

博士論文

転写因子 IRF5 は Th1 型接触皮膚炎を促進し、Th2 型接触皮膚炎を抑制する

市村 洋平

要旨

接触皮膚炎反応は T helper (Th)1, 2 型に分けられ、感作と惹起から成る免疫反応である。転写因子 IRF5 (interferon regulatory factor 5) を欠損したマウスでは Th1 型接触皮膚炎は野生型マウスと比較し減弱している一方で、Th2 型接触皮膚炎は増強していた。IRF5 欠損マウスでは Th1 型反応の際、樹状細胞(dendritic cell; DC)からの interleukin (IL)-12 産生低下がみられ、Th2 型反応の際、選択的 Th2 型反応の誘導に関与する macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2)陽性 programmed cell death ligand 2 (PDL2)陽性 cluster of differentiation (CD)103 陰性真皮樹状細胞 (dermal dendritic cell; dDC)の鼠径および腋窩リンパ節における割合が増加していた。以上より接触皮膚炎モデルにおいて転写因子 IRF5 は IL-12 の産生亢進と DC のサブセットを調整することで Th1 型および Th2 型反応を制御する可能性が考えられた。

序文

接触皮膚炎 (contact hypersensitivity; CHS)は皮膚表面から侵入するハプテンに対する免疫反応である。化粧品、金属、植物など様々な物質が接触皮膚炎を起こすことが知られている。接触皮膚炎の発症機序は未だ明らかでないが、多種の免疫担当細胞が皮膚と所属リンパ節との間を行き来し、情報を伝達することで成立すると考えられている。接触皮膚炎には再現性の高いマウスでの実験系があり、機能解析に繁用されている。

接触皮膚炎モデルで抗原として汎用されるのが 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)、もしくは fluorescein isothiocyanate (FITC)である。DNFB を用いてマウス皮膚で接触皮膚炎を起こすと、DNFB 抗原特異的 T 細胞が炎症の場に浸潤し、interferon (IFN)- γ などのサイトカインを産生する¹。この際に生じる反応が Th1 型反応である。Th1 型反応は主として、細菌やウイルスなどの細胞内微生物に対する防御反応として機能する自然免疫反応であり、IFN- γ 産生能を有する T-cell specific T-box transcriptional factor (T-bet)陽性細胞である Th1 細胞などにより構成されている²。Th1 細胞によって immunoglobulin (Ig)G2a 抗体が B 細胞より産生され³、更に IFN- γ はナイーブ Th 細胞から Th1 細胞への分化を誘導する⁴。更に、IFN- γ による signal transducer and activator of transcription (STAT)1、および IL-12 による STAT4 の活性化を受けて Th1 細胞の誘

導に重要な転写因子である T-bet が誘導され、ケモカインレセプターの発現などを介して、炎症部位へと浸潤する⁴。

一方、FITC を用いた接触皮膚炎モデルでは Th2 優位な免疫応答を起こすことが報告されている^{1, 5-7}。Th2 型反応は主として寄生虫などから生体を防御する際に機能する自然免疫反応である。この反応には IL-4 などを生産する GATA-binding protein 3 (GATA3)陽性細胞である Th2 細胞が寄与している²。Th2 細胞は Th1 細胞に特徴的な IFN- γ を生産せず、IL-4 などを生産するため、Th1 細胞とは本質的に異なる細胞である⁸。IL-4 は B 細胞をクラススイッチし、IgG1 や IgE を生産するのに必要なサイトカインである³。抗原提示細胞とナイーブ Th 細胞とが相互作用する微小環境での IL-4 の存在が、ナイーブ T 細胞が Th2 細胞へと分化させる上で重要である⁹。

接触皮膚炎は感作相と惹起相に分けられる (図 1)。感作相において、抗原ペプチドが皮膚に侵入すると、ランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC)、dDC、マクロファージなどの抗原提示細胞がその抗原を取り込む。抗原提示細胞、特に DC は抗原を取り込むと、major histocompatibility complex (MHC)分子と共刺激分子の発現が増強した成熟 DC になる^{10, 11}。成熟 DC は鼠径および腋窩リンパ節へと移動し、T cell receptor/CD3 複合体に MHC 分子/抗原ペプチド複合体を提示し、CD80/CD86-CD28 などの共刺激シ

グナルを介することで、ナイーブ T 細胞を活性化し抗原特異的エフェクター T 細胞やメモリー T 細胞へと分化誘導する¹⁰⁻¹³。

続く惹起相においては、抗原特異的 T 細胞が抗原提示を受けて再活性化し、CD4 陽性エフェクター Th 細胞や CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞へと分化し、増殖するとともに、抗原を塗布した部位に浸潤して、IFN- γ を始めとする種々のサイトカインなどを放出する (図 1)。IFN- γ は表皮角化細胞に作用することによって、表皮細胞由来の多彩なケモカインが産生される。ケモカイン産生により更なる炎症細胞が誘導され、周囲に存在する肥満細胞の脱顆粒が起これば、肥満細胞より放出されるヒスタミンによる血管拡張、および血管内皮細胞の活性化により炎症が増幅するとともに、表皮角化細胞にアポトーシスを誘導することで、皮膚炎を生じる¹⁴。CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞は接触皮膚炎において異なる役割を果たす。CD4 陽性細胞は炎症促進を担うサイトカインを産生する一方で、CD8 陽性細胞はハプテン刺激を受けた細胞を傷害することで接触皮膚炎の惹起相の形成に寄与する^{14,15}。更に惹起された皮膚組織では様々な細胞の浸潤がみられる。ここでは好酸球、肥満細胞、マクロファージに注目した。好酸球は局所における免疫・炎症反応を調節し、血中や組織において様々な炎症性疾患や感染症に関連して集積することが知られているが¹⁶⁻¹⁸、皮膚疾患における好酸球の役割に関しては不明な点が多い。肥満細胞はその表面に発現する high-affinity

receptor for IgE (Fc ϵ RI)刺激によって、プロテアーゼやヒスタミン、脂質メディエーターを放出し¹⁹、接触皮膚炎の惹起相においてはヒスタミン放出に伴う血管透過性の亢進に伴い、一般的に Th2 型反応に寄与する^{20,21}。マクロファージは様々な機能を有し、中でも古典的活性化マクロファージ (M1 マクロファージ)は細菌、原虫、およびウイルスからの宿主防御に寄与し、選択的活性化マクロファージ (M2 マクロファージ)は抗炎症作用と創傷治癒の調節に寄与する²²。惹起相においてマクロファージを欠損すると、真皮に存在する DC と炎症部位に浸潤する T 細胞とが集積せず、正常な惹起反応が障害されることから、接触皮膚炎反応にも関与することが知られている²³。

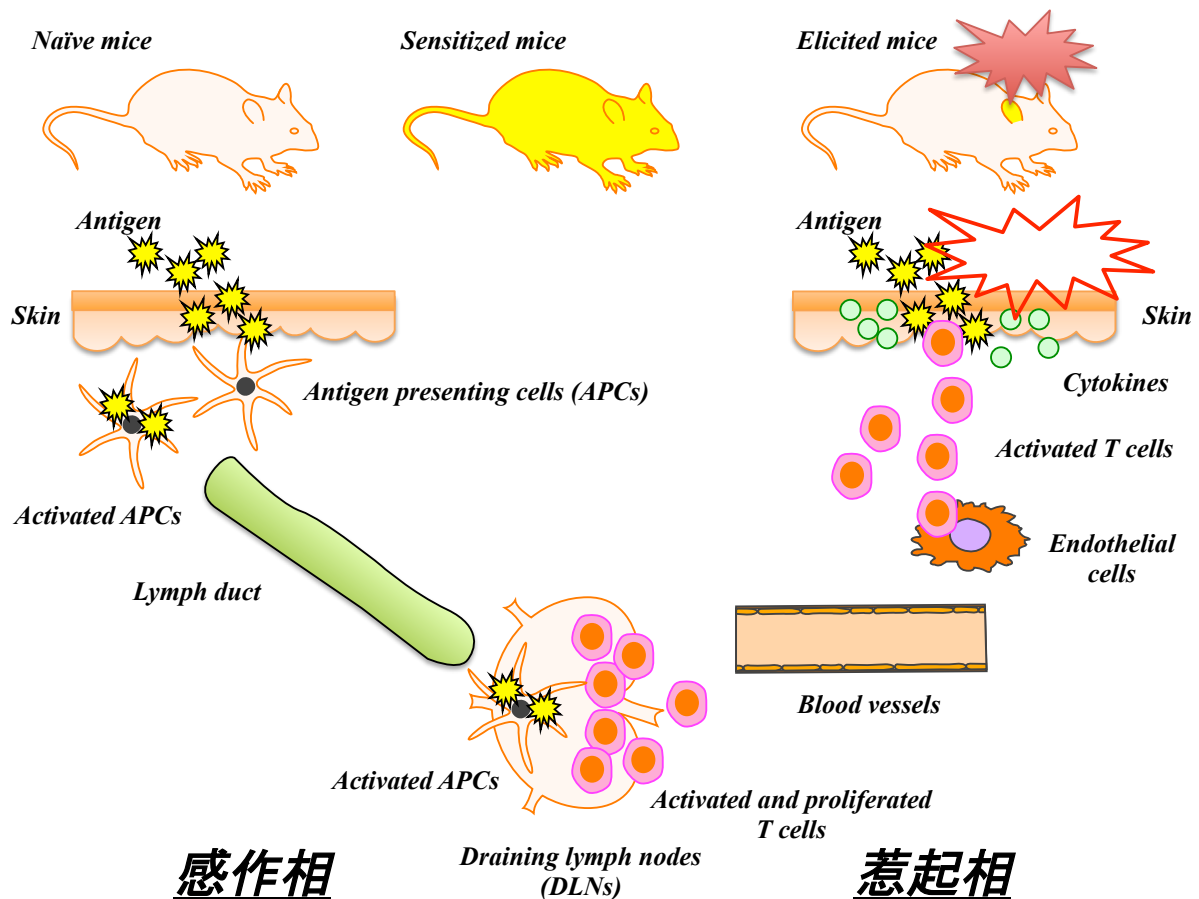


図 1 接触皮膚炎モデルのシエーマ

感作相において、抗原ペプチドが皮膚に侵入すると、抗原提示細胞が抗原を取り込み、鼠径および腋窩リンパ節(所属リンパ節)へと移動し、抗原特異的 T 細胞を活性化する。これにより抗原特異的 T 細胞はエフェクター T 細胞やメモリー T 細胞へと分化する。更に続く惹起相においては、抗原特異的 T 細胞が再度抗原曝露を受けて再活性化し、CD4 陽性エフェクター Th 細胞や CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞へと分化、および増殖するとともに、抗原を塗布した部位に浸潤して、IFN- γ を始めとする種々のサイトカインなどを放出し、皮膚炎反応が誘導される。Naïve mice: 未感作のマウス。Sensitized mice: 感作させたマウス。Elicited mice: 感作後惹起させたマウス。Antigen: 抗原。Skin: 皮膚。Antigen presenting cells (APCs): 抗原提示細胞。Activated APCs: 活性化した抗原提示細胞。Lymph duct: リンパ管。Draining lymph nodes (DLNs): 所属リンパ節。Activated and proliferated T cells: 活性化し増殖した T 細胞。Blood vessels: 血管。Endothelial cells: 血管内皮細胞。Activated T cells: 活性化 T 細胞。Cytokines: サイトカイン。

他方、接触皮膚炎の感作相においては DC の存在が重要である。DC は形態学的に樹状突起を有する細胞で、諸臓器に様々なサブセットが分布し、固有の機能を持つ。マウス皮膚では表皮には LC が、真皮には主として CD103 陽性 DC と CD103 陰性 DC が存在する²⁴⁻²⁷。LC は T 細胞の Th17 細胞への誘導や CD8 陽性 T 細胞のクロスプレゼンテーションの促進機能を有する^{28, 29}。また LC は、外来抗原が侵入するとエフェクターメモリー T 細胞の増殖を促進し、制御性 T 細胞の増殖を抑制する機能を有する³⁰。

CD103 陽性 DC はクロスプレゼンテーションに重要であり、Th1 細胞の分化に寄与する³¹。CD103 陰性 DC は主として MHC class II を提示し、制御性 T 細胞や Th2 細胞の誘導に関与する²⁴。CD103 陰性 DC の中には細胞表面に MGL2 (CD301b) を発現するサブセットが存在し、MGL2 陽性 CD103 陰性 dDC が Th2 型反応を選択的に誘導するとの報告がある³²⁻³⁴。

IRF5 は IRF family に属する転写因子で、主として DC やマクロファージ、B 細胞に発現している。IRF はこれまでに 9 つ同定されており、いずれも N 末端に共通の DNA 結合ドメインを保持している。この DNA 結合ドメインを介して、類似の DNA 配列に結合する。この配列は多数の遺伝子のプロモーター領域に存在し interferon-stimulated response element (ISRE) と呼ばれている^{35, 36}。IRF は pattern

recognition receptors (PRRs)の発見とともに免疫担当細胞の活性化を担う重要な調節作用を持つ転写因子として注目を集めている。PRRsには大きく分けて、細胞膜に存在する Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR)と細胞質内に存在する PRR である retinoic-acid inducible gene I (RIG-I) family の2つが存在している³⁷。TLRは細菌やウイルス、菌類および原虫などに由来する様々な pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)を認識する^{38,39}。TLRは全て intracellular Toll/IL-1 receptor (TIR)ドメインを有し、そのアダプター分子によって下流にシグナルを伝達する。これらのアダプター分子には myeloid differentiation factor 88 (MyD88)や TIR-domain-containing adaptor protein、TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β (TRIF)、TRIF-related adaptor molecule などで構成されている。IRF family は MyD88 依存性経路と非依存的経路により活性化されるとともに、TLRによって誘導される特異的な遺伝子発現に IRF family が寄与する。IRF3 は vesicular stomatitis virus および Newcastle disease virus を認識する RIG-I や encephalomyocarditis virus などを認識する melanoma differentiation associated gene 5、polyinosinic-polycytidylic acid のアナログである double-strand RNA をリガンドとする TLR3 や lipopolysaccharide (LPS)をリガンドとする TLR4 などにより活性化される。IRF7 はこれらの PRRs に加え、imi-quimod や single-strand RNA をリガンドとする TLR7 や cytidine phosphate-guanosine モチーフをリガンドとする TLR9 により活性化さ

れる³⁷。IRF4はTLR4やTLR7およびTLR9により活性化され⁴⁰、リン酸化酵素である Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 2によりリン酸化を受け、T細胞を Th17細胞へと偏倚させる⁴¹。

IRF5はTLR下流のアダプター分子である MyD88と直接結合し^{42,43}、tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6依存性にリン酸化され二量体となり、核内に移行する(図2)。IRF5は細菌の鞭毛成分である flagellinをリガンドとするTLR5やTLR4、TLR7およびTLR9の下流にあるとされる³⁷。IRF5はTLR刺激によりISREに結合し、I型インターフェロンやIL-12p40遺伝子などのプロモーター活性を亢進させる^{42,44}(図2)。また、IRF5はM1マクロファージのマーカースとして知られ⁴⁵、IL-12およびIL-23産生を促すことで、T細胞をTh1細胞もしくはTh17細胞へと分化させる⁴⁵。更にIRF5欠損マウスでは内臓リーシュマニア感染においてTh1型反応が減弱することが知られている⁴⁶。またpristane誘発全身性エリテマトーデスマデルマウスでは、IRF5の欠損により野生型と比較してマウス血清中IL-4の増加もしくは腹腔内リンパ球がTh2偏倚を来すことが知られている^{47,48}。以上よりIRF5は免疫応答、とりわけTh1への分化を誘導し、Th2への分化を抑制する転写因子と考えられる。

以上の背景をもとに、今回我々は IRF5 欠損マウスを用いて DNFB による Th1 型接触皮膚炎、FITC による Th2 型接触皮膚炎を誘発し、接触皮膚炎における IRF5 の役割を解明することを実験の目的とした。

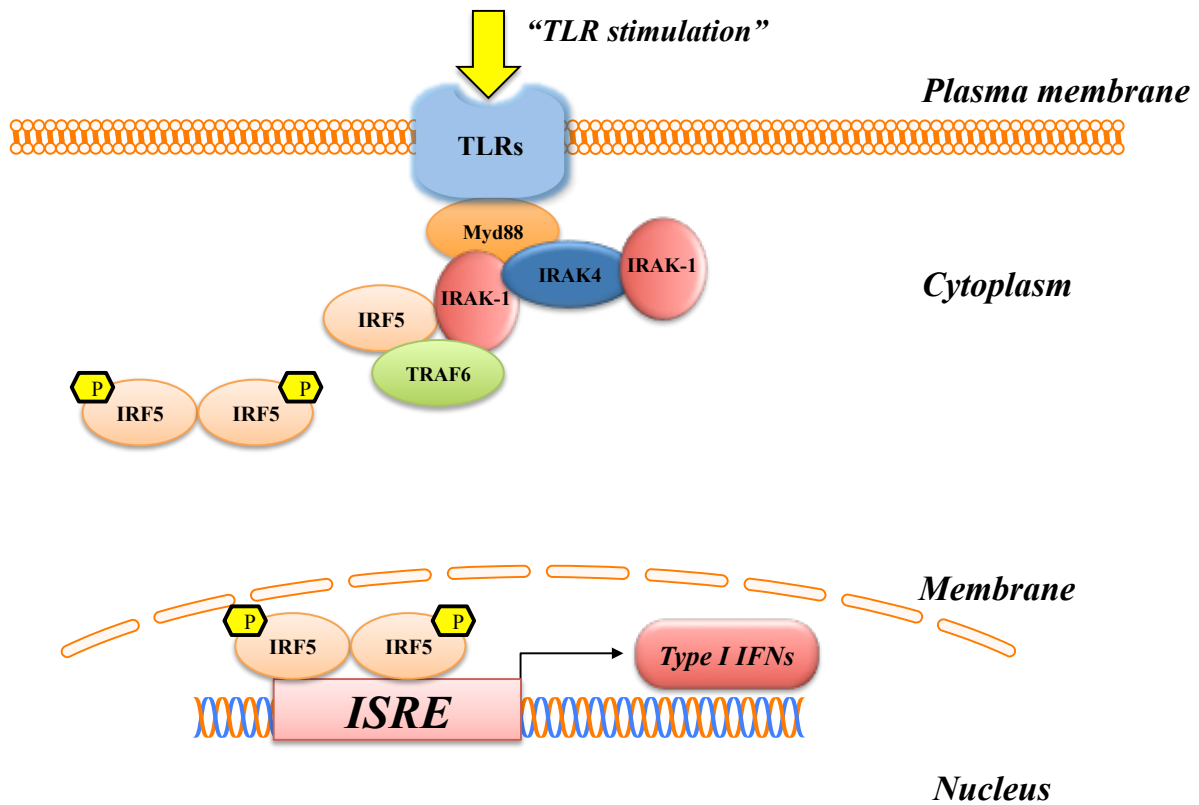


図 2 転写因子 IRF5 のシエーマ

IRF5 は TLR の刺激により活性化する転写因子である。IRF5 は TRAF6 依存性に活性化してリン酸化され、二量体となり核内移行する。IRF5 は様々な遺伝子プロモーター配列を有する ISRE に結合することで、I 型インターフェロンを産生し、炎症反応を惹起する。TLR stimulation: TLR への刺激。TLRs: Toll 様受容体。MyD88: myeloid differentiation factor 88。IRAK1: interleukin-1 receptor-associated kinase 1。IRAK4: interleukin-1 receptor-associated kinase 4。TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6。ISRE: interferon- stimulated response element。Type I IFNs: I 型インターフェロン。Plasma membrane: 細胞膜。Cytoplasm: 細胞質。Membrane: 核膜。Nucleus: 核。

方法

動物

IRF5 欠損マウスは東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学 社会連携研究部門 谷口 維紹 先生より提供して頂いた。全ての実験は東京大学医学系研究科の動物倫理規定に従って施行した。研究に用いたマウスは全て 8-14 週齢であり、specific pathogen-free 条件下、12 時間の明暗サイクル、水と餌を自由に摂取できる環境にて飼育した。麻酔にはエチルエーテルの吸入を用い、エチルエーテルによる吸入麻酔を深くすることで安楽死を行った。

接触皮膚炎反応

接触皮膚炎は DNFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) もしくは FITC (Sigma-Aldrich) を用いて行った⁴⁹。具体的に DNFB を用いた接触皮膚炎では、剃毛したマウスの腹部に 4:1 acetone/olive oil に溶解した 0.5%DNFB を 50 μ l ずつ塗布し、同時に両足底にも 0.5%DNFB を 20 μ l ずつ塗布することで感作 (day 0 および day 1) した。5 日後(day6)に、感作したマウスの右耳介の腹側、背側に 4:1 acetone/olive oil に溶解した 0.25% DNFB を 10 μ l ずつ塗布し、皮膚炎を惹起した。FITC を用いた接触皮膚炎では、剃毛したマウスの腹部に 1:1 acetone/dibutyl phthalate に溶解した 0.5% FITC を 400 μ l 塗布することで感作 (day0 および day1) した。5 日後 (day6)に、感作したマウスの右耳介の腹側、

背側に 1:1 acetone/dibutyl phthalate に溶解した 0.5% FITC を 10 μ l ずつ塗布し、皮膚炎を惹起した。実験は DNFB もしくは FITC 感作後の野生型マウスと IRF5 欠損マウス群の各群 8 匹ずつ用いて行った。以上の系では、いずれも惹起直前と惹起後 6、12、24、36、48、72 および 96 時間の時点で耳介の厚さを計測した。耳介の厚さはダイヤルシクネスゲージ (Adachi, Tokyo, Japan)を用いて測定し、耳介腫脹は[(惹起後の耳介の厚さ)-(惹起直前の耳介の厚さ)]として計算した。

組織切片と免疫染色

DNFB もしくは FITC を用いて接触皮膚炎を惹起した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの耳介皮膚を 10%ホルマリンで固定してパラフィン包埋し、6 μ m の厚さで切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を行った。コントロールには接触皮膚炎惹起前の野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの耳介皮膚を用いた。免疫組織学的検討には VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いて、マクロファージ特異的抗体である抗 F4/80 抗体 (Serotec, Oxford, U.K.)、抗 CD4 抗体 (clone RM4-5; BD Pharmingen, San Diego, CA.)、抗 CD8 抗体 (clone 53-6.7; BD Pharmingen)による染色を行った。実験は DNFB もしくは FITC 感作後の野生型マウスと IRF5 欠損マウス群およびコントロールマウスの計 4 群、各

群 5 匹ずつ用いて行った。細胞数の計測は光学顕微鏡を用いて行い、400 倍率の視野の下で無作為に 10 ヶ所選択して計測を行い、それらの平均を取った。

RNA 抽出と定量 RT-PCR

マウス腹部皮膚に抗原を塗布し、同一抗原による惹起直前 (day6)、および惹起後24時間のマウス耳介組織を回収し、回収した耳介組織よりRNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA)を用いてmRNAを抽出した。耳介組織mRNAの測定にはDNFBもしくはFITC感作後の野生型マウスとIRF5欠損マウス群およびコントロールマウスの各群6匹ずつ用いて行った。またマウスDCおよびT細胞からはTriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH)を用いて細胞を回収した後、mRNAを抽出した。mRNAはその後iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories)を用いて逆転写を行い、cDNAを作成した。用いたプライマーの配列を下記に記す(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。GAPDH forward: 5'-CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT-3', reverse: 5'-TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT TCT-3'; IFN- γ forward: 5'-AGC AAC AGC AAG GCG AAA A-3', reverse: 5'-CTG GAC CTG TGG GTT GTT GA-3'; TNF- α forward: 5'-ACC CTC ACA CTC AGA TCA TCT TC-3', reverse: 5'-TGG TGG TTT GCT ACG ACG T-3'; IL-4 forward: 5'-ACG GAG ATG GAT GTG CCA AAC GTC-3', reverse: 5'-CGA GTA ATC CAT TTG CAT GAT GC-3'; IL-6 forward: 5'-GAT GGA TGC TAC CAA ACT GGA T-3',

reverse: 5'-CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GA-3'; IL-10 forward: 5'-TTT GAA TTC
CCT GGG TGA GAA-3', reverse: 5'-ACA GGG GAG AAA TCG ATG ACA-3'; IL-12p40
forward: 5'-CTC ACA TCT GCT GCT CCA CAA G-3', reverse: 5'-AAT TTG GTG CTT
CAC ACT TCA GG-3'; IRF4 forward: 5'-GCC CAA CAA GCT AGA AAG-3', reverse:
5'-TCT CTG AGG GTC TGG AAA CT-3'

合成したcDNAにSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)を加え、定量的PCRは以下の条件でStep One Plus real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。95°C、20秒間を1サイクル、95°C、3秒間の後に60°C、30秒間というサイクルを40サイクル行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いてmRNAを標準化した。GAPDH PCR産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量をDDCt methodにて算出した。即ち、fold inductionは $2^{-[DDCt]}$ と定義され、ここでCtはthreshold cycle, つまりサンプルの比較蛍光がバックグラウンド蛍光をこえるサイクル数をさす。Ct = [ターゲットとなる遺伝子のCt (発現量不明のサンプル) - GAPDH のCt (発現量不明のサンプル)] - [ターゲットとなる遺伝子のCt (キャリブレータのサンプル) - GAPDH のCt (キャリブレータサンプル)]。野生型マウスにおけるサイトカインmRNA発現量をキャリブレータとして使用した。

感作後鼠径および腋窩リンパ節由来細胞による養子移入実験

ドナーマウスとして野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスに DNFB もしくは FITC を用いて感作を行った。Day6 に鼠径および腋窩リンパ節を回収し、細胞を分離した。この細胞を 50 万個ずつ 200 μ l の PBS に溶解して野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの尾静脈に注射した。尾静注の 24 時間後に 0.25% DNFB もしくは 0.5% FITC を耳介に塗布し、その 24 時間後に耳介の厚さを計測し、耳介腫脹を求めた。実験はドナー側として DNFB もしくは FITC 感作後の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウス群、レシピエント側として未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの計 4 群、各群 6 匹ずつ用いて行った。

表皮細胞シートにおける免疫組織学的染色

未感作の野生型マウスもしくは IRF5 欠損マウス耳介組織を回収し、真皮側を下にして Na-KHPO₄ バッファー (pH:6.8)+0.5M NH₄SCN 中で 37°C、20 分間培養を行った。その後表皮シートを分離し、アセトン固定を行った後に phycoerythrin (PE)-conjugated anti-I-A^b antibody (AF6-120.1; BD Pharmingen, San Diego, CA) を用いて染色を行った。その後蛍光顕微鏡 Keyence Biozero (BZ 8000, Keyence, Osaka, Japan) を用いて、I-A^b 陽性細胞を発色させた上で 400 倍の倍率で、I-A^b 陽性細胞数を計測した。実験は未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの計 2 群、各群 5 匹ずつを用いて行った。

鼠径および腋窩リンパ節内 DC の測定

FITC のみにて経皮感作を行い 48 時間後に野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスから鼠径および腋窩リンパ節を回収した。これらを 1mg/ml collagenase D (Sigma-Aldrich) および 0.2 mg/ml deoxyribonuclease (Sigma-Aldrich)を用いて 37°C、30 分間培養して細胞懸濁液を作成した。同液を 70 μ m のメッシュで濾過し、PE-conjugated mAb anti-I-A^b antibody (BD Pharmingen)および phycoerythrin/cyanin 7 (PE/Cy7)-conjugated anti-mouse CD11c (BioLegend, San Diego, CA)を用いて細胞表面の I-A^b および CD11c を染めた。鼠径および腋窩リンパ節中に存在する FITC 陽性 I-A^b 陽性 CD11c 陽性細胞の割合を FACScan flow cytometer (BD Pharmingen)を用いて計測した。実験には FITC を腹部に塗布した野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの各群 5 匹ずつを用いて行った。

抗原特異的 T 細胞分裂能評価 (Bromodeoxyuridine (BrdU)アッセイ)

DNFB もしくは FITC にて感作を行い 5 日後に野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し、同様の手順で細胞懸濁液を作成した。その後細胞懸濁液を mitomycin C (Calbiochem)を用いて処理したものを抗原提示細胞とした。T 細胞は細胞懸濁液より Pan T Cell Isolation Kit II (mouse) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いて分離した。50 万個の抗原提示細胞と 50 万個の T 細胞とを DNFB の水溶性アナログである 2,4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) 0.4mM 含有培養液、0.005%FITC

含有培養液もしくは培養液のみの条件で 2 日間共培養した。細胞培養後、Cell proliferation ELISA, BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を用いて細胞増殖能を測定した。実験には抗原提示細胞として DNFB もしくは FITC を感作させた野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの各群 3 匹と、T 細胞側として DNFB もしくは FITC を感作させた野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの各群 5 匹ずつを用いた。細胞の共培養は、野生型抗原提示細胞および野生型 T 細胞もしくは IRF5 欠損抗原提示細胞および野生型 T 細胞を DNBS、FITC もしくは培養液単独で培養する計 4 群を 10 個の well に割り付けて行った。

DC および T 細胞との DNBS もしくは FITC 含有共培養系でのサイトカイン発現の検討

In vitro での T 細胞からのサイトカイン発現を検討するために、DNBS (Sigma-Aldrich) もしくは FITC を用いた。鼠径および腋窩リンパ節は DNFB、FITC 感作の 5 日後に野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスからそれぞれ回収し、上記の手順を用いて細胞懸濁液を作成した。DC は細胞懸濁液より CD11c (N418) MicroBeads (Miltenyi Biotec)を用いて分離した。T 細胞は上記の手順を用いて分離した。10 万個の DC と 50 万個の T 細胞を 200 μ l の 0.4mM DNBS もしくは 0.005%FITC 含有培養液もしくは培養液のみの条件で 2 日間共培養した。その後培養上清を回収し、細胞は

TriReagent (Molecular Research Center)を用いて回収し、上記の手順により cDNA を作成後、定量的 RT-PCR 法を用いて、共培養系における IFN- γ 、IL-12p40、IL-4 の mRNA 発現を検討した。実験には樹状細胞側として DNFB もしくは FITC を感作させた野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの各群 5 匹と、T 細胞側として DNFB もしくは FITC を感作させた野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの各群 5 匹を用いて、DNBS、FITC もしくは培養液単独で培養する計 4 群を 10 個の well に割り付けて行った。

DCのIL-12産生の測定

野生型マウスおよびIRF5欠損マウス腹部皮膚にDNFBを用いて感作の5日後に鼠径および腋窩リンパ節を回収し、上記の手順を用いて細胞懸濁液を作成した。同液を70 μ mのナイロンメッシュで濾過し、0.4mM DNBS含有培養液中で2日間共培養を行った。その後brefeldin A (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich)、ionomycin (2 μ g/ml; Sigma-Aldrich)、phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (25 ng/ml; Sigma-Aldrich)を加えて5時間培養し、intracellular Foxp3 with anti-Foxp3 Staining set FITC (eBioscience)キット内に含まれる試薬を用いてintracellular stainingを行った。細胞表面抗体の染色にはPE/Cy7-conjugated anti-mouse CD11c (BioLegend)、PE-conjugated anti-I-A^b antibody (BD Pharmingen)を用いた。死細胞は7-AAD (Life Technologies, Carlsbad, CA)により除去した。細胞内サイトカイン染色にはallophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse IL-12 (BioLegend)を用いた。

実験にはDNFBに感作させた野生型マウスおよびIRF5欠損マウスの計2群、各群4匹ずつを用いて行った。

鼠径および腋窩リンパ節における MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合の測定

FITC 感作後 24 時間の時点で野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し、上記の手順を用いて細胞懸濁液を作成した。同液を 70 μ m のメッシュで濾過し、細胞表面を PE/Cy7 anti-mouse CD11c(BioLegend)、APC anti-mouse CD103 (BioLegend)、PE-conjugated anti-mouse CD301b(BioLegend)、Biotin-conjugated anti-mouse CD273 (B7-DC, PDL2) (BioLegend)、APC/Cy7-conjugated Streptavidin (BioLegend)を用いて染色した。FACScan flow cytometer (BD Pharmingen)により鼠径および腋窩リンパ節中の MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 CD11c 陽性 dDC の割合を調べた。実験には未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの計 2 群、各群 3 匹ずつと FITC 感作後の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの計 2 群、各群 5 匹ずつを用いて行った。

統計解析

統計解析には GraphPad Prism 6 を用いた。統計学的な有意差は 2 群間であれば Mann-Whitney U test により、多群間であれば one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test

による解析を行った。マウス惹起後耳介組織の腫脹を時系列で評価した検討では two-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test による解析を行った。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と考えた。値は平均値±標準誤差(standard error of the mean; SEM)で表記した。

結果

1) IRF5 欠損マウスでは Th1 型の反応が主体の DNFB を用いた接触皮膚炎が減弱していた

IRF5 の接触皮膚炎における役割を明らかにするため、始めに Th1 型の反応が主体の DNFB を用いた接触皮膚炎に関する検討を行った。DNFB を用いて感作を行った野生型マウスもしくは IRF5 欠損マウスの耳介皮膚に DNFB を塗布し、接触皮膚炎を惹起し、惹起前後の耳介腫脹を計測した。野生型および IRF5 欠損マウスにおける耳介腫脹は、共に DNFB による惹起後 24 時間の時点でピークに達し、その後徐々に腫脹は軽減した (図 3)。IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較し、全経過を通じて耳介腫脹が減弱しており、殊に惹起後 12 時間、24 時間、36 時間および 48 時間の時点で有意な耳介腫脹の減弱がみられた (図 3)。次に、惹起後の耳介皮膚について組織学的検討を行った。DNFB 惹起後 24 時間の時点における組織像では、IRF5 欠損マウスにおける耳介組織の浮腫は野生型マウスと比較して軽度であった (図 4)。また、耳介組織の浸潤細胞数を計測したところ、IRF5 欠損マウスでは野生型と比較し、惹起 24 時間後における好酸球数、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数が何れも有意に減少していた (図 5)。以上の結果より IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して、Th1 型の反応が主体の DNFB を用いた接触皮膚炎が減弱していた。

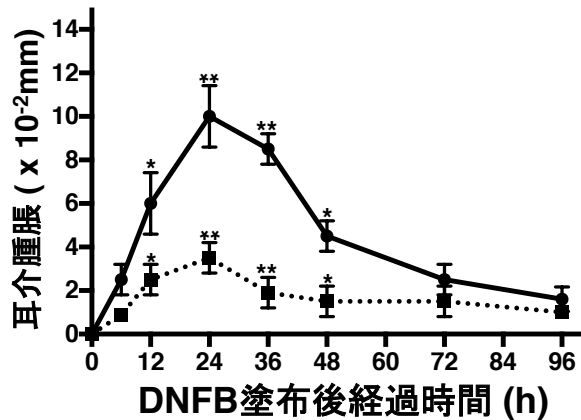


図3 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスにおける DNFB を用いた接触皮膚炎反応

DNFB による接触皮膚炎反応。感作したマウスを DNFB で惹起した後、96 時間までの耳介腫脹の計時的変化を示す。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 8。解析には two-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

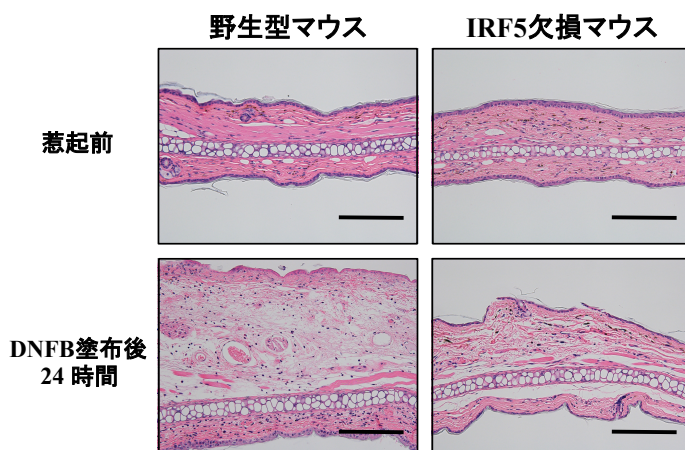


図4 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスにおける DNFB を用いた接触皮膚炎惹起後 24 時間の耳介組織

DNFB による接触皮膚炎の耳介組織のヘマトキシリン・エオジン染色像 (倍率は 200 倍、bar は 50 μ m を表す)。代表的な組織像を示す。

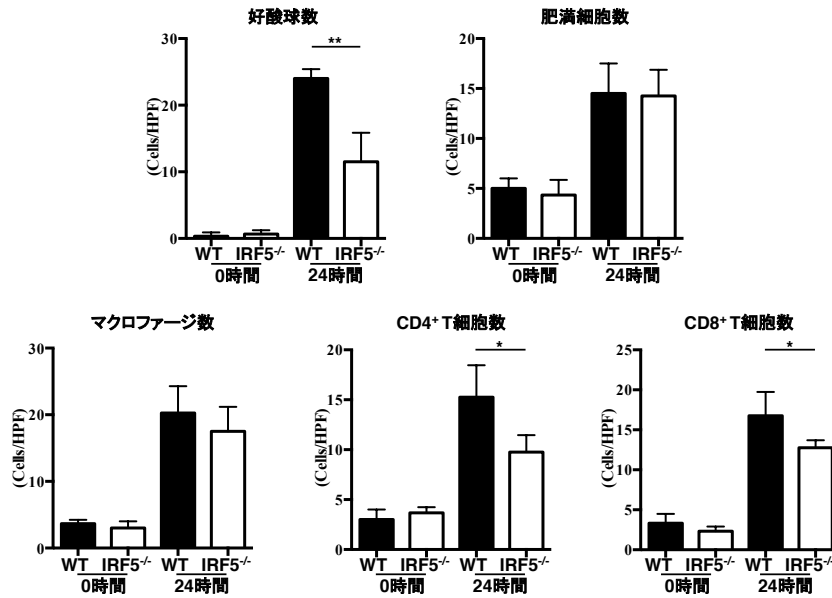


図5 野生型マウスおよびIRF5欠損マウスにおけるDNFBを用いた接触皮膚炎惹起前後の耳介組織における細胞浸潤数の検討

DNFBによる接触皮膚炎の惹起前後に耳介組織に浸潤している好酸球、肥満細胞、マクロファージ、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞数。惹起直前(0時間)、惹起後24時間の耳介を用いた。組織を400倍で観察し、一視野あたりの細胞数を計測した。細胞計測は一切片あたり10視野ずつ行った。データは平均値±SEMを用いて表した。各群n=5。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5欠損マウス。解析にはone-way ANOVAとBonferroni post hoc testによる多群間解析を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

2) IRF5 欠損マウスでは Th2 型の反応が主体の FITC を用いた接触皮膚炎が増強していた

次に Th2 型の反応が主体の FITC を用いた接触皮膚炎に関して検討を行った。

FITC を用いて感作を行った野生型マウスもしくは IRF5 欠損マウスの耳介皮膚に FITC を塗布し、接触皮膚炎を惹起し、惹起前後の耳介腫脹を計測した。野生型および IRF5 欠損マウスにおける耳介腫脹は、共に FITC による惹起後 24 時間の時点でピークに達し、その後徐々に腫脹は軽減した (図 6)。IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較し、惹起後 12 時間、24 時間および 36 時間の時点で有意に耳介腫脹が増強していた (図 6)。次に、惹起後の耳介皮膚について組織学的検討を行った。FITC 惹起後 24 時間の時点における組織像では、IRF5 欠損マウスにおける耳介組織の浮腫は野生型マウスと比較して増加していた (図 7)。また、耳介組織の浸潤細胞数を計測したところ、IRF5 欠損マウスでは野生型と比較し、惹起 24 時間後における好酸球数、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数が何れも有意に増加していた (図 8)。以上の結果より IRF5 欠損マウスは野生型マウスと比較して、Th2 型の反応が主体の FITC を用いた接触皮膚炎が増強していた。

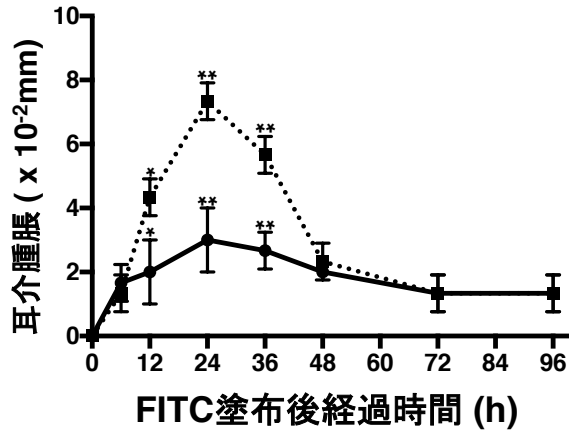


図 6 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスにおける FITC を用いた接触皮膚炎反応

FITC による接触皮膚炎反応。感作したマウスを同一抗原で惹起後 96 時間までの耳介腫脹の計時的変化を示す。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 8。解析には two-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

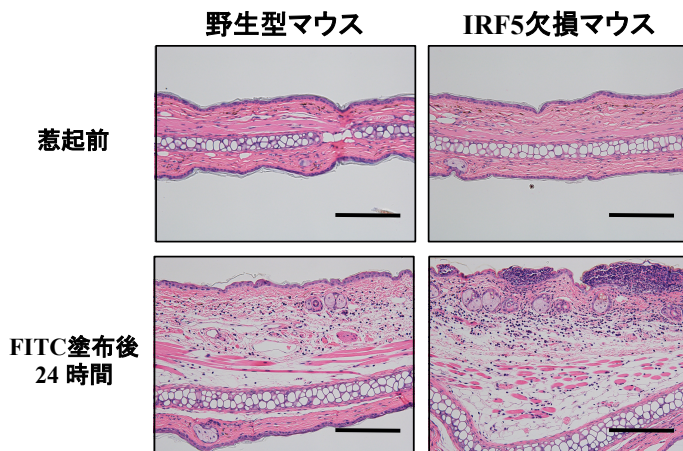


図 7 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスにおける FITC を用いた接触皮膚炎惹起後 24 時間の耳介組織

FITC による接触皮膚炎の耳介組織のヘマトキシリン・エオジン染色像 (倍率は 200 倍、bar は 50 μ m を表す)。代表的な組織像を示す。

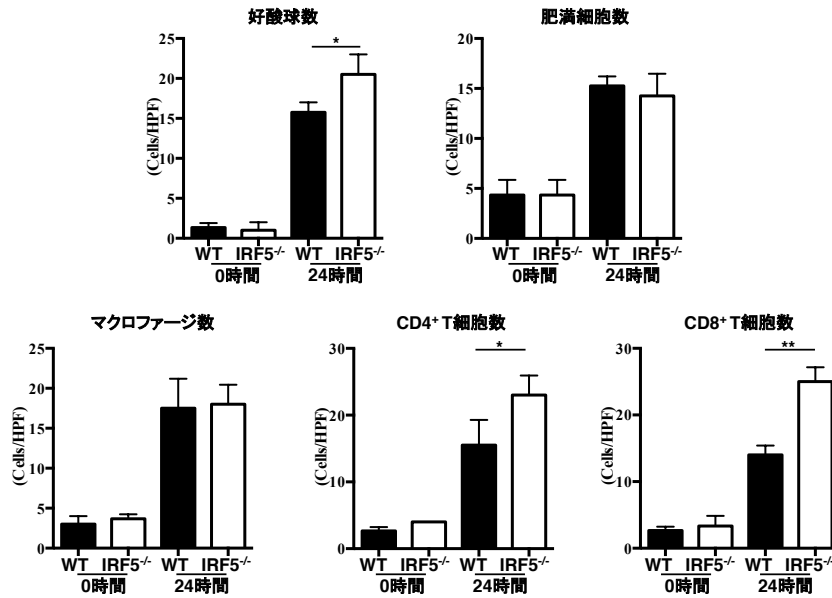


図 8 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスにおける FITC を用いた接触皮膚炎惹起前後の耳介組織における細胞浸潤数の検討

FITC による接触皮膚炎の惹起前後に耳介組織に浸潤している好酸球、肥満細胞、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞数。惹起直前(0 時間)、惹起後 24 時間の耳介を用いた。組織を 400 倍で観察し、一視野あたりの細胞数を計測した。細胞計測は一切片あたり 10 視野ずつ行った。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 5。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test による多群間解析を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

3) IRF5欠損マウス耳介組織ではDNFBによる接触皮膚炎においてはTh1サイトカインであるIFN- γ の発現が低下し、FITCによる接触皮膚炎においてはTh2サイトカインであるIL-4の発現が増加した

次に、接触皮膚炎を惹起した耳介組織内のサイトカインの発現量について検討した。

Th1細胞は主としてIFN- γ を産生する一方で、Th2細胞は主としてIL-4などを産生する^{50, 51}。惹起直前および最も腫脹の強い惹起後24時間の耳介組織を回収し、定量的RT-PCR法を用いて惹起後耳介組織におけるIFN- γ およびIL-4 mRNAの発現量を検討したところ、DNFB惹起後のIRF5欠損マウス耳介組織内IFN- γ のmRNA発現量は野生型マウスと比較し、有意に低下していた(図9)。次にFITCで惹起した耳介組織内サイトカインの発現量を検討したところ、IRF5欠損マウス耳介組織内IL-4のmRNA発現量は野生型マウスと比較し、有意に増加していた(図9)。以上よりIRF5の欠損によりDNFBを用いた接触皮膚炎ではTh1サイトカインであるIFN- γ の発現が低下する一方で、FITCを用いた接触皮膚炎ではTh2サイトカインであるIL-4の発現が増加していた。

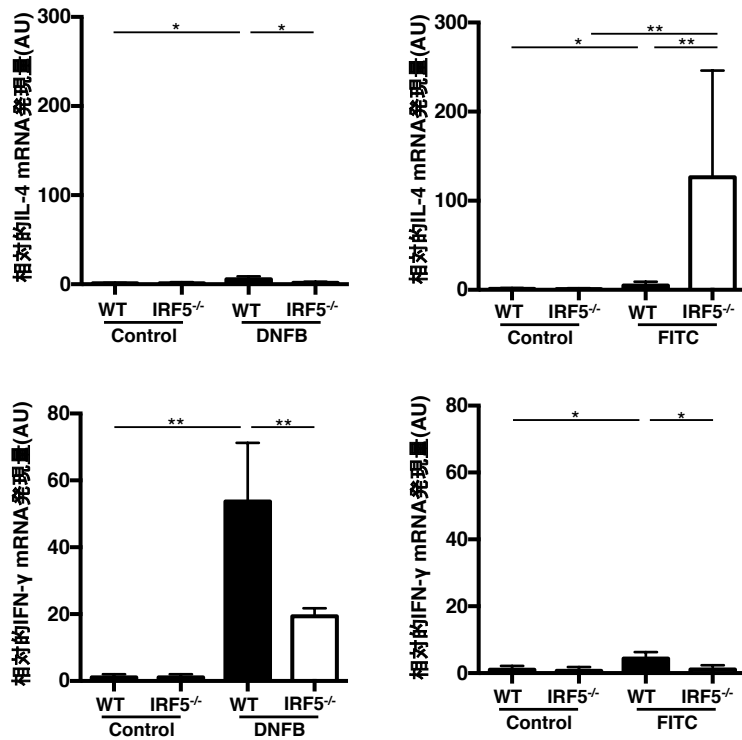


図9 惹起後耳介組織におけるIL-4およびIFN- γ mRNAの発現(DNFBもしくはFITC)

DNFBおよびFITCによる接触皮膚炎を起こした耳介組織におけるIL-4およびIFN- γ mRNAの発現。惹起直前、惹起後24時間の耳介組織を用いた。データは平均値 \pm SEMを用いて表した。各群n=6。解析にはone-way ANOVAとBonferroni *post hoc* testによる多群間解析を用いた。 $*p < 0.05$ 。 $**p < 0.01$ 。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5欠損マウス。

4) IRF5 欠損マウスにおける DNFB を用いた Th1 型接触皮膚炎反応の減弱と FITC を用いた Th2 型接触皮膚炎反応の増強は感作相の異常に起因する

これまでの検討で IRF5 の欠損により Th1 型接触皮膚炎反応が減弱し、Th2 型反応が増強することが示された。接触皮膚炎は感作相と惹起相の 2 相によって構成される免疫反応であるため、次に IRF5 欠損により生じる Th1/Th2 型反応の異常が感作相と惹起相のいずれによるものかについて検討した。DNFB で感作した野生型マウス、および IRF5 欠損マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を回収し、未感作の野生型マウス、および IRF5 欠損マウスに養子移入を行った後、耳介皮膚に DNFB を塗布して惹起を行った。野生型マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を移入した野生型マウスと IRF5 欠損マウスの皮膚炎惹起後耳介腫脹は同程度であった (野生型マウスドナー+野生型マウスレシピエント: $5.00 \pm 0.48 \times 10^{-2} \text{mm}$, 野生型マウスドナー+IRF5 欠損マウスレシピエント: $4.67 \pm 0.33 \times 10^{-2} \text{mm}$) (図 10a)。一方、IRF5 欠損マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を移入した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの皮膚炎惹起後耳介腫脹は、野生型マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を移入した群と比較し、有意に減弱していた (IRF 欠損マウスドナー+野生型マウスレシピエント: $1.67 \pm 0.33 \times 10^{-2} \text{mm}$, IRF5 欠損マウスドナー+IRF5 欠損マウスレシピエント: $1.00 \pm 0.00 \times 10^{-2} \text{mm}$) (図 10a)。

次に FITC を用いて同様の実験を行った。野生型マウス鼠径および腋窩リンパ節細

胞を移入した野生型マウスと IRF5 欠損マウスの皮膚炎惹起後耳介腫脹は同程度であった (野生型マウスドナー+野生型マウスレシピエント: $4.80 \pm 0.37 \times 10^{-2}$ mm, 野生型マウスドナー+IRF5 欠損マウスレシピエント: $4.60 \pm 0.25 \times 10^{-2}$ mm) (図 10b)。一方 IRF5 欠損マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を移入した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの皮膚炎惹起後耳介腫脹は、野生型マウス鼠径および腋窩リンパ節細胞を移入した群と比較し、有意に増強していた (IRF 欠損マウスドナー+野生型マウスレシピエント: $6.00 \pm 0.32 \times 10^{-2}$ mm, IRF5 欠損マウスドナー+IRF5 欠損マウスレシピエント: $7.20 \pm 0.58 \times 10^{-2}$ mm) (図 10b)。

感作相は、抗原を取り込んだ DC が鼠径および腋窩リンパ節へと移動してナイーブ T 細胞を活性化し分化させるまでの段階に相当する。IRF5 欠損に伴う接触皮膚炎の反応異常は、レシピエントにおける IRF5 の欠損に依存せず、ドナーにおける IRF5 の欠損に依存すると考えた。ここでドナーとして用いた細胞は感作によって抗原特異的に増殖した細胞である。通常 IRF5 は T 細胞では発現しないとされている。従って IRF5 欠損による DNFB を用いた Th1 型接触皮膚炎反応の減弱と FITC を用いた Th2 型接触皮膚炎反応の増強は、感作相での異常によるものと考えられた。

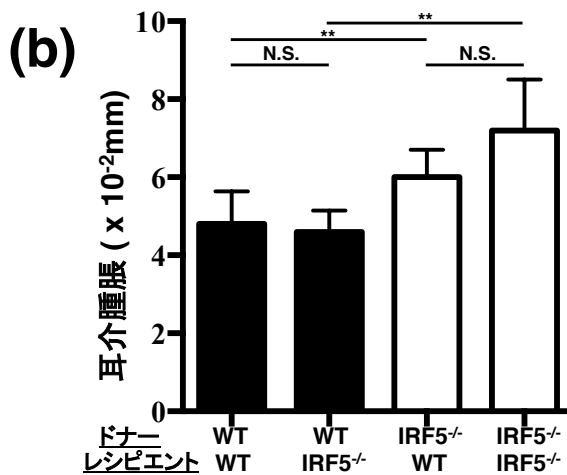
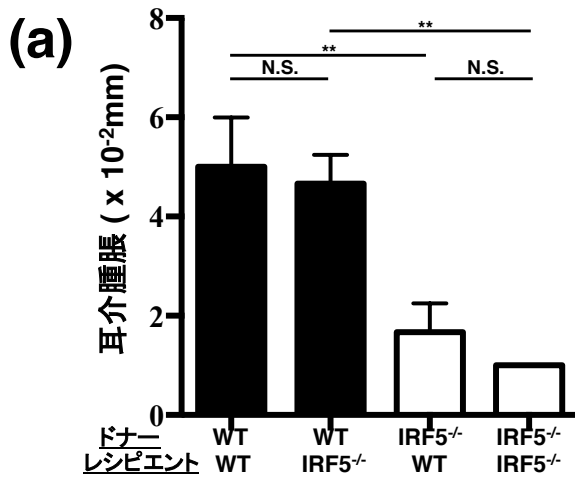


図 10 感作後の鼠径および腋窩リンパ節由来細胞による養子移入実験

DNFB もしくは FITC を野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスに経皮感作した後に鼠径および腋窩リンパ節を回収した。回収した鼠径および腋窩リンパ節から細胞懸濁液を作成し、未感作の野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの尾静脈より移入を行った。

(a) 感作したマウスより養子移入を行い DNFB で惹起して 24 時間後の耳介腫脹を示す。

データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 6。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。***p* < 0.01。N.S.=有意差なし。

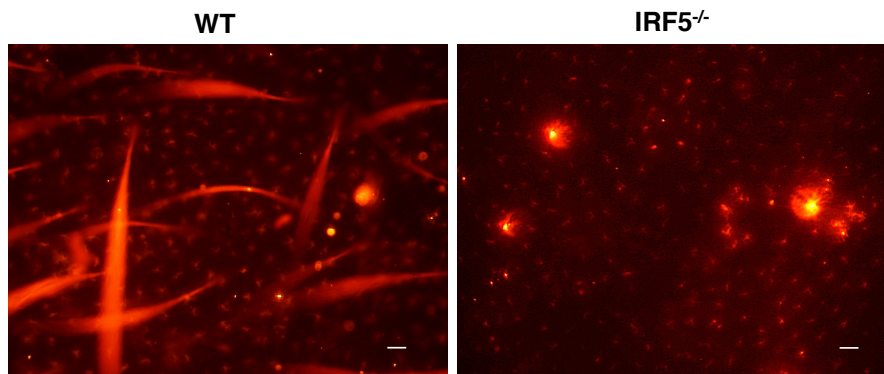
(b) 感作したマウスより養子移入を行い FITC で惹起して 24 時間後の耳介腫脹を示す。

データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 6。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。***p* < 0.01。N.S.=有意差なし。

5) IRF5 欠損マウスと野生型マウスとの間で表皮 DC 数に差はみられなかった

ここまでの検討で IRF5 の欠損による Th1 型接触皮膚炎の反応の減弱と、Th2 型接触皮膚炎の反応の増強は感作相での異常に伴うことが考えられたので、次に野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの表皮 DC 数の検討を行った。表皮内では LC が MHC class II を発現することが知られている。ここでは MHC class II のマーカーの一つである抗 I-A^b 抗体を用いて、表皮 DC を染色した。未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの耳介表皮シートを用いて、表皮 DC 数を検討したところ、野生型マウスと IRF5 欠損マウスとの間に有意差はみられなかった (図 11a, 11b)。また IRF5 欠損表皮 DC と野生型表皮 DC との間に細胞密度や分布に大きな違いはなく、形態学的異常も明らかではなかった。以上の結果より、IRF5 欠損マウスにおける感作相での異常は表皮 DC 数の差異により生じるものではないと考えられた。

(a)



(b)

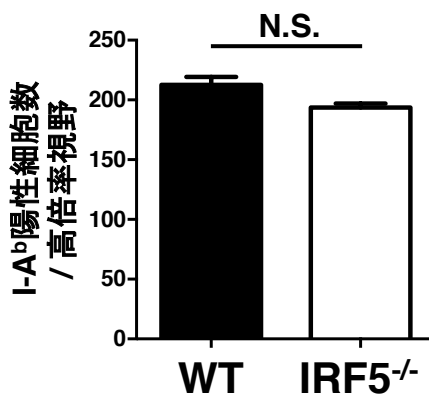


図 11 未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの表皮 DC 数

未感作の野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの耳介を採取し、表皮シートを作成した。表皮 DC を抗 I-A^b 抗体を用いて染色し、I-A^b 陽性細胞数を計測した。

(a) 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウス耳介表皮シート由来 I-A^b 陽性細胞。代表的な結果を示す。組織を 400 倍で観察した。Bar は 50 μ m。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。

(b) 表皮シート上の I-A^b 陽性細胞数。各群 n=5。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。組織を 400 倍で観察し、一視野あたりの細胞数をカウントした。カウントは一切片あたり 10 視野ずつ行った。データは平均値 \pm SEM を用いて表した。各群 n=5。解析には Mann-Whitney U test を用いた。N.S.=有意差なし。

6) IRF5 欠損マウスと野生型マウスとの間で鼠径および腋窩リンパ節における抗原を取り込んだ抗原提示細胞数に差はみられなかった

次に IRF5 欠損抗原提示細胞と野生型抗原提示細胞の抗原取り込み能ならびに遊走能について検討を行った。野生型マウスおよび IRF5 欠損マウス腹部皮膚に FITC を塗布し、鼠径および腋窩リンパ節における FITC を取り込んだ抗原提示細胞について、フローサイトメトリーを用いて CD11c 陽性 I-A^b 陽性 FITC 陽性細胞の割合を検討した。すると、野生型マウスと IRF5 欠損マウスとの間に差はみられなかった (野生型: 45.1 ± 0.55%, IRF5 欠損マウス: 44.2 ± 0.38%) (図 12a, 12b)。以上の結果より IRF5 を欠損しても、抗原提示細胞の抗原取り込み能ならびに遊走能には異常を来さないことが考えられた。

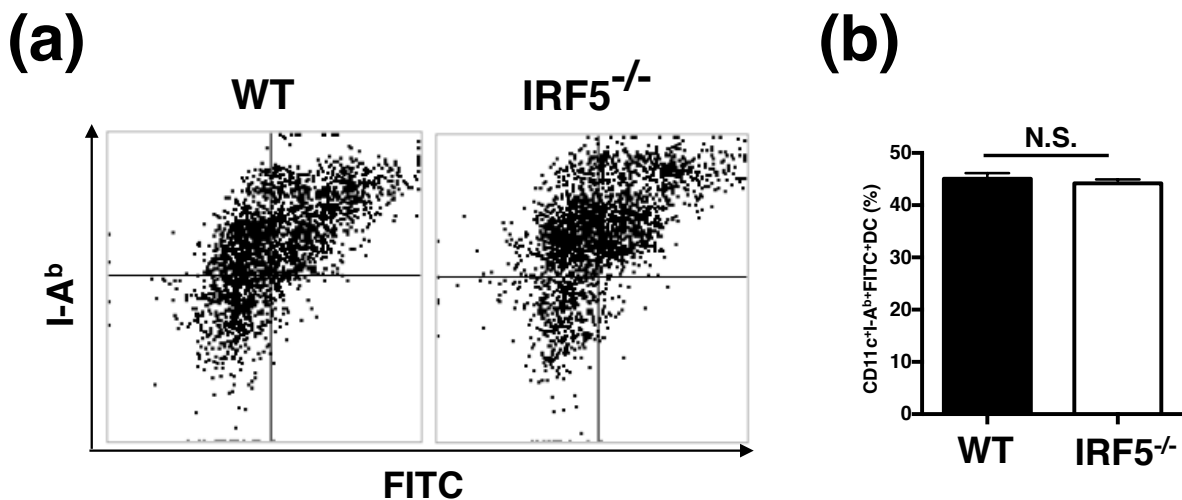


図 12 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウス鼠径および腋窩リンパ節における CD11c 陽性 I-A^b 陽性 FITC 陽性細胞数

FITC を経皮感作し 48 時間後に野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し、CD11c, I-A^b で染色した。CD11c で gating した後に、I-A^b 陽性 FITC 陽性細胞の解析を行った。

- (a) 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節における CD11c 陽性 I-A^b 陽性 FITC 陽性細胞。代表的な結果を示す。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。
- (b) 野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節における CD11c 陽性 I-A^b 陽性 FITC 陽性細胞の割合。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n=4。解析には Mann-Whitney U test を用いた。 N.S.=有意差なし。

7) 感作相での IRF5 欠損に伴う Th1 型反応の減弱と Th2 型反応の増強は DC に起因する可能性がある

次に IRF5 欠損抗原提示細胞による抗原特異的 T 細胞の活性化に与える影響について検討した。DNFB にて感作した野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節より細胞を回収し、mitomycin C を用いて細胞増殖を停止させ、抗原提示細胞として用いた。また DNFB 感作後野生型マウスの鼠径および腋窩リンパ節より T 細胞を分離・回収した。この両者を DNFB の水溶性アナログである DNBS 含有培養液で共培養し、BrdU アッセイを用いて T 細胞の増殖能について検討した。野生型と比べて IRF5 欠損抗原提示細胞の T 細胞増殖能は、有意に低下していた (図 13a)。一方、FITC を用いて同様の実験を行ったところ、野生型と比べて IRF5 欠損抗原提示細胞の T 細胞増殖能は、有意に亢進していた (図 13b)。

次に DNFB もしくは FITC にて感作した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節より DC を回収し、同様に感作後の野生型マウスの鼠径および腋窩リンパ節より T 細胞を回収した。この両者と DNBS もしくは FITC を加えて共培養を行い、サイトカインの発現量を検討した。すると野生型と比較し IRF5 欠損 DC を用いた場合は、DNBS 含有培養液中細胞における IFN- γ および IL-12p40 mRNA の発現量は有意に低下した。その一方で、FITC 含有培養液中細胞における IL-4 mRNA の

発現量は有意に増加していた (図 14)。以上より IRF5 を欠損した DC により DNFB 感作下では T 細胞の増殖が低下するとともに、IFN- γ および IL-12p40 mRNA 発現が低下する一方、FITC 感作下では T 細胞の増殖が増加するとともに、IL-4 mRNA 発現が増加した。従って、DC における IRF5 欠損が Th1 型接触皮膚炎反応の減弱と Th2 型接触皮膚炎反応の増強に関与している可能性が考えられた。

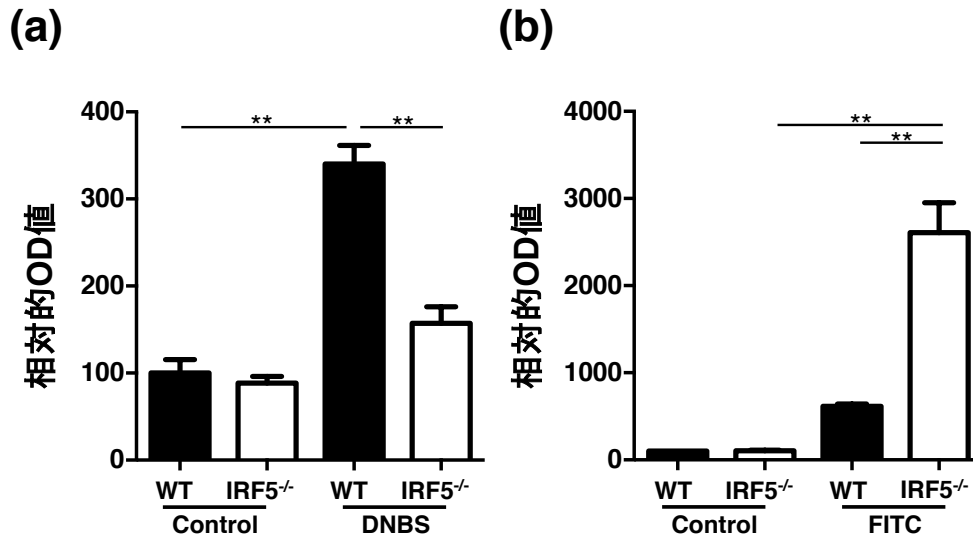


図 13 BrdU アッセイによる抗原特異的 T 細胞増殖能の検討

DNFB もしくは FITC にて経皮感作した野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節より細胞を回収し、mitomycin 処理を施し、抗原提示細胞として用いた。DNFB もしくは FITC 経皮感作後の野生型マウスより T 細胞を分離し、この両者に DNBS もしくは FITC を加えて共培養を行い、BrdU アッセイキットを用いて T 細胞の増殖能の検討を行った。

(a) 抗原提示細胞と T 細胞を分離し、この両者に DNBS を加えて 2 日間共培養を行った。BrdU アッセイキットを用いて T 細胞の増殖能の検討を行った。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control:培養液のみ。DNBS:培養液に DNBS を添加。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n=10。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

(b) 抗原提示細胞と T 細胞を分離し、この両者に FITC を加えて 2 日間共培養を行った。BrdU アッセイキットを用いて T 細胞の増殖能の検討を行った。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control:培養液のみ。FITC:培養液に FITC を添加。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n=10。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。** $p < 0.01$ 。

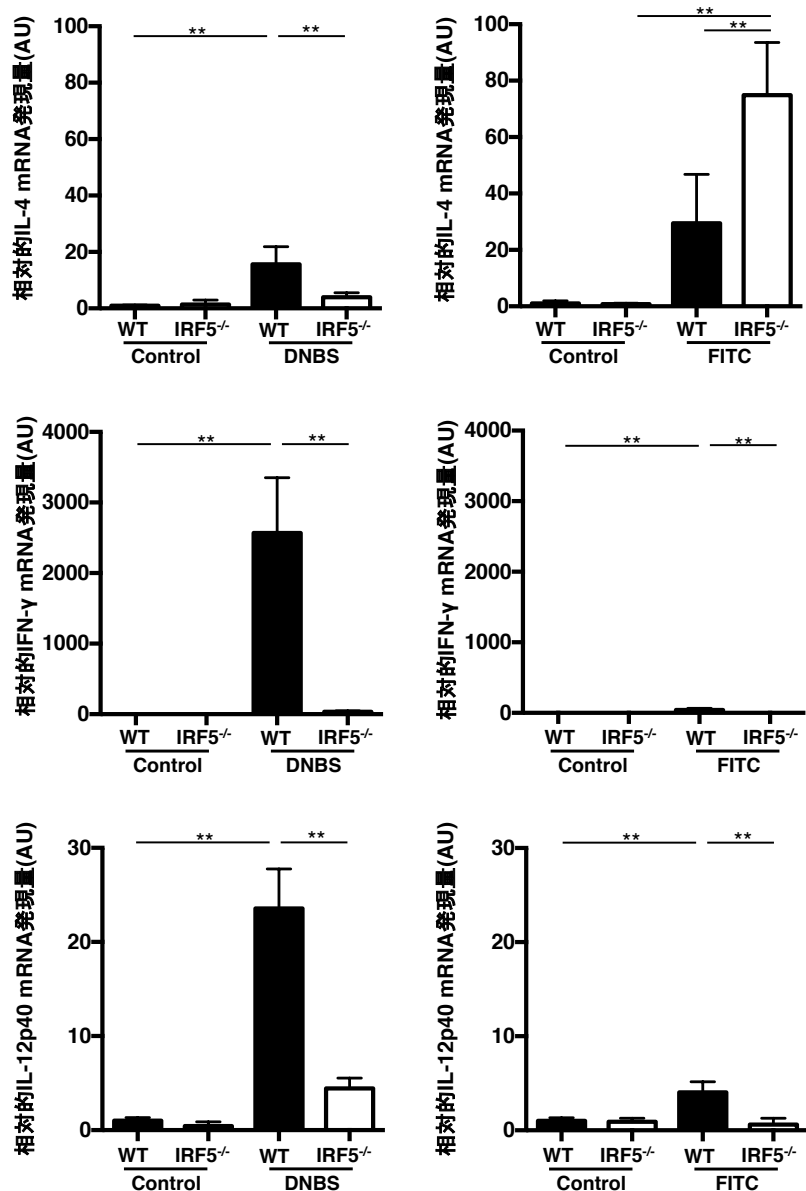


図 14 野生型マウスもしくは IRF5 欠損マウス由来 DC と T 細胞との共培養におけるサイトカイン発現の検討

感作後の野生型および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節より CD11c 陽性細胞を分離・回収した。感作後の野生型マウス鼠径および腋窩リンパ節より T 細胞を分離・回収した。この両者に DNBS もしくは FITC を加えて共培養を行った。2 日後に細胞を TriReagent を用いて回収し、サイトカイン産生を RT-PCR 法を用いて検討した。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control:培養液のみ。DNBS:培養液に DNBS を添加。FITC:培養液に FITC を添加。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n = 10。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

8) IRF5 欠損による Th1 型反応の減弱は DC における IL-12 の産生低下に起因する可能性がある

接触皮膚炎の感作相では DC が重要である。IRF5 は DC、マクロファージ、B 細胞に発現し、通常 T 細胞では発現しないことより、DC に着目して研究を進めた。Th1 型反応では DC から産生される IL-12 により、T 細胞が Th0 から Th1 へと分化する⁵²⁻⁵⁴。更に IRF5 は IL-12 のプロモーター領域に結合し IL-12 の発現調節を行うため^{42, 45}、IRF5 欠損マウスにおける Th1 型反応の減弱は DC 由来 IL-12 の産生低下に起因すると考えた。野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの腹部皮膚に DNFB を用いて感作し、5 日後に鼠径および腋窩リンパ節を回収した後、鼠径および腋窩リンパ節における DC の IL-12 産生について検討した。CD11c 陽性 I-A^b 陽性細胞の中で IL-12 産生細胞の割合は野生型マウスと比較し、IRF5 欠損マウスでは有意に低下していた (野生型: $8.52 \pm 0.65\%$, IRF5 欠損マウス: $3.08 \pm 0.42\%$) (図 15a, 15b)。以上より、IRF5 欠損マウスにおける DNFB による Th1 型接触皮膚炎の減弱は、DC 由来 IL-12 の産生低下に伴うことが考えられた。

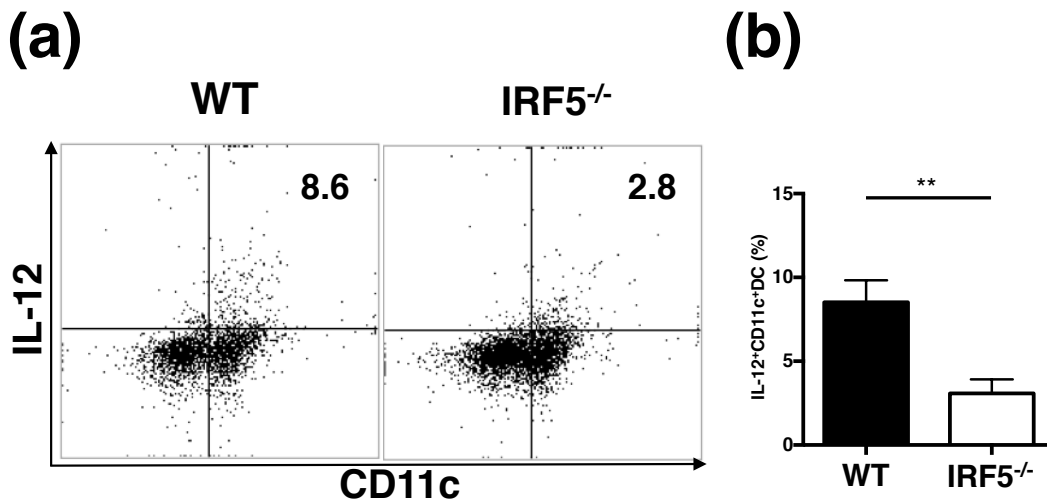


図 15 鼠径および腋窩リンパ節における DC 内 IL-12 産生の検討

DNFB により感作した野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し、PMA+Ionomycin で刺激を加えた。Brefeldin A を用いて細胞内蛋白輸送阻害を行い、細胞内サイトカインの発現を検討した。細胞表面を CD11c, I-A^b で染色し、7-AAD を用いて死細胞を除去した。

(a) DNFB 感作後野生型マウスおよび IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節における CD11c 陽性 I-A^b 陽性 IL-12 陽性細胞の割合。代表的な結果を示す。WT: 野生型マウス。IRF5^{-/-}: IRF5 欠損マウス。

(b) CD11c 陽性 I-A^b 陽性 IL-12 陽性細胞の割合。WT: 野生型マウス。IRF5^{-/-}: IRF5 欠損マウス。データは平均値±SEM を用いて表した。解析には Mann-Whitney U test を用いた。** $p < 0.01$ 。各群 $n=4$ 。

9) IRF5 欠損により鼠径および腋窩リンパ節中の MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103

陰性 dDC の割合が増加する可能性がある

次に、DC における IRF5 欠損が如何に Th2 型反応増強に繋がるのかについて検討を行った。選択的に Th2 型反応を誘導する DC として、近年 MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC が報告された^{32, 33, 55}。MGL2 は DC に発現する唯一のガラクトース型 C 型レクチンであり、PDL2 は DC 上に発現する共刺激分子の一つである。皮膚における PDL2 陽性 DC には MGL2 の発現がみられ、MGL2 陽性 PDL2 陽性 dDC は網羅的遺伝子発現解析の結果、IRF4 を高発現することが知られている⁵⁵。IRF4 は MyD88 と直接的に結合し、IRF5 との間で競合的な MyD88 結合を示し、IRF5 の活性化を抑制する調節因子として機能する。従って、IRF5 欠損 DC においては転写因子 IRF4 の発現が亢進し、それに伴い MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合が増加することが考えられる。そこで未感作もしくは FITC にて感作した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節から DC を回収し、これらの細胞における IRF4 mRNA の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。未感作の状態では野生型 DC、および IRF5 欠損 DC における IRF4 mRNA の発現量に差はみられなかった (図 16)。その一方で、FITC にて感作すると、IRF5 欠損 DC における IRF4 mRNA の発現量は野生型 DC と比較し、有意に亢進していた (図 16)。

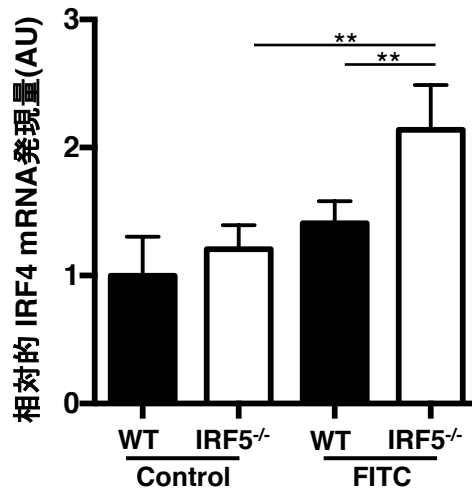


図 16 鼠径および腋窩リンパ節由来 DC における IRF4 mRNA 発現の検討

FITC にて経皮感作もしくは未感作の野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し、CD11c 陽性細胞を分離した。RT-PCR 法を用いて DC 内 IRF4 mRNA の発現量を検討した。データは平均値±SEM を用いて表した。各群 n=5。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。 $**p < 0.01$ 。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control: 未感作の鼠径および腋窩リンパ節由来 CD11c 陽性細胞。FITC: FITC 感作後の鼠径および腋窩リンパ節由来 CD11c 陽性 DC。

次に、鼠径および腋窩リンパ節中 MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合を検討した。MGL2 陽性 DC は FITC にて経皮感作後 1 日目に鼠径および腋窩リンパ節での発現が約 50%になるとされ、4 日目には約 10%まで低下することが過去の報告で示されている³²。以上より、FITC にて経皮感作後 1 日目の鼠径および腋窩リンパ節における MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合をフローサイトメトリーを用いて測定した。FITC にて感作を行った IRF5 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合は有意に増加していた(野生型: 15.5 ± 0.45%, IRF5 欠損マウス: 19.6 ± 0.27%) (図 17a, 17b)。以上の結果より IRF5 欠損マウスにおいて FITC による Th2 型接触皮膚炎反応が増強する要因として、IRF5 欠損により DC における IRF4 mRNA の発現が亢進し、その結果 Th2 型反応を誘導する MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の鼠径および腋窩リンパ節における割合が増加するのではないかと考えられた。

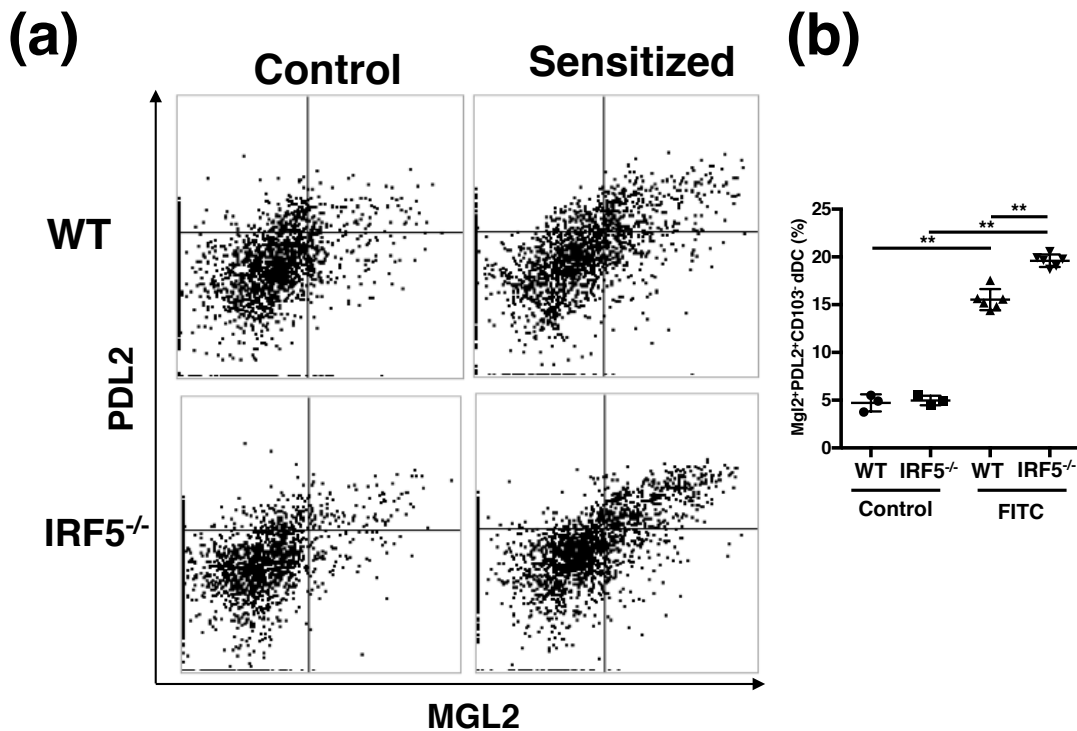


図 17 鼠径および腋窩リンパ節における MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の検討

FITC にて経皮感作した野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節を回収し細胞懸濁液を作成した。7-AAD を用いて死細胞を除去し、CD11c 陽性・CD103 陰性細胞で gating した後に、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC を染色した。

- (a) 野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節における MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC。代表的な結果を示す。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control: 未感作の鼠径および腋窩リンパ節由来細胞。Sensitized: 感作後の鼠径および腋窩リンパ節由来細胞。MGL2: macrophage galactose-type C-type lectin 2。PDL2: programmed cell death ligand 2。
- (b) 野生型マウス、および IRF5 欠損マウスの鼠径および腋窩リンパ節における MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC 数。データは平均値±SEM を用いて表した。コントロールは各群 n=3。FITC 感作後は各群 n=5。解析には one-way ANOVA と Bonferroni *post hoc test* による多群間解析を用いた。***p* < 0.01。WT:野生型マウス。IRF5^{-/-}:IRF5 欠損マウス。Control: 未感作の鼠径および腋窩リンパ節由来細胞。FITC: FITC 感作後の鼠径および腋窩リンパ節由来細胞。MGL2: macrophage galactose-type C-type lectin 2。PDL2: programmed cell death ligand 2。

考察

今回 IRF5 欠損マウスにおいて DNFB による Th1 型接触皮膚炎反応が減弱する一方で、FITC による Th2 型接触皮膚炎反応が増強することを明らかにした。IRF5 は TLR 刺激により活性化する転写因子である。TLR は細菌や寄生虫、ウイルスや菌類などが発現する PAMPs を認識するが、ハプテン刺激により活性化される。ヒトにおける接触皮膚炎の代表的なハプテンであるニッケルは TLR4 とそのリガンドである LPS とは異なる結合を示すことで活性化する⁵⁶。一方で trinitrochlorobenzene のように直接的に TLR に認識されないハプテンはヒアルロン酸など宿主由来内因性リガンドなどによって TLR2 や TLR4 を活性化すると考えられている⁵⁷⁻⁵⁹。接触皮膚炎のメカニズムに TLR シグナル伝達経路を介する系が存在すると考えられていることから、TLR 刺激により活性化される転写因子である IRF5 を欠損したマウスを用いることで、接触皮膚炎における IRF5 の役割の解明を目的とした。

接触皮膚炎では Th1 サイトカインと Th2 サイトカインとが混在しており^{60, 61}、Th1 細胞は主として IFN- γ を産生する一方で、Th2 細胞は主として IL-4 などを産生する^{50, 51}。IRF5 は主として Th1 型反応への寄与が示唆されているが、本検討においては IRF5 欠損マウスで Th1 型接触皮膚炎の減弱および局所での IFN- γ 発現の低下と、Th2 型接触皮膚炎の増強および局所での IL-4 発現の亢進が惹起相で認められた。

また感作後の鼠径および腋窩リンパ節を移入した養子移入を行うと、IRF5 欠損マウスでは Th1 型反応が減弱し、Th2 型反応の増強がみられた。移入した養子は T 細胞や樹状細胞および B 細胞など様々な細胞を含むが、感作により抗原特異的に増殖した細胞が主体である。このため養子移入実験により IRF5 欠損に伴うこれらの接触皮膚炎反応の変化は、感作相に起因するものと考えられた。接触皮膚炎の感作相においては DC と T 細胞が主体であり、IRF5 は DC、マクロファージ、B 細胞に発現し、通常 T 細胞では発現しないことより、DC に着目し、研究を進めた。

感作相は 1) 皮膚における DC によるハプテン-蛋白結合物の取り込み、2) DC の鼠径および腋窩リンパ節などの所属リンパ節への遊走、3) その所属リンパ節における DC の抗原特異的 T 細胞間への抗原提示とそれに伴う抗原特異的 T 細胞の活性化、増殖および分化の段階に分けられるが、表皮 DC 数と DC の抗原取り込み能および遊走能に関しては、IRF5 の欠損による変化はみられなかった。次に感作後の鼠径および腋窩リンパ節の細胞を抗原提示細胞として、それによる抗原特異的 T 細胞の活性化を検討したところ、IRF5 の欠損に伴い、DNFB を用いた Th1 主体の反応下では T 細胞の増殖は低下し、FITC を用いた Th2 主体の反応下では T 細胞の増殖は亢進した。更に DC と T 細胞の両者に DNBS もしくは FITC を加えて共培養を行ったところ、IRF5 を欠損した樹状細胞を用いた際に、T 細胞による Th1 サイトカイン発現量の低下、Th2

サイトカイン発現量の増加がみられた。以上より感作相での IRF5 欠損による Th1 型接触皮膚炎反応の減弱と Th2 型接触皮膚炎反応の増強は DC に起因することが示唆された。

殊に DC は IL-12 を産生し⁶²、DC から産生された IL-12 は T 細胞上の IL-12 受容体の発現を誘導してナイーブ T 細胞を Th1 に誘導する^{63,64}。更に IL-12 によって Th1 へと誘導された T 細胞が IFN- γ を産生し、より Th1 優位に分化誘導が進むことが知られている^{53,65}。IRF5 は ISRE に存在する IL-12 遺伝子プロモーター領域に結合して IL-12 発現の調節を行っており^{42,45}、IRF5 の欠損による Th1 型接触皮膚炎反応の減弱は、DC における IL-12 の産生低下に起因するのではないかと考えられた。DNFB 感作後の DC における IL-12 産生を intracellular staining を用いて検討したところ、IL-12 を産生する DC の割合は、IRF5 欠損マウスでは野生型と比較し低下していた。以上より、IRF5 欠損マウスにおける Th1 型接触皮膚炎の減弱は、DC の産生する IL-12 の低下によると考えた (図 18)。

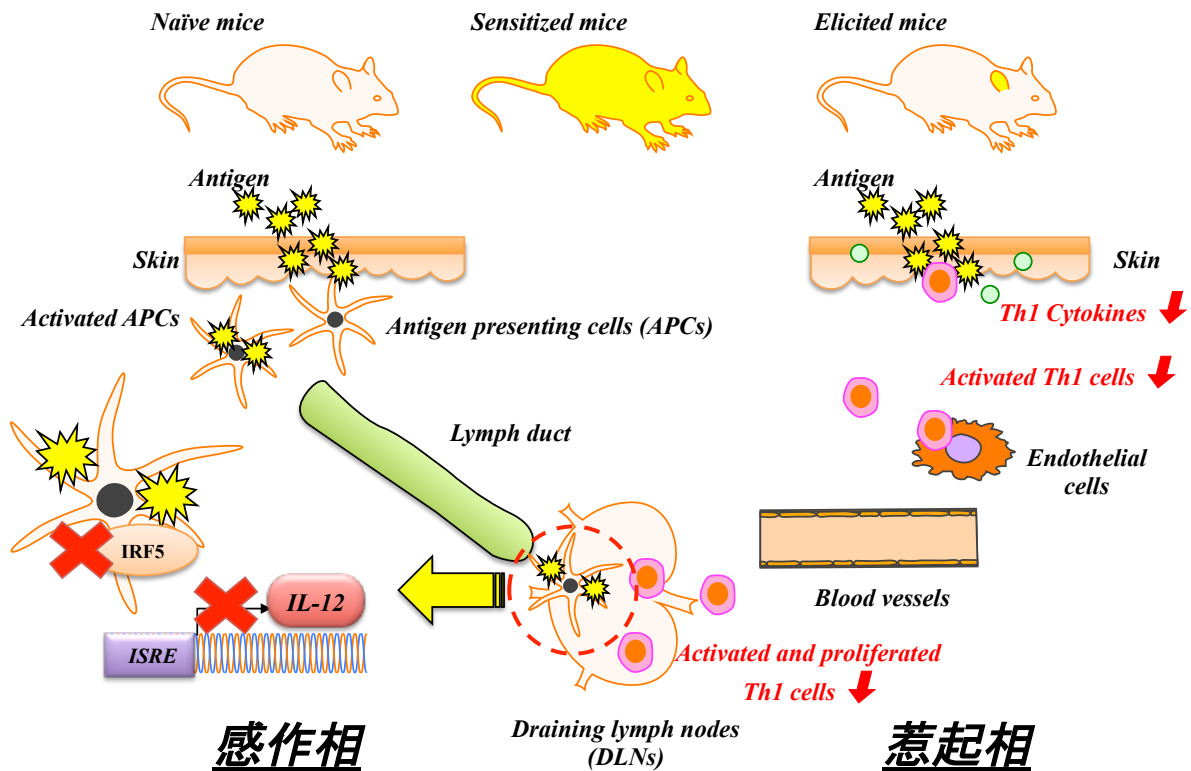


図 18 Th1 型接触皮膚炎における転写因子 IRF5 の役割のシエーマ

樹状細胞において IRF5 を欠損すると、IRF5 は ISRE に結合せず、その結果 IL-12 の産生が低下する。IL-12 は Th1 細胞分化に重要なサイトカインであり、IL-12 の産生低下により、Th1 細胞が減少する。同一抗原を用いて皮膚炎を惹起すると、Th1 細胞の減少により、IRF5 欠損マウスでは Th1 型接触皮膚炎反応が減弱する。Naïve mice: 未感作のマウス。Sensitized mice: 感作させたマウス。Elicited mice: 感作後惹起させたマウス。Antigen: 抗原。Skin: 皮膚。Antigen presenting cells (APCs): 抗原提示細胞。Activated APCs: 活性化した抗原提示細胞。Lymph duct: リンパ管。Draining lymph nodes (DLNs): 所属リンパ節。Activated and proliferated T cells: 活性化し増殖した T 細胞。Blood vessels: 血管。Endothelial cells: 血管内皮細胞。Activated T cells: 活性化 T 細胞。Cytokines: サイトカイン。

次に、DC における IRF5 欠損が如何に Th2 型反応増強に繋がるのかについて検討を行った。IRF5 は DC 内で ISRE に存在する IL-12 遺伝子プロモーター領域に結合し、IL-12 産生を亢進させることで、T 細胞を Th1 へと分化させるが、一方で IL-12 欠損マウスに接触皮膚炎を起こすと、Th1 型反応の減弱がみられるものの Th2 型反応は不変であったとされる^{66,67}。このため IRF5 欠損による DC からの IL-12 産生の低下のみでは Th2 型反応の増強の機序は説明ができない。T 細胞が Th2 へと分化していく上で重要な因子は IL-4 であるが⁶⁸、DC は通常 IL-4 を産生せず、DC が直接的に T 細胞を Th2 に分化誘導するサイトカインの存在は未だ明らかではない⁶⁹。Th2 型反応における DC の関与が報告されているが⁷⁰⁻⁷⁵、Th2 への分化誘導に特化した DC の存在は不明であった。

近年、選択的に Th2 型反応を誘導する DC として、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の存在が報告された^{32,33,55}。MGL2 は DC に発現する唯一のガラクトース型 C 型レクチンであり、他の C 型レクチンとは異なる糖を認識することより特有の免疫応答に関与する可能性が指摘されている⁷⁶。MGL2 は dDC での発現がみられ、MGL2 陽性 dDC は接触皮膚炎に重要であり、ランゲルハンス細胞や CD103 陽性 dDC とは異なるサブセットであることが報告されている^{32-34,76}。更に MGL2 陽性真皮 DC の中でも PDL2 陽性 CD103 陰性の dDC が Th2 型反応を選択的に誘導する³⁴。PDL2 は DC

上に発現し、PDL1 とともに T 細胞上に発現する PD-1 に結合する⁷⁷⁻⁸⁰。IL-4 により PDL2 は DC 上での発現が亢進するが⁸¹、PDL2 は T 細胞の活性化を抑制するという報告がある一方で⁷⁹、IFN- γ の産生を亢進させ Th1 型反応を誘導するという報告もある⁸⁰。また PDL2 抗体により DC の T 細胞刺激能が亢進するともいわれ^{82,83}、PDL2 は置かれた環境に応じて促進性もしくは抑制性の作用を有する。

MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC では網羅的遺伝子発現解析によって転写因子 IRF4 の発現が亢進していることが知られている⁵⁵。IRF4 は TRAF6 を介して調節を受けることにより、Th2 型反応を誘導するサブセットである CD11b^{hi}CD8 α ⁻ DC の発現誘導や、ケモカインレセプターの発現を介して DC の遊走制御に関与しており、その発現を制御することで DC を調節すると考えられている^{84,85}。更に DC 特異的に IRF4 を欠損すると、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 DC 数は有意に減少するとともに、*in vivo* での Th2 型反応の低下がみられた⁵⁵。DC では IRF4 は DC 内の IL-10, IL-33 の遺伝子転写領域に直接的に結合し、IL-10, IL-33 の産生亢進を介して Th2 分化を促す⁸⁶。また、T 細胞自体に発現する IRF4 も Th2 細胞分化に重要である⁸⁷⁻⁸⁹。T 細胞内で IRF4 は 1) 直接的に IL-4 遺伝子領域に結合する⁸⁸、2) GATA3 の上方調節作用を有する⁸⁷、3) IL-2 調節による Th2 細胞分化に寄与が示唆される growth factor independent 1 の発現に寄与する⁹⁰、といった機序を介して Th2 型反応を誘導すると考えられる。

興味深いことに IRF4 は IRF5 の MyD88 結合部位に結合することで、競合的に IRF5 の活性化を阻害することが知られている⁴⁰。IRF4 の mRNA は様々な TLR リガンドにより誘導される。誘導された IRF4 が IRF5 の結合部位に競合的に結合することで、IRF5 の MyD88 への結合を阻害し、IRF5 の MyD88 に依存した活性化を妨げる⁴⁰と考えられている。

そこで我々は IRF5 欠損 DC では IRF4 と IRF5 の競合が起こらず、TLR 刺激を介する IRF4 発現の亢進が起き、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合が増加するのではないかと考えた。FITC により感作後の鼠径および腋窩リンパ節における DC の IRF4 発現量について検討したところ、IRF5 欠損 DC では IRF5 では野生型 DC と比較し、IRF4 mRNA 発現量が有意に亢進していた。更に FITC 感作後鼠径および腋窩リンパ節中の MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合を検討したところ、IRF5 欠損により、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合は有意に増加した。以上より IRF5 欠損に伴う Th2 型反応の増強は MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC の割合の増加によることが考えられた (図 19)。MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC が如何に T 細胞を Th2 細胞へと分化させるのか、また TLR シグナルと IRF5 との間で如何なるメカニズムが作用するのかについては今後検討したいと考えている。

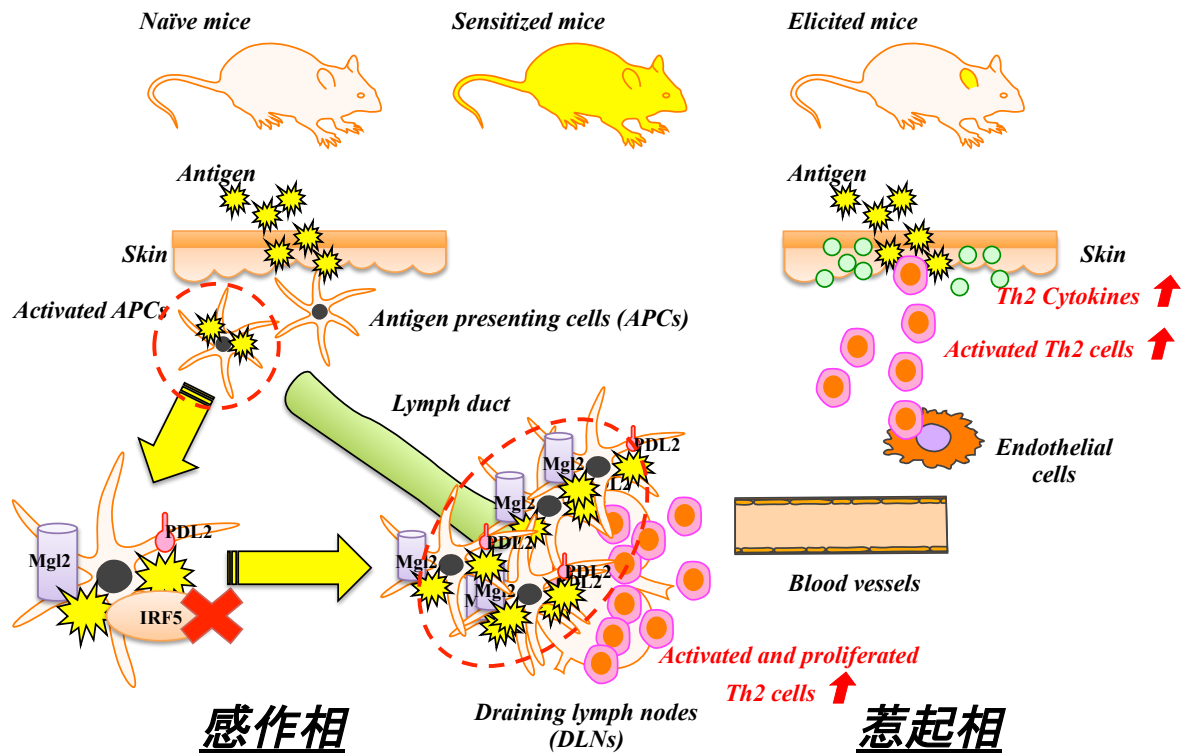


図 19 Th2 型接触皮膚炎における転写因子 IRF5 の役割のシエーマ

樹状細胞において IRF5 を欠損すると、MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性 dDC 数が増加し、その結果 Th2 細胞が増加する。同一抗原を用いて皮膚炎を惹起すると、Th2 細胞の増加により、IRF5 欠損マウスでは Th2 型接触皮膚炎反応が増強する。Naïve mice: 未感作のマウス。Sensitized mice: 感作させたマウス。Elicited mice: 感作後惹起させたマウス。Antigen: 抗原。Skin: 皮膚。Antigen presenting cells (APCs): 抗原提示細胞。Activated APCs: 活性化した抗原提示細胞。Lymph duct: リンパ管。Draining lymph nodes (DLNs): 所属リンパ節。Activated and proliferated T cells: 活性化し増殖した T 細胞。Blood vessels: 血管。Endothelial cells: 血管内皮細胞。Activated T cells: 活性化 T 細胞。Cytokines: サイトカイン。

転写因子 IRF5 は様々な自己免疫性疾患における炎症性サイトカインの発現に寄与すると考えられる転写因子である。これまでに TLR が接触皮膚炎に関与することが知られていたが、その下流のメカニズムについては不明とされていた。本検討により TLR 刺激によって活性化される転写因子 IRF5 が接触皮膚炎における Th1/Th2 型反応を調節することが示された (図 20)。しかし TLR と IRF5 との間で如何なるメカニズムが作用しているかは未だ不明であり、今後検討したいと考えている。

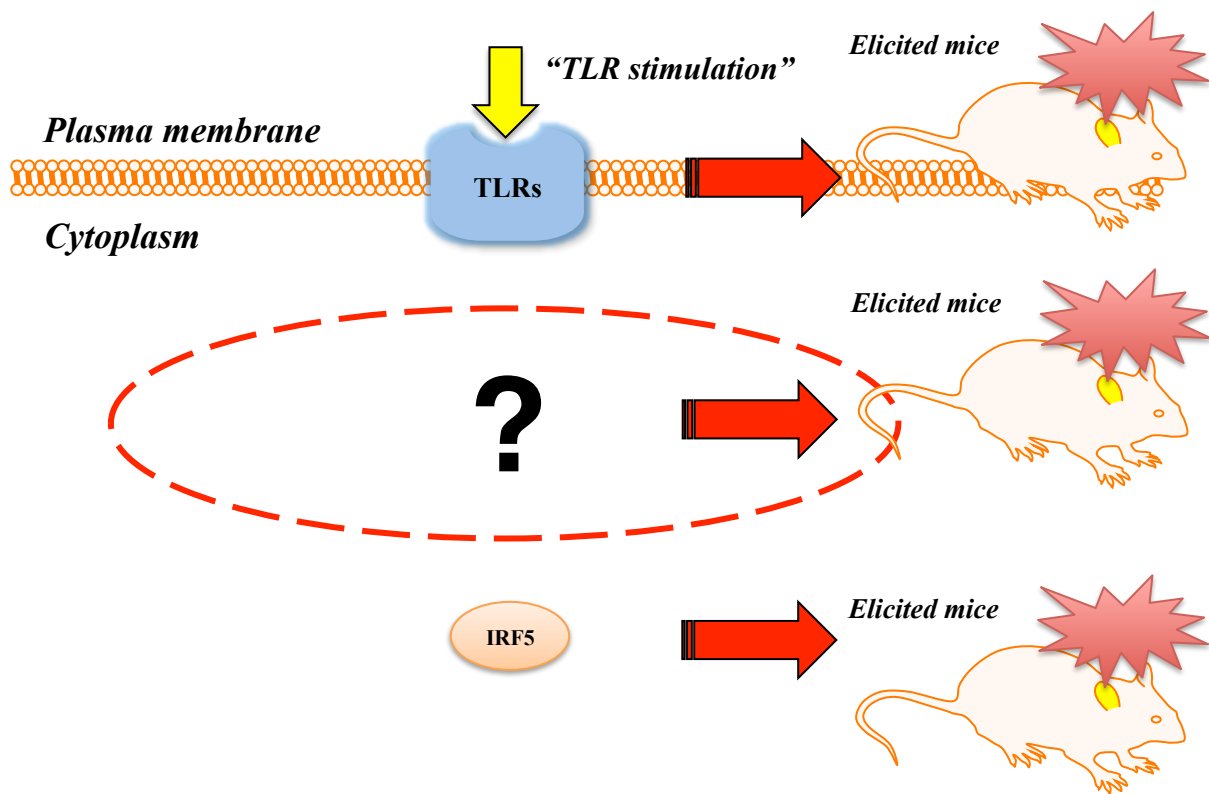


図 20 TLR と接触皮膚炎、IRF5 と接触皮膚炎、および不明な点の略図

様々な TLR を欠損することで、接触皮膚炎が減弱することが知られている。また本検討で TLR 刺激によって活性化される転写因子の一つである IRF5 と接触皮膚炎との関係を検討した。しかし TLR と IRF5 との間でどのようなメカニズムが作用し、接触皮膚炎反応に寄与するかについては未だ不明である。今後 TLRs と IRF5 との間を結ぶメカニズムについては検討していきたいと考えている。TLRs: Toll 様受容体。TLR stimulation: TLR への刺激。Plasma membrane: 細胞膜。Cytoplasm: 細胞質。Elicited mice: 感作後惹起させたマウス。

本検討を通じて IRF5 もしくはそのシグナル伝達経路を制御することが、接触皮膚炎の新しい治療に繋がると考えられた。乾癬やアトピー性皮膚炎など Th1/Th2 型反応のバランスが崩れることが発症要因となる炎症性疾患が多数存在する。将来的には IRF5 を標的とすることでこれらの疾患に対しても臨床展開することを目指していきたい。

謝辞

免疫染色を始め、技術的にサポートして下さった実験助手の加賀玉美さんに深謝致します。IRF5 欠損マウスをご提供頂いた東京大学生産技術研究所 炎症・免疫制御学 社会連携研究部門 谷口 維紹 先生に深謝致します。また、大学院で学ぶ機会を与えて下さり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室 佐藤 伸一 教授に深謝致します。また、本研究の共同研究者の一人である東京大学医学部皮膚科学教室 門野 岳史 准教授には丁寧に御指導ならびに御協力を賜りました。門野先生には免疫学の基礎から実験の仕方に至るまで細部にわたり御指導頂き、心より深謝致します。

表 略語一覽

Th	T helper
IRF5	Interferon regulatory factor 5
DC	Dendritic cell
IL	Interleukin
MGL2	Macrophage galactose-type C-type lectin 2
PDL2	Programmed cell death ligand 2
CD	cluster of differentiation
dDC	dermal dendritic cell
CHS	Contact hypersensitivity
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzene
FITC	fluorescein isothiocyanate
IFN	Interferon
T-bet	T-cell specific T-box transcriptional factor
Ig	Immunoglobulin
STAT	signal transducer and activator of transcription
GATA3	GATA-binding protein 3
LC	Langerhans cell
MHC	major histocompatibility complex
FcεRI	high-affinity receptor for IgE
ISRE	interferon-stimulated response element
PRRs	pattern recognition receptors
TLR	Toll like receptor
RIG-I	retinoic-acid inducible gene I
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
TIR	intracellular Toll/IL-1 receptor
MyD88	myeloid differentiation factor 88
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFNβ
LPS	lipopolysaccharide
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PE	phycoerythrin
PE/Cy7	phycoerythrin/cyanine 7
BrdU	Bromodeoxyuridine
DNBS	2,4-dinitrobenzene sulfonic acid
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
APC	allophycoyanin
SEM	standard error of the mean
Gfi1	growth factor independent 1

引用文献

1. Takeshita K, Yamasaki T, Akira S, Gantner F, Bacon KB. Essential role of MHC II-independent CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int Immunol* 2004; 16:685-95.
2. Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2014.
3. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-57.
4. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002; 109:431-5.
5. Tang A, Judge TA, Nickoloff BJ, Turka LA. Suppression of murine allergic contact dermatitis by CTLA4Ig. Tolerance induction of Th2 responses requires additional blockade of CD40-ligand. *J Immunol* 1996; 157:117-25.
6. Dearman RJ, Kimber I. Role of CD4(+) T helper 2-type cells in cutaneous inflammatory responses induced by fluorescein isothiocyanate. *Immunology* 2000; 101:442-51.

7. Sato T, Ishii N, Murata K, Kikuchi K, Nakagawa S, Ndhlovu LC, et al. Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2002; 32:3326-35.
8. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227-57.
9. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992; 176:1091-8.
10. Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 2007; 56:183-91.
11. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:543-55.
12. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:114-24.
13. 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 2013; 133:303-15.
14. Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2004; 14:131-8.
 15. Fyhrquist N, Wolff H, Lauerma A, Alenius H. CD8+ T cell migration to the skin requires CD4+ help in a murine model of contact hypersensitivity. *PLoS One* 2012; 7:e41038.
 16. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:9-22.
 17. Cheung PF, Wong CK, Ho AW, Hu S, Chen DP, Lam CW. Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Int Immunol* 2010; 22:453-67.
 18. Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, et al. PGD2 induces eotaxin-3 via PPAR γ from sebocytes: a possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:536-43.
 19. Migalovich-Sheikhet H, Friedman S, Mankuta D, Levi-Schaffer F. Novel identified receptors on mast cells. *Front Immunol* 2012; 3:238.

20. Otsuka A, Kabashima K. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy* 2015; 70:131-40.
21. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Köhler A, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* 2011; 34:973-84.
22. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:723-37.
23. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* 2014; 15:1064-9.
24. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol* 2013; 14:978-85.
25. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:289-301.
26. Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 2009; 10:1237-44.

27. Henri S, Williams M, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Dalod M, et al. Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunol Cell Biol* 2010; 88:366-75.
28. Igyártó BZ, Kaplan DH. Antigen presentation by Langerhans cells. *Curr Opin Immunol* 2013; 25:115-9.
29. Stoitzner P, Tripp CH, Eberhart A, Price KM, Jung JY, Bursch L, et al. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:7783-8.
30. Seneschal J, Clark RA, Gehad A, Baecher-Allan CM, Kupper TS. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 2012; 36:873-84.
31. Igyártó BZ, Haley K, Ortner D, Bobr A, Gerami-Nejad M, Edelson BT, et al. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* 2011; 35:260-72.
32. Kumamoto Y, Denda-Nagai K, Aida S, Higashi N, Irimura T. MGL2 Dermal dendritic cells are sufficient to initiate contact hypersensitivity in vivo. *PLoS One* 2009; 4:e5619.

33. 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* 2013; 8:e73270.
34. Kumamoto Y, Linehan M, Weinstein JS, Laidlaw BJ, Craft JE, Iwasaki A. CD301b⁺ dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 2013; 39:733-43.
35. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:623-55.
36. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:125-35.
37. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:644-58.
38. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
39. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
40. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, et al. Negative regulation

- of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15989-94.
41. Biswas PS, Gupta S, Chang E, Song L, Stirzaker RA, Liao JK, et al. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:3280-95.
 42. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 434:243-9.
 43. Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T, Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354:1045-51.
 44. Koshiba R, Yanai H, Matsuda A, Goto A, Nakajima A, Negishi H, et al. Regulation of cooperative function of the Il12b enhancer and promoter by the interferon regulatory factors 3 and 5. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430:95-100.
 45. Krausgruber T, Saliba D, Ryzhakov G, Lanfrancotti A, Blazek K, Udalova IA. IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells. *Blood* 2010; 115:4421-30.

46. Paun A, Bankoti R, Joshi T, Pitha PM, Stäger S. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog* 2011; 7:e1001246.
47. Feng D, Yang L, Bi X, Stone RC, Patel P, Barnes BJ. Irf5-deficient mice are protected from pristane-induced lupus via increased Th2 cytokines and altered IgG class switching. *Eur J Immunol* 2012; 42:1477-87.
48. Xu Y, Lee PY, Li Y, Liu C, Zhuang H, Han S, et al. Pleiotropic IFN-dependent and -independent effects of IRF5 on the pathogenesis of experimental lupus. *J Immunol* 2012; 188:4113-21.
49. Ohmatsu H, Kadono T, Sugaya M, Tomita M, Kai H, Miyagaki T, et al. $\alpha 4 \beta 7$ Integrin is essential for contact hypersensitivity by regulating migration of T cells to skin. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:1267-76.
50. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
51. Ho IC, Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 2002; 109 Suppl:S109-20.
52. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development

- of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science 1993; 260:547-9.
53. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90:10188-92.
54. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med 1997; 186:1819-29.
55. Gao Y, Nish SA, Jiang R, Hou L, Licona-Limón P, Weinstein JS, et al. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. Immunity 2013; 39:722-32.
56. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. Nat Immunol 2010; 11:814-9.
57. Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. J Exp

- Med 2008; 205:2151-62.
58. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006; 177:1272-81.
 59. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195:99-111.
 60. Tamura T, Matsubara M, Takada C, Hasegawa K, Suzuki K, Ohmori K, et al. Effects of olopatadine hydrochloride, an antihistamine drug, on skin inflammation induced by repeated topical application of oxazolone in mice. *Br J Dermatol* 2004; 151:1133-42.
 61. Thomson JA, Troutt AB, Kelso A. Contact sensitization to oxazolone: involvement of both interferon-gamma and interleukin-4 in oxazolone-specific Ig and T-cell responses. *Immunology* 1993; 78:185-92.
 62. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:133-46.
 63. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, et al. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp*

- Med 1997; 185:825-31.
64. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997; 185:817-24.
 65. Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, Hsieh CS, Mattson J, Lanier L, et al. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 1994; 180:223-31.
 66. Müller G, Saloga J, Germann T, Schuler G, Knop J, Enk AH. IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity in vivo. *J Immunol* 1995; 155:4661-8.
 67. Riemann H, Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y, Luger TA, Wysocka M, et al. Neutralization of IL-12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J Immunol* 1996; 156:1799-803.
 68. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990; 145:3796-806.
 69. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* 2010; 11:647-55.

70. Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, Sakamoto K, et al. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol* 2013; 14:364-71.
71. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010; 207:2097-111.
72. León B, Ballesteros-Tato A, Browning JL, Dunn R, Randall TD, Lund FE. Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nat Immunol* 2012; 13:681-90.
73. Phythian-Adams AT, Cook PC, Lundie RJ, Jones LH, Smith KA, Barr TA, et al. CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J Exp Med* 2010; 207:2089-96.
74. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, et al. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 2013; 38:322-35.
75. Steinfelder S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CG, Joshi M, Dwyer D, et al. The

- major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med* 2009; 206:1681-90.
76. Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-Puthinan S, et al. Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem* 2010; 285:19193-204.
77. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5:1365-9.
78. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192:1027-34.
79. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2:261-8.
80. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*

- 2001; 193:839-46.
81. Ishiwata K, Watanabe N, Guo M, Tomihara K, Brumlik MJ, Yagita H, et al. Costimulator B7-DC attenuates strong Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol* 2010; 184:2086-94.
 82. Radhakrishnan S, Nguyen LT, Ciric B, Ure DR, Zhou B, Tamada K, et al. Naturally occurring human IgM antibody that binds B7-DC and potentiates T cell stimulation by dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170:1830-8.
 83. Nguyen LT, Radhakrishnan S, Ciric B, Tamada K, Shin T, Pardoll DM, et al. Cross-linking the B7 family molecule B7-DC directly activates immune functions of dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 196:1393-8.
 84. Suzuki S, Honma K, Matsuyama T, Suzuki K, Toriyama K, Akitoyo I, et al. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α - dendritic cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:8981-6.
 85. Bajiña S, Roach K, Turner S, Paul J, Kovats S. IRF4 promotes cutaneous dendritic cell migration to lymph nodes during homeostasis and inflammation. *J Immunol* 2012; 189:3368-77.
 86. Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, et al.

- Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun* 2013; 4:2990.
87. Lohoff M, Mittrücker HW, Prechtel S, Bischof S, Sommer F, Kock S, et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11808-12.
88. Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 2002; 195:1003-12.
89. Hu CM, Jang SY, Fanzo JC, Pernis AB. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *J Biol Chem* 2002; 277:49238-46.
90. Tominaga N, Ohkusu-Tsukada K, Udono H, Abe R, Matsuyama T, Yui K. Development of Th1 and not Th2 immune responses in mice lacking IFN-regulatory factor-4. *Int Immunol* 2003; 15:1-10.