

広大科研
19
17591172
0100454004

アトピー性皮膚炎における自己免疫寛容の
破綻に関する研究

17591172

平成17年度～平成18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 田中稔彦

広島大学図書

0100454004



広島大学病院皮膚科講師

広大科研

19

17591172

0100454004

〈はしがき〉

難治性の皮膚の炎症と痒みが持続するアトピー性皮膚炎の患者数は、詳細な疫学調査によって増加傾向にあることが示されている。本研究ではアトピー性皮膚炎の免疫学的側面での機序の解析を行った。

研究組織

研究代表者： 田中稔彦 (広島大学・病院・皮膚科 講師)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,600,000	0	1,600,000
平成18年度	1,200,000	0	1,200,000
総計	2,800,000	0	2,800,000

研究発表

- (1) 学会誌等 なし
- (2) 口頭発表 なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし



研究の成果

研究の目的

アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す、痒みのある湿疹を主病変とする疾患であり、慢性期にはT h 1細胞優位に移行することもあるが、基本的にはT h 2細胞優位の炎症反応であると考えられている。また患者血清中にはダニやハウスダスト、あるいはカビ類などの種々の環境抗原に対する特異的I g E抗体が検出され、それらに対する即時型反応が皮疹の悪化に関与していることが考えられている。

しかし近年、患者の即時型反応はそれらのような体外の物質に対してばかりでなく、自己の体内で産生される物質、つまり自己抗原に対しても生じることが知られるようになった。ことに汗の中にはアトピー性皮膚炎患者に特異的に反応を惹起する抗原が存在することが明らかとなり、日常生活の中で多くの患者が自覚する症状の悪化と汗との関係を説明する根拠となっている。汗に対する即時型アレルギー反応は、患者の末梢血好塩基球からの汗中の抗原によるヒスタミン遊離反応によって示されているが、これは患者血清中に含まれる汗中の抗原に対する抗原特異的I g Eを介した反応であることが証明されている。このような自己の抗原に対する特異的I g Eが産生されているという事実は、その抗原に対して個体が感作されているということを示すだけでなく、その抗原に対する免疫寛容機序に何らかの異常が生じていることを示しているものと考えられる。

一方、近年の研究で、抑制性T細胞を始めとする能動的な免疫制御機構の破綻が各種の自己免疫疾患発症の重要な機序として考えられるようになった。今回の研究でアトピー性皮膚炎患者における汗抗原に対する自己免疫制御機構が如何なる異常を生じているのかを明らかにすることを目的とする。

研究方法

1, メチルセルロース法により回収した末梢血好塩基球を用いたスタミン遊離試験

アトピー性皮膚炎患者あるいは健常人ボランティアより血液を提供された。血液提供者より採取したヘパリン添加静脈血をメチルセルロースと混和し、室温で40分間静置した上清を回収し、HEPES緩衝液(10mM HEPES, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH₂PO₄, pH 7.4)で2回洗浄し、沈渣血球を5mM グルコース、0.03% ヒト血清アルブミンを添加したHEPES緩衝液で浮遊させたものを反応血球浮遊液(末梢血好塩基球画分)とした。血球浮遊液と部分精製汗抗原などの検体を等量混和し、37°Cで40分間振盪した後、遠心上清を回収し、血球沈渣に0.2N-HClO₄を加え、上清と沈渣の両方のヒスタミン濃度をHPLC法で測定した。陰性コントロールとして5mM グルコース、0.03% ヒト血清アルブミンを添加したHEPES緩衝液を、陽性コントロールとしてヤギ抗ヒトIgE抗体(生化学工業、東京)を3000倍希釈したものをを用いた。ヒスタミン遊離率は、上清中ヒスタミン量を、上清中ヒスタミン量と沈渣中ヒスタミン量の和で除したものの百分率で表した。net histamine releaseは各検体によるヒスタミン遊離率から陰性コントロールであるHEPES緩衝液によるヒスタミン遊離率を引いた値とした。

2, 汗抗原の部分精製

健常人ボランティア、および患者からサウナ浴により採取した汗を、アトピー性皮膚炎患者由来の末梢血白血球に対するヒスタミン遊離活性を指標にして精製した。精製は、まずサウナ浴により採取した汗を0.22μmのフィルターで濾過し、20mM Tris-HCl緩衝液で希釈してpH 8.0に調整した。次にあらかじめ20mM Tris-HCl緩衝液で平衡化した陰イオン交換樹脂カラム

(monoQ HR 10/10, Amersham Biosciences Co.) に pH 調整した汗を添加し、FPLC システム (AKTA explorer 10S, Amersham Biosciences Co.) を用いて塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出画分を採取した。ヒスタミン遊離活性は 0.25M から 0.3M の塩化ナトリウム濃度の画分に回収された。次にその画分を集めて 0.1% トリフルオロ酢酸で 10 倍に希釈し、0.22 μ m のフィルターで濾過後、逆相カラム (SOURCE 15RPC ST 4.6/100, Amersham Biosciences Co.) に添加し、アセトニトリルの濃度勾配で溶出した。ヒスタミン遊離活性はアセトニトリル 20% から 25% 濃度の画分に溶出され、その画分を集めて凍結乾燥後、リン酸緩衝生理的食塩水で溶解したものを精製汗抗原とした。なお精製汗抗原は、健常人ボランティア、患者いずれの汗からも同様に精製された。

3. 細胞調整

アトピー性皮膚炎患者 12 名あるいは健常人ボランティア 8 名より採取したヘパリン添加静脈血 100 ml を Ficoll-Paque (GE Healthcare) に層状に添加し、室温条件下で 400 g で 30 分間遠心した。遠心後のバフィーコートを採取し、2mM EDTA と 3% 熱不活化牛胎児血清を添加したリン酸緩衝液で 2 回遠心、再浮遊させた細胞を末梢血単核球 (PBMC) とした。次に CD4 陽性細胞を MACS 磁気細胞分離システム (Miltenyi Biotec) で回収し、さらに抗 CD25 モノクローナル抗体を用いて同様のシステムで CD4+CD25⁻細胞群と CD4+CD25⁺細胞群を分離回収した。抗原提示細胞は PBMC から CD4 陽性細胞を回収した残りの細胞を 20 μ g/ml のマイトマイシン C で 1 時間処理をした細胞を培養液で十分に洗浄したものをを用いた。

4, 増殖反応測定およびサイトカイン測定

細胞培養は RPMI1640 に 10% ヒト AB 血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタミン、HEPES を添加したものをを用い、96 穴の丸底培養プレートで duplicate で行った。増殖反応測定には 1 ウェルあたり 5×10^5 の PBMC を $200 \mu\text{l}$ の培養液中で 1×10^5 の抗原提示細胞と 5 日間共生培養した。刺激因子として抗 CD3 モノクローナル抗体 (OKT3: Orthoclone) を $500 \mu\text{g/ml}$ 、ダニ抗原として Derf1 を $5 \mu\text{g/ml}$ (アサヒビール)、未精製汗を 20 倍希釈したもの、あるいは部分精製した汗抗原 (QR) を 100 倍希釈で培養液中に添加した。MACS 磁気細胞分離システムで分離した細胞は、同様の培養条件で CD4+CD25⁻細胞は 1×10^5 で、CD4+CD25⁺細胞は 5×10^4 として 1×10^5 の APC と共生培養とした。5 日間の培養の後、各ウェルから $100 \mu\text{l}$ の培養上清を回収し、サイトカインの測定に供した。その後 $100 \mu\text{M}$ BrdU を添加して 16 時間培養後、各ウェルの細胞を回収して Cell Proliferation ELISA (Roche) で増殖を測定した。培養上清中の IL-4、IFN- γ の両サイトカインは R and D 社の高感度 ELISA kit を使用した。

5, RNA 抽出と real-time PCR

増殖アッセイ用に培養した一部のウェルの細胞は、RNA 抽出と real-time PCR 用に供した。培養細胞は RLT バッファー (RNeasy Plus Mini: QIAGEN) に回収し、添付説明文書に沿って総 RNA を抽出した。それらの RNA をランダムプライマー (Invitrogen) と Superscript II 酵素を用いて cDNA を合成した。SYBR グリーン標識した FoxP3 と GAPDH に対するプライマー (QuantiTect Primer Assays: QIAGEN) で ABI PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems) を用いてメッセンジャーRNA の発現量を比較した。

研究結果

1, PBMC の細胞増殖反応とサイトカイン産生

まず PBMC を用いた細胞増殖反応とサイトカイン産生能を検討した。PBMC は健常人コントロールあるいはアトピー性皮膚炎のいずれから採取したものである。抗 CD3 抗体、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) いずれの刺激に対しても有意な差はみられなかった。しかし Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) による細胞増殖反応は、いずれもアトピー性皮膚炎群より採取した PBMC のほうが高い傾向が見られた (図 1 A)。IL-4 産生については、抗 CD3 抗体、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) のいずれについてもアトピー性皮膚炎群で高い傾向があり、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) 刺激では健常人に比較して有意な差をもって高かった ($P < 0.005$)。IFN- γ については抗 CD3 抗体刺激ではアトピー性皮膚炎群と健常人群ではほぼ同等の産生量であったが、Derf1 刺激で有意差はないものの健常人群で高い傾向にあり、一方汗、部分精製汗抗原 (QR) 刺激では統計学的な有意差をもって健常人群よりの PBMC の IFN- γ の産生量が高かった ($P < 0.05$) (図 1 B)。

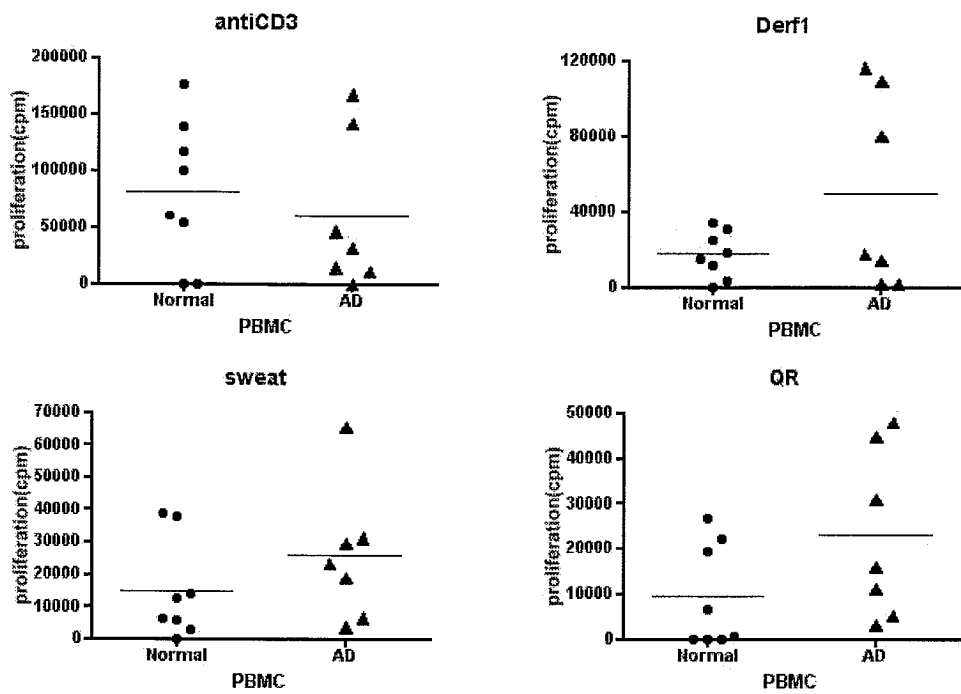


図 1 A PBMC の各種刺激に対する増殖反応

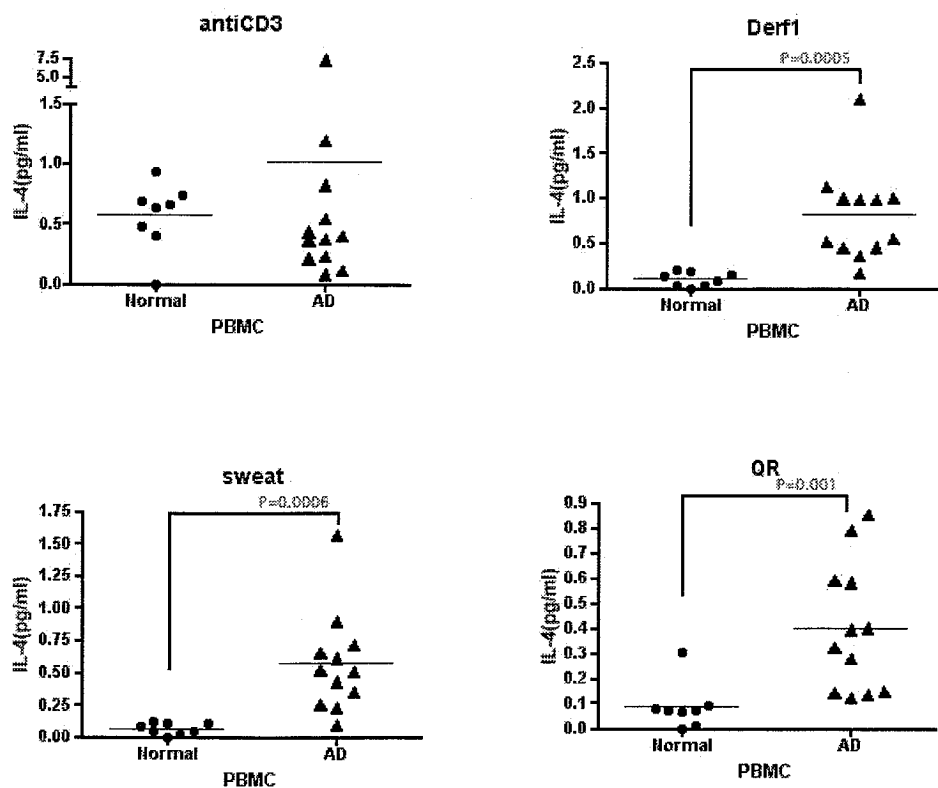


図 1 B PBMC の各種刺激に対する IL-4 産生

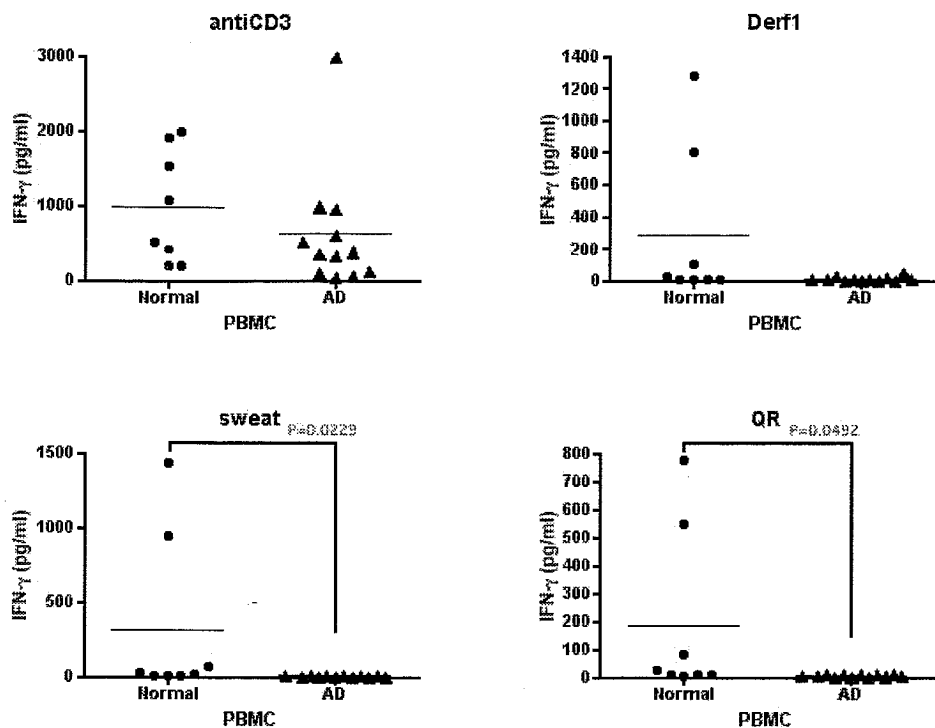


図 1 C PBMC の各種刺激に対する IFN- γ 産生

2. CD4+CD25⁻細胞の増殖反応とサイトカイン産生

次に CD4+CD25⁻細胞を用いた細胞増殖反応とサイトカイン産生能を検討した。CD4+CD25⁻細胞は健常人コントロールあるいはアトピー性皮膚炎のいずれから採取したものにおいても、抗 CD3 抗体、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) いずれの刺激に対しても有意な差はみられなかった。しかしいずれの刺激においてもアトピー性皮膚炎群より採取した CD4+CD25⁻細胞のほうが高い傾向が見られた (図 2 A)。IL-4 産生については、抗 CD3 抗体、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) のいずれについてもアトピー性皮膚炎群で高い傾向があり、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) 刺激では健常人に比較して有意な差をもって高かった ($P < 0.01$) (図 2 B)。IFN- γ については抗 CD3 抗体刺激以外のいずれの刺激でもほとんど産生がみられなかった (data not shown)。

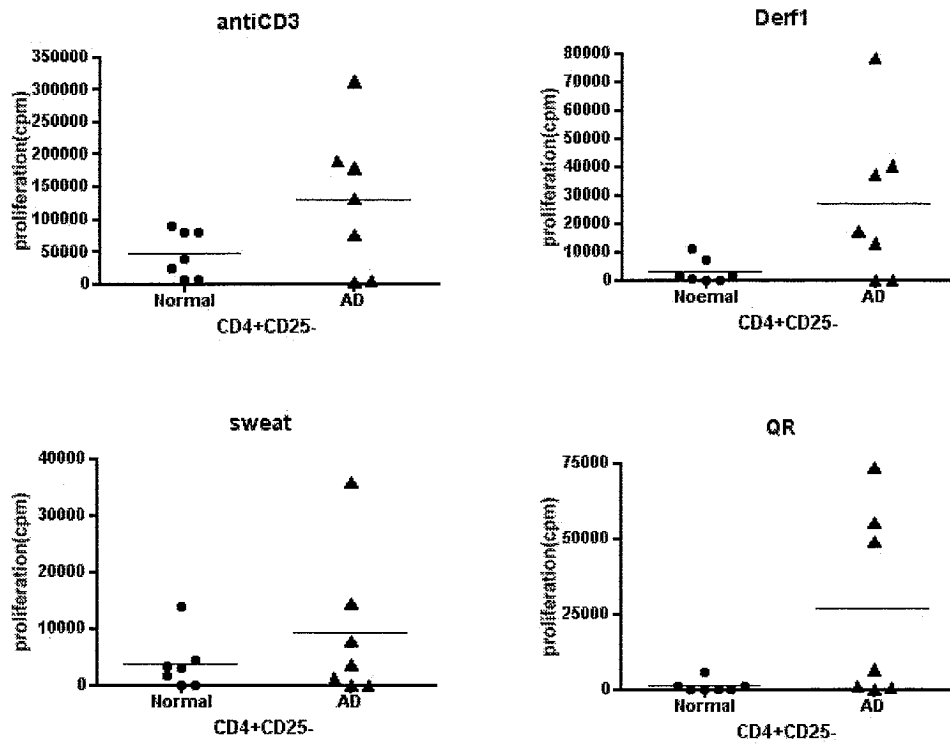


図 2 A CD4+CD25-細胞の各種刺激に対する細胞増殖反応

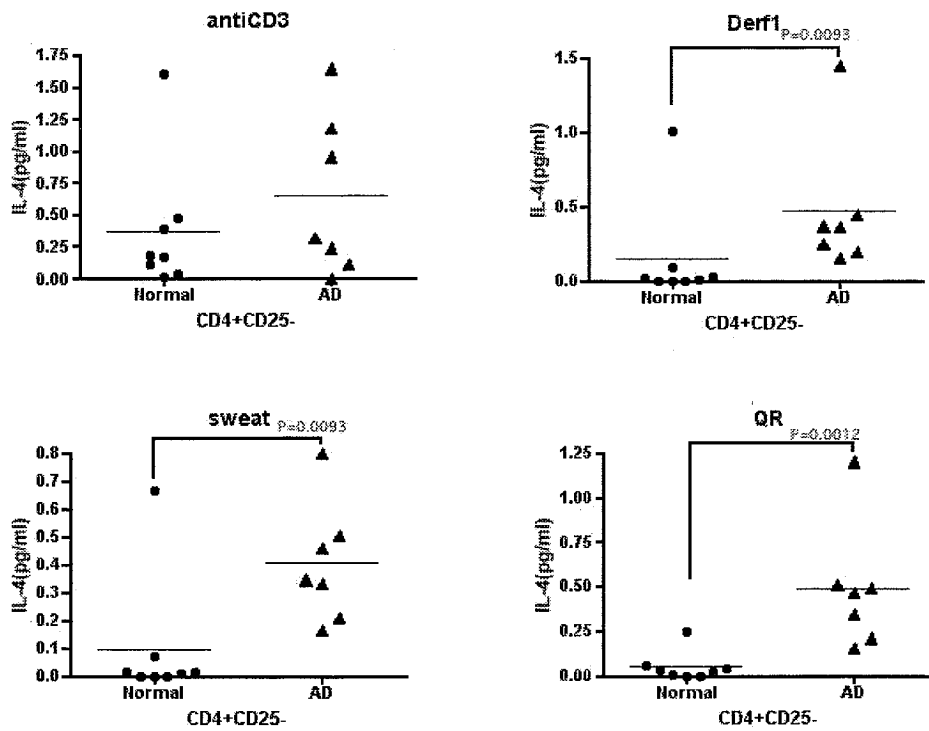


図 2 B CD4+CD25-細胞の各種刺激に対する IL-4 産生

制御性T細胞の特異的マーカーとされる FoxP3 の mRNA 発現を CD4+CD25-細胞群と CD4+CD25+細胞群の両方で real-time PCR で調べた。FoxP3 の mRNA は CD4+CD25-細胞群にはほとんど発現がなく、CD4+CD25+細胞群に強い発現がみられた。このことから制御性T細胞は CD4+CD25+細胞群に存在し、CD4+CD25-細胞群には混入していないと考えられた (図3)。

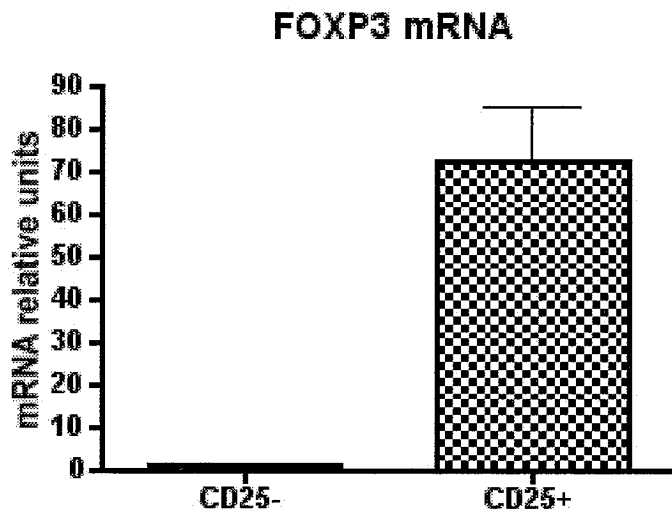


図3 FoxP3 の mRNA 発現

3, CD4+CD25-細胞の抗原刺激による増殖反応と IL-4 産生に対する CD4+CD25+細胞添加による抑制

CD4+CD25-細胞は Derf1 や汗、部分精製汗抗原 (QR) の刺激により IL-4 を産生することが明らかとなったが、それが制御性T細胞を含むと考えられる CD4+CD25+細胞群を添加することによって抑制されるか否かを検討した。健康人コントロールにおいては、抗 CD3 抗体による刺激以外は増殖反応が見られなかったため、CD4+CD25+細胞を添加することによる抑制効果の有無は判定できなかった。アトピー性皮膚炎群においては、抗 CD3 抗体刺激による増殖反応は CD4+CD25+細胞の添加によりほぼ抑制された。しかし Derf1、汗、

部分精製汗抗原 (QR) の刺激による増殖反応は、約半数の症例で CD4+CD25+ 細胞の添加で抑制されなかった。IL-4 産生については、抗 CD3 抗体による IL-4 産生は強く抑制されたものの、Derf1、汗、部分精製汗抗原 (QR) の刺激による IL-4 産生はほとんど抑制されなかった (図 4)。

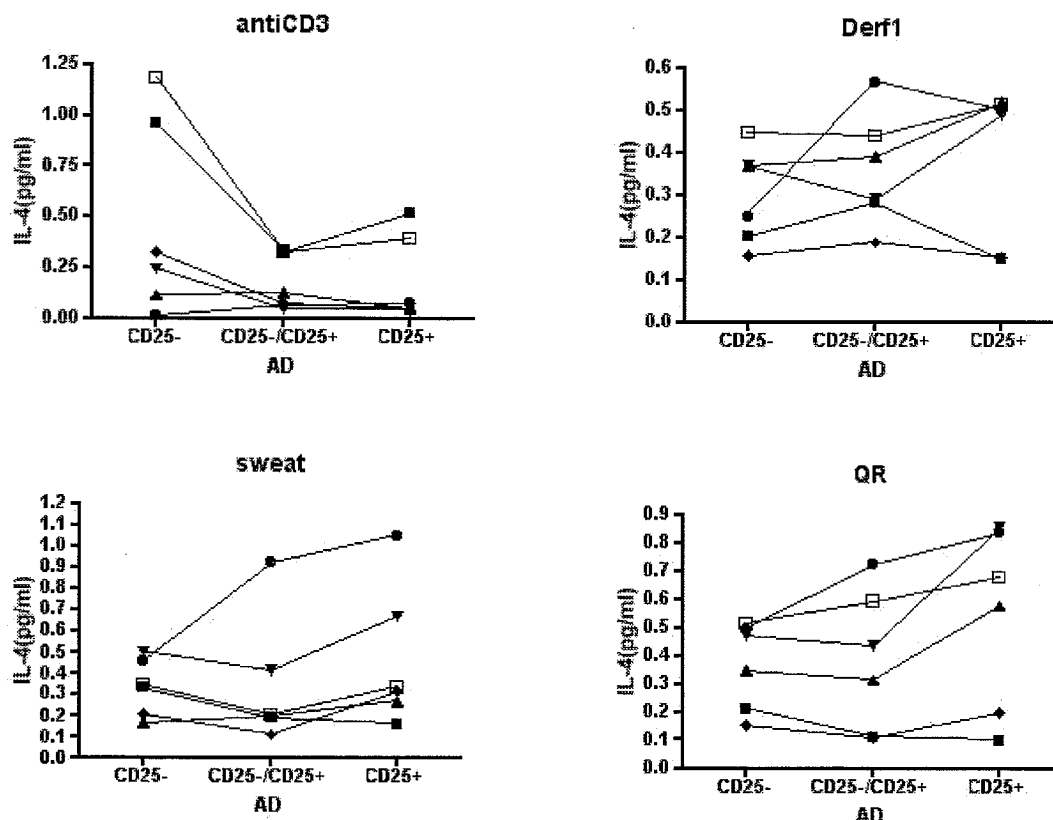


図 4 CD4+CD25-細胞の IL-4 産生に対する CD4+CD25+細胞添加による抑制

考察

アトピー性皮膚炎は痒みを伴う慢性の難治性の皮膚炎を繰り返し生じる炎症性疾患であるが、皮疹の悪化因子としてはダニ抗原などの環境抗原が強く関与していると永らく考えられてきた。しかし日常診療においては、汗をかき、その後シャワー浴などの対処をせずに長時間汗が皮膚表面に付着していることで痒みと皮疹が悪化することを多く経験している。自己の汗の皮内テストと、患

者末梢血好塩基球からのヒスタミン遊離試験により、患者の皮疹の汗による悪化は汗に含まれる抗原に対する即時型アレルギー反応が関与していることが明らかとなった。さらに患者血清と RBL 細胞を用いた実験により、患者血清中には汗抗原に対する特異的 IgE 抗体が存在することが示された。一方アトピー性皮膚炎の急性皮膚炎部位では、Th 2 型サイトカインを産生するリンパ球の集積がみられることが報告されている。これらのことより、汗抗原の暴露により IgE 抗体との結合による即時型アレルギーの惹起ばかりでなく、Th 2 型サイトカイン産生が誘導されることが推定される。

今回の検討の結果、汗抗原は末梢血単核細胞 (PBMC) に対して増殖反応と IL-4 産生を誘導し、その細胞群から制御性 T 細胞を含む CD4+CD25+細胞群を除去した細胞群に対しても同様の反応を示した。このことから、アトピー性皮膚炎患者の生体内においては、汗抗原の皮膚内暴露によって汗抗原特異的 IgE 産生が誘導されるばかりでなく、Th 2 型の炎症反応が惹起されるものと考えられる。さらにこのような Th 2 型炎症反応は自己の成分である汗に含まれる抗原に対する自己免疫反応であり、本来は制御されているべきものであるが、アトピー性皮膚炎患者に特有の何らかの要因によって、制御性 T 細胞の機能障害のために抑制できていないのではないかと推論できる。

今後はアトピー性皮膚炎患者における制御性 T 細胞の機能障害をより詳細に解析し、新たな治療法の開発につなげる可能性が期待される。