

# 皮膚と樹状細胞

## Dendritic Cells in the Skin

相 場 節 也

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻 内科病態学講座 皮膚科学分野

### 1. はじめに一皮膚に存在する樹状細胞

以前から、皮膚においては、主に表皮内に存在するランゲルハンス細胞、真皮内に存在する真皮樹状細胞と2種類の樹状細胞の存在が知られていた。しかし、最近、それら以外に plasmacytoid dendritic cell (PDC) や inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) が存在することが報告されている(図1)。この様に、皮膚には様々な樹状細胞が存在する。近年の免疫学の進歩にともない明らかになった、免疫反応の多くの局面での樹状細胞の重要性を考えると、これら皮膚に存在する樹状細胞は、皮膚における感染防御において、また、種々の炎症性皮膚疾患の発症において重要な役割を演じていると思われる。

### 2. 皮膚線維芽細胞による樹状細胞の分化誘導

近年、試験管内での研究で、造血系前駆細胞からの樹状細胞の分化過程が明らかにされた<sup>1,2)</sup>。しかし、図2に示すような詳細な樹状細胞分化経路の解析にもか

かわらず、何故、皮膚に上述したように様々な樹状細胞が、豊富に存在するのかは明らかにされてこなかった。

そこで、私たちは、このような皮膚の特異性が何に由来するのかを明らかにする目的で、皮膚の線維芽細胞が樹状細胞を分化を誘導するか否かを検討した<sup>3)</sup>。方法は、ヒト臍帯血から CD34 陽性細胞 (HPC) を分離し、それをヒト皮膚線維芽細胞と共培養した。線維芽細胞としては、新生児包皮由来線維芽細胞と私たちの研究室で分離、培養した表皮直下に存在する特殊な機能を有する皮膚ストローマ細胞を用いた。HPC は、それのみで培養すると約1週間で大半が死滅するが、真皮線維芽細胞と共培養すると増殖し、3週間後には約20倍に増殖した。その細胞表面マーカーを検討したところ、約14%が CD1a 陽性細胞で、そのおよそ半分が CD1a+CD14- の細胞であった(図3)。顕微鏡下では、樹状細胞の形態を示し、アロ T 細胞刺激活性を有していた。興味深いことに、それらの樹状細胞は、ランゲルハンス細胞のマーカーであるバーベック顆粒を持っておらず、かわりに、真皮樹状細胞のマーカーである

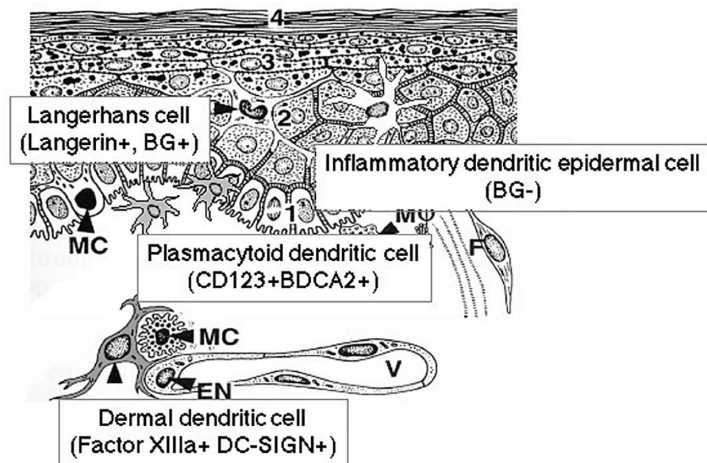


図1. 皮膚に存在する樹状細胞

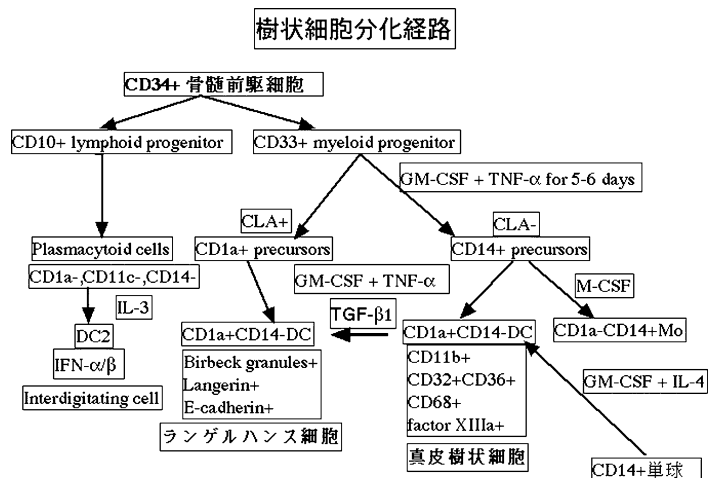


図2. 樹状細胞の分化経路

CF-3

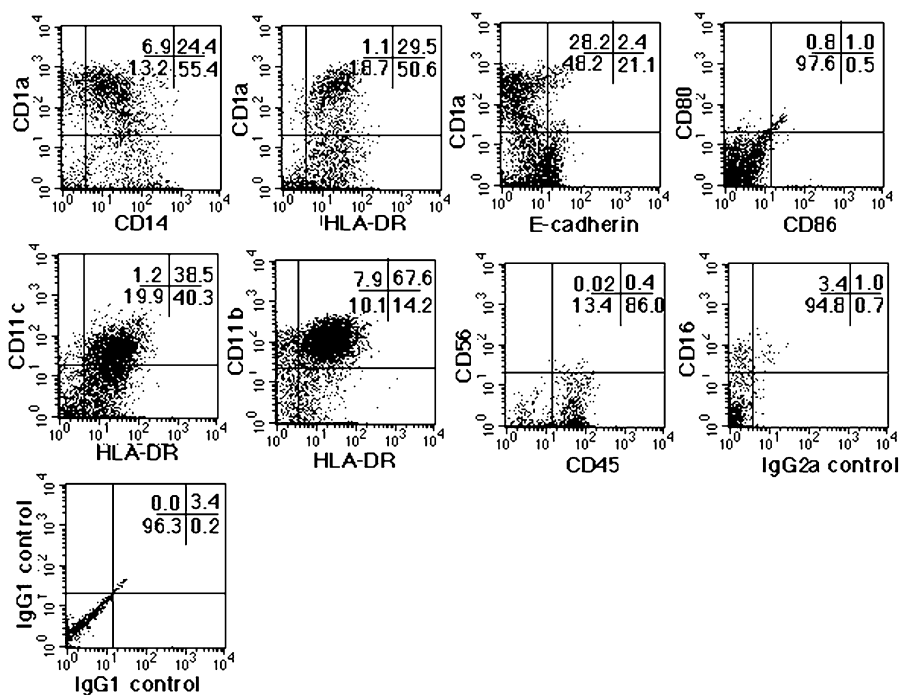


図3. 皮膚由来線維芽細胞との共培養による樹状細胞の分化誘導 (文献3より引用)

factor XIIIa を発現していた。さらに、皮膚線維芽細胞による樹状細胞分化誘導のメカニズムを解析したところ、HPC と真皮樹状細胞の直接接触による作用と真皮樹状細胞の産生する macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) による作用の2つの因子が関与

していることが明らかになった。

### 3. GM-CSF に依存しない樹状細胞の培養

以上の解析から、樹状細胞が GM-CSF の無い環境

下にも分化誘導されることが示唆されたので、つぎに、一般に用いられている GM-CSF を含む無血清培地を用いたランゲルハンス細胞の培養系に GM-CSF のかわりに M-CSF を添加して培養をおこなってみた。すると、臍帯血造血系前駆細胞から GM-CSF を添加することなくランゲルハンス細胞を分化誘導することができた。それらの細胞は、ランゲルハンス細胞のマーカーである CD1a, HLA-DR を初め、E-cadherin, Birbeck granule を有していた。興味深いことに、GM-CSF を用いる培養系に比較して、M-CSF を用いる培養系は、培養細胞中のランゲルハンス細胞の純度が高

く、また、未熟な状態を維持していた(図 4)。また、*in vivo* の報告と一致して、M-CSF によるランゲルハンス細胞の分化誘導には TGF- $\beta$ 1 が不可欠であった<sup>4)</sup>。さらに、他の造血細胞に働く成長因子として IL-3 を検討したところ、同様の培養系において、IL-3 もランゲルハンス細胞に極めて類似した樹状細胞を分化誘導することができた。しかし、M-CSF や GM-CSF で誘導した樹状細胞と異なり Birbeck granule を有していなかった<sup>5)</sup>。以上より、樹状細胞の分化誘導に GM-CSF が必須ではなく、少なくとも M-CSF に依存する分化経路も存在することが示唆された。

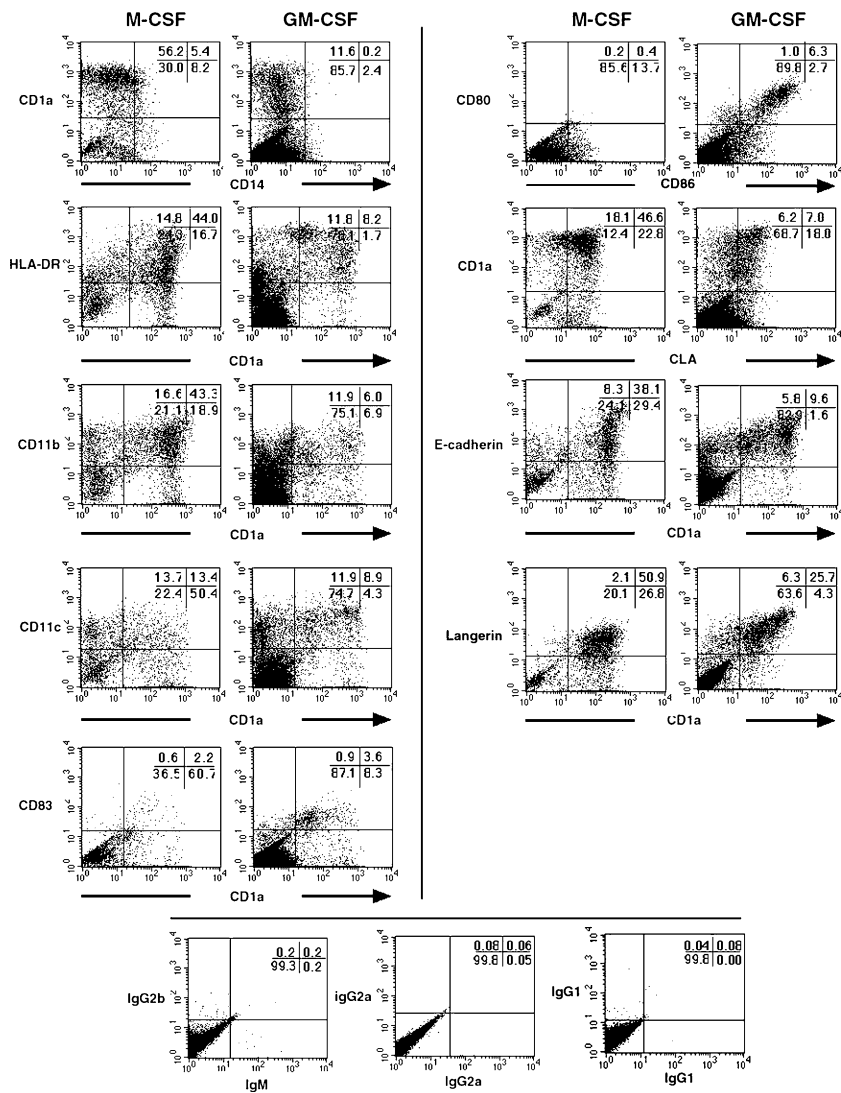


図 4. M-CSF 依存性の樹状細胞の分化誘導 (文献 4 より引用)

#### 4. 培養樹状細胞のハプテンに対する応答性

次に、これら培養樹状細胞を用いて接触皮膚炎における樹状細胞の役割を検討した。皮膚は言うまでもなく外界と生体との隔壁をなす臓器であり、常に種々の微生物ならびに化学物質に曝されている。アレルギー性接触皮膚炎は、ある種の化学物質、すなわちハプテンに対する T 細胞性免疫反応である。T 細胞性免疫反応が生じるためには、いうまでもなく抗原提示という過程が不可欠であるが、アレルギー性接触皮膚炎では、表皮に存在するランゲルハンス細胞がその役割を演ずる。しかし、無刺激の表皮に存在するランゲルハンス細胞の抗原提示能力は弱く、naïve T 細胞を刺激するには不十分である。また、T 細胞を刺激するためには、ランゲルハンス細胞は CCR7 を発現しリンパ管、リンパ節で発現されている SLC や ELC と反応しなければならない。しかし、これまでの研究では、ハプテンがどのようなメカニズムで樹状細胞を活性化するのは明らかにされてこなかった。そこで、末梢血単球を IL-4, GM-CSF の存在下に培養することにより得られる樹状細胞を用いて、ハプテンの樹状細胞への影響を試験管内で検討した<sup>6,7)</sup>。

樹状細胞培養系に、多数の化学物質(DNCB, TNCB, DNFB, Oxazolone, SADBE, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, SnCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, SLS,

Benzalkonium, DMSO) を加えて、それらの化学物質の樹状細胞の分化成熟に与える影響を検討したところ(図5)、今回検討した化学物質のなかでは、DNCB, TNCB, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, SnCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub> が明らかに樹状細胞の活性化を促した。一方、一次刺激性物質として分類される SLS, Benzalkonium, あるいは、ZnCl<sub>2</sub> には、その様な作用は認められなかった。また、これらの化学物質の間でも、誘導される反応の強度に相違が認められた。

次に、NiCl<sub>2</sub>, DNCB, TNCB, SLS で刺激された樹状細胞がいかなるサイトカインを産生するかを ELISA にて検討したところ、NiCl<sub>2</sub> で刺激された樹状細胞は、IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 の産生を、DNCB に関しては、IL-1 $\beta$  の産生のみを未処理のコントロールに比べて有意に増加させた。

#### 5. 培養ランゲルハンス細胞におけるハプテンに対する応答性

以上の検討は、単球由来樹状細胞を用いた検討の結果であるが、最近、この培養系にさらに TGF- $\beta$ 1 を加えると樹状細胞が、表皮ランゲルハンス細胞に近い幾つかの特徴を有するようになることが報告された<sup>8)</sup>。すなわち、TGF- $\beta$ 1 の添加により樹状細胞は、E-cadherin, cutaneous leukocyte antigen を発現し、さら

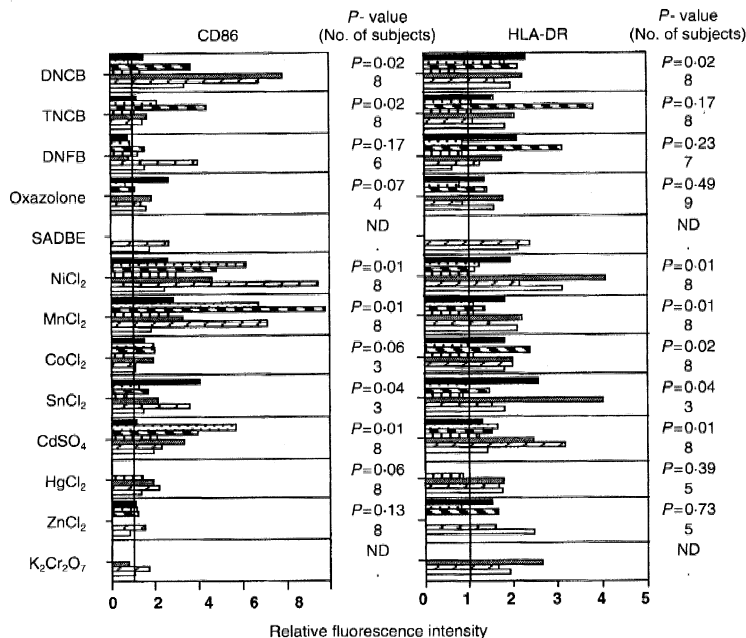


図5. 単純化学物質による樹状細胞の活性化 (文献7より引用)

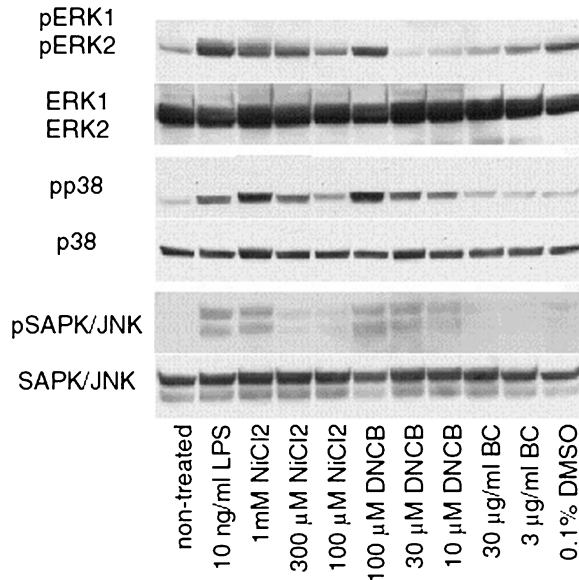


図6. ハプテンによる樹状細胞における MAP kinase の活性化 (文献 10 より引用)

にバーベック顆粒を有するようになる。この細胞を  $\text{NiCl}_2$ , DNCB で刺激すると、刺激された樹状細胞がケモカインレセプター-CCR7 の mRNA の発現と、MIP- $3\beta$  に対する遊走能を示すことが観察された<sup>9)</sup>。

## 6. ハプテンにより樹状細胞内で活性化される signal transduction

そこで、次にハプテンにより樹状細胞が活性化する機序を解析した。まず、 $\text{NiCl}_2$ , DNCB 刺激後に、樹状細胞内の ERK1/2, p38, SAPK/JNK の3種類の mitogen-activated protein kinase の活性化を Western blot にて解析した。その結果、 $\text{NiCl}_2$  はこの3種類の MAP kinase のいずれも活性化するが、中でも ERK1/2 を主に活性化するのに対し、DNCB は、ERK1/2 は活性化せず p38, SAPK/JNK を選択的に活性化することが明らかになった(図6)。また、 $\text{NiCl}_2$  は,  $\text{I}\kappa\text{B}$  をリン酸化し,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  を活性化した。ERK1/2, p38 MAP kinase の阻害剤を用いた実験では、DNCB 刺激後の樹状細胞による CD86 分子の発現増加ならびに IL-8 の産生は、p38 MAP kinase の阻害剤である SB203580 により抑制され、一方、 $\text{NiCl}_2$  により産生が増加する TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  は ERK1/2 の阻害剤 PD98059 により抑制されることが明らかとなった。なお、 $\text{NiCl}_2$  による CD86 の発現増加は、SB203580, PD98059 のいずれによっても抑制されなかった<sup>10)</sup>。

## 7. ま と め

以上、これまで研究してきた樹状細胞に関する一連の成果を報告した。ランゲルハンス細胞は、Paul Langerhans により今から 100 年以上前に、表皮内に存在する樹状細胞として同定された。私が研究を始めた 20 年前には、興味を抱く研究者は、主に皮膚科医に限られていた。近年、ランゲルハンス細胞を含む樹状細胞が、免疫反応の on/off はもとより、その質まで規定する細胞であることが明らかとなり、研究者も飛躍的に増加した。それにともない、皮膚科研究者がこの分野に貢献できることが少なくなった。しかし、これからは種々の炎症性皮膚疾患の病態に関連し、また、悪性黒色種の免疫療法などにおいて皮膚科医の立場から樹状細胞研究を続けていきたい。

## 文 献

- 1) Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) *J Exp Med*, **179**, 1109-1118.
- 2) Romani, N., Bruner, S., Brang, D., et al. (1994) *J. Exp. Med.*, **180**, 83-93.
- 3) Mollah, Z.U., Aiba, S., Manome, H., et al. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 450-460.
- 4) Mollah, Z., Aiba, S., Nakagawa, S., et al. (2003) *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 256-265.
- 5) Mollah, Z.U., Aiba, S., Nakagawa, S., et al.

- (2003) *J. Invest. Dermatol.*, **in press**.
- 6) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H. et al. (1997) *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3031-3038.
- 7) Manome, H., Aiba, S. and Tagami, H. (1999) *Immunology*, **98**, 481-490.
- 8) Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J.P., et al. (1998) *J. Exp. Med.*, **187**, 961-966.
- 9) Aiba, S., Manome, H., Yoshino, Y., et al. (2000) *Immunol.*, **101**, 68-75.
- 10) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., et al. (2003) *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 390-398.