

ヒト Monocyte Chemoattractant Protein(MCP)-1 トランスジェニックマウスにおける接触過敏反応の解析

学位論文内容の要旨

はじめに

分子量 1,000 以下のハプテンと呼ばれる化学物質が皮膚に侵入すると、皮膚固有の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) が捕捉する。LC は表皮から真皮を経て所属リンパ節の T 細胞領域に移動し、MHC 分子とともに抗原を T 細胞に提示する。抗原特異的に感作誘導された T 細胞は血中を循環し、再度抗原が侵入してきた皮膚へと流入し、炎症が惹起誘発される。この過程には、表皮ケラチノサイトや T 細胞から産生される種々のサイトカインと、細胞接着分子が複雑に関与していることが明らかにされている。しかし、接触過敏反応における LC の皮膚への移動、および表皮からリンパ節への遊走に関するサイトカインについては、いまだ不明な点が多い。

C-C ケモカインの一種である MCP-1 は $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 刺激表皮ケラチノサイトによって産生され、LC に対して走化能を持つことが示されている。

本研究では、接触過敏反応における MCP-1 の機能を詳細に検討する目的で、全身性にヒト MCP-1 を発現するトランスジェニックマウス (Tgm) を用いて、接触過敏反応に及ぼす MCP-1 の役割を、主に LC の動態、LC 上の活性化分子の発現調節へ与える影響から解析した。

結果および考察

ELISA 法による血中ヒト MCP-1 濃度の測定の結果、Tgm では週齢には関係なく 17ng/ml 以上の高値を示し、non-Tgm では検出されなかった。表皮ケラチノサイト培養上清においても、Tgm ではヒト MCP-1 の産生が認められた。

DNFB による耳介腫脹反応は、惹起誘発後 1~4 日の全経過中において、non-Tgm と比較して Tgm では有意に増強していた。腫脹のピークである 2 日目の耳介の組織学的解析では、non-Tgm に比べ Tgm では著明な真皮の浮腫と多数の単核細胞浸潤があり、表皮真皮間の裂隙の形成も認められた。

次に、この耳介腫脹反応の有意な増強が感作相、惹起相のどちらの経路に起因するのかを解明する目的で、DNFB で感作誘導後の non-Tgm 及び Tgm の所属リンパ節を採取し、このリンパ節細胞を BALB/c マウスに移注後、DNFB 耳介腫脹反応を計測した。惹起相の

影響は、感作誘導後の BALB/c マウスの所属リンパ節細胞を non-Tgm 及び Tgm に移注し、同時に DNFB による誘発を行うことにより検討した。その結果、感作相、惹起相のどちらにおいても、ピーク時の腫脹反応は Tgm において有意に増強していた。そこで、Tgm における接触過敏反応増強のメカニズムについて感作相、惹起相の両面から検討を行った。

まず感作相について、感作 5 日目における所属リンパ節細胞の各種ハプテン刺激に対する *in vitro* 増殖反応について検討した。所属リンパ節細胞は抗原特異的増殖反応を示し、至適濃度の DNBS 刺激による増殖反応は、non-Tgm に比べ Tgm で有意な増強が認められた。また、DNFB 感作 24 時間後の所属リンパ節内の抗原提示細胞の分布を調べたところ、T 細胞領域である傍皮質において、NLDC-145⁺細胞は non-Tgm よりも Tgm で多数認められた。

この NLDC-145⁺細胞が、感作皮膚から遊走してきた LC であることを確認する目的で、FITC で感作を行い所属リンパ節内の FITC を取り込んだ NLDC-145⁺細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、DNFB 感作と同様に、non-Tgm に比べて Tgm の所属リンパ節では、FITC⁺NLDC-145⁺細胞の増加が認められた。従って、ハプテン経皮投与により、Tgm では多数の抗原提示細胞が所属リンパ節に遊走すると考えられた。

この現象が高濃度のヒト MCP-1 が持続的に存在することによるものか検討するため、正常 BALB/c マウスにリコンビナントヒト MCP-1 1 μ g を静注し、同様に FITC で感作 24 時間後の所属リンパ節を採取し、フローサイトメトリーにて解析した。PBS 静注のコントロール群では、non-Tgm (2.2%) に比べ、Tgm (3.72%) において FITC⁺NLDC-145⁺細胞の増加が認められた。また、リコンビナントヒト MCP-1 1 μ g を静注した BALB/c マウスでは、FITC⁺NLDC-145⁺細胞の割合 (4.58%) が、Tgm と同程度に増加していた。以上の結果から、Tgm 所属リンパ節へ遊走する抗原提示細胞数の増加は、高濃度ヒト MCP-1 が全身性に存在することによるものと考えられた。

次に、抗原提示細胞の皮膚からの遊走を直接確かめる目的で、FITC 塗布後の表皮における I-A^dLC の動態について経時的に検討を加えた。FITC 塗布後経時的に表皮シートを作製し、抗 I-A^d 抗体を用いた蛍光抗体法を施行後、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。感作前の表皮内 I-A^dLC 数では、non-Tgm と Tgm で差は認められなかった。FITC 塗布後 18 時間をピークに non-Tgm、Tgm 表皮シート内の I-A^dLC 数の減少が認められたが、単位面積あたりの I-A^dLC 数は、non-Tgm に比べ Tgm では減少の程度が大きかった。さらに画像解析の結果、感作 12 時間後の Tgm の LC は、non-Tgm に比べて著しく I-A^d の蛍光強度を増し、また細胞の面積も約 3.7 倍に増加していた。

フローサイトメトリーで比較すると、FITC 感作 24 時間後の所属リンパ節内 FITC⁺NLDC-145⁺細胞は、non-Tgm に比べ Tgm では B7-1 の平均蛍光強度が約 25% 上昇していた。また、FITC 塗布後の表皮内 I-A^dLC が non-Tgm に比べ早期に腫大していたことから、ヒト MCP-1 が抗原提示細胞の所属リンパ節への遊走を促進させるばかりでなく、機能にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、ヒト MCP-1 が *in vitro* においても LC の B7-1 発現に影響を与えるか検証するため、LC をリンフォライト M で enrich した表皮細胞浮遊液にリコンビナントヒト MCP-1 を加え、I-A^dLC 上の B7-1 の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、I-A^dLC における B7-1 の発現は、ヒト MCP-1 の添加で濃度依存的に増強することが判明した。

惹起相については、DNFB で惹起誘発後耳介から表皮を採取し、表皮に発現する MCP-1 mRNA の経時的变化を解析することにより検討した。マウス MCP-1 (JE) mRNA の発現

は、惹起後 12 時間ピークで認められた。またこの JE 発現は、Tgm に比較して non-Tgm で増強していたが、24 時間では Tgm で高い傾向が認められた。これに対してヒト MCP-1 は、Tgm を DNFB で惹起後 24 時間でピークを示した。

次に、感作相、惹起相において抗ヒト MCP-1 中和抗体を投与することにより、Tgm の DNFB による接触過敏反応増強を抑制することが可能であるか検討した。抗ヒト MCP-1 中和抗体を osmotic pump により持続的に投与して、DNFB による耳介腫脹反応を計測した。24 時間および 48 時間後の平均耳介腫脹をアイソタイプコントロールに対する抑制率で示した。惹起後 24 時間の抑制百分率は、non-Tgm 4.4% vs Tgm 44.5%, 48 時間では non-Tgm 4.9% vs Tgm 39.1% だった。すなわち抗ヒト MCP-1 中和抗体の持続投与により、Tgm での接触過敏反応増強が抑制されることから、Tgm における接触過敏反応増強は、Tgm に恒常的に存在するヒト MCP-1 によることが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大河原 章

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

ヒト Monocyte Chemoattractant Protein(MCP)-1

トランスジェニックマウスにおける接触過敏反応の解析

ヒト β -アクチンをプロモーターとして出生時から恒常的に高濃度のヒト MCP-1 を発現するトランスジェニックマウス (Tgm) を用いて, 接触過敏反応における *in vivo* での MCP-1 の機能を主にランゲルハンス細胞 (LC) の動態, LC 上の活性化分子の発現調節へ与える影響から検討した.

Tgm では DNFB による接触過敏反応が増強していた. この接触過敏反応増強が感作相, 惹起相のどちらの経路に起因するのかを解明する目的で, adoptive transfer を施行したところ, 感作相, 惹起相ともに腫脹反応は Tgm で有意に増強していた. そこで, 感作相, 惹起相の両面から検討を行った.

まず感作相について, 感作 5 日目における所属リンパ節細胞の各種ハプテン刺激に対する *in vitro* 増殖反応について検討した. 所属リンパ節細胞は抗原特異的増殖反応を示し, 至適濃度の DNBS 刺激による増殖反応は, non-Tgm に比べ Tgm で有意な増強が認められた. また DNFB 感作 24 時間後の所属リンパ節内の NLDC-145⁺細胞は, non-Tgm よりも Tgm で多数認められた.

この NLDC-145⁺細胞が感作皮膚から遊走してきた LC であることを確認する目的で, FITC で感作を行い所属リンパ節内の FITC を取り込んだ NLDC-145⁺細胞をフローサイトメトリーで解析した. DNFB 感作と同様に, non-Tgm に比べて Tgm の所属リンパ節では, FITC⁺NLDC-145⁺細胞の増加が認められた.

この現象が高濃度のヒト MCP-1 の存在によるものか確認するため, BALB/c マウスにリ

コンビナントヒト MCP-1 1 μ g を静注し、同様に FITC で感作 24 時間後の所属リンパ節をフローサイトメトリーで解析した。その結果、リコンビナントヒト MCP-1 1 μ g を静注した BALB/c マウスでは、FITC⁺NLDC-145⁺細胞の割合が Tgm と同程度に増加していた。

次に、抗原提示細胞の皮膚からの遊走を直接確かめる目的で、FITC 塗布後の表皮における I-A^dLC の動態について、表皮シートを用いて経時的に検討を加えた。FITC 塗布後 18 時間をピークに non-Tgm, Tgm の I-A^dLC 数の減少が認められ、non-Tgm に比べ Tgm では減少の程度が大きかった。さらに、感作 12 時間後の Tgm の LC は non-Tgm に比べて著しく I-A^d の蛍光強度を増し、また細胞の面積も約 3.7 倍に増加していた。

以上の結果から、ヒト MCP-1 が抗原提示細胞の所属リンパ節への遊走を促進させるばかりでなく、機能にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、ヒト MCP-1 が *in vitro* において LC の B7-1 発現に影響を与えるか検証するため、LC を enrich した表皮細胞浮遊液にリコンビナントヒト MCP-1 を加え、フローサイトメトリーで解析した。その結果、I-A^dLC における B7-1 の発現は、ヒト MCP-1 の添加で濃度依存的に増強することが判明した。

惹起相については、DNFB で惹起誘発後の表皮に発現する MCP-1 mRNA の経時的变化を解析することにより検討した。マウス MCP-1 (JE) mRNA の発現は、惹起後 12 時間ピークで認められた。この JE 発現は Tgm に比較して non-Tgm で増強していたが、24 時間では Tgm で高い傾向が認められた。これに対してヒト MCP-1 は、惹起後 24 時間でピークを示した。

次に、感作相、惹起相において中和抗体を投与することにより、Tgm の DNFB による接触過敏反応増強を抑制することが可能であるか検討した。抗ヒト MCP-1 中和抗体を osmotic pump により持続的に投与して、耳介腫脹反応を計測した。平均耳介腫脹をアイソタイプコントロールに対する抑制率で示すと、惹起後 24 時間の抑制百分率は、non-Tgm 4.4% vs Tgm 44.5%, 48 時間では non-Tgm 4.9% vs Tgm 39.1% だった。

ヒト MCP-1 Tgm の解析から、*in vivo* において MCP-1 が LC の表皮から所属リンパ節への遊走を促進させること、LC 上の MHC class II 抗原および B7-1 の発現を増加させ、結果として接触過敏反応を増強させることが判明した。

公開発表に際し、副査の上出教授より、MCP-1 の作用機序、LC に作用する MCP-1 以外

のサイトカイン・接着分子について、副査の小野江教授より、Tgm のマクロファージ機能低下との相違、LC の機能低下の所見の有無について、最後に主査の大河原教授より、臨床応用の可能性について質問があった。申請者は最新の情報を混え、大概適切な解答をなし得た。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。