

## 学位論文要旨

菅原 叶子

アレルギー性接触皮膚炎はハプテンと呼ばれる低分子化学物質が皮膚に接触することで生じる遅延型アレルギーである。アレルギー性接触皮膚炎の発症は感作相と惹起相の二つの過程から成る。感作相で皮膚がハプテンに曝露されるとハプテンは生体内タンパクと結合し抗原となり、皮膚上の樹状細胞に取り込まれ、成熟しながら所属リンパ節へと遊走する。その際、皮膚上では血中から新たな樹状細胞が供給される。遊走樹状細胞は所属リンパ節においてナイーブ T 細胞に抗原を提示し、T 細胞増殖・分化を誘導する。惹起相では、皮膚が同一のハプテンに再度曝露されることにより抗原特異的 T 細胞が皮膚局所へ引き寄せられ浸潤し、炎症反応を誘発する。以上のように、アレルギー性接触皮膚炎発症の感作誘導において樹状細胞は重要な役割を担う。日常生活において医薬品などを介して様々な部位がハプテンに曝露される。そして、健常皮膚だけでなく粘膜や皮疹部におけるハプテン曝露によっても感作が誘導され、アレルギー性接触皮膚炎を発症することが知られている。アレルギー性接触皮膚炎のメカニズムはこれまでにマウス接触過敏症モデルを用いて研究されてきたが、これらの研究は基本的に健常皮膚を介したハプテン曝露による感作誘導についての検討がほとんどであり、健常皮膚以外の部位に着目した接触過敏症研究は報告が少ない。そこで、先行研究において、粘膜の中でも特に知見がない膣粘膜および皮疹部の中でも罹患率が高いアトピー性皮膚炎発症部位に着目してマウス接触過敏症モデルを用いた検討を行った。その結果、膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位いずれを介したハプテン感作誘導においても、接触過敏症応答は健常皮膚を介した感作に対して減弱していることが明らかとなった。しかしながら、これら膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介した接触過敏症応答が弱いメカニズムは未解明な部分があり、特に接触過敏症の感作誘導に必須な樹状細胞に着目したメカニズム解析は行われていない。そこで、本研究では膣粘膜もしくはアトピー性皮膚炎発症部位でハプテン感作した二つの場合について、健常皮膚でのハプテン感作と比較検討することで、樹状細胞に着目したハプテン感作抑制メカニズムを解明することを目的とした。

第 1 章では膣粘膜感作における樹状細胞の遊走や供給のメカニズム解析を行った。まず初めに代表的なハプテンである fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いて感作後の所属リンパ節への樹状細胞遊走をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、膣粘膜感作後 24 時間において MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は皮膚感作後よりも少ないことが明らかとなった。次に、感作後樹状細胞供給メカニズムを検証するために皮膚および膣粘膜の末梢組織上感作後樹状細胞分布を免疫組織化学により解析した。その結果、皮膚および膣粘膜いずれにおいても感作後 6 時間に真皮もしくは粘膜下樹状細胞の末梢組織上局所への動員が認められ、皮膚では感作後 24 時間においても継続的に局所への真皮樹状細胞の動員が認められた一方で、膣粘膜では感作後 24 時間に有意な粘膜下樹状細胞数の減少が認められた。これらの結果から膣粘膜感作では樹状細胞の継続的な供給や遊走が抑制されることが示唆された。さらに、膣粘膜感作後樹状細胞の供給や遊走が抑制された理由を明らかにするために、樹状細胞の抑制に働くことが知られている transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や CD206 陽性細胞といった抑制因子を解析した。膣粘膜は皮膚よりも感作前および感作後 6, 12 時間において持続的に TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3 の発現が高かった。また免疫組織化学により、膣粘膜感作後 24 時間に

CD206 陽性 MHC class II 陽性細胞の増加が特に粘膜固有層基底部に認められた。さらに、CD206 陽性細胞が TGF- $\beta$  を発現していることも明らかとなった。以上の結果から、膣粘膜感作では TGF- $\beta$  産生 CD206 陽性細胞を介して感作後樹状細胞の供給や遊走が抑制されるために、その後の接触過敏症応答が皮膚感作よりも減弱されるということが示唆された。

第 2 章ではアトピー性接触皮膚炎発症部位を介したハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟のメカニズム解析を行った。解析にはアトピー性接触皮膚炎を誘導した NC/Nga マウス (AD マウス) および非誘導マウス (non-AD マウス) を用いた。先行研究における AD マウスでの接触過敏症応答解析は Th1 型免疫応答を誘導する代表的なハプテン 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) のみに対する検討であった。そこで、本章ではまず初めに DNFB 以外のハプテンとして Th2 型免疫応答を誘導することが知られている FITC を用いて non-AD マウスと AD マウスにおける接触過敏症応答を比較した。その結果、DNFB に対する検討と同様に FITC に対する接触過敏症応答は non-AD マウスに対して AD マウスで減弱した。このことから、ハプテン非依存的に AD マウスでの接触過敏症応答の減弱が認められることが考えられた。FITC 感作後 T 細胞応答についても解析を行った結果、non-AD マウスに対して AD マウスで CD4 陽性もしくは CD8 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞割合は低く、ハプテン感作後 T 細胞による interferon- $\gamma$  の産生も低かった。これらの結果から AD マウスではハプテン感作後 T 細胞の増殖や活性化が抑制されることが示唆された。次に、感作後の所属リンパ節への樹状細胞の遊走と成熟を non-AD マウスと AD マウスで比較した。FITC 感作後 24 時間において MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は non-AD マウスと AD マウス間で同等であった。AD マウスにおける樹状細胞遊走に変化は認められなかったことから、次に樹状細胞の成熟について解析を行った。その結果、non-AD マウスに対して AD マウスにおいて MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞上の共刺激分子 CD80、CD86 発現が低く樹状細胞の成熟が抑制されていることが示唆された。さらに、MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞における抑制性分子 PD-L1 の発現や抗炎症性サイトカイン TGF- $\beta$  の mRNA 発現は高く、免疫寛容性が誘導されていることが示唆された。これらの結果から、アトピー性接触皮膚炎発症部位を介したハプテン感作では感作後遊走樹状細胞の成熟が抑制されるとともに免疫寛容性が誘導され、その後の T 細胞応答や接触過敏症応答が減弱されることが示唆された。

以上より、本研究によって健常皮膚以外の部位として膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介した二つの場合のハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給、成熟といったメカニズムが明らかとなった。健常皮膚でのハプテン感作に対して膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位における感作ではいずれも接触過敏症応答が減弱されることが先行研究で報告されているが、本研究では樹状細胞に着目したメカニズム解明を進めることでそれぞれにおける新たな感作抑制メカニズムの可能性を示した。膣粘膜感作では皮膚感作よりも TGF- $\beta$  産生 CD206 陽性細胞によって樹状細胞の継続的な遊走・供給が抑制され、その後の接触過敏症応答が減弱されることが示唆された。それに対し、アトピー性皮膚炎発症部位を介したハプテン感作においては樹状細胞の遊走に変化はない一方で樹状細胞の成熟が抑制され免疫寛容性が誘導されるために接触過敏症応答が抑制されることが示唆された。本成果は健常皮膚以外の部位を介した接触過敏症の感作誘導メカニズムの理解を深めると共に、アレルギー性接触皮膚炎の抑制機構解明、さらには治療に貢献する知見であると考えられる。

# Abstract

Kanako Sugawara

Allergic contact dermatitis (ACD) is a delayed-type hypersensitivity caused by skin exposure to low-molecular-weight sensitizing chemicals called haptens. ACD consists of sensitization and elicitation phases. In the sensitization phase, dendritic cells (DCs) efficiently acquire antigens, hapten-protein conjugates, in the skin on hapten application. The DCs migrate to draining lymph nodes (LNs), undergo maturation, and present the antigen to naïve T cells and induce T cell proliferation and differentiation, while DCs are newly recruited at the sensitization site in the skin from the blood. In the elicitation phase, antigen-specific T cells are infiltrated by re-exposure to haptens and elicit skin inflammation. DCs have a critical role in the induction of sensitization in ACD. The sensitization is also induced by exposure to haptens via mucosae, such as vaginal and oral mucosae (VM and OM), and lesional skin like skin with atopic dermatitis (AD). Although the mechanism of ACD, especially for the sensitization phase, has been actively investigated using a murine contact hypersensitivity (CHS) model, there have been far fewer studies on the sensitization via VM and skin with AD. Previously, we reported that hapten sensitization via VM and skin with AD induce lower CHS responses than via healthy skin. However, the mechanisms of attenuated CHS responses, especially focused on DCs which is essential in the sensitization phase, were still unknown. Thus, this study investigated the suppression mechanism of hapten sensitization especially focused on DCs via VM and skin with AD compared with that in healthy skin.

In chapter 1, the mechanism of DC migration and recruitment after VM sensitization was investigated using mice. First, DC migration to draining LNs was analyzed using fluorescein isothiocyanate (FITC), a representative hapten, by flow cytometry. It was observed that the number of MHC class II<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup>FITC<sup>+</sup> migratory DCs in the draining LNs was lower in the VM-sensitized mice than in the skin-sensitized mice at 24 h after sensitization. Next, to investigate the DC recruitment after VM sensitization, the distribution and number of DCs in the VM were assessed compared with the skin at steady state and after sensitization by immunohistochemistry. While the number of MHC class II<sup>+</sup> dermal DCs continually increased until 24 h after hapten application to the skin, the number of MHC class II<sup>+</sup> submucosal DCs in the lamina propria increased 6 h and decreased at 24 h to a similar level to that of the intact VM, indicating the suppression of continuous recruitment of DCs in VM sensitization. In addition, to reveal the suppression mechanism of DC migration and recruitment after VM sensitization, an immunosuppressive cytokine transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and CD206<sup>+</sup> immunosuppressive cells were analyzed. The VM expressed higher levels of *Tgfb2* and *Tgfb3* than the skin before and 6/12 hours after sensitization. Moreover, immunohistochemistry showed increment of CD206<sup>+</sup>MHC class II<sup>+</sup> cells in the basal portion of the lamina propria at 24 h after VM sensitization and expression of TGF- $\beta$  in CD206<sup>+</sup> cells. These results suggested that TGF- $\beta$ -producing CD206<sup>+</sup> cells might contribute to the suppression of DC migration and recruitment after VM sensitization followed by the attenuated CHS responses compared with skin sensitization.

In chapter 2, the mechanism of DC migration and maturation after hapten sensitization via skin with AD was investigated using NC/Nga mice without and with AD induction (non-AD and AD mice, respectively). Previous study showed attenuated CHS responses in AD mice to 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) inducing Th1-type CHS.

Thus, this study compared CHS responses to FITC known to induce a Th2-type immune response and showed the attenuated CHS response to FITC in AD mice, indicating that the attenuated CHS response may be hapten-independent. In addition, analysis of T cell responses after FITC sensitization showed the proportions of BrdU<sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells and interferon- $\gamma$  levels were significantly lower in AD mice with FITC-induced sensitization than in non-AD mice. Next, DC migration to draining LNs after FITC sensitization was compared between non-AD and AD mice. The number of FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>high</sup> migratory DCs was comparable between non-AD and AD mice. Because altered DC migration was not observed in AD mice, DC maturation was analyzed. As a result, the expression levels of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>high</sup> migratory DCs in AD mice were lower than those in non-AD mice, indicating suppression of DC maturation after sensitization in AD mice. Moreover, FITC<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>high</sup> migratory DCs in AD mice exhibited increased expression levels of the inhibitory molecule PD-L1 and increased mRNA levels of the immunosuppressive cytokine *Tgfb1* compared with those in non-AD mice, indicating the induction of the tolerogenic phenotype of hapten-bearing DCs after sensitization in AD mice. These results suggest that suppression of DC maturation and induction of tolerogenic phenotype of hapten-bearing DCs may contribute to the attenuated T cell responses and CHS response after hapten sensitization in AD skin lesions.

From these results, this study revealed the mechanism of DC migration, recruitment, and maturation after hapten sensitization via VM or skin with AD. Previous study showed the attenuated CHS responses after sensitization in VM or skin with AD compare with those in healthy skin. In this study, addressing the mechanism focused on DCs suggested the novel mechanisms of suppression in sensitization via VM or skin with AD. In VM sensitization, TGF- $\beta$ -producing CD206<sup>+</sup> cells might contribute to the suppression of DC migration and recruitment after VM sensitization followed by the attenuated CHS responses compared with skin sensitization. In contrast, although DC migration was not altered after hapten sensitization in skin with AD, suppression of DC maturation and induction of tolerogenic phenotype of DCs after hapten sensitization in skin with AD might contribute to suppression of CHS responses. These findings could improve understanding of the sensitization via mucosae and lesional skin and may contribute to reveal the mechanism of suppression of ACD and medical treatment of ACD.

## 論文審査の結果の要旨

菅原 叶子氏から提出された論文「粘膜や皮疹部における樹状細胞に着目した感作抑制メカニズムの解明」は、健常皮膚以外の部位として膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介した二つの場合のハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給、成熟といったメカニズムを明らかにするものである。

アレルギー性接触皮膚炎はハプテンと呼ばれる低分子化学物質が皮膚に接触することで生じる遅延型アレルギーである。アレルギー性接触皮膚炎の発症は感作相と惹起相の二つの過程から成る。感作相で皮膚がハプテンに曝露されるとハプテンは生体内タンパクと結合し抗原となり、皮膚上の樹状細胞に取り込まれ、成熟しながら所属リンパ節へと遊走する。その際、皮膚上では血中から新たな樹状細胞が供給される。遊走樹状細胞は所属リンパ節においてナイーブ T 細胞に抗原を提示し、T 細胞増殖・分化を誘導する。惹起相では、皮膚が同一のハプテンに再度曝露されることにより抗原特異的 T 細胞が皮膚局所へ引き寄せられ浸潤し、炎症反応を誘発する。以上のように、アレルギー性接触皮膚炎発症の感作誘導において樹状細胞は重要な役割を担う。日常生活において医薬品などを介して様々な部位がハプテンに曝露される。そして、健常皮膚だけでなく粘膜や皮疹部におけるハプテン曝露によっても感作が誘導され、アレルギー性接触皮膚炎を発症することが知られている。アレルギー性接触皮膚炎のメカニズムはこれまでにマウス接触過敏症モデルを用いて研究されてきたが、これらの研究は基本的に健常皮膚を介したハプテン曝露による感作誘導についての検討がほとんどであり、健常皮膚以外の部位に着目した接触過敏症研究は報告が少ない。そこで、先行研究において、粘膜の中でも特に知見がない膣粘膜および皮疹部の中でも罹患率が高いアトピー性皮膚炎発症部位に着目してマウス接触過敏症モデルを用いた検討を行った。その結果、膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位いずれを介したハプテン感作誘導においても、接触過敏症応答は健常皮膚を介した感作に対して減弱していることが明らかとなった。しかしながら、これら膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介した接触過敏症応答が弱いメカニズムは未解明な部分があり、特に接触過敏症の感作誘導に必須な樹状細胞に着目したメカニズム解析は行われていない。そこで、本研究では膣粘膜もしくはアトピー性皮膚炎発症部位でハプテン感作した二つの場合について、健常皮膚でのハプテン感作と比較検討することで、樹状細胞に着目したハプテン感作抑制メカニズムを解明することを目的とした。

第 1 章では膣粘膜感作における樹状細胞の遊走や供給のメカニズム解析を行った。まず初めに代表的なハプテンである fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いて感作後の所属リンパ節への樹状細胞遊走をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、膣粘膜感作後 24 時間において MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は皮膚感作後よりも少ないことが明らかとなった。次に、感作後樹状細胞供給メカニズムを検証するために皮膚および膣粘膜の末梢組織上感作後樹状細胞分布を免疫組織染色法により解析した。その結果、皮膚および膣粘膜いずれにおいても感作後 6 時間に真皮もしくは粘膜下樹状細胞の末梢組織上局所への動員が認められ、皮膚では感作後 24 時間においても継続的に局所への真皮樹状細胞の動員が認められた一方で、膣粘膜では感作後 24 時間に有意な粘膜下樹状細胞数の減少が認められた。これらの結果から膣粘膜感作では樹状細胞の継続的な供給や遊走が抑制されることが示唆された。さらに、膣粘膜感作後樹状細胞の供給や遊走が抑制された理由を明らかにするために、樹状細胞の抑制に働くことが知られている transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や CD206 陽性細胞といった抑制因

子を解析した。臍粘膜は皮膚よりも感作前および感作後 6, 12 時間において持続的に TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3 の発現が高かった。また免疫組織染色法により、臍粘膜感作後 24 時間に CD206 陽性 MHC class II 陽性細胞の増加が特に粘膜固有層基底部に認められた。さらに、CD206 陽性細胞が TGF- $\beta$  を発現していることも明らかとなった。以上の結果から、臍粘膜感作では TGF- $\beta$  産生 CD206 陽性細胞を介して感作後樹状細胞の供給や遊走が抑制されるために、その後の接触過敏症応答が皮膚感作よりも減弱されるということが示唆された。

第 2 章ではアトピー性接触皮膚炎発症部位を介したハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟のメカニズム解析を行った。解析にはアトピー性接触皮膚炎を誘導した NC/Nga マウス (AD マウス) および非誘導マウス (non-AD マウス) を用いた。先行研究における AD マウスでの接触過敏症応答解析は Th1 型免疫応答を誘導する代表的なハプテン 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) のみに対する検討であった。そこで、本章ではまず初めに DNFB 以外のハプテンとして Th2 型免疫応答を誘導することが知られている FITC を用いて non-AD マウスと AD マウスにおける接触過敏症応答を比較した。その結果、DNFB に対する検討と同様に FITC に対する接触過敏症応答は non-AD マウスに対して AD マウスで減弱した。このことから、ハプテン非依存的に AD マウスでの接触過敏症応答の減弱が認められることが考えられた。FITC 感作後 T 細胞応答についても解析を行った結果、non-AD マウスに対して AD マウスで CD4 陽性もしくは CD8 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞割合は低く、ハプテン感作後 T 細胞による interferon- $\gamma$  の産生も低かった。これらの結果から AD マウスではハプテン感作後 T 細胞の増殖や活性化が抑制されることが示唆された。次に、感作後の所属リンパ節への樹状細胞の遊走と成熟を non-AD マウスと AD マウスで比較した。FITC 感作後 24 時間において MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は non-AD マウスと AD マウス間で同等であった。AD マウスにおける樹状細胞遊走に変化は認められなかったことから、次に樹状細胞の成熟について解析を行った。その結果、non-AD マウスに対して AD マウスでは MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞上の共刺激分子 CD80、CD86 発現が低く、樹状細胞の成熟が抑制されていることが示唆された。さらに、MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞における抑制性分子 PD-L1 の発現や抗炎症性サイトカイン TGF- $\beta$  の mRNA 発現は高く、免疫寛容性が誘導されていることが示唆された。これらの結果から、アトピー性接触皮膚炎発症部位を介したハプテン感作では感作後遊走樹状細胞の成熟が抑制されるとともに免疫寛容性が誘導され、その後の T 細胞応答や接触過敏症応答が減弱されることが示唆された。

本研究は、健常皮膚以外の部位として臍粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介した二つの場合のハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給、成熟といったメカニズムを明らかとし、感作抑制メカニズムの新規な知見を示した。臍粘膜感作では皮膚感作よりも TGF- $\beta$  産生 CD206 陽性細胞によって樹状細胞の継続的な遊走・供給が抑制され、その後の接触過敏症応答が減弱されることが示唆された。それに対して、アトピー性皮膚炎発症部位を介したハプテン感作においては樹状細胞の遊走に変化はない一方で樹状細胞の成熟が抑制され免疫寛容性が誘導されるために接触過敏症応答が抑制されることが示唆された。本成果は健常皮膚以外の部位を介した接触過敏症の感作誘導メカニズムの理解を深めると共に、アレルギー性接触皮膚炎の抑制機構解明、さらには治療に貢献する知見であると考えられる。

以上を総合的に考慮した結果、本論文は課程によらない博士 (薬科学) の論文として十分価値のあるものと判断した。