

サイトカインによる接触性皮膚炎誘導の制御に関する基盤研究

東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門

善本 隆之

In contact hypersensitivity (CHS) induced by haptens such as 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), CD8⁺ T cells producing IL-17 (Tc17) are important effector cells. Tc17 cells also produce IL-22, which promotes dermal inflammation, and IL-27 is an inhibitory cytokine for the differentiation to helper T-17 cells. The present study suggests that IL-22 produced by Tc17 cells is essential for the CHS reaction at the elicitation phase and that IL-27 inhibits it by suppressing the Tc17 differentiation.

1. 緒言

接触過敏症(CHS)は、化粧品や漆によるかぶれなどで炎症が起こるIV型アレルギー疾患で、原因となるアレルゲンは、化粧品や漆などに含まれる特定の化学物質である^{1,2)}。この比較的分子量の小さい化学物質(ハプテン)は、体内に侵入し皮膚組織の蛋白質と結合し、この修飾蛋白質に対する免疫応答が誘導される。CHSのエフェクターT細胞として以前からヘルパーCD4⁺T(Th)1や細胞傷害性CD8⁺T(Tc)1細胞が考えられていたが、最近、ハプテンがFluorescein isothiocyanate (FITC)の場合はIL-4を産生するTh2細胞が、2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)の場合はIL-17を産生するTc17細胞が重要なこと明らかにってきている³⁾。IL-22は、炎症反応によりCD4⁺/CD8⁺T細胞やナチュラルキラー(NK)/NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの免疫細胞より産生され、表皮角化細胞などの非免疫細胞に作用し、抗菌ペプチドの発現誘導や角化細胞の増殖、表皮肥厚を引き起こすサイトカインで、Tc17細胞からも産生されるが、CHS反応における役割に関する報告は未だない⁴⁾。一方、IL-27は、マクロファージや樹状細胞(DC)から産生され、初期のTh1分化誘導を促進するが、後期のTh1分化やTh2およびTh17分化は抑制するのみならず、IL-10を産生する制御性T細胞であるTr1細胞分化を増強し、炎症性サイトカイン産生も抑制する作用を有する多機能性サイトカインである⁵⁻⁷⁾。そこで、本研究では、IL-22遺伝子欠損マウスとIL-27を高発現しているトランスジェニック(Tg)マウスを用いて、CHS反応におけるIL-22の役割とさらにIL-27の効果について検討を行った。

2. 実験

2. 1. IL-22欠損マウスにおけるCHS反応の解析

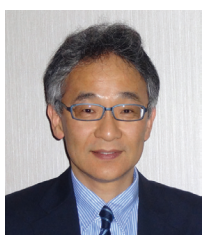
2日前に背部の皮膚の毛剃りをした野生型およびIL-22欠損マウスの背部皮膚にハプテンとしてDNFBを塗布し感作した。5日後同じハプテンを片方の耳介に、溶媒のみを反対の耳介に塗布しその厚さを24、48、72時間と経時的に測定した。24時間後には、それぞれの耳介を切除しホルマリン固定し、病理組織標本を作製しヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、炎症の程度を比較検討した。

2. 2. IL-22欠損マウスにおけるDCの所属リンパ節への遊走能の検討

IL-22の作用機序を調べるため、まず、ハプテンとして蛍光を発するハプテンであるFluorescein isothiocyanate (FITC)で感作後、表皮のDCであるランゲルハンス細胞が抗原を捕らえ所属リンパ節へ遊走する能力を比較検討した。感作を直接耳で行うため、野生型およびIL-22欠損マウスの片方の耳介にハプテンを塗布し、反対の耳介に溶媒のみを塗布し、24時間後、それぞれの耳介の所属リンパ節である顎下リンパ節を取り出した。次に、リンパ節細胞の懸濁液を調製し、MHCクラスIIとDCに対する抗体で染色し、それぞれのダブルポジティブ細胞中のFITC陽性細胞の割合をFACSを用いて解析した。

2. 3. 感作したIL-22欠損マウスの所属リンパ節細胞の再刺激後のサイトカイン産生の検討

次に、IL-22のTh分化への影響を調べるため、野生型およびIL-22欠損マウスの耳介をDNFBで感作5日後、所属リンパ節である顎下リンパ節を取り出し、*in vitro*で同じ抗原性を有する水溶性化合物2,4-dinitrobenzene sulfonate, sodium salt (DNBS)で再刺激し、24、48、72時間後の培養上清を回収した。その上清中のIL-22、IL-17、IFN- γ のサイトカイン量を、それぞれのELISAにより定量した。



Studies on the regulation of contact hypersensitivity reaction by cytokines

Takayuki Yoshimoto

Department of Immunoregulation, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University

2. 4. 惹起時に抗IL-22抗体投与の検討

IL-22の惹起相での役割を調べるために、ハプテンDNFBで感作した野生型マウスの耳介にDNFBを再塗布する際、抗IL-22抗体を投与し耳介厚を測定した。さらに、惹起24時間後それぞれの耳介をホルマリン固定し、病理組織標本を作製しHE染色を行い、炎症の程度を比較検討した。

2. 5. 惹起24時間後の耳介でのエフェクター分子の発現解析

ハプテンで惹起24時間後のエフェクター分子のmRNA発現を比較するため、野生型およびIL-22欠損マウスをハプテンDNFBで感作5日後、片方の耳介をDNFBで、反対の耳介を溶媒だけで塗布し惹起した24時間後に、耳介よりRNAを抽出しcDNAを調製し、リアルタイムPCRによりIL-22およびそのシグナル伝達の下流分子CXC3やCCL3、S100A7などの発現を比較検討した。

2. 6. IL-27TgマウスでのCHS反応の解析

次に、IL-27のCHS反応への影響を調べるため、我々が以前に作製した血清アミロイドP成分のプロモーターの下流にIL-27の2つのサブユニットEBI3とp28をリンカーを挟んで繋いで1本鎖IL-27を血中に多量に有しているトランスジェニック(Tg)マウスを用いた⁸⁾。野生型マウスおよびこのIL-27Tgマウスに、上述同様にDNFBをハプテンとして用い感作と惹起を行い、耳介厚を経時的に測定した。また、その際惹起24時間後の耳介をホルマリン固定し、病理組織学的解析も同様に行った。

2. 7. 感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節の再刺激後のサイトカイン産生の検討

IL-27の作用機序を調べるため、上述と同様に感作したマウスの所属リンパ節細胞からCD8⁺T細胞をAutoMACS Proを用いて精製し、in vitroで抗CD3抗体と抗CD28抗

体で刺激48時間後の培養上清中のIL-17やIL-22、IFN- γ 、IL-4などのサイトカイン産生量をELISAで測定した。

3. 結果

3. 1. IL-22欠損マウスにおけるCHS反応が低下する

ハプテンとしてDNFBを用い、野生型マウスおよびIL-22欠損マウスのCHS反応への感受性の違いを検討したところ、IL-22欠損マウスでは耳介肥厚が約半分に減弱した(図1)。さらに、感作24時間後の病理組織解析より、野生型マウスに比べてIL-22欠損マウスではリンパ球に浸潤や表皮の肥厚、浮腫などの炎症症状が軽減していた。これより、IL-22欠損マウスではDNFBに対するCHS反応が低下することがわかった。

3. 2. IL-22欠損マウスにおけるDCの所属リンパ節への遊走能には影響ない

IL-22の作用機序を調べるために、まず耳皮膚にハプテンとしてFITCを感作後24時間後、抗原であるFITCを捕らえたDCの所属リンパ節への遊走能を比較すると、IL-22欠損マウスでも野生型マウスと同様にFITC⁺MHCクラスII⁺CD11c⁺細胞の所属リンパ節への遊走が見られた。これより、IL-22欠損マウスでは、DCの所属リンパ節への遊走能には影響がないことが示された。

3. 3. 感作したIL-22欠損マウスの所属リンパ節細胞の再刺激後のサイトカイン産生の検討

次に、DNFBで感作後所属リンパ節細胞をin vitroでDNBSで再刺激し、その培養上清中のサイトカイン産生量をELISAで測定した。IL-22欠損マウスでは、IL-22産生は全く検出されなかったが、IL-17産生やIFN- γ 産生には有意な差は見られなかった(図2)。これより、IL-22欠損マウスは、DNFBに対するT細胞分化には影響しないことが示された。

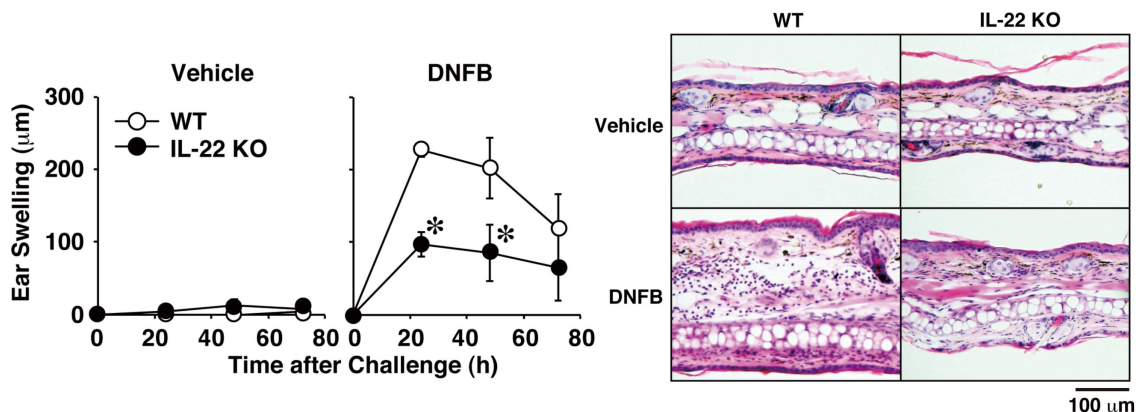


図1 IL-22欠損マウスでは、CHS反応で耳介厚と炎症反応が低下する

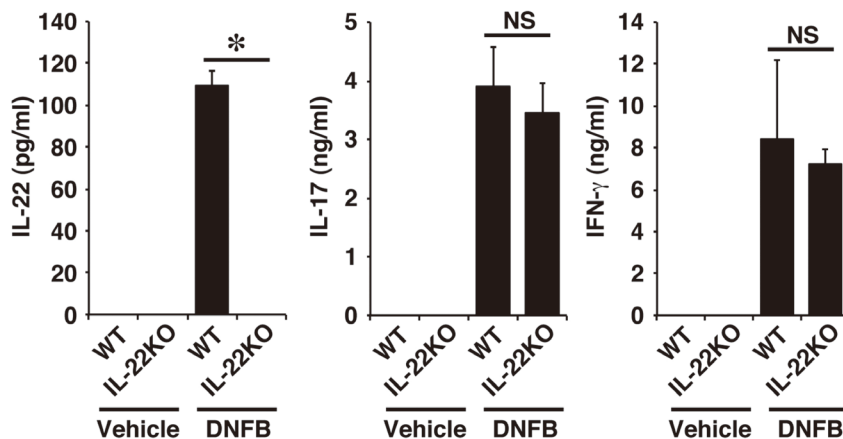


図2 IL-22欠損マウスでは、Th17やTh1分化には影響しない

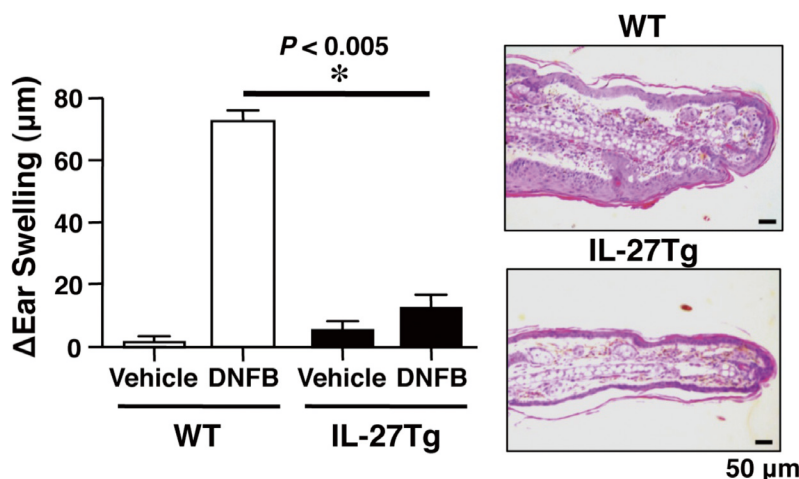


図3 IL-27Tgマウスでは、CHS反応で耳介厚と炎症反応が低下する

3. 4. 惹起時に抗IL-22抗体投与によるCHS反応が低下する

DNFBで感作した野生型マウスに惹起直前に抗IL-22抗体を投与し、DNFBで惹起すると、コントロール抗体を投与したマウスに比べ耳介厚が有意に半減し、さらに病理組織学的にもリンパ球の浸潤や表皮の肥厚、浮腫などが減弱していた。これより、IL-22は、CHS反応の惹起時に作用していることが明らかになった。

3. 5. 惹起24時間後の耳介でのエフェクター分子の発現解析

さらに、DNFBで感作・惹起24時間後の耳介皮膚でのエフェクター分子の発現を調べると、IL-22欠損マウスではIL-22発現は、ほぼ検出されず、IL-22シグナルの下流に位置するエフェクター分子であるCXCL3やCCL3などのケモカインや、抗菌ペプチドで好中球などの遊走にも関与するS100A7発現が低下傾向にあった。これより、IL-22欠損マウスでは、惹起時にIL-22の下流のシグナルが低下していることが示された。

3. 6. IL-27TgマウスでのCHS反応の低下

次に、IL-27Tgマウスを用いてIL-27によるCHS反応への効果を調べると、IL-27Tgマウスでは野生型マウスに比べ耳介の肥厚が顕著に減少し、病理組織学的解析よりリンパ球の浸潤や表皮の肥厚、浮腫などが減弱していた(図3)。これより、IL-27はCHS反応を抑制することが抑制することがわかった。

3. 7. 感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節の再刺激後のサイトカイン産生の検討

IL-27によるCHS反応の抑制の作用機序を調べるため、感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節細胞のCD8⁺T細胞を、in vitroで抗CD3抗体で刺激した上清中のサイトカイン産生をELISAで調べると、IFN- γ 産生は野生型マウスと変わらなかったが、IL-17やIL-22産生は顕著に減少していた。IL-27は、Tc17分化を抑制しCHS反応を阻害することが示された。

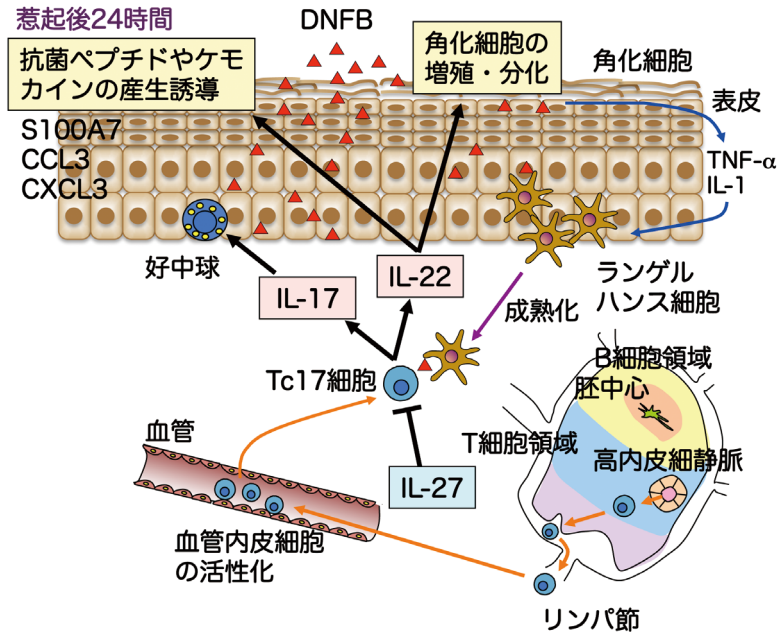


図4 IL-22は惹起相でのエフェクター機構に重要で、IL-27はTc17分化を阻害しCHS反応抑制する

4. 考察

以上より、DNFBをハプテンとして用いたCHS反応において、IL-22は感作相であるTc/Th分化には強くは影響しないが、惹起相においてケモカインなどのエフェクター分子の発現を増強し、CHS反応の誘導に重要な役割を担っていることが明らかになった(図4)。さらに、IL-27は、このDNFBで誘導されるCHS反応において、Tc/Th17分化を阻害しIL-17やIL-22産生を低下することで抑制効果を発揮することが示された。IL-27による阻害効果の作用機序としては、IL-27がCD8⁺T細胞中のTc17分化に重要なROR γ tやROR α などの転写因子発現を低下させている可能性が考えられる。本研究より、接触過敏症において、IL-22発現や機能の阻害剤やその中和抗体、さらに、IL-27投与が治療効果を示す可能性が示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、コスメトロジー研究振興財団よりご支援頂きましたことに心より感謝申し上げます。また、共同研究者として多大なるご協力を頂いた兵庫医科大学免疫学・医動物学講座教授・善本知広先生に深謝致します。

(引用文献)

- 1) Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*, 12, 114-24, 2012.
- 2) Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas

JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 64, 1699-714, 2009.

- 3) Kish DD, Li X, Fairchild RL. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *Journal of immunology*, 182, 5949-59, 2009.
- 4) Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445, 648-51, 2007.
- 5) Hall AO, Silver JS, Hunter CA. The Immunobiology of IL-27. *Adv Immunol*, 115, 1-44, 2012.
- 6) Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity*, 37, 960-9, 2012.
- 7) Mizoguchi I, Higuchi K, Mitobe K, Tsunoda R, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Interleukin-27: Regulation of immune responses and disease development by a pleiotropic cytokine with pro- and anti-inflammatory properties. In: Yoshimoto T, Yoshimoto T, eds. *Cytokine frontiers: Regulation of immune responses in health and disease*. Springer, 2013; 353-75.
- 8) Seita J, Asakawa M, Ooehara J, Takayanagi S, Morita Y, Watanabe N, Fujita K, Kudo M, Mizuguchi J, Ema H, Nakauchi H, Yoshimoto T. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells. *Blood*, 111, 1903-12, 2008.