの一つで、CC chemokine receptor (CCR) 10 のリガンドである。CCL27 は表皮のケラチノサイト、真皮の血管内皮細胞や細胞外マトリックスに発現しているが、その mRNA はケラチノサイトのみに認められる。アトピー性皮膚炎患者および尋常性乾癬患者においては、末梢血および表皮ケラチノサイトの CCL27 発現量が増加しているという報告や、CCL27 と CCR10 の相互作用がアレルギー性接触性皮膚炎、Toxic epidermal necrolysis (TEN) 型薬疹、スティーブンス・ジョンソン症候群に関与する可能性を示唆する報告がある。さらに、マウスに CCL27 を皮下注射すると注射部位にリンパ球が遊走される一方で、CCL27 と CCR10 の相互作用を減弱するとリンパ球の遊走が減少し、皮膚の炎症が緩和するとの報告がある。これらのことより、CCL27 は病変部に CCR10 陽性細胞を遊走させることにより、皮膚炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

Contact hypersensitivity (CHS) (臨床的にはアレルギー性接触性皮膚炎) はある個体がある物質に感作された場合、その同じ個体が再び同じ物質に接触した場合に起こる反応である。初めて接触し、準備状態を作る感作相と、再び接触して炎症が起こる惹起相に分けられる。感作相では表皮に存在するランゲルハンス細胞が抗原を取り込み、処理しながら所属リンパ節まで遊走し、ナイーブ T 細胞に抗原提示を行い、感作 T 細胞を誘導する。惹起相では感作リンパ球が遊走し、抗原提示を受けて活性化し、炎症を引き起こす。感作物質と惹起方法によって Th1 型と Th2 型の反応が起きる。

これらのことを背景にして、本研究ではケラチノサイトによって産生される CCL27 の意義を明らかにするため、表皮基底層に発現する keratin 14 のプロモーター支配下に、表皮で murine CCL27 (mCCL27) を恒常的に強発現するトランスジェニック (transgenic=Tg) マウスを作成した。Oxazolone による Th1 型の CHS、fluorescein isothiocyanate (FITC) による Th2 型の CHS、croton oil による一次刺激を行い、種々の解析を加えた。

Tg マウスは、human keratin 14 promoter/enhancer-mCCL27-human growth hormone 遺伝子断片を C57BL/6 マウスの受精卵に顕微注入し、仮親の C57BL/6 雌マウスの子宮内に戻すことで作製した。作製した Tg マウスでは、mCCL27 cDNA を含む transgene が組み込まれており、表皮ケラチノサイトにおいて mCCL27 mRNA が多量に転写され、多量の mCCL27 蛋白に翻訳され、産生、分泌されていた。この産生された mCCL27 は抗 mCCL27 抗体に認識され、その分子量は報告されているものと一致し、CCR10 強制発現細胞に対して遊走活性を有していた。これにより、このマウスの系が表皮に生物活性を有する mCCL27 蛋白を発現する Tg マウスとして機能していることが確認された。Tg マウスで皮膚炎の自然発症はみられなかった。また、croton oil による一次刺激では、Tg マウスと non-Tg マウスで違いはみられなかった。腹部に感作した後に耳介に 1 回惹起するものを acute CHS、反復惹起するものを chronic CHS と定義した。Oxazolone では acute CHS も chronic CHS も、Tg マウスと non-Tg マウスで違いはみられなかった。

FITC acute CHS では Tg マウスと non-Tg マウスで違いはみられなかったが、FITC chronic CHS において、Tg マウスは non-Tg マウスと比べて耳介がより腫脹し、耳介皮膚に浸潤したリンパ球、好中球、肥満細胞および CCR10 陽性細胞の数が多かった。CCR10 陽性細胞は主にリンパ球であり、好中球も散見された。これらのことより、Tg マウスではケラチノサイトによって産生された mCCL27 によって引き寄せられた CCR10 陽性細胞が CHS の修飾に関与していることが示唆された。また、肥満細胞の増加も耳介腫脹の増強に関与している可能性がある。

また、FITC chronic CHS においては、Tg マウスは non-Tg マウスよりも耳介皮膚由来ケラチノサイトにおける IL-4 mRNA 発現が増強し、IFN- γ mRNA 発現が減弱していた。これは Tg マウスでは Th2 優位な状態に傾いていることを意味する。

さらに IgE は Th2 優位な状態のマーカーであるが、FITC chronic CHS では Tg マウスは non-Tg マウスよりも血清 IgE が増加した。これは FITC が Th2 優位な炎症反応を起こすこと

と合致しており、ケラチノサイトによって産生された CCL27 が IgE 産生を促進していることを示す。CCL27 が IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカイン産生を誘導し、B 細胞からの IgE 産生を促進した可能性がある。また、IgE を介した慢性アレルギー性皮膚炎には好塩基球が必要であり、Th2 型反応を誘導すると好塩基球が IL-4 を産生することから、FITC chronic CHS に好塩基球が関与している可能性も示唆される。

ところで Th2 優位な炎症性皮膚疾患として知られるアトピー性皮膚炎では、慢性の湿疹病変とともに血清 IgE が高値であることが多い。FITC chronic CHS の方が FITC acute CHS より IgE が高値だったことは、様々な抗原に曝露し続けるアトピー性皮膚炎において IgE 値が上昇することを示唆するものかもしれない。また、アトピー性皮膚炎においては特に慢性期に肥満細胞が増加しており、病態に強く関与している。FITC chronic CHS においては Tg マウスでは non-Tg マウスよりも肥満細胞が増加していた。CCL27 がどのようにして肥満細胞の増加を引き起こすのかは不明であるが、慢性の湿疹病変については CCL27 が肥満細胞の増加を通して関与していると考えられる。

これらのことより、CCL27 は単独では炎症をひきおこさないが、いったん炎症が起こると CCR10 陽性 Th2 細胞を遊走させ、Th2 優位な状態を誘導して、炎症を修飾すると考えられる。その際、肥満細胞や血清 IgE 濃度の増加というアトピー性皮膚炎に似た状態がみられることより、アトピー性皮膚炎の病態に CCL27 が関与していることが示唆される。今後研究が進み、アトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患の治療に結びつくことが期待される。