

司会(伊藤(薫)) それでは質問ございますか。

山本 細菌学教室の山本ですが、先生ケモカインの抗体を使って治療とか、されてますけど現実問題抗体でやるというのは非常に難しいと思うのですが、抗菌剤の中にもサイトカインを抑えるとか、いろんな抗免疫作用のあるマクロライドとかあると思うのですが、こういう薬剤を使ってこういう IP-10とかそういうものが下がるとかそういうケモカインのレベルを下げるという方向性というのは難しいでしょうか？

鈴木 確かに先生おっしゃるとおり非常に重要な方

向でございますので是非進めていきたいと思います。人の炎症性腸疾患の治療にペントサとかサラゾピリンなどの薬をよく使うのですけれど、作用機序がよく分かっていないということがありますので、本モデルに対する同薬剤の治療実験を行なっています。その際に、先生から御助言頂きました点に関して検討したいと思っています。

司会(伊藤(薫)) その他いかがでしょうか。それではつづいて皮膚科学教室の富山先生お願いいたします。

5 マウス GVHD モデルと炎症性皮膚疾患

新潟大学医学部皮膚科学教室(主任:伊藤雅章教授)

富山 勝博

Murine GVHD Models and Inflammatory Cutaneous Diseases

Katsuhiko TOMIYAMA

*Department of Dermatology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Masaaki Ito)*

Abstract

Human inflammatory cutaneous diseases include immunologically induced diseases, e.g. contact dermatitis, drug eruption, cutaneous GVHD. Although many murine experimental models mimicking human immunological events have been reported, there have been few murine models manifesting inflammatory cutaneous lesions. We previously reported that systemic GVHD in athymic nude mice involved apparent cutaneous lesions like human cutaneous GVHD. Our studies suggested that dendritic epidermal T cells (DETC) might play an important role for regulation of murine cutaneous GVHD. Here, we will demonstrate DETC-dependence of cutaneous rigidity to GVHD.

Key words: murine GVHD, DETC, inflammatory cutaneous diseases

Reprint requests to: Katsuhiko TOMIYAMA
Department of Dermatology
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学医学部皮膚科学教室 富山勝博

表 1

GVHD モデル	宿主	皮膚病変	皮膚以外の病変
F1-GVHD	(B6* × bm12**) F1	-	+
nu-GVHD	B6 nu ***	+	+
ATx-GVHD	胸腺摘出および 抗Thy1-2抗体処理 B6	-	+

* C57BL/6 mice ** B6.C-H-2^{bm12} mice *** athymic B6 nude mice

上記の宿主マウスに, bm12マウスからの脾臓 T 細胞 1×10^7 個を移入してGVHDを誘導した。NK細胞活性を抑制するため, 全ての宿主マウスに, T細胞移入3日前から3日毎に抗アシアロGM1抗体を投与した。病変の解析は, T細胞移入14日後に行った。

はじめに

炎症性皮膚疾患には, 接触皮膚炎や薬疹など, 比較的単純な免疫的機序を介して形成される疾患が少なくないが, その動物モデル, 殊にマウスモデルは極めて少ない。

皮膚 GVHD も例外ではない。ヒト GVHD は, 輸血, 同種骨髄移植, 同種末梢幹細胞輸血などの際に発症し, 皮膚病変はその代表的な症状のひとつである。マウスでも, 容易に全身性の GVHD を惹起できるが, 皮膚症状の誘導は一般に困難である。事前に高容量の放射線を照射すれば可能であるが, 放射線自体による皮膚障害が無視しえない。

われわれは, これまでに, 放射線照射なしに容易に皮膚病変をきたすマウス GVHD モデルを確立した¹⁾。この実験モデルの解析により, 前述のマウス GVHD における皮膚病変発症の抵抗性は, 樹状表皮 T 細胞 (DETC) によって担われている可能性が示唆された。本稿では, 実験結果をもとに, マウス皮膚 GVHD 病変における DETC の関与について述べる。

結 果

1 各種 GVHD モデルにおける皮膚病変の有無と表皮細胞のクラス II 発現

表 1 に示すように, 3 系統のマウス GVHD モデルの解析を行った。B6 と bm12 は, クラス II 分子のみに若干の差異を有する。従って, いずれの

表 2

GVHDモデル	KCのclass II 発現		
	4日後	7日後	14日後
F1-GVHD	-	-	-
nu-GVHD	+	+	+

KCのclass II 発現は, 上記のそれぞれの時期に得た。皮膚の免疫組織化学染色により解析した。両モデルとも, GVHD誘導前には発現は認められなかった。

GVHD モデルもこの分子を標的として, 同様の免疫学的機序により発症すると考えられる。皮膚以外の臓器病変については, 3 系統のモデルすべてに同様の組織変化を認めた。一方, 皮膚病変は, われわれが確立した, 先天性に胸腺を欠くヌードマウスを用いた nu-GVHD のみに認められた。

表皮細胞 (KC) におけるクラス II の発現は, nu-GVHD でのみ認められた (表 2)。これは, 皮膚病変がまだ誘導されていない, T 細胞移入後 4 日目, 7 日目ですでに観察された。マウスの KC は, ヒトとは異なり, 極めてクラス II を発現しづらいことを考慮すると, nu-GVHD では早期から KC にクラス II が発現するために, 表皮が標的として認識され, 病変が惹起される可能性が考えられた。

2 GVHD モデルにおける IFN γ の産生

GVHD の発症基盤である同種反応 (allo 反応) により産生されるサイトカインのなかで, クラス II 発現を強力に誘導しうるものとしてインターフェロン γ (IFN γ) が考えられる。表 3 に示すように, nu-GVHD および F1-GVHD のどちらでも, T 細胞移入後 3 日目を最高として, IFN γ の産生が認められた。nu-GVHD では, はるかに多くの IFN γ 産生が認められたことから, この IFN γ の産生量の違いが, 前述の KC のクラス II 発現の差異に反映した可能性が考えられた。

3 DETC の有無と皮膚 GVHD 感受性

しかし一方で, nu-GVHD にのみ皮膚病変が生ずる理由としては, 標的組織である皮膚の差異に基づく可能性も考えられる。通常のマウス表皮には, 胎児胸腺由来の, 多様性のない $\gamma\delta$ 型 T 細胞

表3

マウス	IFN- γ (IU/ml)
(B6 \times bm12) F1	0.3 \pm 0.3
F1-GVHD day 4	17.4 \pm 4.5
" day 7	1.4 \pm 0.7
" day 14	2.0 \pm 1.3

B6 nu	0.9 \pm 0.9
nu-GVHD day 4	980.6 \pm 55.1
" day 7	633.5 \pm 5.2
" day 14	450.5 \pm 154.8

上記の各マウスから得た血清を用いて、ELISA法により解析した。

レセプターをもつ $V\gamma 3^+$ DETC が存在する。胸腺の欠損している B6 nu では、 $V\gamma 3^+$ DETC が存在せず、そのため皮膚 GVHD 病変の感受性が他とは異なる可能性が考えられる。

そこで、宿主に皮膚移植を行った後に全身性 GVHD を誘導し、移植皮膚片における病変の有無を解析した。

表4に示すように、nu-GVHD では、通常の B6 マウスからの移植皮膚には病変は認められないのに対し、F1-GVHD では、B6 nu からの移植皮膚には、nu-GVHD と同様の皮膚病変を認めた。この結果から、皮膚病変の有無は、各 GVHD モデルにおける IFN γ 産生量の違いではなく、標的である皮膚自体の違いによると考えられた。さらに、F1-GVHD において、B6 scid (先天的に T・B 細胞を欠く) からの移植皮膚にも病変を認めたことから、皮膚自体の差異は、 $V\gamma 3^+$ DETC の有無に起因すると考えられた。

4 KC のクラスII発現と $V\gamma 3^+$ DETC

$V\gamma 3^+$ DETC を欠損した皮膚に GVHD が惹起されるならば、表2で示した KC のクラスII発現と $V\gamma 3^+$ DETC の有無に相関があると予想される。これを検証するために、IFN γ の存在下に皮膚の組織培養を行い、KC のクラスIIの発現を

表4

GVHDモデル	移植皮膚	病変を有する移植皮膚の割合
nu-GVHD	B6	0 / 4
	B6 nu	3 / 3

F1-GVHD	B6	0 / 4
	B6 nu	3 / 3
	B6 scid	3 / 4

皮膚病変の確認は、nu-GVHDでは14日後、F1-GVHDでは21日後に行った。

表5

マウス	器官培養後の KCのclass II 発現
B6	-
B6 nu	+
B6 scid	+

各マウスの皮膚を IFN- γ 100IU/ml を添加した培養液上で3日間培養した後、表皮シートを作製し、蛍光抗体染色により class II の発現を観察した。

比較した。結果を表5にまとめた。B6とは対照的に、B6 nu や B6 scid では、明らかな KC のクラスII発現を認めたことから、 $V\gamma 3^+$ DETC の存在と KC のクラスII発現は相関すると考えられた。

考 案

以上の実験結果から、以下の可能性が考えられる。すなわち、B6 nu では、移入 T 細胞と宿主との allo 反応により産生された IFN γ によって、KC に標的分子であるクラスIIが発現することで病変が惹起されると考えられる。一方、通常の B6 の KC は、おそらくは $V\gamma 3^+$ DETC の影響により、クラスIIが発現されず、従って GVHD の標的器官となることから免れると推察される。

しかし、 $V\gamma 3^+$ DETC の存在と皮膚 GVHD の発症抑制が相関するとしても、上記とは異なる抑制機序がはたらく可能性も考えられる。表皮にはランゲルハンス細胞が存在し、常時クラス II を発現していることから、皮膚における最初の標的は LC である可能性がある。また、皮膚 GVHD の発症には、真皮内への T 細胞の浸潤が必要である。これらは、通常のマウスの皮膚 GVHD の発症抑制が、 $V\gamma 3^+$ DETC による KC のクラス II 発現抑制のみでは説明できないことを示唆するものと考えられる。

おわりに

われわれの実験結果は、冒頭に述べたヒト皮膚疾患のマウスモデルが少ない理由のひとつを示唆していると考えられる。すなわち、マウスでは、ヒト表皮では認められない $V\gamma 3^+$ DETC が存在するために、皮膚疾患の誘導が困難なのかもしれない。しかし、このことは、B6 nu などの $V\gamma 3^+$ DETC の影響を排除できるマウスを選択すれば、皮膚疾患のマウスモデルを確立できる可能性も示唆するものと考えられる。

参考文献

- 1) Tomiyama K, Watanabe H, Seki S, Ito M and Abo T: Phenotypic and functional modulation of T cells in vivo by extrathymic T cells when T cells with MHC class II disparity were injected into athymic nude mice. Clin Exp Immunol 112: 196-204 1998.

司会 ありがとうございます。ただいまの富山先生のご発表に対して何かございませんでしょうか。

鈴木 この実験ではクラス II の差異によって GVHD を誘導していますが、クラス I 違いの組み合わせでも GVHD はおきるのでしょうか。もしそうなら、組織に浸潤する細胞に違いなどがあるのでしょうか。

富山 クラス I の差異による実験はしていません。しかし、我々の実験系で、クラス I, II と異なる組み合わせでは GVHD は誘導されませんでした。ただし、う

まく系を選べば、同じように GVHD を誘導できる組み合わせはあるかもしれません。クラス I 特異的な CD 8 T 細胞クローンを用いた局所的な GVHD の誘導の報告があることを考えると、もしクラス I の差異で GVHD を誘導できた場合は浸潤細胞も CD 8 である可能性はあると思います。

鈴木 先生の作製した GVHD モデルは、ヒトではどのような疾患のモデルになると考えられますか。

富山 もちろんヒトの GVHD が挙げられますが、それ以外に、薬疹にも類似していると考えます。薬疹のなかには、GVHD 型の組織変化を示すものがあります。標的が MHC と外来抗原という違いはありますが、特異的 T 細胞による皮膚での異物への直接的な攻撃という点では、類似していると考えます。

鈴木 ヒトの薬疹の場合も主に CD 4 が浸潤するのでしょうか。

富山 CD 4, CD 8 のどちらもあると思いますが、文献的には検討していません。

鈴木 一般にマウスでは、事前に宿主に放射線照射した場合に皮膚 GVHD が誘導されるとのことでしたが、その場合も放射線照射により表皮にクラス II が発現されて皮膚病変がおきるのでしょうか。

富山 一般的なマウス GVHD モデルで、皮膚病変の誘導に放射線照射が必要な理由は分かりません。従って、その場合も、我々のモデルと同様な機序で表皮が障害されるかどうかは不明です。しかし、高容量の放射線照射が DETC を消失させることがわかっており、そのため皮膚 GVHD が惹起されるという可能性はあると思います。

鈴木 ノードマウスでは皮膚病変が惹起されるということですが、ノードマウスの皮膚は通常のマウスとは明らかに異なっています。DETC の有無だけが問題なのでしょうか。

富山 確かに、皮膚病変に影響するのは DETC の有無だけではないかもしれません。その点をはっきりさせるために、スキッドマウスの皮膚を移植した実験を行いました。スキッドマウスは、肉眼上は通常と同じ皮膚ですし、また、特に皮膚機能異常があるとの報告もないと思います。その皮膚に病変が起きたことから、皮膚 GVHD の発症には DETC の有無が重要であると考えます。

鈴木 先程の河井先生のお話で、ヒトでは DETC はないとのことでしたが、

富山 ヒト表皮に T 細胞があるかないかということ

でいえば、多少は $\alpha\beta$ T細胞はあるだろうという報告はあります。しかし、マウスのDETCのような極めて単一のT細胞は見つかっていません。

鈴木 DETCが、例えば所属リンパ節などに遊走して、そこでGVHDの発症に影響するような可能性はありませんか。

富山 先程の質疑にあったように、接触皮膚炎のような場合にはDETCの遊走はあり得ると思いますが、その場合でも遊走先でどのような機能をするのかはわかっていません。われわれのGVHDでDETCが遊走するかどうかは不明です。

司会(伊藤(薫)) そのほかございませんでしょうか。では、富山先生ありがとうございます。

最後にご発表いただいた5人の先生方に、全体を通して改めてご質問等ございませんでしょうか。ありませんでしたら最後にオーガナイザーの伊藤雅章教授からご挨拶を申し上げます。

伊藤(雅) 本日は大変活発なご討論を頂きました。皮膚粘膜の免疫について演者の先生方のそれぞれの得意な分野からアプローチしていただき、お互いに勉強になったと思います。今後これを機会に先生方で交流していただいて新潟大学から皮膚粘膜に関連した免疫の優秀な仕事が出てくる事を祈念したいと思います。本当に今日は演者の方には厚く御礼申しあげたいと思います。本日もご参加の先生方もありがとうございます。ではこれを持ちましてシンポジウムを終らせていただきます。