

## 論文の内容の要旨

論文題目 アトピー性皮膚炎モデルにおける L-selectin の役割

指導教員 佐藤伸一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月進学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 富田 学

アトピー性皮膚炎は先進国を中心にみられるアレルギー性疾患であり、多くの患者を肉体的にも精神的にも苦しめている。アトピー性皮膚炎患者のうち約 80% に血中 IgE 値の上昇がみられ、様々な食物アレルギーや吸入アレルギーの特異的抗 IgE 抗体が検出されるが、これらのアレルギーは直接、正常皮膚に付着することにより皮膚症状を起こすことが知られている。また、アトピー性皮膚炎の急性期病変では Th2 優位の反応が主体であると考えられているが、慢性期に移行すると Th1 の反応が混在してくることが知られている。

アトピー性皮膚炎の動物モデルとして Geha らによる報告が知られており、BALB/c

マウスの背部に卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)を浸み込ませたガーゼを1週間固定する操作を繰り返すことにより、皮膚炎が誘発されるとともに血清のOVA特異的IgG1やOVA特異的IgE抗体価が上昇する。それに対して、OVA特異的IgG2aの上昇はみられないことよりTh2優位の反応が起こっていると考えられる。この方法により経表皮的に、しかも皮膚に傷を作ることなく感作を行うことができ、人間のアトピー性皮膚炎の特徴を多く兼ね備えている。

L-selectinはP-およびE-selectinと共にセレクチンファミリーに属する細胞接着因子で殆どの血球細胞に発現する。CD34などの蛋白質に特殊な糖鎖が付加したものがリガンドであり、その発現は末梢リンパ節や、鼻咽頭関連リンパ組織などの高内皮細静脈(high endothelial venule; HEV)を中心にみられる。L-selectinは血管内皮における血球細胞の捕獲および回転に重要で、皮膚の所属リンパ節を含む末梢リンパ節へのナイーブリンパ球の移行を制御しているが、L-selectin欠損マウスでは、ナイーブなリンパ球が末梢リンパ節や頸部リンパ節のHEVに接着しないため、リンパ球がHEVを介して末梢リンパ節や頸部リンパ節内に移行せず、末梢リンパ節や頸部リンパ節が小さいという特徴がある。また、L-selectinは炎症におけるeffector細胞が血管から皮膚へと浸潤するのをP-selectinやE-selectinと協同で制御している。以上より、L-selectinは皮膚の炎症においてナイーブリンパ球が所属リンパ節で活性化するinduction phase、およびeffector細胞が皮膚に浸潤し炎症を引き起こすeffector phaseの両局面において重要な役割を果たしていることが想定される。

本研究ではOVAを用いたマウスアトピー性皮膚炎モデルにおいて、L-selectinがどのような役割を果たすのかについて検討を行った。更にCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、B細胞のうち、どの細胞に発現しているL-selectinが重要であるかについて皮膚炎とOVA特異的抗体産生の2つの側面から検討を行った。

結果は、経皮的に OVA を反復貼付することによって OVA 特異的 IgG1 抗体価および OVA 特異的 IgE 抗体価が上昇するこのマウスアトピー性皮膚炎モデルは、Th2 優位とされる BALB/c マウスのみならず、Th1 優位とされる C57BL/6 マウスでも再現できた。次に L-selectin 欠損マウスにおいては OVA 貼付第 35 日までという長期間、抗体価は抑制され、皮膚炎もほぼ完全に抑制されていた。また野生型マウス等のリンパ球を adoptive transfer することにより dose dependent に L-selectin<sup>-/-</sup>マウスにおいて OVA 特異的抗体価の上昇がみられた。さらに transfer したリンパ球の各分画について検討したところ、特異的抗体の産生には CD4<sup>+</sup>T 細胞に L-selectin が発現することが重要であり、皮膚炎には CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞に L-selectin が発現することが重要で、B 細胞における L-selectin の発現はあまり関与しなかった。

次に、CD4<sup>+</sup>T 細胞に焦点をあて、L-selectin<sup>-/-</sup>マウスに OVA を特異的に認識する OT-II マウス CD4<sup>+</sup>T 細胞を adoptive transfer したところ、1 X 10<sup>2</sup> 個の transfer だけで OVA 特異的抗体価の上昇がみられ、皮膚炎が生じた。この場合、transfer する細胞数と抗体価の上昇は dose independent であった。一方、L-selectin の発現がない L-selectin<sup>-/-</sup>OT-II マウス CD4<sup>+</sup>T 細胞 1 X 10<sup>2</sup> 個では反応がみられなかったことから、特異的抗体の産生および皮膚炎の惹起には CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞に L-selectin が発現することが重要であることが確認された。さらに、この OVA 特異的抗体産生細胞は L-selectin を持たないのかかわらず、主として末梢リンパ節に分布していた。最後に、こうした L-selectin を欠損したリンパ球は、炎症が惹起されリンパ節が大きくなるとともに、リンパ節への移入数が増大することが分かった。

以上の結果から、OVA 反復貼付によるアトピー性皮膚炎モデルにおいて L-selectin は重要な役割を果たし、OVA 特異的抗体産生には L-selectin が CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現し HEV を介して所属リンパ節に入ることが重要であると考えられた。ナイーブ B 細胞は通常

CD4<sup>+</sup>T 細胞の助けを得て脾臓もしくは所属リンパ節で活性化し、抗原特異的抗体を産生するようになる。L-selectin<sup>-/-</sup>マウスに adoptive transfer を行なう実験で、L-selectin が OVA 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現するだけで OVA 特異的抗体が産生されるには 2 つのメカニズムが考えられた。1 つは L-selectin を発現する OVA 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞が所属リンパ節で活性化し、この細胞が脾臓に移行してそこでナイーブ B 細胞に働き OVA 特異的抗体産生細胞に分化させること、もう 1 つはこの所属リンパ節で活性化した OVA 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞がそのまま所属リンパ節でナイーブ B 細胞に働くことである。そこで OVA 特異的抗体産生細胞の分布について検討したところ大多数は所属リンパ節に存在した。ナイーブ B 細胞は L-selectin<sup>-/-</sup>マウス由来のため L-selectin を欠損しており、脾臓に多く存在し、定常状態では所属リンパ節には殆ど存在しない。OVA 反復塗布により所属リンパ節の細胞数が著明に増加したことを考えると、炎症を伴うリンパ節においてはナイーブ B 細胞は L-selectin に依存せず別の接着分子を用いて移入したと考えられた。

また皮膚炎惹起には CD4<sup>+</sup>T 細胞に加えて CD8<sup>+</sup>T 細胞に L-selectin が発現することが強く関与していた。CD8<sup>+</sup>T 細胞を欠く MHC class I 欠損マウスにおいてはアレルギー性接触皮膚炎は抑制されているなどの報告から CD8<sup>+</sup>T 細胞は最も直接的に皮膚を障害すると考えられている。また、正常な CD4<sup>+</sup>T 細胞がない MHC class II 欠損マウスでもアレルギー性接触皮膚炎が低下しており、CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞の両者が L-selectin を介して所属リンパ節に入り、活性化した後皮膚へと移行することが重要と考えられた。以上より、本研究で用いたアトピー性皮膚炎モデルにおいて CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞における L-selectin の発現は極めて重要であると考えられた。本結果に基づき、抗 L-selectin 抗体単独もしくは他の接着因子阻害薬との組み合わせによる臨床応用を検討することが、アトピー性皮膚炎の有効な治療につながると考え

られた。