

脂質を標的とした新しい皮膚遅延型アレルギー応答の機序解明と制御

京都大学ウイルス研究所

杉田 昌彦

The delayed-type hypersensitivity (DTH), or type IV allergy, is critical for many aspects of skin diseases, including contact dermatitis. It has been established that DTH occurs in response to protein-based allergens, but our recent study suggested that lipid components were able to elicit DTH responses in sensitized guinea pigs. Therefore, it is important to determine how DTH to lipids may differ from DTH to proteins and whether it may also occur in primates. Here, we show that a mycobacteria-derived glycolipid, glucose monomycolate (GMM), elicits DTH responses in bacillus Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated guinea pigs. The GMM-elicited hypersensitivity was comparable with the classical DTH to purified protein derivative (PPD) in that the skin reaction was associated with local infiltration by mononuclear cells with a peak response at about 2 days. Nevertheless, the GMM-elicited DTH was dependent on CD1 function and highly skewed to the TH1-type cytokine response. Furthermore, a similar response was observed also in BCG-vaccinated rhesus macaque monkeys. Thus, these observations detect a novel pathway of DTH directed against lipid allergens.

1. 緒言

MHC分子がタンパク質断片であるペプチド抗原を結合しT細胞に抗原提示する現象は、近代免疫学が確立した中心的パラダイムのひとつである。皮膚アレルギーをはじめ、感染免疫やがん免疫、自己免疫病など多くの免疫病態が、このパラダイムに基づいて考察され、診断法や治療法が開拓されてきた。しかしながら、たとえばギランバレー症候群では糖脂質に対する自己抗体が検出され、全身性エリテマトーデスでは核酸に対する自己抗体が産生される。すなわち、獲得免疫系が認識する抗原はタンパク質だけではないことを、これらの疾患は示唆している。実際、多様な脂質抗原をT細胞に提示する新しい抗原提示分子「グループ1CD1分子(CD1a, CD1b, CD1c)」の存在が知られているが、実験動物として有用なマウスやラットがこの免疫システムを欠如することから、本領域の研究は立ち遅れている。皮膚においても表皮ランゲルハンス細胞は特異的にグループ1CD1分子を発現するが、その意義はほとんど不明である¹⁾。

このような背景から、研究代表者の杉田は、モルモットやアカゲザルを用いた脂質免疫の研究を進めてきた。モルモットは、ヒトと類似したグループ1CD1システムを有し、またヒトと同様の結核病態を示すことから、主としてBCG接種モルモットをモデルとした解析研究を行っている²⁾。後述のように、BCGワクチン投与モルモットに、結

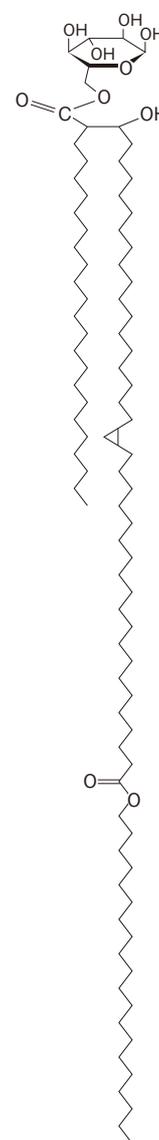
核菌細胞壁糖脂質であるグルコースモノミコール酸(GMM)(右図)を皮内接種すると、2日をピークとし、単核球の浸潤を主体としたアレルギー応答が観察されることを見いだした。このことは、ツベルクリン反応に代表されるタンパク質を標的とした遅延型アレルギー応答(delayed-type hypersensitivity; DTH)とは機序の異なるDTHが存在することを示唆する。

そこで本研究において、GMMを標的とした新しいタイプの皮膚DTHについて、モルモットおよびアカゲザルを用いて詳細に検討することにより、タンパク質を標的とした古典的DTHとの違いを明らかにすることを目的とする。

2. 実験

2.1 GMMの大量精製

Mycobacterium avium (serovar 4) あるいは*M. bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG)より脂質の生成を行った。菌を7H9培地(ミドルブルックADC、0.05% Tween-80、5%グルコース添加)にて37°Cで震盪培養し、ログフェーズの段階(OD600が1~1.5)で菌を回収したのち、常法により総脂質をクロロホルム/メタノール(C/M)にて抽出した³⁾。得られた総脂質をC/M(2:1)1mlに溶解し、さらに30mlの氷冷アセトンを加え、氷中で20分静置した。遠心にて不溶画分を沈殿させ、ペレットを氷冷アセトンで



A novel pathway for the delayed-type hypersensitivity directed against lipids

Masahiko Sugita

Institute for Virus Research, Kyoto University

洗浄した後、1mlのC/Mに溶解した。これをC/M/アセトン/酢酸(90:10:10:1)を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー(TLC)にて展開し、GMMに相当するスポットを掻き出して脂質を抽出した。夾雑物がなくなるまでこの操作を2~3回繰り返した後、脂質を乾固し、メタノール洗浄を行った。最終精製物をマススペクトロメトリーで解析し、GMMに対応したマススペクトラムが得られることを確認した。

2.2 GMM リポソームの作製

クロロホルムに溶解した精製GMMとホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンとを混和し、減圧乾固することにより脂質フィルムを形成させた。ここに滅菌水を加え、超音波処理を施すことによりリポソーム形成を促進した。

2.3 モルモット免疫および皮内テスト

生後3週のマウスHartleyモルモットを、SPF環境で飼育して実験に供した。2%グルコース存在下で培養したBCG東京172株(5×10^7 cfu)をモルモット皮下に接種し、6週後に剃毛を施した大腿部において皮内テストを行った。5 μ gのGMMを含んだリポソームおよび相当量の空リポソームを100 μ lのPBSに溶解して接種するとともに、PPD(0.5mg)の接種を行った。抗原のチャレンジ後、経時的に皮膚硬結の長径を測定した。

2.4 リンパ節細胞の遺伝子発現解析

BCG接種モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、*in vitro*でGMMリポソーム(1 μ g/ml)あるいはPPD(0.5 μ g/ml)の刺激を行った。一部の実験においては、抗モルモットpan-CD1抗体であるCD1F2/6B5を10 μ g/mlの濃度で加えた。18時間後に細胞を回収し、全RNAを抽出して、常法によりRT-PCRを行った。

2.5 アカゲザル免疫および皮内テスト

アカゲザル一頭あたり、 1×10^8 cfuのBCGを皮内接種した。またGMMリポソームの皮内接種には、50 μ gを用いた。すべての動物実験は当該機関の承認を得て行った。

2.6 リアルタイムPCR

リポソームを接種した皮膚を切り出し、破碎したのち、全RNAの抽出を行った。逆転写酵素反応により1本鎖DNAを合成し、それを鋳型としたリアルタイムPCRを行うことにより、各遺伝子のmRNA発現量を定量した。変性処理(95 $^{\circ}$ C、60秒)ののち、変性(95 $^{\circ}$ C、15秒)、伸長(60 $^{\circ}$ C、35秒)の2ステップPCR(40サイクル)を行った(Applied Biosystems 7500)。用いた各プライマーの配列

は下記の通りである。IFN- γ : GAC ATC TTG AGG AAT TGG AAA G (sense), TTT GGA TCC TCT GGT CAT CTT (antisense); IL-4: AGC TGA TCC GAT TCC TGA AA (sense), GCT GGC TTC CTT CAC AGG AC (antisense); IL-10: TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA (sense), GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA (antisense); eotaxin 1: GGG CTC ACT GGG CCA GAT TC (sense), TCT CCA GTC GCT GAA GGG GT (antisense); granulysin: TCG ACT GCA AGA TCT GTC TGA G (sense), ACT TCA CCA TCC TAC ACA CAC G (antisense); perforin: GAG TGC CGC TTC TAC AGT TAC CA (sense), CAG CCC GGA TGA AGT GGG TG (antisense); GAPDH: GAA GCC CCA TCA CCA TCT TCC AGG (sense), GAG CCC CAG CCT TCT CCG TG (antisense)。

3. 結果

3.1 モルモットの解析

BCG投与を行ったモルモットにPPDを皮内接種すると、2日をピークとした典型的なDTH応答が観察されたこと、およびナイーブモルモットでは観察されなかったことから、BCGの感作は成立したと判断した。BCG非感作、感作を問わず、空リポソーム接種による皮膚変化を認めなかったことから、リポソーム自体により炎症惹起はないと判断した。一方、GMMリポソーム接種により、BCG非感作モルモットに対しては皮膚応答を認めなかったが、感作モルモットに対して1.5~2日をピークとした遅延型応答を認めた。組織学的には、単核球の浸潤を主体とするものであった。したがって、1) 応答の成立には、事前の感作が必要、2) 遅延型を示すこと、3) 単核球の浸潤を顕著に認めること、以上の3点からGMMによって誘起される応答はDTHの基準を満たすものであり、DTHの標的抗原として糖脂質が存在することが初めて明らかになった。

一方、BCG接種の所属リンパ節細胞をGMMリポソームで刺激するとインターフェロン γ (IFN- γ)の顕著な遺伝子発現誘導を認めたが、このサイトカイン応答は抗CD1抗体の存在下で完全に阻害された。したがって、GMMによって誘起されるDTHはMHCを拘束因子とする古典的DTHと異なり、CD1分子によって制御されていることが明らかとなった。またTH1サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α)およびTH2サイトカイン(IL-5、IL-10)の発現を検討したところ、PPD刺激では両者が誘導されたのに対し、GMMリポソーム刺激ではTH1サイトカインのみが誘導され、TH2サイトカインは誘導されなかった。したがって、GMMによって誘起されるDTHは、極度にTH1型サイトカイン産生にシフトした応答であることが分かった。

3.2 アカゲザルの解析

2頭のアカゲザルにBCGの感作を行い、GMMリポソームならびに空リポソームの皮内接種を行ったところ、GMMリポソームにおいてのみ、皮膚の硬結を観察した。組織学的には単核球の顕著な浸潤を伴うものであった。

皮膚組織より全RNAを抽出し、それを鋳型としたリアルタイムPCRを行った結果、IFN- γ の著明な発現亢進を認めた。一方、TH2サイトカインであるIL-4やIL-10の発現は非接種組織と比較してむしろ低下していた。また、細胞傷害性T細胞あるいはNK細胞因子であるperforinやgranulysinの発現上昇を認めた。

4. 考察

本研究から、糖脂質を標的としたCD1依存的な皮膚DTH応答が実証された。旧来、たとえばウルシオールやダニ由来アカリジアルのような脂質成分が皮膚DTHを誘起することが知られている⁴⁾が、ハプテンとしてタンパク質を修飾することによりMHC依存的T細胞応答が誘起されると考えられる。この点、本研究で明らかとなったDTHとは異質である。

皮膚DTHを担うCD1陽性抗原提示細胞は同定できていない。GMMの提示は主としてCD1b分子が担うと考えられているが、アカゲザルにおいてはCD1c分子の関与が認められている⁵⁾。表皮ランゲルハンス細胞はCD1aを高度に発現し、CD1cを中等度に発現するが、CD1bの発現をほとんど欠如している。一方、真皮には少数ながらCD1b陽性樹状細胞が存在する¹⁾。また、一部のマクロファージは本来CD1分子を発現しないが、炎症刺激によりCD1分子の発現を獲得することから、活性化マクロファージの関与も考えられる。

遺伝子操作が容易で免疫解析の手法も確立しているマウスにおいては、グループ1CD1遺伝子が欠落しており、本研究で見られた皮膚DTHは存在しない。しかし、研究代表者は最近、ヒトCD1Aゲノム遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを樹立し、表皮ランゲルハンス細胞での特異的なCD1a発現を確認している⁶⁾。同様の手法でヒトCD1bトランスジェニックマウスやサルCD1cトラン

スジェニックマウスが得られれば、GMMに対する皮膚DTHがマウスにおいて再構築できる可能性が高い。

5. 総括

本研究により、霊長類における脂質特異的DTHの存在が明らかとなった。治療に難渋し再発を繰り返す接触皮膚炎において、CD1分子を介した皮膚DTHが関与しているとすれば、抗CD1抗体の局所投与などが治療効果を発揮するかもしれない。新たなDTH応答の発見は、これまで未知であった皮膚病態の解明に結実し、皮膚医学の発展に貢献するものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Pena-Cruz V, Ito S, Dascher CC, et al.: Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J. Invest. Dermatol.* 121, 517-521, 2003.
- 2) Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, et al.: Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181, 8528-8533, 2008.
- 3) Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, et al.: Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283, 28835-28841, 2008.
- 4) Sasai T, Hirano Y, Maeda S, et al.: Induction of allergic contact dermatitis by astigmatid mite-derived monoterpene, alpha-acaridial. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 336-340, 2008.
- 5) Morita D, Hattori Y, Nakamura T, et al.: Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. *Infect. Immun.* 81, 311-316, 2013.
- 6) Kobayashi C, Shiina T, Tokioka A, et al.: GM-CSF-independent CD1a expression in epidermal Langerhans cells: evidence from human CD1A genome-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 132, 241-244, 2012.