

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

菅原 叶子

目次

緒言	1
第 1 章 腔粘膜のハプテン感作における樹状細胞に着目したメカニズムの解明.....	3
第 1 節 実験	4
1. 動物	4
2. ハプテン感作.....	4
3. フローサイトメトリー.....	4
4. 免疫組織化学法.....	4
5. 定量的リアルタイム PCR.....	5
6. 統計的解析	6
第 2 節 結果	6
1. 皮膚および腔粘膜感作後における所属リンパ節への樹状細胞遊走	6
2. 皮膚および腔粘膜感作における樹状細胞分布	9
3. ハプテン感作後における TGF- β 発現と CD206 発現細胞	12
第 3 節 考察	15
第 4 節 小括	17
第 2 章 アトピー性皮膚炎発症部位のハプテン感作における樹状細胞に着目したメカニズ ムの解明	18
第 1 節 実験	19
1. 動物	19
2. NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎誘導	19
3. 接触過敏症モデル.....	19
4. T 細胞増殖	19
5. 細胞培養とサイトカイン測定.....	20
6. 樹状細胞遊走.....	20
7. セルソーティングと定量的リアルタイム PCR	20
6. 統計的解析	21
第 2 節 結果	22
1. Non-AD および AD マウスにおける接触過敏症応答	22
2. Non-AD および AD マウスにおける FITC 感作後 T 細胞増殖とハプテン特異的 T 細 胞によるサイトカイン産生.....	24
3. ハプテン感作後 non-AD および AD マウスにおける樹状細胞遊走	27
4. Non-AD および AD マウスにおける FITC 感作後樹状細胞の成熟と免疫寛容性....	30
第 3 節 考察	33
第 4 節 小括	35
総括	36

引用文献	38
謝辞	46

略語

ACD	Allergic contact dermatitis
AD	Atopic dermatitis
BrdU	Bromodeoxyuridine
CHS	Contact hypersensitivity
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC	Dendritic cell
dDC	Dermal dendritic cell
dLN	Draining lymph node
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzene
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzene
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin-10
LC	Langerhans cell
PCR	Polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed death-ligand 1
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th1	T helper cell type 1
Th2	T helper cell type 2
VM	Vaginal mucosa

緒言

アレルギーは、外来抗原（アレルゲン）に繰り返し曝露されることで引き起こされる異常な免疫反応である。アレルギー反応は、発生メカニズムによって、I型からIV型の主に4つに分類され、それぞれ即時型、細胞傷害型、免疫複合型および遅延型とも呼ばれる^{1,3)}。その中で、アレルギー性接触皮膚炎は、代表的なIV型（遅延型）アレルギーであり、金属、植物、防腐剤、香料などの様々な低分子化学物質ハプテンがアレルゲンとして知られる⁴⁾。アレルギー性接触皮膚炎の発症メカニズムは、感作相と惹起相の二つの過程から成り、マウス接触過敏症モデルを用いて研究されてきた^{5,6)}。感作相では、皮膚がハプテンに曝露されると、ハプテンが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、CD4陽性およびCD8陽性T細胞の増殖・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、ハプテン曝露後24~48時間後に炎症反応を誘発する。CD4陽性ヘルパーT細胞（Th）およびCD8陽性細胞傷害性T細胞のいずれもがハプテン特異的なエフェクターT細胞として働く。以上のように、樹状細胞は、接触過敏症の感作成立において非常に重要である。

日常生活において、健常皮膚だけでなく粘膜や皮疹部といった様々な部位は、医薬品などを介してハプテンに曝露される。そのため、健常皮膚だけでなく粘膜や皮疹部を介しても、感作が誘導され、アレルギー性接触皮膚炎は発症する。例えば、重層扁平上皮で覆われた皮膚と似た特徴を有すII型粘膜の膣粘膜⁷⁾や口腔粘膜^{8,9)}、皮疹部としてはアトピー性皮膚炎^{10,11)}や乾癬¹²⁾で感作が誘導されることが知られる。しかしながら、マウス接触過敏症研究の対象はほとんどが健常皮膚であり、健常皮膚以外の部位に着目した接触過敏症に関する研究は少ない。健常皮膚と比較すると粘膜や皮疹部はバリア機能が低いことから感作誘導が促進される可能性が考えられる^{13,14)}。一方、粘膜や皮疹部は免疫寛容といった免疫応答を抑制する機構を有することも知られており^{15,16)}、逆に健常皮膚よりも感作誘導が抑制される可能性も考えられる。そこで、我々は、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に着目し、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、健常皮膚で感作した場合と比較して接触過敏症研究を進めてきた。

膣粘膜感作における接触過敏症モデルを用いた先行研究においては、皮膚と膣粘膜感作を比較すると膣粘膜感作では耳介腫脹やT細胞応答といった接触過敏症応答が低いことが明らかとなった¹⁷⁾。しかしながら、なぜ皮膚感作に対して膣粘膜感作で接触過敏症応答が弱いのかは不明であり、接触過敏症の感作誘導において重要な樹状細胞に着目した検討は未だ行われていない。口腔粘膜ではハプテン感作後の樹状細胞応答に関する報告があるが¹⁸⁾、膣粘膜ではタンパク質などに対する樹状細胞応答の研究報告は複数

あるもののハプテン感作後の樹状細胞に関する報告はほとんどない。口腔粘膜だけでなく膣粘膜もハプテン感作誘導部位であり、日常生活において医薬品などを介してハプテンに曝露され得る部位であることから重要な研究対象として考えた。

アトピー性皮膚炎発症部位での感作による接触過敏症の先行研究においても、ダニ抗原によりアトピー性皮膚炎を誘導した NC/Nga マウス (AD マウス) は、アトピー性皮膚炎を誘導していないマウス (non-AD マウス) よりも接触過敏症応答が弱く、細胞傷害性 T リンパ球抗原-4 (CTLA-4) 陽性 T 細胞がその抑制に関与していることが明らかとなった²²⁾。しかしながら、この結果は、ハプテン 1 物質のみに対する検討であり、抑制メカニズムとしては CTLA-4 陽性 T 細胞にしか着目しておらず、膣粘膜感作と同様に感作誘導に重要な樹状細胞に着目したメカニズムの解明は行われていない。臨床研究においてはアトピー性皮膚炎患者では Th2 優位な状態であることが Th1 型のアレルギー性接触皮膚炎応答を抑制する可能性を考察した報告もあるが詳細なメカニズム解析は行われておらず²³⁾、本研究では樹状細胞に着目して新たなメカニズム解析を進めることを考えた。以上より、アレルギー性接触皮膚炎は、健常皮膚だけでなく膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位を介したハプテン曝露によっても生じ、これまでの接触過敏症モデルを用いた検討から健常皮膚を介した感作よりも接触過敏症応答が弱いことが報告されている。しかしながら、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の遊走や供給、成熟に関する報告はない。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おける樹状細胞に着目したハプテン感作抑制メカニズムの解明を健常皮膚の場合と比較して行った。第 1 章では、膣粘膜感作における樹状細胞の遊走や供給などの解析を行った。まず、ハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給を皮膚感作と膣粘膜感作で比較した。さらに、免疫抑制因子として知られる CD206 や Transforming growth factor- β (TGF- β) の膣粘膜感作における発現解析を行った。第 2 章では、接触過敏症モデルとアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いてアトピー性皮膚炎発症部位を介したハプテン感作後樹状細胞の遊走や成熟についてメカニズムを解析した。まず初めに代表的なハプテンの一つである fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いて接触過敏症応答や感作後 T 細胞応答を non-AD マウスと AD マウスで比較した。次に、non-AD マウスと AD マウスにおけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟、免疫寛容性について解析を行った。

第1章 膣粘膜のハプテン感作における樹状細胞に着目したメカニズムの解明

口腔や膣といった粘膜部位を介してもハプテン曝露によって感作が誘導されアレルギー性接触皮膚炎を生じ得る⁷⁻⁹⁾。口腔粘膜と膣粘膜は、いずれも重層扁平上皮で覆われたII型粘膜に分類され、皮膚と似た特徴を有す²⁴⁾。皮膚と比較すると、これらの粘膜を介した接触過敏症研究の報告は少ないが、近年の我々の先行研究において、複数のハプテン(2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) および 2,4,6-trinitrochlorobenzene, oxazolone)を用いた検討において、皮膚感作に比べて膣粘膜感作では接触過敏症応答(耳介腫脹)が弱いことが明らかとなった¹⁷⁾。加えて、皮膚感作に比べて膣粘膜感作は、感作後T細胞増殖の低下も認められた。しかしながら、なぜ膣粘膜感作で接触過敏症応答が弱いのか、そのメカニズムは不明であり、樹状細胞に着目した検討はない。皮膚において樹状細胞は表皮に存在するランゲルハンス細胞と真皮に存在する真皮樹状細胞の大きく二つに分類される^{5, 6, 25)}。それに対応する形で、口腔や膣粘膜では上皮に存在する樹状細胞をランゲルハンス細胞、粘膜固有層に存在する樹状細胞を粘膜下樹状細胞と呼ぶ²⁴⁾。これまでに、口腔粘膜や膣粘膜における樹状細胞の分布やフェノタイプ、遊走、供給に関する研究が複数報告されている^{8, 18, 26)}。例えば、FITCを用いた口腔粘膜と皮膚での感作後樹状細胞の比較検討では、口腔粘膜からの遊走(CD11c陽性FITC陽性)樹状細胞数は皮膚からの遊走樹状細胞数よりも少ないが、口腔粘膜感作後と皮膚感作後の遊走樹状細胞のフェノタイプは大きく変わらないことが明らかとなった¹⁸⁾。膣粘膜については、ヒトにおいて皮膚表皮に対して膣粘膜上皮のランゲルハンス細胞数が少ないことが報告されている²⁷⁾。またマウスにおいて、定常状態における樹状細胞のフェノタイプや活性化状態が膣粘膜上皮と皮膚表皮では異なることが明らかとなっている²⁸⁾。しかしながら、ウイルスや細菌感染、タンパク抗原に対する膣粘膜樹状細胞応答の研究は複数報告²¹⁻²⁴⁾がある一方で、ハプテン感作による接触過敏症における膣粘膜樹状細胞に関する報告はほとんどない。そこで、本研究では、代表的なハプテンであるDNFBやFITCを用いて、膣粘膜におけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給について解析を行った。第1章の原著論文は *Immunity, Inflammation and Disease* にて報告されたものである²⁹⁾。

第1節 実験

1. 動物

C57BL/6J マウスは6週齢の雌マウスを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。なお、本実験は花王動物実験委員会において承認され、委員会のガイドラインに従って実施した (承認番号: S18093-0000)。

2. ハプテン感作

皮膚感作は、0.3% DNFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液を剃毛した腹部皮膚に 10 μ L 塗布することによって誘導した。溶媒は olive oil を用いた。膣粘膜感作は、発情休止期のマウス膣腔に 0.3% DNFB (Sigma-Aldrich) を 10 μ L 投与することで誘導した。マウスの性周期は、膣垢を採取した後、Giemsa 染色液 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) で染色し、確立された方法³⁰⁾に従って判定した。樹状細胞の遊走の解析は、ハプテンとして 10 μ L の 1.0% FITC (DOJINDO, Kumamoto, Japan) 溶液を用いて皮膚および膣粘膜感作を誘導した。FITC の溶媒には acetone/dibutyl phthalate (1:1) 混合溶液を用いた。Acetone/dibutyl phthalate は FITC を用いた接触過敏症研究において広く用いられる溶媒であり、それ自体は抗原性を有しない³¹⁾。なお、皮膚感作と膣粘膜感作で曝露面積は大きく変わらなかった。

3. フローサイトメトリー

皮膚感作後のマウスから腋窩および鼠経リンパ節を、膣粘膜感作後のマウスから腸骨および鼠経リンパ節を無処置および感作後 6, 24, 48 時間後に採取した。リンパ節から単一細胞懸濁液を調製するために、リンパ節を 400 U/L の collagenase type I (Sigma-Aldrich) 溶液に浸漬し、37°C、30 分間処理した。その後、5 mM の ethylenediaminetetraacetic acid を添加し 10 分間インキュベートした。

Fc レセプターをブロックするために、調製した単一細胞懸濁液を抗 CD16/32 抗体で前処理した。染色には蛍光色素標識モノクローナル抗体として PE-Cy7 標識抗 CD11c (HL3) 抗体および PE 標識抗 MHC class II (M5/114.15.2) 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いた。死細胞は 7-aminoactinomycin D (7-AAD, BD Biosciences) により染色し除去した。染色後、BD FACSVerser フローサイトメーターと FlowJo 解析用ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞 (遊走樹状細胞) 数を結果として示す。

4. 免疫組織化学法

剃毛した腹部皮膚および膣粘膜を、無処置および DNFB 感作後のマウスより採取した。皮膚および膣粘膜の末梢組織サンプルは、ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) で包埋し、7 μ m の凍結切片を作製した。

凍結切片は 4% paraformaldehyde 溶液 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) で 3 分間処理し固定した後、ブロッッキング剤の 1% bovine serum albumin で処理した。biotin 標識抗 MHC class II 抗体を用いた免疫染色を行う場合は切片を Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) で処理した。ブロッッキング後、切片に一次抗体溶液を添加し、4°Cで一晩インキュベートした。その後、streptavidin および二次抗体を用いて室温で 30 分間処理した。一次抗体は biotin 標識抗 MHC class II (M5/114.15.2) 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、抗 CD11c (N418) 抗体 (BioLegend, San Diego, CA, USA)、抗 CD206 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を用いた。それぞれに対応する streptavidin および二次抗体として RRX 標識 streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories)、Alexa Fluor 488 標識抗アルメニアンハムスターIgG 抗体 (Abcam)、Cy5 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) を用いた。streptavidin および二次抗体とのインキュベーション後、切片を VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) で封入し対比染色を行った。

TGF- β および CD206 の二重陽性細胞の解析において、TGF- β の染色は、TGF- β I 型と II 型受容体の細胞外領域に免疫グロブリンの Fc 領域を融合した Fc キメラ受容体 (T β RI-T β RII-Fc) を用いた³²⁾。T β RI-T β RII-Fc は、白水美香子博士 (理化学研究所) よりご供与いただいた。固定およびブロッッキング後、切片を T β RI-T β RII-Fc と 4°Cで一晩インキュベートした。その後、Alexa Fluor 488 標識抗ヒト IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) と室温で 30 分間インキュベートした。TGF- β に対する染色後、切片を抗 CD206 抗体と室温で 1 時間インキュベートし、続けて Cy5 標識抗ウサギ IgG 抗体と室温で 30 分間インキュベートした。

免疫組織化学法により染色を行った組織の蛍光画像は、LSM 880 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss Co., Ltd., Oberkochen, Germany) で取得した。全ての蛍光画像は ImageJ/Fiji ソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて染色された細胞を解析した。定量的解析では表皮/上皮における MHC class II 陽性細胞をランゲルハンス細胞、真皮、粘膜固有層に存在する MHC class II 陽性細胞をそれぞれ真皮樹状細胞、粘膜下樹状細胞としてカウントした。また、粘膜固有層の基底部 (基底膜から約 150-300 μ m) に位置する CD206 陽性細胞をカウントした。基底膜の単位長さあたりの細胞数を結果として示す。

5. 定量的リアルタイム PCR

無処置および DNFB 感作後 6, 12 時間後のマウスの剃毛した腹部皮膚および膣粘膜から RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてトータル RNA を抽出した。トータル RNA サンプルから High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を調製した。Taqman Gene Expression Assay と QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用

いて定量的リアルタイム PCR を実施した。TaqMan プローブは TGF- β 1 (Mm01178820_m1)、TGF- β 2 (Mm00436955_m1)、TGF- β 3 (Mm00436960_m1)、 β -actin (Mm00607939_s1) を用いた。 β -actin を内在性コントロールとした。2- $\Delta\Delta C_t$ 法により求めた皮膚無処置群に対する mRNA 発現量を結果に示す。

6. 統計的解析

統計解析は one or two-way analysis of variance with Bonferroni's or Tukey's multiple-comparison test を用いて GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) により行った。 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意であるとした。

第2節 結果

1. 皮膚および膣粘膜感作後における所属リンパ節への樹状細胞遊走

感作性かつ蛍光物質である FITC は感作後の遊走樹状細胞の特定に用いられる³³⁾。FITC を用いて解析した皮膚 (Skin) および膣粘膜 (VM: Vaginal mucosa) 感作後の樹状細胞の遊走の結果を Figure 1-1 に示す。皮膚に FITC 塗布後、所属リンパ節中のトータル細胞数は 48 時間増加し続けた (Figure 1-1A)。一方で、膣粘膜感作後には継続的な所属リンパ節中のトータル細胞数の増加は認められず、皮膚感作群に比べて感作後 24、48 時間における細胞数は有意に膣粘膜感作群で低かった。所属リンパ節中の MHC class II 高発現 CD11c 陽性樹状細胞数 (全遊走樹状細胞数) は皮膚感作後増加し 24 時間でピークになったが、膣粘膜感作後 6、24、48 時間で有意な全遊走樹状細胞数の増加は認められなかった (Figure 1-1B)。皮膚および膣粘膜感作後いずれにおいても MHC class II 高発現 CD11c 陽性細胞中の FITC 陽性細胞の割合は感作後 48 時間で約 20%まで増加した (Figure 1-1C, D)。感作後 6、24、48 時間の FITC 陽性細胞の割合は、皮膚感作群と膣粘膜感作群で有意な変化はなかった。所属リンパ節における MHC class II 高発現 CD11c 陽性で且つ FITC 陽性遊走樹状細胞数は、皮膚および膣粘膜感作後のいずれも増加し、24 時間後にピークとなった (Figure 1-1E)。しかしながら、所属リンパ節における MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は感作後 24 時間で皮膚感作群よりも膣粘膜感作群で低く、感作後 48 時間では有意な差は無かった。これらの結果より膣粘膜感作後に樹状細胞の遊走が弱いことが示された。

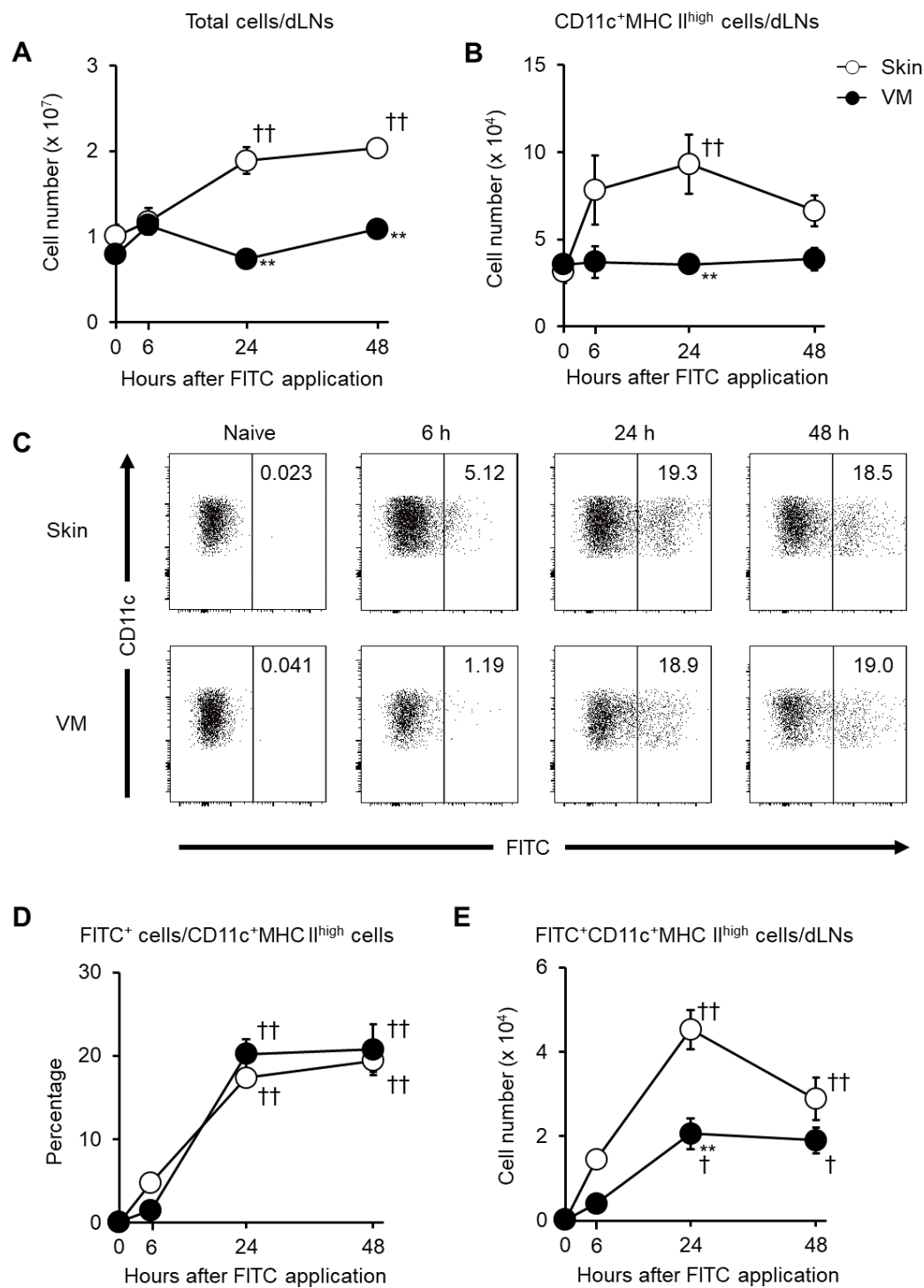


Figure 1-1

皮膚 (Skin) に対する膣粘膜 (VM: Vaginal mucosa) における所属リンパ節 (dLNs: draining lymph nodes) 中 FITC 感作後遊走樹状細胞数の減少

(A) 無処置 (0 時間) および感作後 6、24、48 時間後のトータル細胞数の変化

- (B) MHC class II 高発現 CD11c 陽性遊走樹状細胞数の変化
- (C) 代表的なフローサイトメトリープロット。無処置および感作後マウスの所属リンパ節における 7-AAD 陰性 MHC class II 高発現 CD11c 陽性細胞中の FITC 陽性細胞割合を示す。
- (D) MHC class II 高発現 CD11c 陽性細胞中の FITC 陽性細胞割合の変化
- (E) FITC 陽性 MHC class II 高発現 CD11c 陽性遊走樹状細胞数の変化
- データは平均値±SEM 値を示す (n=3-9)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (皮膚感作群との比較)。† $P < 0.05$ 、†† $P < 0.01$ (0 時間 (無処置群) との比較)。

2. 皮膚および腔粘膜感作における樹状細胞分布

抗 MHC class II 抗体を用いた免疫組織化学法によって解析した無処置および DNFB 感作後の皮膚と腔粘膜における樹状細胞の分布と数の結果を Figure 1-2 に示す。MHC class II 陽性細胞は表皮/上皮および真皮/粘膜固有層に位置していた (Figure 1-2A)。感作後に MHC class II 陽性細胞の局所への動員が、皮膚では感作後 6、24 時間に真皮で、腔粘膜では感作後 6 時間の粘膜固有層で認められた。抗 CD11c 抗体を用いた免疫組織化学法においても同様の結果が得られた (Figure 1-2B)。感作後 6 時間において、皮膚表皮よりも腔粘膜上皮における基底膜の単位長さあたりの MHC class II 陽性ランゲルハンス細胞数は有意に少なかった (Figure 1-2C)。皮膚真皮の真皮樹状細胞について、基底膜の単位長さあたりの MHC class II 陽性真皮樹状細胞数は DNFB 感作後 24 時間までに継続的に増加し、無処置に対して 24 時間後は 2 倍の細胞数であった (Figure 1-2D)。一方、腔粘膜感作後、粘膜固有層における基底膜の単位長さあたりの MHC class II 陽性粘膜下樹状細胞数は 6 時間後に 1.9 倍増加したが、24 時間後には皮膚真皮の真皮樹状細胞数に対して腔粘膜上の粘膜下樹状細胞数は有意に減少した。以上より、腔粘膜感作において樹状細胞の供給数が低いことが示された。

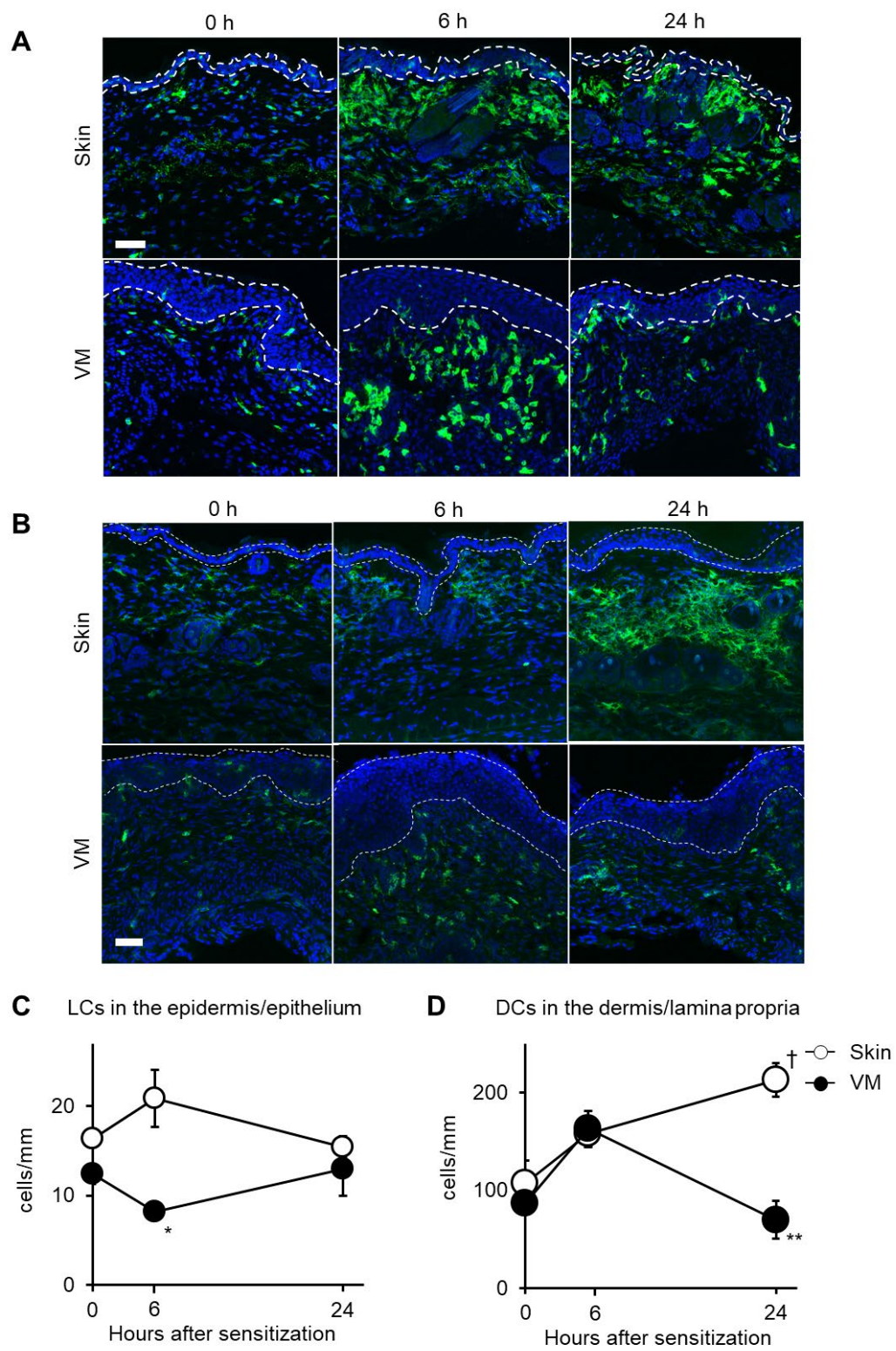


Figure 1-2

DNFB 感作後の皮膚 (Skin) および膣粘膜 (VM) における樹状細胞分布と数
無処置および DNFB 感作後 6、24 時間の膣粘膜および皮膚の免疫組織化学法の結果。
DAPI (青) による対比染色を行った。

- (A) 抗 MHC class II 抗体を用いて樹状細胞 (緑) を免疫染色した代表的な画像
 - (B) 抗 CD11c 抗体を用いて樹状細胞 (緑) を免疫染色した代表的な画像
 - (C) 表皮 (epidermis) と上皮 (epithelium) における基底膜の単位長さあたりの MHC class II 陽性ランゲルハンス細胞 (LC: Langerhans cell) 数の定量結果
 - (D) 真皮 (dermis) および粘膜固有層 (lamina propria) における基底膜の単位長さあたりの MHC class II 陽性真皮および粘膜下樹状細胞数の定量結果
- データは平均値±SEM 値を示す (n=3)。* $P < 0.05$ (皮膚感作群との比較)。† $P < 0.05$ (0 時間 (無処置群) との比較)。スケールバー; 50 μm 。

3. ハプテン感作後における TGF- β 発現と CD206 発現細胞

なぜ皮膚感作に対して臍粘膜感作で樹状細胞応答が弱かったのかは不明である。臍粘膜感作に関与すると考えられるいくつかの抑制性サイトカインや細胞が存在する。TGF- β は、抑制性サイトカインであり、樹状細胞前駆細胞のマクロファージへの分化や M2 フェノタイプへの誘導、樹状細胞の遊走や成熟の抑制に働くことが知られている³⁴⁻³⁸)。CD206 は、M2 型マクロファージのマーカーとして知られており、M2 型マクロファージは、抗炎症や免疫抑制機能を有し、interleukin-10 (IL-10) や TGF- β といった抗炎症性 (抑制性) サイトカインを産生する³⁴)。ハプテンによる臍粘膜感作におけるこれらの抑制性サイトカインや免疫抑制性細胞の報告は無いが、臍粘膜感作後の樹状細胞の遊走や供給の抑制に関与している可能性が考えられた。

そこで、まず臍粘膜における *Tgfb* mRNA 発現を検討することにした。リアルタイム PCR による無処置および DNFB 感作後 6、12 時間のマウスの臍粘膜、皮膚における *Tgfb* の mRNA 発現量の解析結果を Figure 1-3 に示す。全ての解析時間 (無処置および感作後 6、24 時間) において、臍粘膜は皮膚よりも *Tgfb2* mRNA と *Tgfb3* mRNA を 1.9-3.5 倍高く発現した (Figure 1-3A)。

TGF- β は M2 型への誘導に寄与する^{34, 35, 37})ことから CD206 陽性細胞が臍粘膜樹状細胞の供給を抑制した可能性を考え、次に、DNFB 感作後臍粘膜における CD206 と MHC class II の共発現を免疫組織化学法により解析した。ハプテンに応答すると考えられる MHC class II 陽性 CD206 陰性細胞は特に臍粘膜感作後 6 時間に粘膜固有層の臍腔側 (基底膜の真下) に主に認められた (Figure 1-3B)。さらに、MHC class II 陽性 CD206 陽性細胞は粘膜固有層の基底部に特に臍粘膜感作後 24 時間に認められた。定量的解析により臍粘膜感作後 6 時間に対して 24 時間では粘膜固有層の基底側の基底膜の単位長さあたりの CD206 陽性細胞数が有意に増加していた (Figure 1-3C)。以上より、臍粘膜感作において、粘膜固有層局所への CD206 陽性細胞の動員が起きていることが示された。

CD206 陽性マクロファージは TGF- β によって誘導されるが、TGF- β の重要な産生細胞としても知られている³⁵)。そこで、臍粘膜における TGF- β 産生細胞を明らかにするために、抗 CD206 抗体および T β RI-T β RII-Fc を用いた二重蛍光免疫組織化学法を行った。T β RI-T β RII-Fc は全ての TGF- β アイソフォーム TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 に結合することができる³²)。全ての解析時間 (無処置および臍粘膜感作後 6、24 時間) において T β RI-T β RII-Fc に対して陽性の細胞のほとんどは CD206 陽性であった (Figure 1-3D) ことから、CD206 陽性細胞により TGF- β が産生されていることがわかった。これらの結果より、TGF- β 産生 CD206 陽性細胞が臍粘膜感作後の樹状細胞遊走および供給の抑制に働いている可能性が示された。

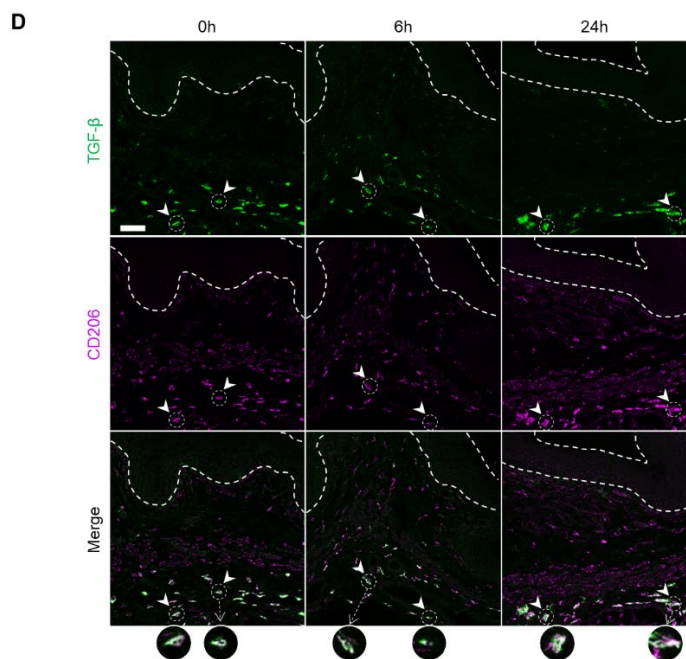
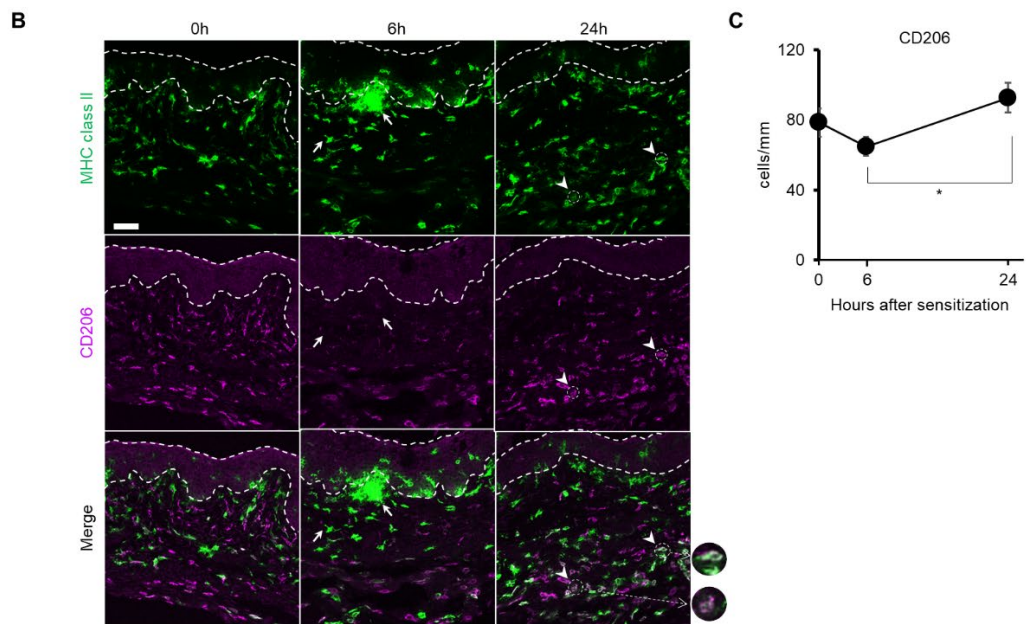
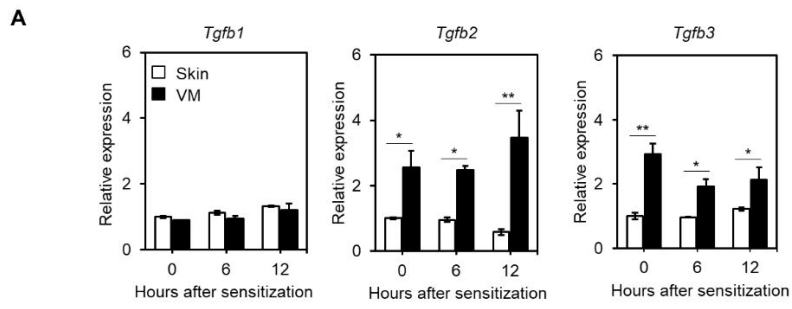


Figure 1-3

DNFB 感作後における TGF- β 発現と CD206 発現細胞

- (A) 感作後の皮膚 (Skin) と臍粘膜 (VM) における TGF- β の mRNA 発現。定量的リアルタイム PCR による *Tgfb1*、*Tgfb2*、*Tgfb3* の mRNA レベルを無処置 (0 時間) 皮膚に対する相対発現量として示す。データは平均値 $\pm$ SEM 値を示す (n=3)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$
- (B) 無処置および臍粘膜感作後 6、24 時間における MHC class II および CD206 発現。抗 MHC class II 抗体 (緑) および抗 CD206 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色した細胞の代表的な画像を示す。矢印は代表的な MHC class II 陽性 CD206 陰性細胞を指す。矢頭は代表的な MHC class II 陽性 CD206 陽性の円形型細胞を指す。ドットで囲った領域は上皮を示す。スケールバー; 50 μ m。
- (C) 粘膜固有層の基底側における基底膜の単位長さあたり CD206 陽性細胞数解析結果。データは平均値 $\pm$ SEM 値を示す (n=3)。* $P < 0.05$
- (D) 無処置と臍粘膜感作後 6、24 時間後の TGF- β と CD206 発現解析。T β RI-T β RII-Fc (緑) および抗 CD206 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色した細胞の代表的な画像を示す。矢頭は代表的な TGF- β /CD206 二重陽性細胞を指す。ドットで囲った領域は上皮を示す。スケールバー; 50 μ m。

第3節 考察

本章では、ハプテンによる皮膚および腔粘膜感作後の樹状細胞に着目したメカニズムを検討した。皮膚感作と比較して腔粘膜感作は、MHC class II 高発現 CD11c 陽性かつ FITC 陽性遊走樹状細胞の数が低く、迅速に MHC class II 陽性粘膜下樹状細胞が減少した。さらに、腔粘膜感作において、腔粘膜での *Tgfb* mRNA の高発現や CD206 陽性細胞の増加、さらに CD206 陽性細胞における TGF- β 発現が認められた。以上より、皮膚感作と比較して腔粘膜感作では樹状細胞の遊走や供給が減少し、その減少に TGF- β 産生性の CD206 陽性細胞が寄与している可能性が示唆された。

先行研究において、皮膚感作よりも腔粘膜感作で、接触過敏症応答（耳介腫脹や所属リンパ節における細胞増殖）が弱いことが明らかとなっている¹⁷⁾。本研究でも、その結果と一致し、皮膚感作よりも腔粘膜感作で、感作後の樹状細胞の遊走・供給が減弱されていた。これらの結果は、皮膚よりも腔粘膜の方が感作に対する感受性が低いことを示唆する。本研究は、接触過敏症の腔粘膜感作相におけるハプテンに対する樹状細胞応答に関する初めての報告である。

頬や舌下といった口腔粘膜では FITC 塗布後に粘膜下の MHC class II 陽性細胞が増加し、6 時間後にピークとなり、24 時間後には減少することが報告されている^{18,39)}。さらに、皮膚感作よりも頬粘膜感作では所属リンパ節における FITC 陽性 CD11c 陽性樹状細胞数が低いことが明らかとなっている¹⁸⁾。腔粘膜感作に関する本研究でもこれらの口腔粘膜感作の報告と同様の結果が得られた。腔粘膜と口腔粘膜はいずれも重層扁平上皮で覆われた II 型粘膜に分類され、皮膚と似た特徴を有すが、単層上皮で覆われた腸管や呼吸器粘膜のような I 型粘膜とは異なる^{24,38)}。したがって、II 型粘膜でのハプテン感作後の樹状細胞の供給・遊走のメカニズムは共通することが示唆される。

なぜ継続的な樹状細胞の遊走・供給が、皮膚感作に比べて腔粘膜感作で弱かったのかは未だ不明である。TGF- β は、遊走・成熟・抗原提示といった樹状細胞の機能の抑制に寄与することが報告されている^{36,38,40)}。また、腔粘膜上には TGF- β の全アイソフォームである TGF- β 1、TGF- β 2 および TGF- β 3 が発現しており⁴¹⁾、タンパク質抗原 ovalbumin 特異的な T 細胞増殖において腔粘膜抗原提示細胞を抑制する⁴²⁾。舌下粘膜への抗原の繰り返し塗布では、CD206 陽性免疫寛容マクロファージが誘導され樹状細胞の機能を抑制する⁴³⁾。本研究では、腔粘膜において皮膚よりも *Tgfb2* と *Tgfb3* の mRNA が高発現しており、腔粘膜で CD206 陽性細胞は TGF- β を発現していることが明らかとなった (Figure 1-3A, D)。また、腔粘膜感作後 24 時間に粘膜固有層の基底側における MHC class II 陽性 CD206 陽性細胞の増加も認められた (Figure 1-3B, C)。以上の結果より、ハプテン感作後の腔粘膜では CD206 陽性細胞が TGF- β 2 と TGF- β 3 の産生・放出を介して樹状細胞の遊走・供給を抑制していることが示唆された。今回認められた CD206 陽性 M2 型マクロファージ様の細胞の由来については、TGF- β による組織上の樹状細胞の形質転換やマクロファージの M2 型への変化、血管由来の単球の分化など複数が考えられ

今後より詳細なメカニズム解析が必要である。

膣粘膜は、感染や有害な環境への侵襲から生体を守ると共に、免疫寛容誘導部位としても知られ、その効果は性ホルモンにより制御される⁴⁴⁾。本研究より TGF- β 産生 CD206 陽性細胞が膣粘膜における免疫寛容誘導に寄与している可能性がある。また、その作用は、性ホルモンの周期によって制御されているかもしれない。マウスの性周期は、発情前期、発情期、発情後期および発情休止期の 4 つに分けられる³⁰⁾。合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロールは、TGF- β 1、TGF- β 2 および TGF- β 3 の発現を増加させる³⁰⁾。エストロゲンの産生・放出レベルは発情前期にピークを迎える⁴⁵⁾。エストラジオールは、膣粘膜上の細胞によって局所的に産生される TGF- β を介して膣粘膜における抗原提示を抑制する⁴¹⁾。それゆえ、TGF- β 産生 CD206 陽性細胞は、エストロゲンレベルに依存して性周期において変化する可能性が考えられる。本研究では、発情休止期におけるマウスを用いたが、膣粘膜におけるハプテン感作や免疫寛容誘導における性周期の影響を明らかにする更なる検討が必要である。

第4節 小括

本章では皮膚と比較して膣粘膜におけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や供給について解析を行った。その結果、膣粘膜感作後の遊走樹状細胞数や粘膜下樹状細胞数の減少が明らかとなった。さらに、膣粘膜感作では、膣粘膜における TGF- β 高発現、MHC class II 陽性 CD206 陽性細胞が増加し、CD206 陽性細胞における TGF- β 発現が認められた。以上より、皮膚に比べて膣粘膜は、樹状細胞の継続的な遊走・供給が TGF- β 産生 CD206 陽性細胞により抑制されるために接触過敏症応答が弱いことが示唆された。これらの結果は、アレルギー性接触皮膚炎における膣粘膜感作メカニズムや膣粘膜における免疫寛容誘導への理解を深める一助となることが期待される。

第2章 アトピー性皮膚炎発症部位のハプテン感作における樹状細胞に着目したメカニズムの解明

アレルギー性接触皮膚炎は、アトピー性皮膚炎患者においても発症し得る^{10,11)}。アトピー性皮膚炎は、皮膚バリア機能低下、遺伝的素因、免疫異常など様々な因子によって生じる慢性的な皮膚炎である⁴⁶⁻⁴⁸⁾。アトピー性皮膚炎患者では皮膚バリア機能低下により化学物質の曝露が増加するために、アレルギー性接触皮膚炎発症のリスクが増加する可能性が考えられている。しかしながら、アトピー性皮膚炎患者の集団において、アレルギー性接触皮膚炎発症頻度が高いという報告もあれば、逆に発症頻度が低いという報告も存在する^{10,11)}。加えて、臨床研究において、アトピー性皮膚炎患者は、Th1 偏向のアレルギー性接触皮膚炎応答の減弱を示している^{23,49)}。これは、アトピー性皮膚炎患者では Th2 優位な状態であることが原因かもしれないと考察されている。また、接触過敏症モデルマウスを用いた複数のアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける接触過敏症応答も研究されている^{22,50-54)}。しかしながら、アトピー性皮膚炎患者におけるアレルギー性接触皮膚炎の応答減弱のメカニズムは分かっていない。近年、我々の先行研究から臨床研究と同様にアトピー性皮膚炎を誘導した NC/Nga マウス (AD マウス) がアトピー性皮膚炎を誘導していないマウス (non-AD マウス) よりも接触過敏症応答が弱く、細胞傷害性 T リンパ球抗原-4 (CTLA-4) 陽性 T 細胞がその抑制に関与していることが明らかとなった²²⁾。ただし、この結果は、ハプテン 1 物質のみに対する検討であり、接触過敏症の感作相において重要な役割を担う樹状細胞に着目した検討は行われていない^{5,55)}。アトピー性皮膚炎発症皮膚では、定常状態と比較して皮膚上の樹状細胞数やサブセット、フェノタイプが変化する^{56,57)}。また、アトピー性皮膚炎では Th1/Th2/Th17 サイトカイン (例. IFN- γ , IL-4, IL-17) を含む様々なサイトカインの変化などの免疫異常が認められる^{46,47)}。さらに、樹状細胞の遊走・成熟は、種々サイトカイン (例. IL-4, IFN- γ) を含む様々な因子の影響を受ける⁵⁸⁻⁶⁰⁾。以上より、アトピー性皮膚炎における接触過敏症の感作相には、樹状細胞の遊走や成熟に変化が生じているのではないかと考えた。そこで、本研究ではアトピー性皮膚炎発症部位におけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟について解析を行った。第2章の原著論文は *Biochemical and Biophysical Research Communications* にて報告されたものである⁶¹⁾。

第1節 実験

1. 動物

NC/Nga マウスは、10 週齢の雌マウスを日本 SLC より購入し、11-12 週齢のマウスを実験に供した。なお、本実験は、花王動物実験委員会において承認され、委員会のガイドラインに従って実施した（承認番号：S20004-0000）。

2. NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎誘導

アトピー性皮膚炎を誘導するために、過去の報告^{22, 62)}と同様にコナヒョウヒダニ由来アレルギーを含む軟膏（Biostir-AD, Biostir Inc., Osaka, Japan）を適用した。まず初めに、100 mg の Biostir-AD を剃毛したマウスの背部皮膚と両耳表面に塗布した。2 回目以降は 150 μ L の 4% sodium dodecyl sulfate を剃毛した背部皮膚と両耳表面に塗布し、乾燥後に 100 mg の Biostir-AD を剃毛した背部皮膚と両耳表面に塗布した。背部皮膚への Biostir-AD の塗布は、3 週間、週 2 回行った。一方、両耳表面への塗布は、接触過敏症応答比較のためにアトピー性皮膚炎の誘発による過剰な耳介腫脹を避ける目的で初回と 2 回目のみ塗布した²²⁾。初回の Biostir-AD 塗布後 21 日目に NC/Nga マウスの皮膚炎の状況をスコア化して判定した。

3. 接触過敏症モデル

皮膚感作は、過去の報告⁶³⁾と同様に 150 μ L の 1.0% FITC を剃毛した背部皮膚へ塗布することで誘導した。皮膚炎非誘発（Non-AD）マウスとアトピー性皮膚炎誘発（AD マウス）で塗布面積は同様にした。FITC の溶媒には acetone/dibutyl phthalate (1:1) 混合溶液を用いた。感作後 5 日目に 40 μ L の 0.5% FITC を右耳の両面に、40 μ L の溶媒コントロールを左耳の両面に塗布することで接触過敏症を惹起した。耳介厚を惹起前および惹起後 24, 48, 72 時間後にデジタルシックネスゲージ（Mitutoyo, Kanagawa, Japan）を用いて測定した。耳介腫脹は次の式を用いて定量した。

$$\text{耳介腫脹} = (\text{惹起後右耳介厚} - \text{惹起前右耳介厚}) - (\text{惹起後左耳介厚} - \text{惹起前左耳介厚})$$

4. T 細胞増殖

FITC 感作後 5 日目に腋窩および鼠経リンパ節を採取し、単一細胞懸濁液を調製した。BrdU Flow Kit（BD Biosciences）を用いて FITC 感作後の所属リンパ節における T 細胞増殖を解析した。平底タイプの 96 ウェルプレートに 2×10^5 細胞を播種し、10 μ M の BrdU で 12 時間インキュベートした。Fc レセプターをブロックするために、BrdU 標識した細胞に抗 CD16/32 抗体（BD Biosciences）で前処理を行った。その後、PE 標識抗 CD4（RM4-5）抗体と APC/Cyanine7 標識抗 CD8（53-6.7）抗体を用いて染色を行った。細胞表面抗原染色後に APC 標識抗 BrdU 抗体を用いて取り込まれた BrdU の染色を行った。染色後、BD FACSLytic フローサイトメーターと FlowJo 解析用ソフトウェア（BD

Biosciences) を用いて解析した。BrdU 取り込み細胞 (増殖細胞) の割合を結果として示す。

5. 細胞培養とサイトカイン測定

2 mM の L-glutamine と 25 mM の N-2-hydroxyethylpiperazine-N 9-2-ethanesulfonic acid を含む RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) に 10% heat-inactivated fetal calf serum、50 μ M の 2-mercaptoethanol、1 $\times$ MEM nonessential amino acid solution、100 units/mL の penicillin、100 μ g/mL の streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を添加したものを培養培地として使用した。

FITC 特異的な応答を解析するために、FITC 感作後 5 日目に腋窩および鼠経リンパ節を採取し、単一のリンパ節細胞懸濁液を調製した。過去の報告⁶⁴⁾と同様に、平底タイプの 96 ウェルプレートに 4×10^5 細胞を播種し、40 μ g/mL の FITC 添加有無について 37°C で 72 時間培養した。interferon (IFN)- γ と interleukin (IL)-4 のサイトカインレベルは enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いて測定した。ELISA キットは R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) と BioLegend からそれぞれ購入した。

6. 樹状細胞遊走

樹状細胞遊走は、第 1 章第 1 節と同様に解析した。背部皮膚への FITC 感作後 24 時間に腋窩および鼠経リンパ節を採取した。リンパ節から単一細胞懸濁液を調製するために、リンパ節を 400 U/L の collagenase type I (Sigma-Aldrich) 溶液に浸漬し、37°C、30 分間処理した。その後、5 mM の ethylenediaminetetraacetic acid を添加し 10 分間インキュベートした。Fc レセプターをブロックするために、単一細胞懸濁液を抗 CD16/32 抗体 (BD Biosciences) で前処理した。染色には蛍光色素標識モノクローナル抗体として BD Biosciences もしくは BioLegend から購入した PE-Cy7 標識抗 CD11c (HL3) 抗体、PE 標識抗 MHC class II (M5/114.15.2) 抗体、BV510 標識抗 CD326 (G8.8) 抗体、APC/Cyanine7 標識抗 CD103 (2E7) 抗体、BV510 標識抗 CD80 (16-10A1) 抗体、APC 標識抗 CD86 (GL1) 抗体、BV421 標識抗 PD-L1 (MIH5) 抗体を用いた。死細胞は 7-aminoactinomycin D (7-AAD、BD Biosciences) により染色し除去した。染色後、BD FACSVerse フローサイトメーターと FlowJo 解析用ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞 (遊走樹状細胞) 数を結果として示す。

7. セルソーティングと定量的リアルタイム PCR

感作後、遊走樹状細胞の分離回収は、過去の報告と類似の方法で行った^{65,66)}。FITC 感作後 24 時間に 1 サンプルあたり 3 個体分の腋窩および鼠経リンパ節を採取し、リンパ節をプールした。単一のリンパ節細胞懸濁液は前述の通り調製した。CD11c 陽性細胞は

CD11c Microbeads UltraPure および autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) を用いて分離した。抗 CD16/32 抗体 (BD Biosciences) でブロッキング後、分離した細胞は、PE 標識抗 MHC class II (M5/114.15.2) 抗体で染色した。MHC class II 高発現 FITC 陽性細胞を BD FACSAria III セルソーター (BD Biosciences) で分離回収した。

トータル RNA は RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) を用いて抽出した。トータル RNA サンプルから High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を調製した。Taqman Gene Expression Assay と QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて定量的リアルタイム PCR を実施した。TaqMan プローブは IL-10 (Mm00439614_m1)、TGF- β 1 (Mm01178820_m1)、 β -actin (Mm00607939_s1) を用いた。 β -actin を内在性コントロールとした。2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法により求めた mRNA 発現量を non-AD と比較した結果として示す。

6. 統計的解析

統計解析は two-way analysis of variance with Tukey's multiple-comparison test もしくは unpaired two-tailed Student's t-test を用いて GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) により行った。*P* 値が 0.05 未満のとき統計的に有意であるとした。

第2節 結果

1. Non-AD および AD マウスにおける接触過敏症応答

先行研究において、non-AD マウスに比べて AD マウスは接触過敏症応答が弱いことが明らかとなっている²²⁾。しかしながら、本検討は代表的なハプテンである DNFB のみによる検討結果であり、他のハプテンに対する接触過敏症応答の検討は報告がない。そこで、本章では、まず DNFB 以外のハプテンに対する接触過敏症応答を non-AD マウスと AD マウスで比較することにした。ハプテンとしては、Th1 型の免疫応答を誘導する DNFB とは異なる Th2 型の免疫応答を誘導し^{5,67)}、感作後の遊走樹状細胞の特定に一般的に用いられる FITC⁶³⁾を使用した。FITC を用いた接触過敏症応答の比較の結果を Figure 2-1 に示す。AD マウスについては、アトピー性皮膚炎誘導後に背部皮膚へ FITC を塗布した (Figure 2-1A)。Non-AD マウスおよび AD マウスのいずれも背部皮膚へ FITC を塗布することで感作し、感作後 5 日目に耳介に対して FITC を塗布することで惹起した。Non-AD マウスと AD マウスいずれにおいても、未感作群 (sensitization -) に対して感作群 (sensitization +) で耳介腫脹が認められ、その応答は、惹起後 48 時間にピークとなった (Figure 2-1B)。しかしながら、耳介腫脹は、non-AD マウスよりも AD マウスで有意に低かった (48 時間後 53%; $P < 0.01$ 、72 時間後 52%; $P < 0.05$)。以上より、DNFB を用いた過去の検討と同様に FITC をハプテンとして用いた接触過敏症応答においても AD マウスでは応答が弱いことが明らかとなった。

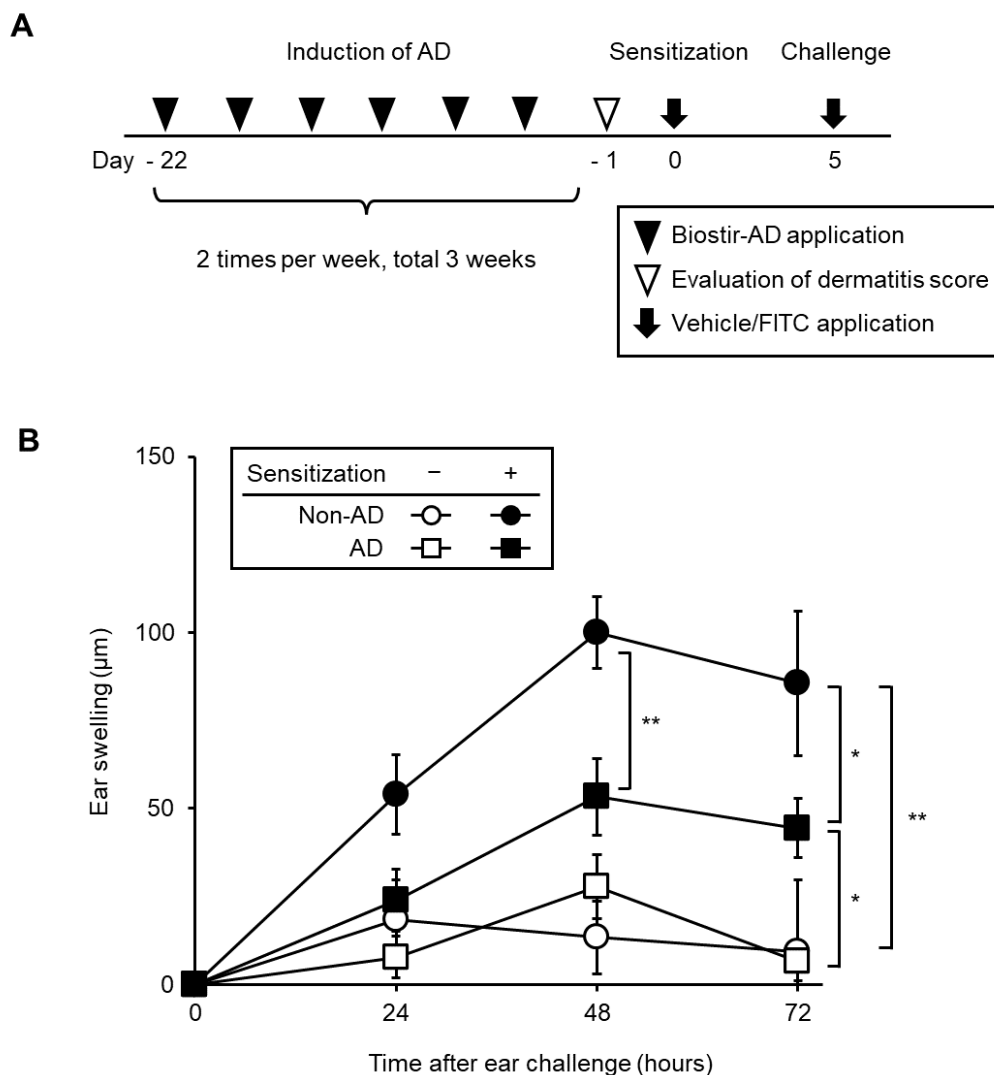


Figure 2-1

Non-AD および AD マウスにおける FITC 感作による接触過敏症応答

(A) NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎 (AD) と接触過敏症の誘導

(B) FITC 未感作 (sensitization-) および感作後 (sensitization+) の non-AD マウス、AD マウスにおける接触過敏症応答

データは平均値 $\pm$ SEM 値を示す (n=4-6)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test)。

2. Non-AD および AD マウスにおける FITC 感作後 T 細胞増殖と T 細胞によるサイトカイン産生

第 1 章の臍粘膜感作では、皮膚感作に対してハプテン感作後 T 細胞増殖についても減少していることが明らかとなっている¹⁷⁾。そこで次に、ハプテン感作後 T 細胞増殖が non-AD マウスと AD マウス間でも異なるかを明らかにするために、FITC 感作後の所属リンパ節細胞における BrdU 取り込みを指標として non-AD マウスと AD マウスのハプテン感作後 T 細胞増殖を比較した。Non-AD マウスと AD マウスいずれにおいても未感作群 (sensitization-) と比較して感作群 (sensitization+) において CD4 陽性もしくは CD8 陽性細胞中 BrdU 陽性細胞割合が有意に増加 (1.6-8.3 倍) した (Figure 2-2A, B)。しかしながら、FITC 感作後 non-AD マウスと比較して FITC 感作後の AD マウスの T 細胞では CD4 陽性もしくは CD8 陽性細胞中 BrdU 陽性細胞割合が有意に低かった (約 30%) (Figure 2-2A, B)。

さらに、non-AD マウスと AD マウス間の FITC 感作後所属リンパ節におけるハプテン感作後 T 細胞によるサイトカイン産生を比較した。FITC 感作後の non-AD マウス、AD マウスから得られた所属リンパ節細胞を FITC で再刺激あり、もしくは再刺激なし (培地コントロール (medium)) の条件で培養した。FITC 感作後 non-AD マウスおよび AD マウス由来のリンパ節細胞いずれについても FITC 再刺激後 72 時間に IFN- γ と IL-4 の産生が認められた (Figure 2-2C, D)。Non-AD マウスと AD マウス間のサイトカイン産生量を比較すると、IL-4 レベルは同等であった (Figure 2-2D)。一方で、non-AD マウスと比較して AD マウスの T 細胞では IFN- γ レベルが有意に低かった (約 20%) (Figure 2-2C)。以上より、AD マウスではハプテン感作後の T 細胞の増殖や活性化が低く、接触過敏症応答 (耳介腫脹) が減弱される可能性が示された。

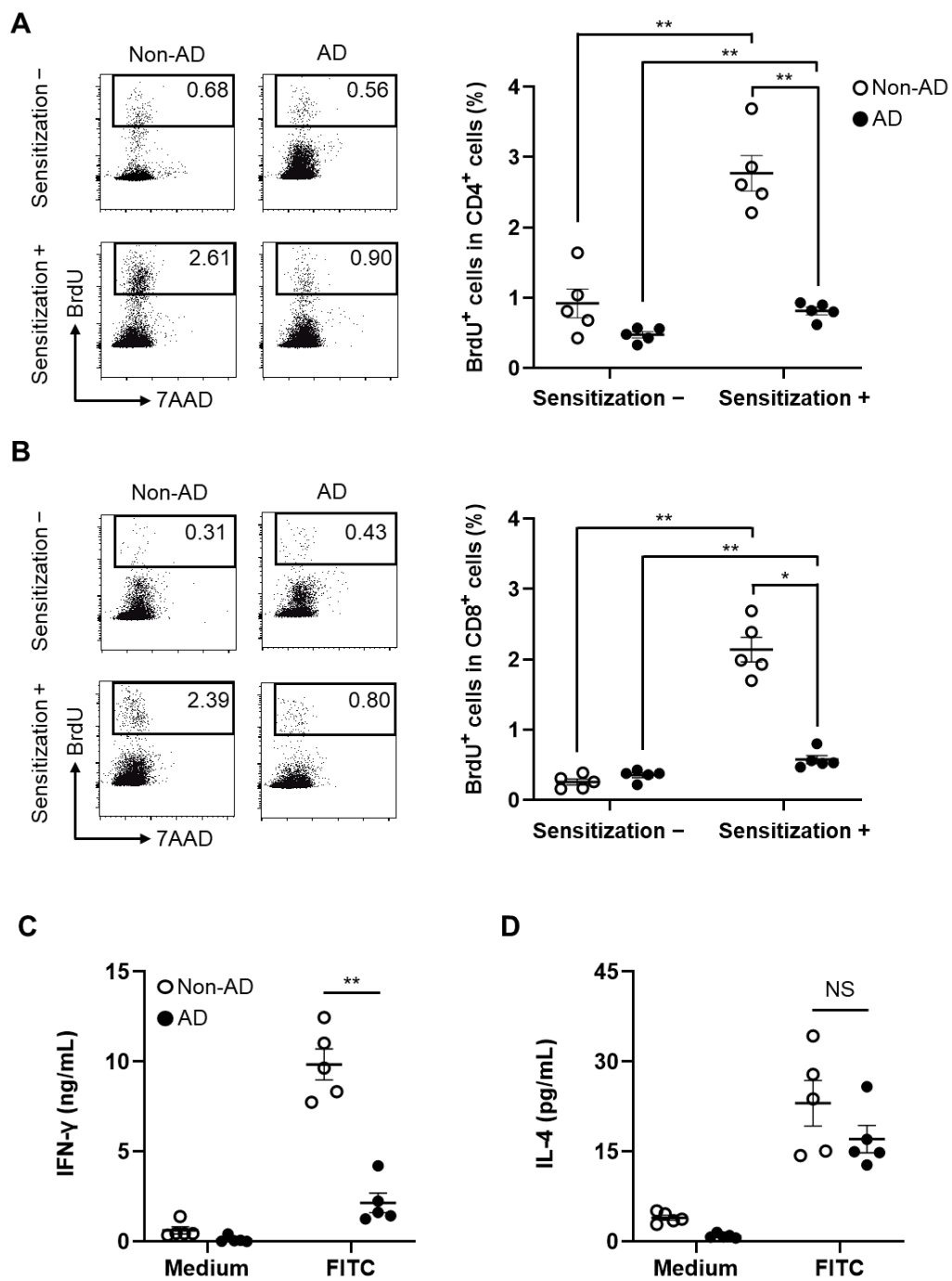


Figure 2-2

Non-AD および AD マウスのリンパ節における FITC 感作後の T 細胞増殖および T 細胞によるサイトカイン産生

FITC 感作後 5 日目に non-AD マウスまたは AD マウスから採取した所属リンパ節由来の所属リンパ節細胞を BrdU で標識し、フローサイトメトリーにより CD4 陽性もしくは

は CD8 陽性細胞中の BrdU 取り込みを解析した。

(A) 代表的な CD4 陽性細胞のフローサイトメトリープロットおよび CD4 陽性細胞中 BrdU 陽性細胞の割合

(B) 代表的な CD8 陽性細胞のフローサイトメトリープロットおよび CD8 陽性細胞中 BrdU 陽性細胞の割合

FITC 感作後 5 日目に non-AD マウス、AD マウスから採取した所属リンパ節由来の細胞を FITC 再刺激もしくは溶媒コントロールの条件で 72 時間培養し、上清中サイトカインレベルを ELISA により解析した。

(C) IFN- γ レベル

(D) IL-4 レベル

丸は各個体データ、バーは平均値 $\pm$ SEM 値を示す (n=5)。* P <0.05、** P <0.01 (two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test)。

3. ハプテン感作後 non-AD および AD マウスにおける樹状細胞遊走

抗原を取り込んだ樹状細胞の遊走は、接触過敏症の感作相において必須である^{5, 55)}。そこで、FITC 感作後の樹状細胞の遊走を解析した。その結果、non-AD マウスよりも AD マウスで未感作群 (sensitization-) と感作群 (sensitization+) いずれにおいても、MHC class II 高発現 CD11c 陽性遊走樹状細胞のトータル数は有意に高かった (Figure 2-3A)。これはアトピー性皮膚炎の誘導によって増加したものと考えられる。一方で、所属リンパ節中の 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 マウス間で大きく変わらなかった (Figure 2-3B)。皮膚の樹状細胞は、EpCAM 陽性ランゲルハンス細胞、CD103 陽性真皮樹状細胞、CD103 陰性真皮樹状細胞の少なくとも 3 つのサブセットに分けられる⁶⁸⁾。そこで、各サブセットに対しても non-AD マウスと AD マウス間で、ハプテン感作後の樹状細胞の遊走に変化がないかを解析した。フローサイトメトリーにより MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞における EpCAM 陽性ランゲルハンス細胞、CD103 陽性真皮樹状細胞、CD103 陰性真皮樹状細胞の 3 つのサブセットを同定した (Figure 2-3C)。その結果、各サブセットについても MHC class II 高発現 CD11c 陽性かつ FITC 陽性遊走樹状細胞数は、non-AD マウスと AD マウス間で大きな変化はなかった (Figure 2-3D)。以上の結果より、アトピー性皮膚炎は、接触過敏症の感作相における樹状細胞遊走に影響を与えないことが示された。

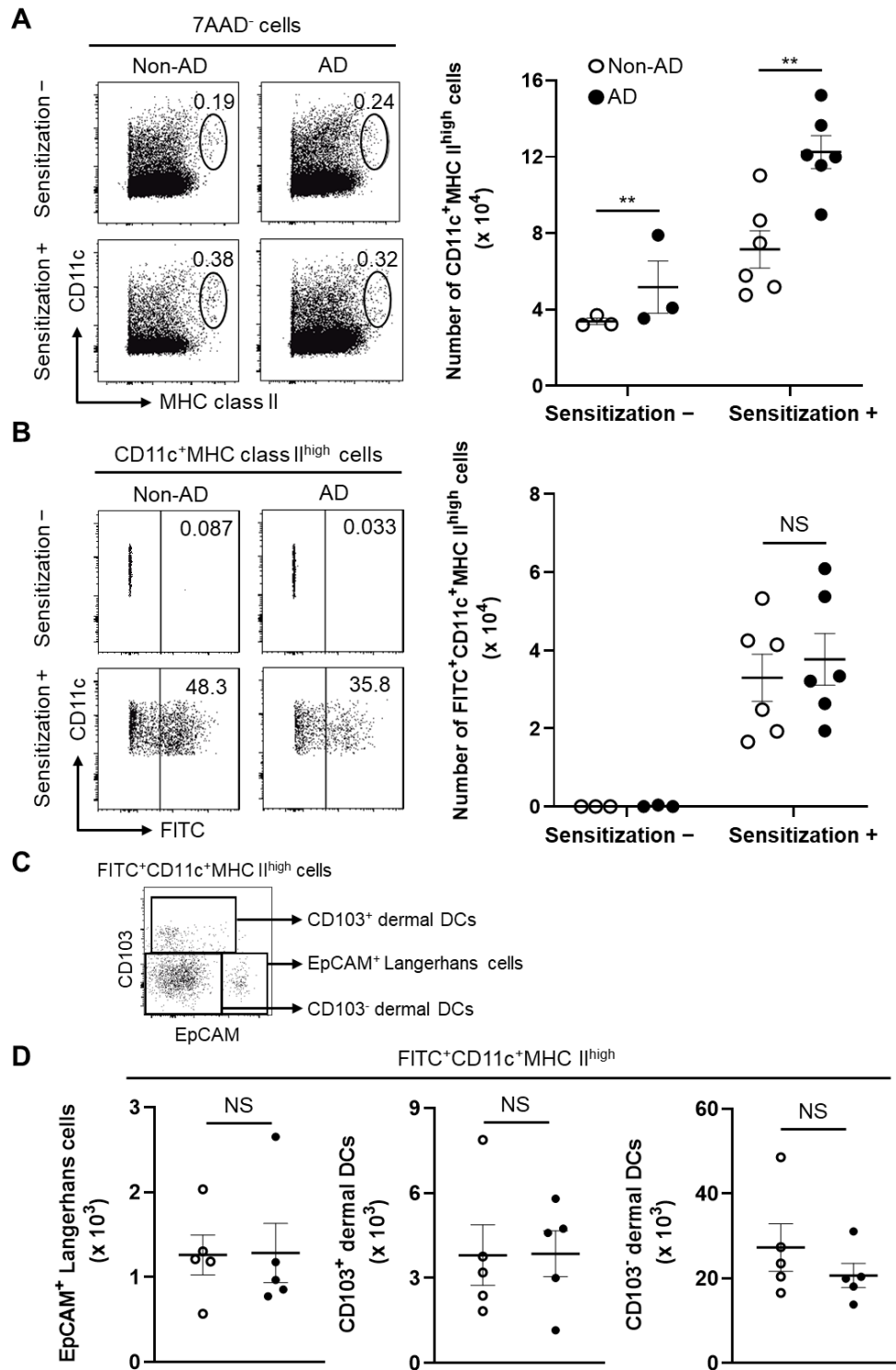


Figure 2-3

Non-AD および AD マウスのリンパ節における FITC 感作後遊走樹状細胞の変化
FITC 感作後 24 時間における所属リンパ節中の MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽

性遊走樹状細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。

- (A) MHC class II 高発現 CD11c 陽性遊走樹状細胞の同定における代表的なフローサイトメトリープロットおよび FITC 感作後もしくは未感作 non-AD マウスと AD マウスの所属リンパ節中の MHC class II 高発現 CD11c 陽性遊走樹状細胞数
- (B) MHC class II 高発現 CD11c 陽性細胞中 FITC 陽性遊走樹状細胞の同定における代表的なフローサイトメトリープロットおよび FITC 感作後もしくは未感作 non-AD マウスと AD マウスの所属リンパ節中の MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数
- 丸は各個体データ、バーは平均値±SEM 値を示す (n=3-6)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (two-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test)。NS は有意差なし。
- (C) MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞における EpCAM 陽性ランゲルハンス細胞、CD103 陽性真皮樹状細胞、CD103 陰性真皮樹状細胞の同定におけるフローサイトメトリーゲーティング戦略
- (D) FITC 感作後 non-AD マウスと AD マウスの所属リンパ節中の EpCAM 陽性 MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞、CD103 陽性 MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞、CD103 陰性 MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞数
- 丸は各個体データ、バーは平均値±SEM 値を示す (n=5)。NS は有意差なし (Student's t-test)。

4. Non-AD および AD マウスにおける FITC 感作後樹状細胞の成熟と免疫寛容性

AD マウスで感作後の樹状細胞遊走に変化は認められなかったが、アトピー性皮膚炎における免疫異常が樹状細胞の成熟に影響を与える可能性が考えられる。そこで、FITC 感作後 24 時間における MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞上の表面分子の発現レベルを解析した (Figure 2-4)。その結果、non-AD マウスよりも 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である CD80 と CD86 の発現レベル (MFI: 蛍光強度の中央値) が低下した (CD86; 64%, CD80; 45%) (Figure 2-4A)。このことから、AD マウスでは、ハプテン感作後の樹状細胞の成熟が抑制されることが示された。

T 細胞増殖を抑制する免疫寛容性樹状細胞は、CD80 や CD86 といった共刺激分子の発現低下や PD-L1 のような免疫応答抑制性分子の発現上昇、IL-10 や TGF- β のような抗炎症性 (抑制性) サイトカインの産生増加などの特徴を有す^{69, 70)}。そこで次に、MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞における PD-L1 および *Il-10* mRNA、*Tgfb1* mRNA の発現を解析した。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 陽性遊走樹状細胞における PD-L1 発現レベルは増加していた (129%) (Figure 2-4A)。さらに、FITC 感作後 24 時間に non-AD マウスおよび AD マウスから採取した所属リンパ節細胞から MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞を分離回収し、免疫抑制性サイトカイン *Il-10*、*Tgfb1* の mRNA 発現を解析した。*Il-10* mRNA 発現については、non-AD マウスと AD マウスで有意な差は認められなかったが、*Tgfb1* 発現については non-AD マウスよりも AD マウス由来の MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞の方が 2.3 倍高かった (Figure 2-4B)。以上より AD マウスにおいて、感作後樹状細胞の成熟が抑制され免疫寛容性が誘導される可能性が示された。この樹状細胞における免疫寛容性誘導により、ハプテン感作後の T 細胞応答や接触過敏症応答が減弱した可能性が考えられる。

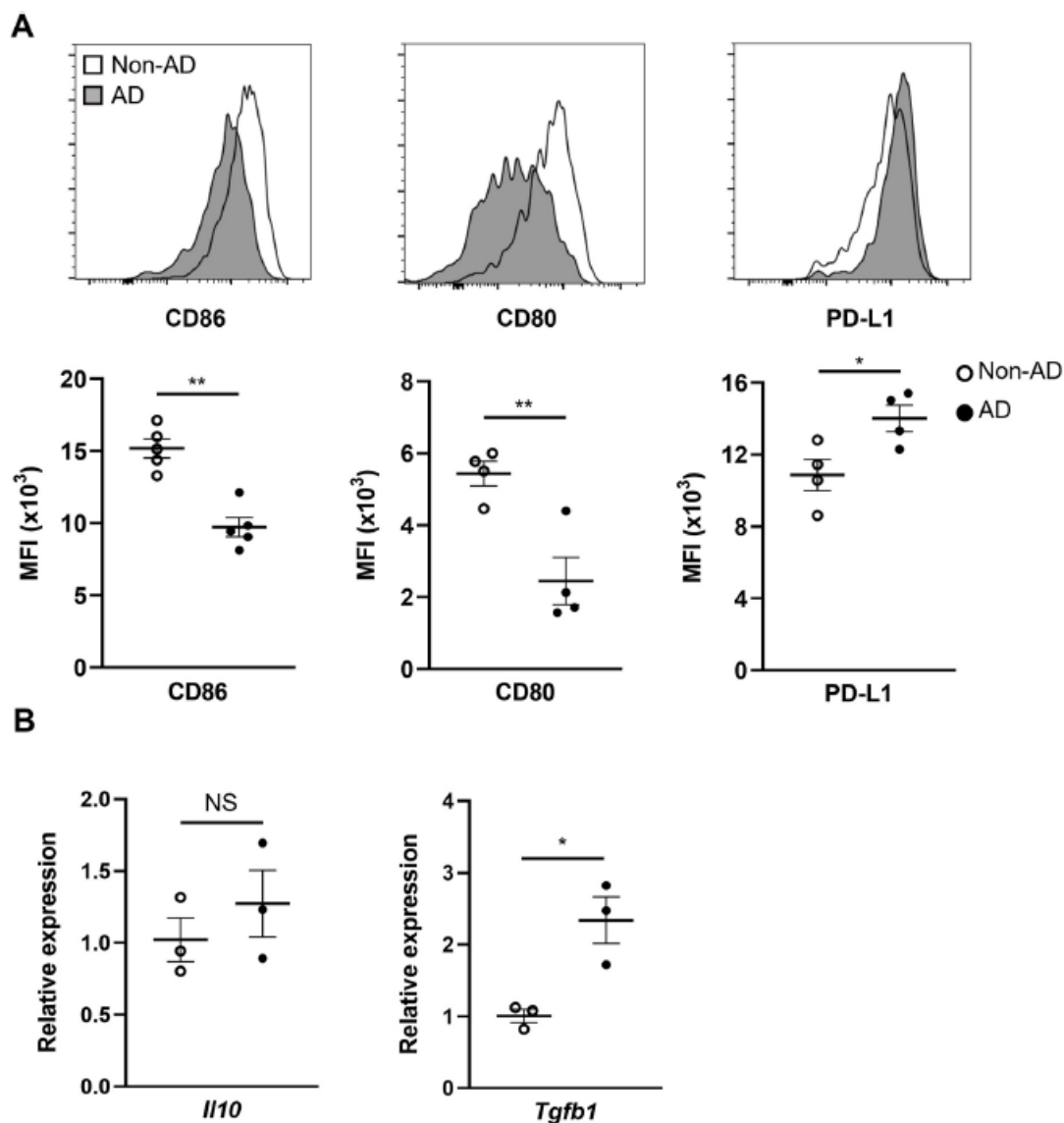


Figure 2-4

Non-AD マウスおよび AD マウスにおける FITC 感作後の遊走樹状細胞の成熟と免疫寛容性

FITC 感作後 24 時間の non-AD マウスおよび AD マウスの所属リンパ節における MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞上の CD80、CD86、PD-L1、*Il-10* mRNA、*Tgfb1* mRNA の発現レベルを解析した。

(A) MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞上の CD80、CD86、PD-L1 発現を解析した代表的なヒストグラム。実線は non-AD マウス、網掛け領域は AD マウスの結果を示す。グラフは MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞上の CD80、CD86、PD-L1 発現レベルを蛍光強度の中央値として示す。丸は各個体データ、バーは平均値 $\pm$ SEM 値を示す (n=5)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Student's t-test)。

(B) FITC 感作後 24 時間の non-AD マウスおよび AD マウスの所属リンパ節由来 MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性細胞における *Il-10*、*Tgfb1* の mRNA 発現
丸は各個体データ、バーは平均値±SEM 値を示す (n=3)。* $P < 0.05$ (Student's t-test)。
NS は有意差なし。

第3節 考察

本章では、アトピー性皮膚炎発症部位におけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟について検討した。過去の AD マウスにおける接触過敏症応答の検討は DNFB に対してのみであったため、まず、FITC による接触過敏症応答を non-AD マウス・AD マウス間で比較したところ、AD マウスでは、ハプテン感作後 T 細胞増殖が弱くサイトカイン産生も抑制され、耳介腫脹が有意に低いことが明らかとなった。続いて、樹状細胞に着目したメカニズムの解析を行った結果、non-AD マウスに比較して AD マウスでは、MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞の CD80、CD86 発現が減少し、PD-L1 発現が上昇し、*Tgfb1* の mRNA 発現が上昇するといった免疫寛容性を示した。以上の結果より、ハプテン感作後の樹状細胞の免疫寛容性誘導がアトピー性皮膚炎発症におけるハプテン感作後の T 細胞応答や接触過敏症応答の低下に寄与する可能性が示唆された。今回の本研究結果は、アトピー性皮膚炎におけるハプテン感作後の樹状細胞の遊走や成熟のメカニズムに関する初めての報告である。

2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) を用いた過去の臨床研究において、Th2 優位な状態であるアトピー性皮膚炎患者は、Th1 型のアレルギー性接触皮膚炎応答の減弱を示すことが報告されており、Th2 優位な状態がハプテンによる Th1 型応答の減弱に寄与することが考えられている²³⁾。加えて、先行研究で DNFB を用いた AD マウスにおける接触過敏症応答の減弱も報告されている²²⁾。DNCB/DNFB、FITC いずれも代表的なハプテンであり、Th1 型、Th2 型の接触過敏症応答をそれぞれ誘導することが知られている^{5, 67)}。DNCB/DNFB を用いた過去の検討結果と一致して、FITC を用いた本研究においても AD マウスでの接触過敏症応答（耳介腫脹）の減弱が認められた。以上より、本研究の知見は、ハプテンの種類に依らないことが示唆された。

接触過敏症の感作相において樹状細胞の遊走や成熟は必須である^{5, 55)}。ハプテンを認識した樹状細胞は、成熟、所属リンパ節への遊走を経て、ナイーブ T 細胞への抗原提示、T 細胞増殖・分化を誘導する。逆に、免疫寛容性樹状細胞は、共刺激分子の発現低下、抑制性分子の発現上昇、および抗炎症性サイトカインの分泌増加といった作用を示し、様々なメカニズムを介して T 細胞増殖などの T 細胞応答の抑制に働くことが知られている⁶⁹⁻⁷¹⁾。本研究において、non-AD マウスおよび AD マウス間でいずれの FITC 感作後の樹状細胞サブセットにおいても、MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞数は同等であったが、non-AD マウスよりも AD マウスにおいて MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞は免疫寛容性を示した。以上より、ハプテンを取り込んだ遊走樹状細胞の数ではなく、感作後の遊走樹状細胞の成熟抑制・免疫寛容性誘導が AD マウスにおける感作後 T 細胞応答・接触過敏症応答の抑制に寄与した可能性が考えられる。

PD-L1 は、Th2 型免疫応答ではなく Th1 型免疫応答の減弱における（IL-4 ではなく）IFN- γ の減少に働く免疫抑制性因子であることが知られている⁷²⁾。本研究において、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 PD-L1 発現増加および、IL-4 ではなく IFN- γ のハプテン感作後 T 細胞による産生減少が認められた。これらの知見より AD マウスでは PD-L1 を介して IFN- γ の選択的な抑制が生じることが示唆された。

AD マウスの MHC class II 高発現 CD11c 陽性 FITC 陽性遊走樹状細胞において、なぜ免疫寛容性が誘導され成熟が抑制されたか、などの詳細な抑制メカニズムは未だ不明である。アトピー性皮膚炎患者や AD モデルマウスでは、CTLA-4 陽性制御性 T 細胞が増加することが知られている⁷³⁾。また、制御性 T 細胞は、CTLA-4 を介して CD86/80 を抑制することが報告されている⁷⁴⁾。以上より、AD マウスでは、制御性 T 細胞上の CTLA-4 を介してハプテンを認識した樹状細胞の免疫寛容性が誘導され、その後の T 細胞応答および接触過敏症応答が減弱した可能性が考えられる。

本研究では、皮疹の中でもアトピー性皮膚炎に着目したが、乾癬など他の皮疹でも接触過敏症は誘導される¹²⁾。また、アトピー性皮膚炎同様に様々な炎症性皮膚疾患において、制御性 T 細胞が増加していることが報告されている¹⁶⁾。他の皮疹でもアトピー性皮膚炎と同様の接触過敏症に対する抑制機構が働くかもしれない。

本章では、ハプテン感作後遊走樹状細胞の免疫寛容性誘導が、接触過敏症応答の低下に寄与していることを示唆したが、アトピー性皮膚炎における Th2 優位な免疫状態²³⁾や制御性 T 細胞増加⁷⁵⁾といった他の細胞や因子の抑制機構への関与も考えられる。しかしながら、細胞特異的な機能解析は、実施できておらず、いずれの細胞や因子がアトピー性皮膚炎における接触過敏症応答の抑制に優先的に働くかは不明である。本メカニズムの解明のためには、アトピー性皮膚炎および接触過敏症を誘導した制御性 T 細胞特異的 CTLA-4 欠損マウスや樹状細胞特異的 PD-L1 欠損マウスといった遺伝子改変マウスを用いた検討が必要である。

第4節 小括

本章では、アトピー性皮膚炎発症部位でのハプテン感作後の接触過敏症応答、ハプテン感作後 T 細胞によるサイトカイン産生、T 細胞増殖の低下およびハプテン感作後の遊走樹状細胞の免疫寛容性誘導が明らかとなった。これらの結果は、ハプテンの種類に依らないことも示唆された。アトピー性皮膚炎における接触過敏症応答の抑制には、Th2 優位な免疫状態や制御性 T 細胞の増加が寄与していることも考えられるが、本研究では、FITC により感作を誘導した AD マウスを用いて、ハプテン感作後樹状細胞の免疫寛容性の寄与を新たに示した。今後、接触過敏症応答の抑制に関する更なる詳細なメカニズム解明や他の皮疹部でのメカニズム共通性の検討が必要であると考ええる。本知見が、アトピー性皮膚炎におけるハプテン感作接触過敏性応答のメカニズムへの理解を深めることや免疫寛容性樹状細胞の誘導によるアレルギー性接触皮膚炎の抑制・治療に有用であることが期待される。

総括

本研究では、粘膜や皮疹部におけるハプテン感作抑制メカニズムを樹状細胞に着目して解明することを目的として、膣粘膜のハプテン感作とアトピー性皮膚炎発症部位のハプテン感作の二つの場合における樹状細胞応答等について健常皮膚のハプテン感作との比較検討を行った。

第1章では、膣粘膜のハプテン感作による接触過敏症での樹状細胞の遊走や供給を解析した。皮膚感作に対して膣粘膜感作では感作後の遊走樹状細胞の数が低く、感作後の末梢組織上における樹状細胞の継続的な供給についても弱いことが明らかとなった。また、皮膚感作よりも膣粘膜感作で *Tgfb* mRNA 発現が高く、MHC class II 陽性 CD206 陽性細胞の増加、CD206 陽性細胞における TGF- β 発現が認められた。これらの結果より、皮膚よりも膣粘膜感作では樹状細胞の継続的な遊走・供給が抑制されるために接触過敏症応答が低くなることが示唆され、TGF- β 産生 CD206 陽性細胞がその抑制に寄与する可能性が考えられた。これまでハプテン感作による接触過敏症における膣粘膜樹状細胞に関する報告はほとんどなく、なぜ皮膚感作に対して膣粘膜感作では接触過敏症応答が弱いのかは不明であった。しかしながら、本研究により膣粘膜のハプテン感作後の樹状細胞応答が明らかとなり、皮膚に対して膣粘膜では TGF- β 産生 CD206 陽性細胞が誘導されることにより感作が抑制される可能性を初めて示した。これらの結果はアレルギー性接触皮膚炎における膣粘膜感作メカニズムや膣粘膜における免疫寛容誘導への理解を深めることが期待される。

さらに、第2章では、アトピー性皮膚炎発症部位におけるハプテン感作に着目し、接触過敏症応答や樹状細胞の遊走・成熟について解析を行った。その結果、アトピー性皮膚炎発症部位でのハプテン感作では、樹状細胞の遊走には大きな変化が無い一方で、ハプテン感作後の樹状細胞で免疫寛容性が誘導され、接触過敏症応答における T 細胞増殖、ハプテン感作後 T 細胞によるサイトカイン産生および耳介腫脹が抑制されることが示唆された。これまでアトピー性皮膚炎患者では Th2 優位な状態であることが Th1 型のアレルギー性接触皮膚炎応答の抑制に寄与する可能性について考察はなされていたものの、感作成立に重要な樹状細胞に着目した検討はなく、その抑制メカニズムは不明であった。今回、アトピー性皮膚炎発症部位のハプテン感作後の樹状細胞の遊走・成熟を明らかにすることで、ハプテン感作後の樹状細胞の免疫寛容性の誘導が感作抑制に寄与する可能性を新たに示した。これらの結果からアトピー性皮膚炎発症皮膚におけるハプテン感作メカニズムへの理解を深めることや免疫寛容性樹状細胞の誘導によるアレルギー性接触皮膚炎の抑制が期待される。

我々は日常生活において、医薬品などに含まれるハプテンに様々な部位が曝露されるため、アレルギー性接触皮膚炎は健常皮膚だけでなく粘膜や皮疹部を介しても生じる懸念がある。これまでの接触過敏症のメカニズムは、健常皮膚に対する検討がほとんどで、粘膜や皮疹部を介した感作誘導に関する報告は少ない。本研究では、膣粘膜やアトピー

性皮膚炎発症部位におけるハプテン感作後の樹状細胞に着目した抑制メカニズムの一部を明らかにした。興味深いことに、膣粘膜やアトピー性皮膚炎発症部位のいずれにおいても、健常皮膚での感作よりも接触過敏症応答が弱い、その抑制メカニズムは異なることが示唆された。膣粘膜感作では、TGF- β 産生性の CD206 陽性細胞により皮膚感作よりも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ることで免疫寛容性が誘導され、それに伴って接触過敏症応答が抑制されることが示唆された。それぞれ、他の粘膜部位や皮疹部にも共通する知見であることが考察される。今後、接触過敏症応答に関する更なる詳細な抑制メカニズムの解明や他の部位での検討を進めたい。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化するとともに、アレルギー性接触皮膚炎の抑制機構の解明、さらには治療に貢献するものと考えられる。例えば、TGF- β 産生 M2 型マクロファージや免疫寛容性樹状細胞を誘導するような免疫抑制薬がアレルギー性接触皮膚炎の治療に有用かもしれない。

引用文献

- 1) Coombs RRA, Gell PGH: Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology*, 575-596 (1963).
- 2) Rajan TV: The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*, **24**, 376-379 (2003).
- 3) Dispenza MC: Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc*, **40**, 470-473 (2019).
- 4) Brar KK: A review of contact dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **126**, 32-39 (2021).
- 5) Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, **133**, 303-315 (2013).
- 6) Christensen AD, Haase C: Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS*, **120**, 1-27 (2012).
- 7) Newmann EA, Buehler EV, Parker RD: Delayed contact hypersensitivity in the vagina and skin of the guinea pig. *Fundam Appl Toxicol*, **3**, 521-527 (1983).
- 8) Okamura T, Morimoto M, Yamane G, Takahashi S: Langerhans' cells in the murine oral mucosa in the inductive phase of delayed type hypersensitivity with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene. *Clin Exp Immunol*, **134**, 188-194 (2003).
- 9) Hirunwidchayarat W, Furusawa E, Kang S, Ohno T, Takeuchi S, Rungsiyanont S, Azuma M: Site-specific regulation of oral mucosa-recruiting CD8(+) T cells in a mouse contact allergy model. *Biochem Biophys Res Commun*, **490**, 1294-1300 (2017).
- 10) Yüksel YT, Nørreslet LB, Thyssen JP: Allergic Contact Dermatitis in Patients with Atopic Dermatitis. *Current Dermatology Reports*, **10**, 67-76 (2021).
- 11) Wee C, Tan CH, Zhao X, Yew YW, Goon A: Pattern of contact sensitization in patients with and without atopic dermatitis in an Asian dermatology center. *Contact Dermatitis*, **86**, 398-403 (2022).

- 12) Stanescu AMA, Cristea AM, Bejan GC, Vieru M, Simionescu AA, Popescu FD: Allergic Contact Cell-Mediated Hypersensitivity in Psoriasis: A Narrative Minireview. *Medicina (Kaunas)*, **58**, (2022).
- 13) Farage MA, Bjerke DL, Mahony C, Blackburn KL: Quantitative risk assessment for the induction of allergic contact dermatitis: uncertainty factors for mucosal exposures. *Contact Dermatitis*, **49**, 140-147 (2003).
- 14) Halling-Overgaard AS, Kezic S, Jakasa I, Engebretsen KA, Maibach H, Thyssen JP: Skin absorption through atopic dermatitis skin: a systematic review. *Br J Dermatol*, **177**, 84-106 (2017).
- 15) Kiyono H, Okada K: The mucosal immune system. *Japanese Society of Otorhinolaryngology*, **144**, 843-850 (2011).
- 16) Kalekar LA, Rosenblum MD: Regulatory T cells in inflammatory skin disease: from mice to humans. *Int Immunol*, **31**, 457-463 (2019).
- 17) Nishijo T, Nakayama K, Miyazawa M, Kuroda Y, Sakaguchi H: Differential susceptibility between skin and vaginal mucosa in sensitization phase of allergic contact dermatitis in mice. *Immun Inflamm Dis*, **8**, 629-637 (2020).
- 18) Chalermarp N, Azuma M: Identification of three distinct subsets of migrating dendritic cells from oral mucosa within the regional lymph nodes. *Immunology*, **127**, 558-566 (2009).
- 19) Lambrecht B, Iwasaki A, Kelsall B: Mucosal Dendritic Cells: Origins, Subsets, and Biology. *Mucosal Immunology*, **1**, 489-541 (2015).
- 20) Lee HK, Zamora M, Linehan MM, Iijima N, Gonzalez D, Haberman A, Iwasaki A: Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J Exp Med*, **206**, 359-370 (2009).
- 21) Oh JE, Oh DS, Jung HE, Lee HK: A mechanism for the induction of type 2 immune responses by a protease allergen in the genital tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **114**, E1188-E1195 (2017).
- 22) Tetsu H, Nakayama K, Nishijo T, Yuki T, Miyazawa M: CTLA-4 suppresses hapten-induced contact hypersensitivity in atopic dermatitis model mice. *Sci Rep*,

13, 7936 (2023).

23) Newell L, Polak ME, Perera J, Owen C, Boyd P, Pickard C, Howarth PH, Healy E, Holloway JW, Friedmann PS, Ardern-Jones MR: Sensitization via healthy skin programs Th2 responses in individuals with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, **133**, 2372-2380 (2013).

24) Iwasaki A: Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **25**, 381-418 (2007).

25) Kaplan DH: In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends Immunol*, **31**, 446-451 (2010).

26) Aramaki O, Chalermarp N, Otsuki M, Tagami J, Azuma M: Differential expression of co-signal molecules and migratory properties in four distinct subsets of migratory dendritic cells from the oral mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*, **413**, 407-413 (2011).

27) Edwards JN, Morris HB: Langerhans' cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol*, **92**, 974-982 (1985).

28) Iijima N, Linehan MM, Saeland S, Iwasaki A: Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19061-19066 (2007).

29) Nakayama K, Nishijo T, Miyazawa M, Watabe T, Azuma M, Sakaguchi H: Hapten sensitization to vaginal mucosa induces less recruitment of dendritic cells accompanying TGF-beta-expressing CD206(+) cells compared with skin. *Immun Inflamm Dis*, **10**, e605 (2022).

30) Green EL: Biology of the laboratory mouse. *Dover Publications*, **706**, (1966).

31) Matsuda T, Maruyama T, Iizuka H, Kondo A, Tamai T, Kurohane K, Imai Y: Phthalate esters reveal skin-sensitizing activity of phenethyl isothiocyanate in mice. *Food Chem Toxicol*, **48**, 1704-1708 (2010).

32) Takahashi K, Akatsu Y, Podyma-Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi H, Yoshimatsu Y, Koinuma D, Shirouzu M, Miyazono K, Watabe T: Targeting all transforming growth factor-beta isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer. *J Biol Chem*, **295**,

12559-12572 (2020).

33) Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P: Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med*, **166**, 1654-1667 (1987).

34) Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A: Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, **233**, 6425-6440 (2018).

35) Suzuki K, Meguro K, Nakagomi D, Nakajima H: Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis. *Allergol Int*, **66**, 392-397 (2017).

36) Halliday GM, Le S: Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. *Int Immunol*, **13**, 1147-1154 (2001).

37) Byrne SN, Knox MC, Halliday GM: TGFbeta is responsible for skin tumour infiltration by macrophages enabling the tumours to escape immune destruction. *Immunol Cell Biol*, **86**, 92-97 (2008).

38) Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA: Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **24**, 99-146 (2006).

39) Zhang C, Ohno T, Kang S, Takai T, Azuma M: Repeated antigen painting and sublingual immunotherapy in mice convert sublingual dendritic cell subsets. *Vaccine*, **32**, 5669-5676 (2014).

40) Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaga CL, Akporiaye ET: Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res*, **63**, 1860-1864 (2003).

41) Takahashi T, Eitzman B, Bossert NL, Walmer D, Sparrow K, Flanders KC, McLachlan J, Nelson KG: Transforming growth factors beta 1, beta 2, and beta 3 messenger RNA and protein expression in mouse uterus and vagina during estrogen-

induced growth: a comparison to other estrogen-regulated genes. *Cell Growth Differ*, **5**, 919-935 (1994).

42) Wira CR, Roche MA, Rossoll RM: Antigen presentation by vaginal cells: role of TGFbeta as a mediator of estradiol inhibition of antigen presentation. *Endocrinology*, **143**, 2872-2879 (2002).

43) Yang Y, Nagai S, Kang S, Xia Y, Kawano Y, Miyake K, Karasuyama H, Azuma M: Tolerogenic properties of CD206+ macrophages appeared in the sublingual mucosa after repeated antigen-painting. *Int Immunol*, **32**, 509-518 (2020).

44) Zhou JZ, Way SS, Chen K: Immunology of the Uterine and Vaginal Mucosae. *Trends Immunol*, **39**, 302-314 (2018).

45) Wang H, Dey SK: Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, **7**, 185-199 (2006).

46) Owen JL, Vakharia PP, Silverberg JI: The Role and Diagnosis of Allergic Contact Dermatitis in Patients with Atopic Dermatitis. *Am J Clin Dermatol*, **19**, 293-302 (2018).

47) Langan SM, Irvine AD, Weidinger S: Atopic dermatitis. *Lancet*, **396**, 345-360 (2020).

48) Gittler JK, Krueger JG, Guttman-Yassky E: Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, **131**, 300-313 (2013).

49) Correa da Rosa J, Malajian D, Shemer A, Rozenblit M, Dhingra N, Czarnowicki T, Khattri S, Ungar B, Finney R, Xu H, Zheng X, Estrada YD, Peng X, Suarez-Farinas M, Krueger JG, Guttman-Yassky E: Patients with atopic dermatitis have attenuated and distinct contact hypersensitivity responses to common allergens in skin. *J Allergy Clin Immunol*, **135**, 712-720 (2015).

50) Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*, **129**, 1538-1546 (2012).

51) Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki

H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am J Pathol*, **176**, 2385-2393 (2010).

52) Petersen TH, Jee MH, Gadsboll AO, Schmidt JD, Sloth JJ, Sonnenberg GF, Geisler C, Thyssen JP, Bonefeld CM: Mice with epidermal filaggrin deficiency show increased immune reactivity to nickel. *Contact Dermatitis*, **80**, 139-148 (2019).

53) Rahrig S, Dettmann JM, Brauns B, Lorenz VN, Buhl T, Kezic S, Elias PM, Weidinger S, Mempel M, Schon MP, Braun A: Transient epidermal barrier deficiency and lowered allergic threshold in filaggrin-hornerin (FlgHrnr(-/-)) double-deficient mice. *Allergy*, **74**, 1327-1339 (2019).

54) Scharschmidt TC, Man MQ, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP, Silva KA, Mauro TM, Hupe M, Cho S, Wu Y, Celli A, Schmuth M, Feingold KR, Elias PM: Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol*, **124**, 496-506, 506 e491-496 (2009).

55) Honda T, Egawa G, Kabashima K: Antigen presentation and adaptive immune responses in skin. *Int Immunol*, **31**, 423-429 (2019).

56) Haniffa M, Gunawan M, Jardine L: Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*, **77**, 85-92 (2015).

57) Boltjes A, van Wijk F: Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol*, **5**, 131 (2014).

58) Feng M, Zhou S, Yu Y, Su Q, Li X, Lin W: Regulation of the Migration of Distinct Dendritic Cell Subsets. *Front Cell Dev Biol*, **9**, 635221 (2021).

59) Lutz MB, Schuler G: Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, **23**, 445-449 (2002).

60) Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, **289**, 1-8 (1996).

- 61) Nakayama K, Tetsu H, Nishijo T, Yuki T, Miyazawa M: Tolerogenic phenotype of dendritic cells is induced after hapten sensitization followed by attenuated contact hypersensitivity response in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **678**, 24-32 (2023).
- 62) Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Deguchi M, Arimura A: A novel atopic dermatitis model induced by topical application with dermatophagoides farinae extract in NC/Nga mice. *Allergol Int*, **56**, 139-148 (2007).
- 63) Maestroni GJ, Mazzola P: Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J Neuroimmunol*, **144**, 91-99 (2003).
- 64) Oboki K, Ohno T, Kajiwarra N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S: IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18581-18586 (2010).
- 65) Oyoshi MK, Larson RP, Ziegler SF, Geha RS: Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a T(H)2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression. *J Allergy Clin Immunol*, **126**, 976-984 (2010).
- 66) Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T: A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*, **8**, e73270 (2013).
- 67) Hopkins JE, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Dearman RJ, Kimber I, Park BK: Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem Res Toxicol*, **18**, 375-381 (2005).
- 68) Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, Nakamizo S, Murata T, Ueharaguchi-Tanada Y, Ono S, Amano W, Nakajima S, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Kitoh A, Dainichi T, Ogawa N, Kobayashi Y, Yokomizo T, Arita M, Nakamura M, Miyachi Y, Kabashima K: Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. *J Exp Med*, **212**, 1921-1930 (2015).
- 69) Domogalla MP, Rostan PV, Raker VK, Steinbrink K: Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Front Immunol*, **8**,

1764 (2017).

70) Suuring M, Moreau A: Regulatory Macrophages and Tolerogenic Dendritic Cells in Myeloid Regulatory Cell-Based Therapies. *Int J Mol Sci*, **22**, (2021).

71) Schulke S: Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol*, **9**, 455 (2018).

72) Chen RY, Zhu Y, Shen YY, Xu QY, Tang HY, Cui NX, Jiang L, Dai XM, Chen WQ, Lin Q, Li XZ: The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. *Front Immunol*, **14**, 1163633 (2023).

73) Bilbao A, Perez-Garay R, Rius I, Irurzun A, Terren I, Orrantia A, Astarloa-Pando G, Borrego F, Zenarruzabeitia O: Increased Frequency of CTLA-4 and PD-1 Expressing Regulatory T Cells and Basophils With an Activating Profile in Infants With Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis Hypersensitized to Food Allergens. *Front Pediatr*, **9**, 734645 (2021).

74) Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, **118**, 240-249 (2006).

75) Ito Y, Adachi Y, Makino T, Higashiyama H, Fuchizawa T, Shimizu T, Miyawaki T: Expansion of FOXP3-positive CD4+CD25+ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **103**, 160-165 (2009).

謝辞

本章を遂行し、まとめるにあたって、実に多くの方にお世話になりました。この場を借りて、感謝の意を述べさせて頂きたいと思います。

本論文の作成に際して貴重な御指導を賜りました城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学教授 藤堂 浩明先生、皮膚生理学教授 高木 豊先生、臨床薬理学教授 木村 光利先生、生体防御学教授 神内 伸也先生、薬品作用学教授 袁 博先生、栄養生理学准教授 片倉 賢紀先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導、御助言を賜りました花王株式会社 安全性科学研究所 宮澤 正明博士に心から感謝を申し上げます。投稿論文の執筆や学会発表、日頃の研究内容に渡って、手厚いご指導を頂きました。本論文を執筆することができたのも、宮澤博士の日頃の御指導・御助言のお陰に他なりません。また、同研究所 坂口 斉博士には、日頃より多くの御助言や御支援を頂きました。深く感謝申し上げます。

腫粘膜感作に関する研究においては東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 医歯学系専攻 口腔機能再構築学講座 分子免疫学教授 東 みゆき先生、同 生体支持組織学講座 病態生化学分野教授 渡部 徹郎先生に多大な御指導をいただき衷心より深甚なる謝意を表します。アトピー性皮膚炎に関する研究においては京都大学大学院医学研究科 皮膚科学講座教授 椛島 健治先生に有益な御助言を賜り衷心より深甚なる謝意を表します。

さらに研究の遂行にあたり、多大なご協力、ご支援を頂いた同研究所 西條 拓博士に心から感謝の意を表します。そして、一緒に研究を進めてくださった鉄 啓恵氏に深く感謝申し上げます。また、同研究所 行 卓男博士には、研究の進め方や投稿論文の執筆について様々な御助言をいただきました。深くお礼申し上げます。

以上の皆様の御助言、御支援、御協力、励ましに対し、深く感謝申し上げます。