

サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応と ストレス応答を指標とする皮膚機能の解析

昭和大学 薬学部毒物学教室

吉 田 武 美

The induction of contact sensitization is associated with the movement of epidermal Langerhans cells (LC) from the skin and their migration to draining lymph nodes where they accumulate as immunostimulatory dendritic cells (DC). It has been reported that interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF α) are key cytokines for LC migration and/or maturation. This study has determined the effect of 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) on contact sensitization in IL-1 α/β gene deficient (IL-1KO) and TNF α deficient (TNF α KO) mice. IL-1KO mice showed weak ear swelling response (about 85% of wild). LC existed in IL-1KO epidermis appeared to be morphologically similar to that observed in wild. The migration ratio of LC in IL-1 was almost the same as that seen in wild. These results suggest that IL-1 may not be a key factor of the contact sensitization in mouse skin. Additionally, we preliminary found that functional changes in immune reaction in TNF α KO mice, however, the findings will be required further study.

Ultraviolet A (UVA) is known to induce the expression of many stress responsive genes due to the generation of reactive oxygen species (ROS). However, UVA's role in inducing metallothionein (MT) gene expression has not been studied. Furthermore, Ishizaki et al. (1996) demonstrated that UVA enhanced 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-mediated induction of ornithine decarboxylase (ODC) activity in mouse skin¹⁾. Considering these facts, we examined the interaction of UVA, TPA and antioxidants on the induction of MT and ODC mRNA in mouse skin. UVA (19J/cm²) induced MT mRNA in mouse skin. The study using antioxidants suggest that ROS produced by UVA exposure may contribute to its ability to induce MT mRNA. UVA enhanced TPA-mediated ODC enzyme activity and TPA-mediated MT mRNA induction. Alpha-tocopherol pretreatment inhibited the induction of ODC enzyme activity by TPA treatment combined with UVA exposure (TPA+UVA). In addition, pretreatment of mouse skin with curcumin resulted in the almost complete inhibition of TPA- and/or UVA-mediated gene expression. These results demonstrate that UVA can induce MT gene expression and enhance TPA-induced ODC and MT gene expression. The data further suggest that these effects are partially mediated by ROS.

1. 緒 言

皮膚は生体内外からの様々な刺激に対する防御機能を果たすと共に、生体内の生理的病的症状の表現の場でもある。皮膚組織には、インターロイキン 1 (IL-1) をはじめ多くのサイトカインが存在し、生体内外からの刺激に対し生理的かつ防御的応答の情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。例えば、遅延性アレルギーを獲得する上で重要な感作の過程においては、IL-1 β と TNF α がトリガーとなりその主要な役割を果たしていると言われている²⁾。しかしながら、遺伝子欠損マウスを用いた詳細な研究は成されていない。

アレルギー性接触皮膚炎は、皮膚に存在するランゲルハンス細胞 (LC) が抗原を局所リンパ節に提示することが発症メカニズムの第一段階であると言われているが、このランゲルハンス細胞の遊走及び成熟に IL-1 β や TNF α が大

きく関与していることがそれぞれのサイトカインに対する抗体を用いた研究などで報告されている²⁾。しかしながら、その詳細については不明な点もあり、サイトカイン遺伝子欠損動物モデルを用いた研究によりその役割に関する情報が得られると予想される。そこで、本研究では IL-1 α/β ノックアウトマウス (IL-1KO マウス) および TNF α ノックアウトマウス (TNF α KO) を用いてアレルギー性接触皮膚炎や感作の成立過程におけるサイトカインの役割を検討した。

UV による細胞障害や数々の毒性反応は良く知られた事実である。しかしながら、UVA はその光毒性は比較的弱く、作用機序も UVA により産生された活性酸素に起因する事から、UVB や UVC とは光毒性の強さも性質も異なると報告されている。また、毒性の強い UVB や UVC には古くから数多くの研究報告があるが、UVA はそれに比べると報告も多くない。さらに、UVA は活性酸素を産生する事から、活性酸素により発現するストレス応答タンパク質に影響を及ぼすのではないかと考えた。そこで本研究では、UVA により発生した活性酸素が皮膚におけるストレス応答タンパク質、特にストレス応答タンパク質としてよく研究されているメタロチオネイン (MT)³⁾ やオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の遺伝子発現にどの様に影響しているかについて皮膚研究に比較的多く用いられている CD-1 マウスを用いて検討した。



The study on immune reaction and stress response in cytokine knockout mouse skin.

Takemi Yoshida

Department of Biochemical Toxicology,
School of Pharmaceutical Sciences, Showa
University

2. 実験

2.1 アレルギー性接触皮膚炎の実験

2.1.1 実験動物および繁殖

実験には10週齢前後のIL-1KO⁴⁾、TNF α KO⁵⁾及びWildマウスを用いた。サイトカイン遺伝子欠損マウスは、東京大学医科学研究所、岩倉洋一朗教授より供与された親株を当大学実験動物研究施設内で交配させ、PCRによる遺伝子チェックを行ってそれぞれのサイトカイン遺伝子欠損マウス株およびWildマウス株を得、系統維持繁殖を行った。本研究では、雌雄マウスを使用した。

2.1.2 Ear Swelling Test

マウスの腹部の毛を刈り3% 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB; アセトン: オリーブ油 = 4: 1の溶媒に溶解) 溶液を100 μ L塗布した。その6日後に片方の耳に1% TNCBをもう片方の耳に溶媒を25 μ Lずつ塗り、24時間後に耳厚をダイヤルシクネスゲージ (株ミットヨ) で測定しその耳厚差を表示した。

2.1.3 マウスの耳介表皮シートの免疫染色

0.5% TNCBと溶媒をマウスの耳それぞれに25 μ Lずつ塗布し、その約16時間後に耳介を採取した。試薬を塗布した側の耳介を20mM EDTA含有PBS処理した表皮シートを得、冷アセトン溶液で固定した後、ビオチン化抗マウスIA δ 抗体 (ファーマンジェン社) で一次染色した。抗体はペルオキシダーゼ標識した後、DABにより発色させ立体光学顕微鏡で写真撮影 (対物 $\times$ 20、接眼 $\times$ 2.5; 0.336mm²) を行い、その写真を用いてLC数を数え、1mm²当たりのLC数を求めた。

2.1.4 リンパ節細胞 (LNC) 増殖反応

0.05~3% TNCBをマウスの両耳に25 μ L/ear塗布し、その72時間後に耳下腺リンパ節よりLNCを採取し、トリチウムチミジンの取り込みを測定した。

2.2 UVAによるストレス応答タンパク質の遺伝子発現への影響の実験

2.2.1 実験動物および処置

日本チャールスリバーラボラトリーズ(株)より購入した雌性CD-1マウスを用いた。マウスは、実験に用いる2~3日前に背部の毛をバリカンで刈った後、ヘアリムーバー (資生堂(株)) にて完全に毛を取り除いた。

2.2.2 光源

蛍光Black Blueライト (FL15 BL-B、ナショナル(株); 300-400nm) を用い、ガラス板にてUVBを除いた。光量はUVR

305/365 Dradiometer (クリニカルサプライ社) を用いて測定した。

2.2.3 UVA照射および抗酸化物質処置

本研究で用いた抗酸化物質は、1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO; 10⁻⁴M)、 α -トコフェロール (2 $\times$ 10⁻⁴M)、クルクミン (10⁻⁴M) であり、いずれもアセトンに溶解し、脱毛したマウス背部皮膚に100 μ L塗布した。12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は、ジメチルスルフォキシドに溶解した後アセトンで40倍希釈したものを100 μ L (8nmol TPA) 塗布した。対照動物には同量の溶媒を塗布した。UVAは固定したマウスに19J/cm²照射した。また、UVA照射開始時間を0時間と表示した。

2.2.4 RNA調製およびノーザンブロット法

処置一定時間後のマウス背部皮膚を取り、グアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法⁶⁾にてtotal RNAを採取した。total RNA (20 μ g) を1.2%アガロース-ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動した。ノーザンブロット法に用いたプローブは、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC; 0.72kb, pMK934 mODC cDNAのEcoRI fragment)、メタロチオネイン-1 (MT-1; 0.4kb, マウスpMT-1 cDNAのHindIII/EcoRI fragment)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH; 0.5kb, GAPDH cDNAのPstI fragment) である。

2.2.5 表皮サンプル採取法およびODC酵素活性測定法

マウス表皮は、O'Brein等の方法により採取した⁷⁾。すなわち、採取したマウス皮膚を冷水に60秒間浸漬した後、55℃の温湯に30秒間浸し、再び冷水に浸漬した。この皮膚より表皮を片刃カミソリでかき取り、50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2, 1mMジチオスレイトール、0.1mMピリドキサルリン酸、0.1mM EDTA含有) に集め、ソニケーターでソニケート (19W, 2分) した。これを遠心した (30000g, 20分間) 上清を用いてODC酵素活性測定を行った。

ODC活性は、RussellとSnyderの方法により測定した⁸⁾。

3. 結果と考察

3.1 IL-1KOマウスを用いたアレルギー性接触皮膚炎の研究

3.1.1 Ear swelling testの検討

アレルギー性接触皮膚炎がIL-1KOマウスで生じるか否か検討する目的で、アレルギー性接触皮膚炎の指標として汎用されているear swelling testを行った (Fig. 1)。この結果、IL-1KOマウスの耳厚差は、Wildマウスのそれ

の約 80%と、わずかながら減少した。

3. 1. 2 免疫染色による LC 遊走の比較検討

次に、0.5% TNCB 塗布 18 時間後の耳表皮 LC を抗マウス IAd 抗体で免疫染色を行い、溶媒処置のものと比較することにより LC 遊走を検討した (Fig. 2)。まず、抗 IAd 抗体による免疫染色の結果、IL-1KO マウスにも LC が存在し、形態学的観察では Wild の LC と特に大きな差

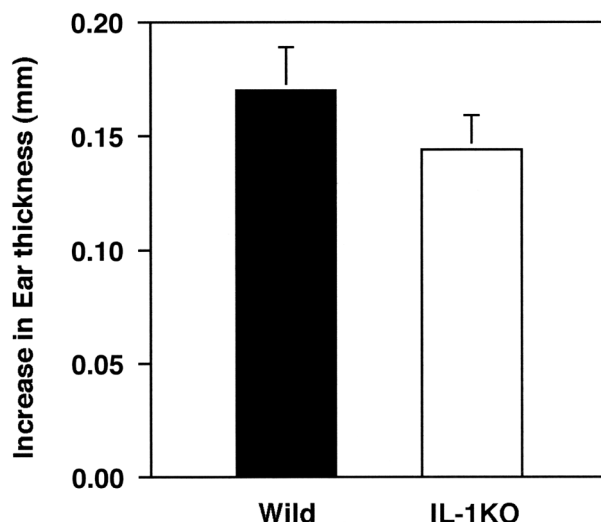


Fig. 1 Ear swelling response induced by TNCB in IL-1KO and wild mice. Three percent of TNCB was painted on mouse abdomen and one percent of TNCB or vehicle was applied on each ear 6 days after the sensitization. Ear thickness was measured 24 hr after the challenge.

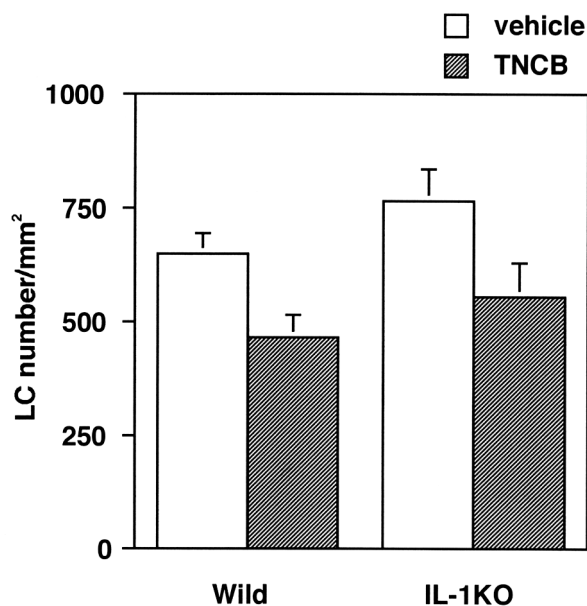


Fig. 2 The effect of TNCB on LC migration in wild and IL-1KO mice. TNCB (0.5%) or vehicle was painted on each ear and epidermal sheet was prepared 16 hr after the treatment. LC was stained with a monoclonal antibody against IAd and number of LC was counted.

が認められなかった。また、TNCB 塗布により、表皮から明らかに LC が減少している事が認められた。実際に LC 数を計測して比較したところ、IL-1KO マウスの方がもともと持っている LC 数が多い傾向にあった。TNCB 処置により LC は、Wild、IL-1KO 共に溶媒処置に比較して約 20% 減少した。これらのことは、IL-1 が存在しなくても LC は発現し、ハプテン刺激にも反応して遊走する事を示している。そこで、次に近位リンパ節で LNC がハプテンの信号を受け取って増殖しているかどうかを LNC 増殖反応により検討した。

3. 1. 3 LNC 増殖反応

感作性物質の検出試験法の一つである LNC 増殖反応を 0.05 から 3% TNCB で検討したところ、0.1% TNCB の場合は IL-1KO マウスでの LNC 増殖反応は Wild より弱くなる傾向が認められたが、高濃度の TNCB では Wild とほぼ同様に増殖反応が起きていることが明らかになった (Fig. 3)。

本研究の結果、IL-1 が不在でも LC の遊走や感作は正常動物と同程度に生じ、IL-1 を介さない LC 遊走や感作成立の系が存在することが示唆された。しかしながら、遺伝子欠損動物は生まれながらにして特定の遺伝子産物が欠損していることから、何らかの他の因子によって代償作用が生じている可能性も否定できないことから、今後その点に関する検討が必要である。

3. 2 その他のサイトカイン KO マウスを用いた研究

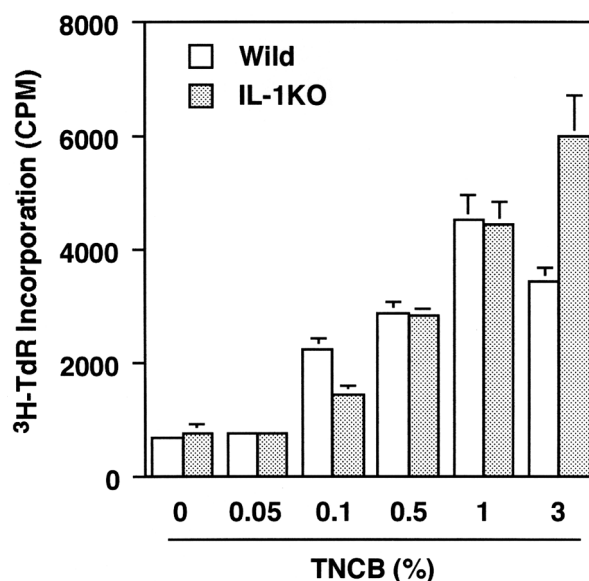


Fig. 3 The effect of TNCB on LNC proliferation in IL-1KO and wild mice. TNCB (0.05-3%) was painted on both ears and draining lymph nodes were excised. LNC was isolated and the incorporated radioactivity of ³H-thymidine was measured.

IL-1KO マウスにおけるアレルギー性接触皮膚炎に対する応答は、Wild マウスと特に大きな相違が認められなかったことから、TNF α KO マウスを用いて同様の検討を進めた。現在まで得られている知見は、最終的に詳細な確認を必要とするものであるが、TNF α KO マウスでは LC に異常が発生している結果が得られている。さらに本条件下においてもアレルギー性接触皮膚炎を正常動物よりは弱い明らかに成立しているという重要な成果が得られている。本成果は皮膚 LC のアレルギー性接触皮膚炎における役割に関して重要な話題を提供するものである。現在強力にその解明の検討を進めている。

3.3 UVA によるストレス応答タンパク質の遺伝子発現への影響⁹⁾

3.3.1 UVA による MT 遺伝子発現の経時変化

まず始めに、UVA がマウス皮膚 MT に直接的な作用を引き起こすかどうか検討した (Fig. 4)。UVA は、MTmRNA を照射直後ですでに著しく増加させ、照射開始 4 時間後には、対照の約 6 倍の MTmRNA が認められた。その後、徐々に mRNA 量は減少し始め、照射 24 時間後にはほぼコントロールレベルに回復した。UVA はマウス表皮における ODC 遺伝子発現に、本実験で検討した限りにおいては全く影響しなかった。これは、以前の我々の報告や他のグループの報告と一致している^{1, 10)}。

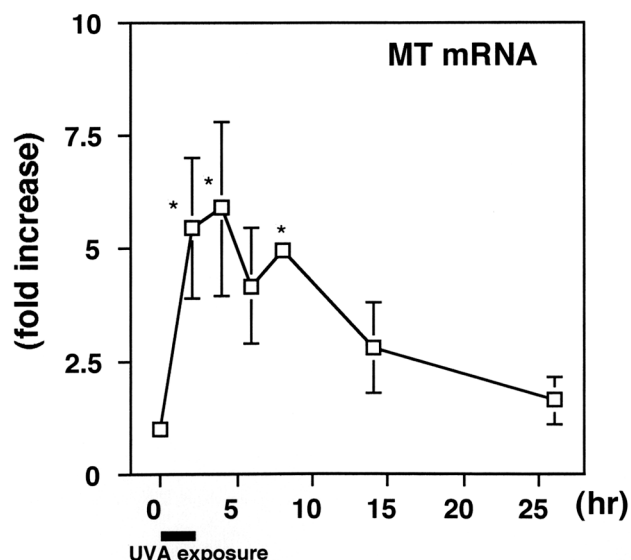


Fig. 4 Time course study of MT and HO-1 mRNA following UVA exposure in mouse skin. Mouse dorsal skin was irradiated with UVA (19J/cm²) and the skin was collected at the times indicated. Time 0 indicates the starting time of UVA exposure. Each blot was semiquantified and the signal of MT mRNA was normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean $\pm$ SE for three mice. *Significantly different from controls at $p < 0.05$. (引用文献 9 より)

3.3.2 UVA による MTmRNA 誘導に及ぼす抗酸化剤の影響

UVA は活性酸素を生じることから、この活性酸素が MTmRNA 誘導におよぼしている影響を検討する目的で、抗酸化剤である α -トコフェロール¹¹⁾ および一重項酸素捕獲剤である DABCO¹²⁾ を UVA 照射 30 分前に処置した (Fig. 5)。 α -トコフェロールは UVA による MTmRNA 誘導を 20%、DABCO は 40% 阻害した。このことから、UVA による MTmRNA 誘導は部分的に UVA 照射により生じた活性酸素¹³⁾、特に一重項酸素が関与していることが示唆された。活性酸素以外の要因としては、UVA により産生されると報告されており、またエンドトキシンによる MT 誘導の主な要因といわれている IL-6¹⁴⁾ が考えられる。

3.3.3 UVA の TPA により引き起こされる ODC や MT 誘導の増強効果ならびに α -トコフェロールによる防御作用

TPA は強力な皮膚発ガンプロモーターとして古くから良く知られた化合物であり、ODC^{1, 7)} や MT³⁾ など様々

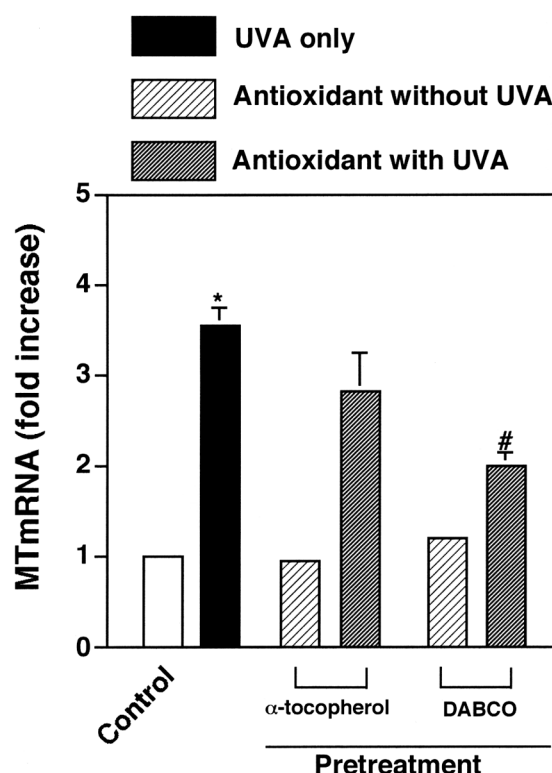


Fig. 5 Effect of antioxidant pretreatment on UVA-mediated expression of MT gene in mouse skin. Antioxidants were applied to the skin and followed with UVA exposure. The skin was collected 4 hr after starting UVA exposure. Each blot was semiquantified and the signal of MT mRNA was normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean $\pm$ SE for three or four mice. *Significantly different from controls at $p < 0.05$. #Significantly different from UVA alone at $p < 0.05$. (引用文献 9 より)

なストレス応答タンパク質を誘導することが明らかにされている。また、TPA は活性酸素を産生する事も報告されていることから、UVA との相互作用に興味を持たれ検討した (Fig. 6)。UVA 照射は TPA による ODCmRNA 誘導をさらに増加する傾向が認められたのみであった。しかし、ODC 活性誘導は UVA 照射により顕著に増強され、TPA 単独処置の約 1.7 倍の活性を示した。また、TPA による MTmRNA 誘導は UVA 照射により著しく増幅し、TPA 単独処置の約 2 倍になった。

ここで認められた UVA 照射の TPA 誘導性 ODC や MT 増強作用に、活性酸素が関与しているかどうか知る目的で、 α -トコフェロールを TPA 塗布直前に処置した。 α -トコフェロールは、UVA 照射による mRNA 増幅作用にはほとんど影響を与えなかった。興味深いことに、 α -トコフェロールは、UVA 照射により増幅した ODC 活性を TPA 単独処置による誘導レベルに回復した。この事は、UVA 照射の TPA による ODC 誘導増幅効果が、何らかの活性酸素により引き起こされていること、またこの活性酸素が ODC タンパク質のターンオーバーを遅らせるなどに

より ODCmRNA レベルではなく、酵素タンパクレベルに作用していることが示唆された。

3.3.4 クルクミンの UVA による ODC や MT 誘導増強効果におよぼす影響

ターメリックの主要な黄色素成分であり、活性酸素捕獲作用を有する^{15, 16)}ことが知られているクルクミンの UVA による TPA 誘導性 ODCmRNA や MTmRNA 増幅作用に及ぼす影響について検討した (Fig. 7)。クルクミン前処置は、TPA による ODC および MTmRNA 誘導をほぼ完全に阻害しただけでなく、UVA 照射によるこれらの増強作用も阻害した。これらの事実は、クルクミンが活性酸素を捕獲する¹⁶⁾だけでなく、TPA によるプロテインキナーゼ C を介したシグナル伝達を直接的に阻害¹⁷⁾していることを示唆している。

本研究により UVA 照射は皮膚において MT 遺伝子発現を誘導するのみでなく、TPA による ODC や MT 誘導を増幅する作用があることが明らかになった。UVA は皮膚の IL-6 を増加させるという報告があるが、本研究で認

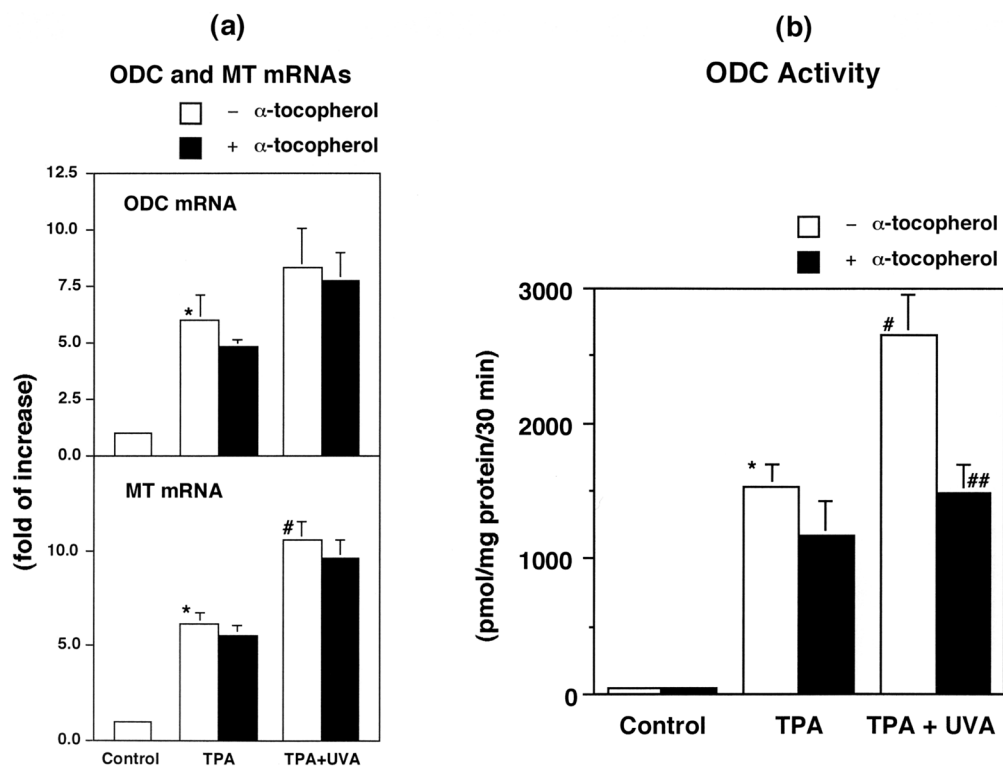


Fig. 6 Effect of α -tocopherol on UVA-mediated enhancement of ODC activity, ODC and MT gene expression after TPA application in mouse skin. α -Tocopherol and/or vehicle was applied to the dorsal skin just before TPA application on the mouse dorsal skin. Two hours after UVA exposure, the skin was collected. (a) Blots of ODC and MT mRNA were semiquantified and normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean $\pm$ SE for three or six mice. *Significantly different from controls at $p < 0.05$. #Significantly different from TPA alone at $p < 0.05$. (b) The epidermis was obtained from the rest of the skin and ODC activity was measured as described in "Materials and Methods." Symbols represent the mean $\pm$ SE for six or ten mice. *Significantly different from controls at $p < 0.05$. #Significantly different from TPA alone at $p < 0.05$. ##Significantly different from the group without α -tocopherol treatment at $p < 0.05$. (引用文献 9 より)

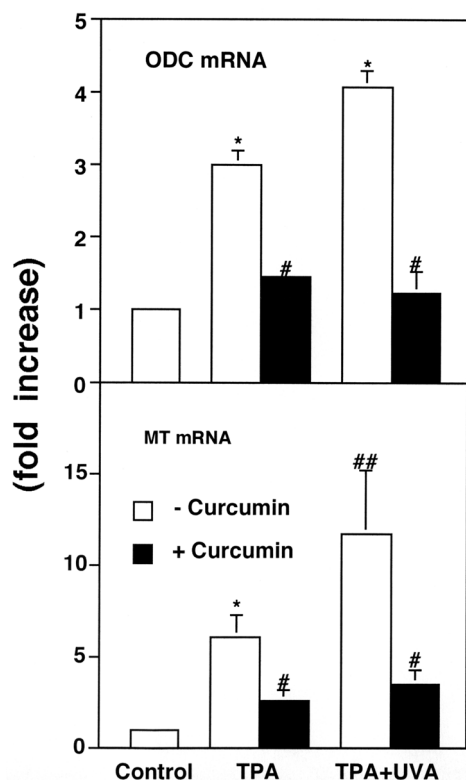


Fig. 7 Effect of curcumin on UVA-mediated enhancement of ODC and MT gene expression following TPA application. Curcumin was applied just before TPA application. Skin was collected 2 hr after UVA exposure. For a group without UVA treatment, skin was collected 4 hr after TPA application. Blots for ODC and MT mRNA were semiquantified and normalized with that for GAPDH. Symbols represent the mean $\pm$ SE for three or six mice. *Significantly different from controls at $p < 0.05$. #Significantly different from the equivalent group without curcumin treatment at $p < 0.05$. ##Significantly different from TPA alone at $p < 0.05$. (引用文献 9 より)

められた作用にどのようなサイトカインが関与しているかは、今後サイトカインノックアウトマウスなどを用いた検討を進めていく必要がある。

謝 辞

本研究を行うに際し、貴重なサイトカインノックアウトマウスを後供与していただきました、東京大学医科学研究

所、ヒト疾患モデル研究センター、岩倉洋一郎教授に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Ishizaki, C., Oguro, T., Yoshida, T., et al.: *Dermatology* **193**, 311-317, (1996)
- 2) Kimber, I., Dearman, RJ, Cumberbatch, M., et al., *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 614-619. (1998)
- 3) Klaassen, C. D., Liu, J., and Choudhuri, S.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267-294. (1999)
- 4) Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., et al.: *J. Exp. Med.* **187**, 1463-1475. (1998)
- 5) Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y.: *J. Immunol.* **159**, 1418-1428. (1997)
- 6) Chomczynski, P., and Sacchi, N.: *Anal. Biochem.* **162**, 156-159. (1987)
- 7) O'Brien, TG., Simsiman, RC., and Boutwell, RK.: *Cancer. Res.* **35**, 1662-1670. (1975)
- 8) Russell, D., and Snyder, SH.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 1420-1427. (1968)
- 9) Oguro, T., and Yoshida, T.: *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.* **17**, in press. (2001)
- 10) Hillebrand, GG., Winslow, M. S., Benzinger, M. J., et al.: *Cancer Res.* **50**, 1580-1584. (1990)
- 11) Jurkiewicz, BA., Bissett, DL., and Buettner, GR.: *J. Invest. Dermatol.* **104**, 484-488. (1995)
- 12) Cynshi, O., Takashima, Y., Katoh, Y., et al.: *J. Biolumin. Chemilumin.* **10**, 261-269. (1995)
- 13) Wlaschek, M., Wenk, J., Brenneisen, P., et al.: *FEBS Lett.* **413**, 239-242. (1997)
- 14) Lee, DK., Carrasco, J., Hidalgo, J., et al.: *Biochem. J.* **337**, 59-65. (1999)
- 15) Lu, YP., Chang, RL., Huang, MT., et al.: *Carcinogenesis* **14**, 293-297. (1993)
- 16) Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., et al.: *Jpn. J. Cancer Res.* **89**, 361-370. (1998)
- 17) Lin, JK., Chen, YC., Huang, YT., et al.: *J. Cell Biochem. Suppl.* **28-29**, 39-48. (1997)