

アレルギー性接触皮膚炎成立の必要条件となる ハプテンによる成熟分化機構の解析

東北大学 医学部皮膚科

相 場 節 也

After application of haptens to the skin, Langerhans cells (LCs), i.e., immature dendritic cells (DCs) in the skin, move to secondary lymphoid organs to sensitize naive T cells. During this process, LCs become mature DCs with augmented expression of various co-stimulatory molecules and class II MHC antigens. In this scenario, however, critical questions remain as to what kind of chemicals can induce this maturation process through what kind of mechanisms. To clarify these questions, we used monocyte-derived CD1a⁺ DCs instead of LCs since LCs matured in *in vitro* culture, spontaneously. After we confirmed that monocyte-derived DCs showed at least phenotypic characteristics and a response to TNF α similar to LCs, we added various chemicals, i.e., dinitrochlorobenzene (DNCB), trinitrochlorobenzene (TNCB), NiCl₂, ZnCl₂, sodium lauryl sulfate (SLS), or benzalkonium chloride (BC), to a culture of purified monocyte-derived CD1a⁺ DCs. Among them, only NiCl₂ and DNCB significantly increased the surface expression of CD54, CD86, HLA-DR antigen, and IL-1b production, while SLS, BC, or ZnCl₂ could not augment them, except for weak augmentation of CD86 expression by SLS. Among these three molecules, the increase in the expression of CD86 induced by NiCl₂ or DNCB was most remarkable, being observed in DCs from almost all the subjects we examined. TNCB could also induce responses similar to those with DNCB, but the number of the subjects whose DCs responded to it was far less than that of the subjects whose DCs responded to NiCl₂ or DNCB. In spite of the augmented CD86 expression on DCs treated with DNCB or NiCl₂, they induced different responses of DCs in their expression of CD54 and HLA-DR and the production of IL-6 and TNF α . In addition, the up-regulation of CD86 expression on DCs treated with DNCB was significantly suppressed by either anti-IL-1b or anti-TNF α antibody, while that by NiCl₂ was relatively insensitive to these antibody treatments. Finally, the protein kinase C inhibitor, H7, but not staurosporin, could suppress the augmentation of CD86 expression on DCs induced either by NiCl₂ or by DNCB. These data suggest that DCs respond to some haptens by changing their expression of several co-stimulatory molecules and their production of cytokines with a resultant change in potency of antigen presenting function. They also suggest that these chemicals stimulate DCs by different mechanisms. By these responses, DCs may modulate the final immune response to chemicals.

1 緒 言

骨髄の幹細胞に由来する樹状細胞は、分化成熟に伴い、種々の co-stimulatory molecules, class II MHC 抗原の発現を増強させることが知られている¹⁻⁶⁾。この樹状細胞の分化成熟ともなう変化は、はじめ、試験管内での培養後に観察され⁷⁻⁸⁾、その後、同様の現象が、皮膚にハプテンというある種の化学物質が塗布された際にも起こることが我々の研究により明らかにされた⁹⁾。一方、Macatoni ら¹⁰⁾や、Kripke ら¹¹⁾は、その際、ランゲルハ

ス細胞が表皮から所属リンパ節に遊走する事を報告した。これらの報告により、生体内の非リンパ組織のいたるところに分布している樹状細胞が、そこに侵入してくる抗原を取り込み、その後所属リンパ節に遊走しT細胞を感作するというシエーマが完成した。

しかし、このシエーマの中には、非リンパ組織に分布するランゲルハンス細胞がどのような刺激を、どの様な機序で認識し、また、どの様な機序で分化成熟するのかという未解決の問題が存在する。当然、この問題を明らかにするためには、樹状細胞を試験管内で培養する必要があるが、上述したように、ランゲルハンス細胞は試験管内で培養したのみでは、未刺激で分化成熟してしまうため、我々の明らかにしたい問題の解決には利用できない。しかし、最近、Sallustro ら¹²⁾、および、Romani ら¹³⁾により、末梢血 CD14 陽性細



Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules.

Setsuya Aiba

Department of Dermatology, Tohoku University School of Medicine

胞を、IL-4、GM-CSF の存在下に培養すると未熟な樹状細胞が誘導できることが報告され、我々は、この培養系を利用してハプテンの樹状細胞への影響を試験管内で検討した。

2 実験方法

2.1 樹状細胞、ランゲルハンス細胞の培養

樹状細胞の純粹培養は、末梢血バフィーコートから比重遠心にて分離した白血球分画を、抗CD14 標識ビーズと magnetic activated cell sorter (MACS) にて処理し CD14 陽性細胞を単離した後に、IL-4 と GM-CSF の存在下に培養することにより得た。また、ランゲルハンス細胞は、手術などに際し余った皮膚を dispase、トリプシンなどで処理した後比重遠心を行い、ランゲルハンス細胞の含有率の高い表皮細胞浮遊液を作成し、それを用いた。

2.2 化学物質の添加と樹状細胞に対する生物学的効果の検討

可能な限り多くの化学物質の影響を検討したいと考えたが、主に、本研究では、ニッケル、コバルト、dinitrochlorobenzen、trinitrochlorobenzen などのハプテンと分類される化学物質、sodium lauryl sulfate、benzalkonium chloride、phenol など皮膚一次性刺激物質、ハプテンとはなりにくい亜鉛、銅などを中心に検討した。これらの物質を種々の濃度で培養系に加えて以下のアッセイ方法にてその影響を調べた。

2.3 flow cytometry を用いた class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 などの co-stimulatory molecules の発現量の定量

培養樹状細胞に、種々の濃度の化学物質を添加後、経時的に樹状細胞を回収し、抗 class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 抗体にて免疫染色を施行後、flow cytometry (FACScan) にて解析した。

2.4 産生された IL-1a、IL-1b、TNF α 、IL-10、IL-12 などのサイトカインの市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットによる定量

樹状細胞培養上清を回収し、市販の ELISA キットにて IL-1a、IL-1b、TNF α 、IL-10、IL-12 の産生量を定量した。

2.5 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

以上の細胞表面マーカー、サイトカインの産生が mRNA の発現増加を伴っているか reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) により半定量した。

2.6 抗原提示

樹状細胞の機能的変化に関しては、アロ T 細胞刺激能力を指標にして検討した。

3 結果と考察

3.1 ランゲルハンス細胞と単球由来樹状細胞の比較 (図1)

ランゲルハンス細胞と CD14 陽性単球由来の樹状細胞を、いかなるサイトカインも加えていない状態、あるいは、TNF α を添加した状態で培養し、その細胞表面マーカーの変化を比較検討した。ランゲルハンス細胞は、TNF α を加えない培養でも活性化し、CD86 分子の発現を増強してしまい、樹状細胞を分化成熟させることが明らかな TNF α ^{12, 14)} を添加してもその影響が観察られなかった。

一方、単球由来の樹状細胞では、TNF α 無添加では、分化が抑制され CD86 の発現が弱く抑えられており、それに、TNF α 添加することにより CD86 の発現が著明に増強され、その影響が明らかに観察された。

3.2 化学物質による樹状細胞表面の class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 などの co-stimulatory molecules の発現増強 (図2、3、4)

そこで、この細胞を用い、7種類の化学物質 (DNCB、TNCB、NiCl₂、ZnCl₂、SLS、Benzalkonium、DMSO) が樹状細胞の分化成熟に与える影響を検討した。

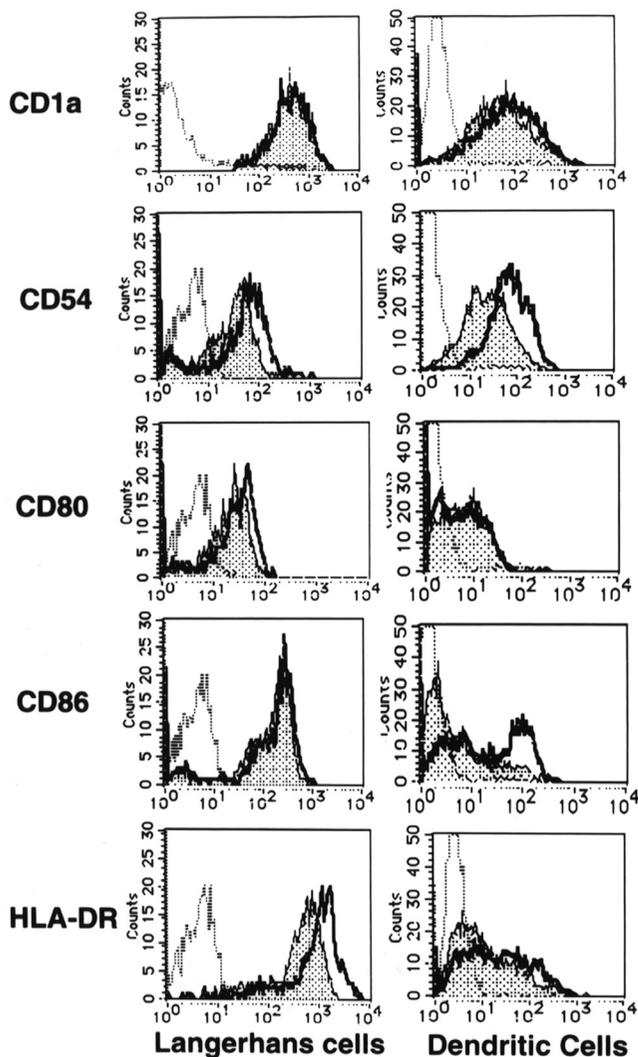


図1 ランゲルハンス細胞と単球由来樹状細胞の細胞表 マーカーの比較
点線: negative control 抗体, shaded curve: サイトカイン無添加の培養、実線: TNF α 添加培養。ランゲルハンス細胞の培養系では、TNF α の影響がほとんど認められないが、樹状細胞の培養系では、CD86 の発現増強が明瞭に認められる。(文献 17 より)

まず、培養系にそれぞれを種々の濃度で添加したところ、採取した白血球により個体差がみられたが、今回の検討した試薬のなかでは DNCB、TNCB、NiCl₂ が明らかに樹状細胞の活性化を促した。また、この3種の化学物質の間でも相違が認められ、NiCl₂ は CD86 のみならず HLA-DR 抗原と CD54 の発現を、DNCB は CD86 のみの明らかな発現を増強させた。TNCB

は DNCB に類似した影響を及ぼしたが、実験に用いた白血球による個体差が非常に大きかった。また、RT-PCR を用いた、mRNA の解析によっても、NiCl₂、DNCB 処理樹状細胞では、CD86 mRNA の発現が増強していた。

3.3 樹状細胞によるサイトカインの産生 (図5)

次に、NiCl₂、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。NiCl₂ で刺激された樹状細胞は、IL-1b、TNF α 、IL-6 の産生を、DNCB に関しては、IL-1b 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。

3.4 ハプテン刺激により誘導される樹状細胞の成熟過程におよぼす抗 IL-1b、TNF α 抗体の影響

NiCl₂、DNCB 刺激により樹状細胞のサイトカイン産生が増強する事が明らかとなったので、次に、樹状細胞の成熟がこれらの産生されるサイトカインにより二次的に誘導されているのか否かを、NiCl₂、DNCB で刺激された樹状細胞の培養系に抗 IL-1b、TNF α 抗体を添加することにより検討した。

その結果、NiCl₂ により誘導される樹状細胞の CD86 分子の発現増強には、それらの抗体はほとんど影響を及ぼさな

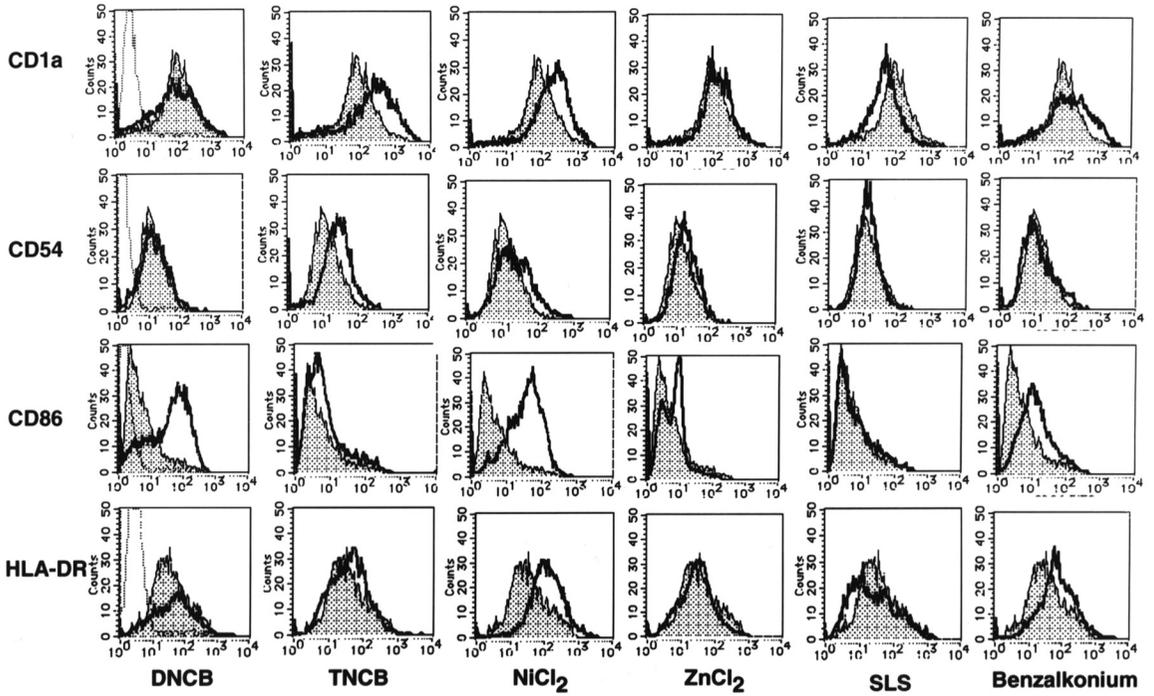


図2 種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原 (flow cytometry profile)

種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原の変化を flow cytometry にて解析した。その代表的なプロフィール。shaded curve: 化学物質を添加しないコントロール、実線; 化学物質添加 48 時間後の発現パターン。(文献 17 より)

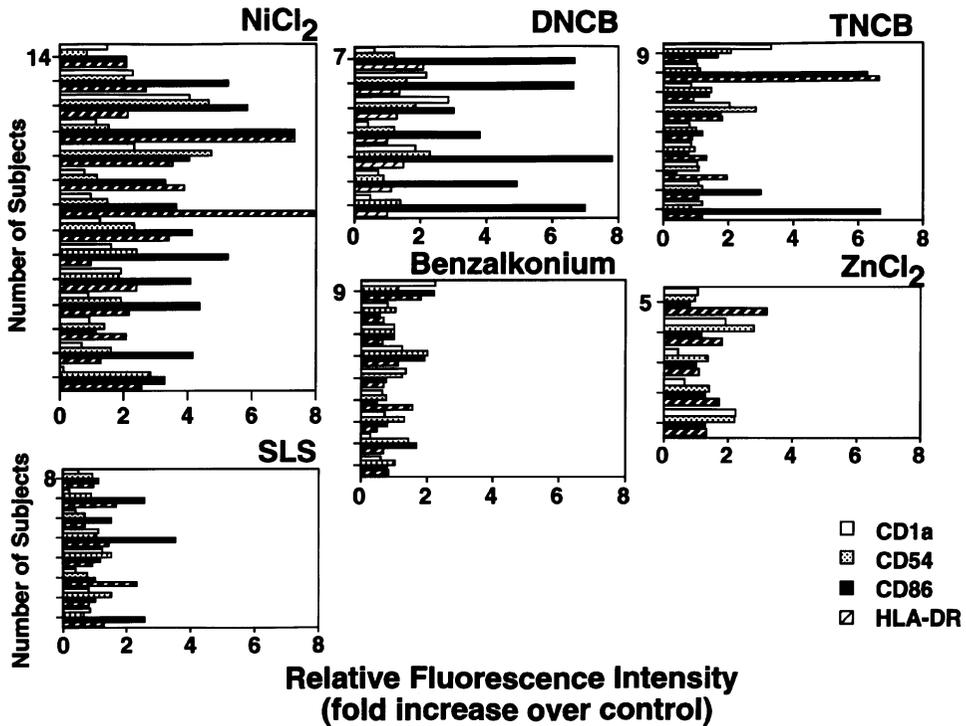


図3 種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原 (前解析例のまとめ)

種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原の relative fluorescence intensity を棒グラフに表した。(文献 17 より)

ったが、DNCBの作用は、抗 TNF α 抗体により著明に抑制されることが明らかとなった。以上から、樹状細胞が、ハプテンの種類により、異なった機構により表面マーカーの発現、サイトカインの産生を変化させることが明らかとなった。すなわち、例えば DNCB の場合は IL-1 β 、TNF α を産生し、その autocrine 機構により樹状細胞を活性化させ、NiCl $_2$ の場合はサイトカインの分泌を介さず、むしろ、直接、CD86 の発現を増強させる。

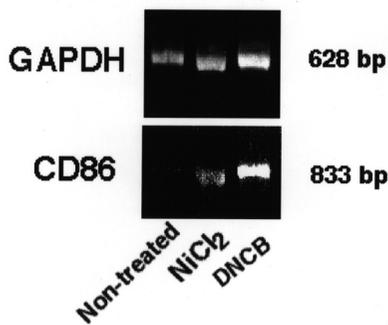


図4 化学物質処理樹状細胞の CD80、CD86mRNA の発現

化学物質処理樹状細胞から mRNA を取り出し、RT-PCR にて CD80、CD86mRNA の発現を比較した。

3.5 化学物質の刺激を受けた樹状細胞の抗原提示 (図6)

NiCl $_2$ 、DNCB で刺激された樹状細胞は、アロ T 細胞刺激する抗原提示活性を増強した。また、その活性は抗 CD54、CD86 抗体により抑制された。

総括

アレルギー性接触皮膚炎は、一見、T 細胞が 成立過程のすべてを支配しているように受けとられがちである。しかし、今回の我々の研究により、実際は、ランゲルハンス細胞あるいは樹状細胞が抗原の侵入を察知し、それを引き金として成熟、分化し、自らの形質を変化させるという過程がきわめて重要なカギを握っていることがあきらかとなった。

化粧品の開発において、添加する化学物質が接触皮膚炎を惹起する物質であるか否かの判定はきわめて重要な過程である。これまでは、その試験を Kligaman、Magnusson ら^{15, 16)} により開発された実験動物を用いた maximization test により行ってきた。しかし、この方法には、化粧品というヒトの生命とは関わりのない物の開発に、実験動物の貴重な命を犠牲にしてよいのかと

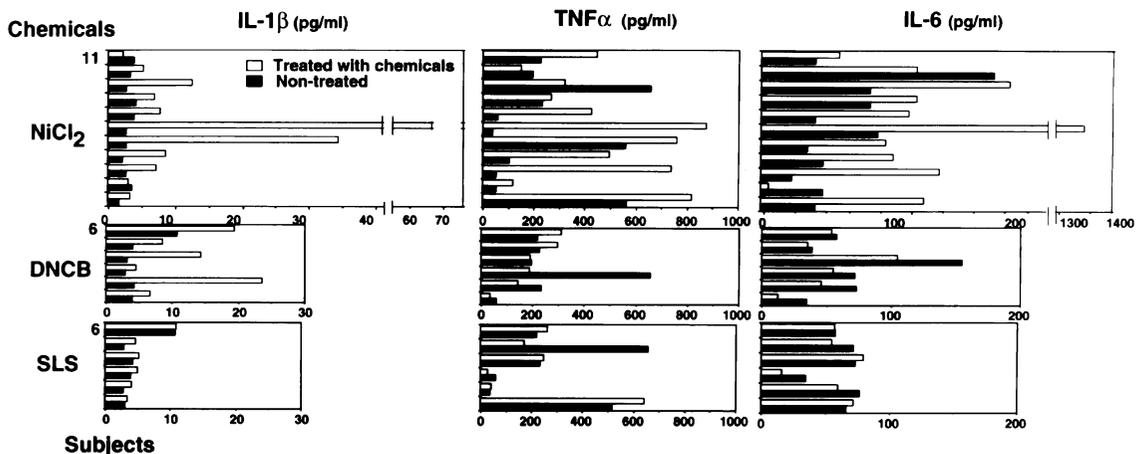


図5 化学物質処理樹状細胞のサイトカイン産生

樹状細胞を NiCl $_2$ 、DNCB、SLS にて処理し 48 時間後の培養上清中に含まれるサイトカインを ELISA に定した。(文献 17 より)

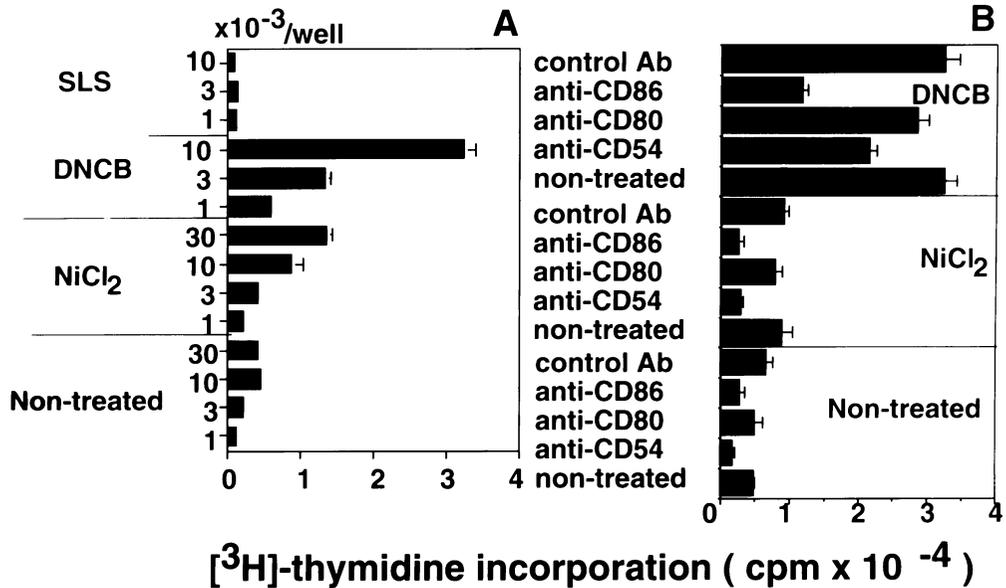


図6 化学物質処理樹状細胞のアロT細胞刺激

化学物質処理した樹状細胞の抗原提示能を、アロT細胞刺激活性を指標に比較した。また、その系に抗体を添加し、その抗原提示活性にどの co-stimulatory molecules が重要な役割を たしているか検討した。

いう倫理的問題と、また、実験動物のデータが果たしてヒトに当てはまるのかという未解決の問題が存在する。今回我々が詳細に検討した樹状細胞培養系は、化学物質に接触皮膚炎を惹起する必要条件が存在するかを明らかにでき、maximization test の代替法としての可能性が示唆される。

なお、以上の結果は、Eur J Immunol vol 27, 2031-2038 に報告した。

文 献

- Steinman, R. M., *Annu Rev Immunol* 1991. 9 : 271.
- Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdie, O., Fritsch, P. and Schuler, G., *J Invest Dermatol* 1989. 93 : 600.
- Symington, F. W., Brady, W. and Linsley, P. S., *J Immunol* 1993. 150 : 1286.
- Girolomoni, G., Zambruno, G., Manfredini, R., Zacchi, V., Ferrari, S., Cossarizza, A. and

- Giannetti, A., *J Invest Dermatol* 1994. 103 : 54.
- Ozawa, H., Nakagawa, S., Tagami, H. and Aiba, S., *J Invest Dermatol* 1996. 106 : 441.
- Yokozeki, H., Katayama, I., Ohki, O., Matsunaga, T., Watanabe, K., Satoh, T., Azuma, M., Okumura, K. and Nishioka, K., *J Invest Dermatol* 1996. 106 : 147.
- Schuler, G. and Steinman, R. M., *J Exp Med* 1985. 161 : 526.
- Inaba, K., Schuler, G., Witmer, M. D., Valinsky, J., Atassi, B. and Steinman, R. M., *J Exp Med* 1986. 164 : 605.
- Aiba, S. and Katz, S. I., *J Immunol* 1990. 145 : 2791.
- Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S. and Fryer, P., *J Exp Med* 1987. 166 : 1654.
- Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M. and Bucana, C., *J Immunol* 1990. 145 : 2833.

- 12 Sallustro, F. and Lanzavechia, A., *JEM* 1994. 179 : 1109.
- 13 Romani, N., Bruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G., *J Exp Med* 1994. 180 : 83.
- 14 Ludewig, B., Graf, D., Golderblom, H. R., Becker, Y., Kroczeck, R. A. and Pauli, G., *Eur J Immunol* 1995. 25 : 1943.
- 15 Kligman, A. M., *J Invest Dermatol* 1965. 47 : 393.
- 16 Magnusson, B. and Kligman, A. M., *Identification of contact allergens.*, Springfield, Illinois 1970.
- 17 Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H., *Eur J Immunol* 1997. 27:3031.