

論文の内容の要旨

論文題目

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(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り、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。接触皮膚炎の発生機序はいまだ明らかでないが、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。

接触皮膚炎は感作相と惹起相に分けられる。感作相において、抗原ペプチドが皮膚に侵入すると、真皮樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞が抗原を取り込んで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。続く惹起相においては、抗原特異的 T 細胞が抗原に邂逅すると、再活性化し増殖するとともに、対応抗原が存在する炎症の場に集まり、種々のサイトカインなどを放出する。更に表皮角化細胞などの皮膚を構成する細胞よりケモカインなどが産生されることで炎症細胞浸潤が増加し、炎症反応が増幅される。接触皮膚炎モデルで抗原として汎用されるのが dinitrofluorobenzene (DNFB)、または 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、Th1 優位な免疫応答を生じる一方、FITC を用いた接触皮膚炎は Th2 優位な免疫応答を生じることが知られている。

Interferon regulatory factor 5 (IRF5)は IRF ファミリーの一員で、Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR)の刺激により活性化する転写因子である。IRF5 は tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)依存性に活性化して二量体となり、核内移行する。IRF ファミリーはいずれも N 末端に共通の DNA 結合ドメイ

ンを保持し、これを介して、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)と呼ばれる。IRF5 は、種々の TLR 刺激において樹状細胞やマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を制御するとされ、特に Th1 型反応に重要な転写因子である。

以上の背景をもとに、今回我々は接触皮膚炎における転写因子 IRF5 の役割を解明することを実験の目的とした。IRF5 欠損マウスに対して DNFB による Th1 型接触皮膚炎、FITC による Th2 型接触皮膚炎を惹起する実験系を用いて解析を行った。

DNFB で感作を行った野生型もしくは 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たところ、IRF5 欠損マウスの耳介腫脹は野生型マウスと比較し、有意に減弱していた。ところが、FITC を用いて同様に接触皮膚炎を惹起したところ、IRF5 欠損マウスの耳介腫脹は野生型マウスと比較し、有意に増強していた。また、DNFB を用いて接触皮膚炎を惹起した耳介組織内サイトカインの発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて検討したところ、IRF5 欠損マウスでは IFN- γ mRNA の発現量は野生型マウスと比較し、有意に低下していた。一方、FITC を用いて接触皮膚炎を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 欠損マウスでは IL-4 mRNA の発現量は野生型マウスと比較し増加していた。以上の結果より IRF5 の欠損により Th1 型接触皮膚炎反応は減弱するのに対して、Th2 型接触皮膚炎反応は逆に増強することが示唆された。

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 で感作させた野生型もしくは IRF5 欠損マウス所属リンパ節細胞を回収し、未感作の野生型もしくは 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。野生型マウス所属リンパ節細胞を移入した野生型マウスと IRF5 欠損マウスの耳介腫脹は同程度であった。一方、IRF5 欠損マウス所属リンパ節細胞を移入した野生型マウスの耳介腫脹は、野生型マウス所属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。次に FITC を用いて同様の実験を行った。野生型マウス所属リンパ節細胞を移入した野生型マウスと IRF5 欠損マウスの耳介腫脹は同程度であ

った。一方 IRF5 欠損マウス所属リンパ節細胞を移入した野生型マウスの耳介腫脹は、野生型マウス所属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。以上の結果より、IRF5 欠損による Th1 型反応の減弱と Th2 型反応の増強は移入した感作後の所属リンパ節細胞によることから、感作相に起因することが示唆された。

感作相は、1) 皮膚における抗原提示細胞によるハプテン-蛋白結合物の取り込み、2) 抗原提示細胞の所属リンパ節への遊走、3) 所属リンパ節における抗原提示細胞の抗原特異的 T 細胞への抗原提示、およびそれに伴う抗原特異的 T 細胞の活性化、増殖および分化の各段階に分けられる。まず耳介より表皮シートを作成し、表皮抗原提示細胞数を検討したが、野生型マウスと IRF5 欠損マウスとの間で差はみられなかった。次に野生型マウスおよび IRF5 欠損マウス腹部皮膚に FITC を経皮感作後、所属リンパ節における FITC を取り込んだ抗原提示細胞の割合を検討したが、両者の間で差はみられなかった。以上より IRF5 欠損によって抗原提示細胞の数、抗原の取り込み能および遊走能には変化を来さないと考えた。

次に抗原提示細胞による抗原特異的 T 細胞の活性化について検討を行った。DNFB で感作した野生型もしくは IRF5 欠損マウス所属リンパ節細胞を回収し、増殖を停止させ、抗原提示細胞として用いた。これと DNFB 感作後野生型マウス由来 T 細胞とを DNFB の水溶性アナログである DNBS 存在下で共培養し、細胞増殖能を検討した。すると野生型と比べて 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。同様に FITC を用いて同様の実験を行ったところ、逆に野生型と比べて 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。以上より感作相での IRF5 欠損による Th1 型反応の減弱と Th2 型反応の増強は抗原提示細胞に起因することが示唆された。

更に、感作後の野生型もしくは IRF5 欠損マウスより樹状細胞を回収し、感作した野生型 T 細胞と DNBS もしくは FITC 存在下で共培養し、サイトカイン発現について検討した。すると野生型と比べて IRF5 欠損樹状細胞を用いた場合には DNBS 存在下での IFN- γ および IL-12p40 mRNA の発現量は低下する一方、FITC 存在下での IL-4 mRNA の発現量が有意に増加した。Th1 型反応の誘導に不可欠なのが樹状細胞から産生される IL-12 である。DNFB 感作後の樹状細胞における IL-12 産生を intracellular staining を用いて検討した。すると、IL-12 を産生する樹状細胞の割合は、野生型と比較して IRF5 欠損樹状細胞では低下していた。

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、樹状細胞の産生する IL-12 の低下によると考えた。

次に、IRF5 欠損でみられる Th2 型反応の増強の機序についての検討を行った。近年、選択的に Th2 型反応を選択的に誘導する樹状細胞として、macrophage galactose-type C-type lectin (MGL2)陽性 programmed cell death ligand 2 (PDL2)陽性 CD103 陰性真皮樹状細胞が注目されている。MGL2 はガラクトース型 C 型レクチンであり、古典的樹状細胞や真皮樹状細胞で発現がみられる。MGL2 陽性樹状細胞は接触皮膚炎の感作相に重要な細胞であることが知られ、その中でも PDL2 陽性 CD103 陰性の真皮樹状細胞が Th2 型反応を選択的に誘導する。またこの MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性樹状細胞は網羅的遺伝子発現解析により IRF4 を高発現し、その数は IRF4 に依存する。そして、興味深いことに IRF4 は IRF5 の MyD88 結合部位に競合的に結合することで IRF5 の活性化を阻害する。実際、FITC 感作後所属リンパ節由来樹状細胞における IRF4 の発現について検討したところ、IRF5 欠損樹状細胞では野生型樹状細胞と比較し、IRF4 の発現が有意に亢進していた。更に FITC 感作後所属リンパ節中の MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性真皮樹状細胞の割合を検討したところ、IRF5 欠損により MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性真皮樹状細胞の割合は野生型 MGL2 陽性 PDL2 陽性 CD103 陰性真皮樹状細胞数と比較し、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 陰性真皮樹状細胞の割合が増加することによることが考えられた。

本検討により転写因子 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、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。また、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皮膚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。