

特集II ウイルス感染とアレルギー

薬剤性過敏症症候群と ヒトヘルペスウイルス*

戸倉新樹**

Key Words : drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS), human herpes virus (HHV), HHV-6, drug eruption

はじめに

薬剤性過敏症症候群 (drug-induced hypersensitivity syndrome ; DIHS) は、薬疹であるがウイルスの再活性化でもある。1998年に同号の「Archives of Dermatology」に杏林大学皮膚科¹⁾と愛媛大学皮膚科²⁾から、重症型遷延性薬疹におけるhuman herpes virus-6 (HHV-6)の関与が示唆される論文が発表され、DIHSと命名されるに至った。このエポックメイキングな出来事を契機に、次々と多くの症例報告がなされ、典型例の供覧が反復される一方で、さまざまな点において、非典型的な症例も報告されるようになった。ここではまずDIHSについて一般的な事柄を概説し、次いで薬剤とウイルスのかかわる疾患のメカニズムについて考えてみたいと思う。

DIHS典型例と非典型的事項

臨床像・組織像、原因薬剤、再活性化されるウイルス、合併症、検査値について典型のおよび非典型的事項を記す。

1. 臨床像、組織像

臨床像について、初期は紅斑丘疹型あるいは多形紅斑型が多く、紅皮症になりやすい、とい

うのが典型例である。顔面は腫脹し、眼周囲は皮疹が抜け、口周囲には好色丘疹、膿疱、小水疱、鱗屑が出現する (図1)。咽頭の発赤や口蓋の紫斑も出現することがある。38℃以上の発熱とリンパ節腫脹も伴うのが一般的である。

こうした典型的皮疹に加え、小膿疱を顕著に伴い acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) に似るタイプが報告されている³⁾ (図2)。DIHSはStevens-Johnson症候群 (SJS) や中毒性表皮融解壊死症 (toxic epidermal necrolysis ; TEN) といったgraft-versus-host disease (GVHD) 型の薬疹形態はとりにくい。つまり、表皮壊死がみられないということが特徴ともいえるが、苔癬型組織反応を示し表皮壊死が顕著な例も稀には報告されている。いずれにしろ、TENやSJSにみられないように、先行する薬疹が重症であるからといってDIHSを発症させるのではない。

通常、皮疹を含めた臨床症状は再燃することがしばしばみられ、典型的には2峰性の皮疹や発熱をみる。2峰目のときに肝機能障害が起こることが多い。また、2峰目がはっきりせず、ただらと皮疹や血液異常が遷延する例もある。

2. 原因薬剤

DIHSは比較的限られた薬剤で起こることがいわれてきた。抗けいれん薬であるカルバマゼピン、フェニトイン、フェノバルビタール、ゾニサミド、それからジアフェニルスルホン (DDS)、サラゾスルファピリジン、メキシレチン、アロ

* Drug-induced hypersensitivity syndrome and human herpes virus.

** Yoshiki TOKURA, M.D., Ph.D.: 産業医科大学医学部皮膚科学教室 [☎807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1]; Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807-8555, JAPAN

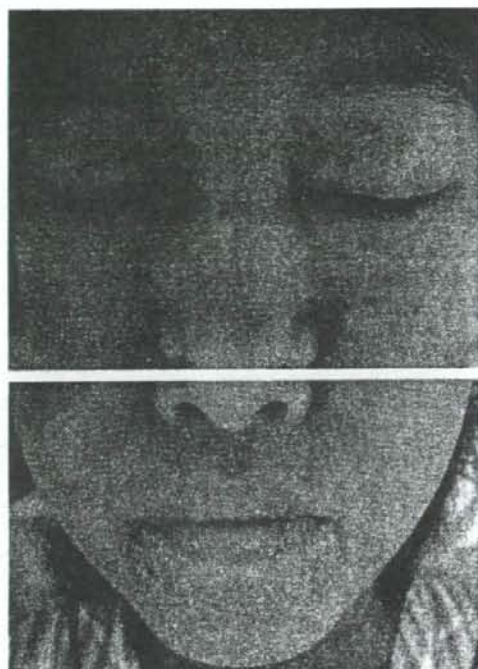


図1 DIHSの顔面の皮疹

プリノール、ミノサイクリンの9薬剤である⁴⁾。しかしその後、シアナミド、コデイン、クロミプロミン、トラビジルなどの非典型的な薬剤、さらには健康食品であるスピルリナ⁵⁾も報告されている。軽度のDIHSを含めると、今後さらに種類の増加が予見される。したがって、被疑薬をあげる場合、多剤を内服しているときには、典型的な薬剤をまず考えるが、典型的な薬剤を内服していなくても、DIHSを否定できない。通常、内服開始後2~6週間(平均4週間)で発症し、原因薬中止後も2週間以上遷延する。

3. HHV-6以外のウイルスの再活性化

DIHSは基本的にHHV-6が再活性化する薬疹であるが、これ以外のウイルスが再活性化することも明らかになっている。とくに、サイトメガロウイルス(CMV)の再活性化は多くの症例で認められ⁶⁾、肝障害の程度との関連がいわれている(図3)。加えてHHV-7、EBウイルスも報告されている。これらはすべてヘルペスウイルスであり、他の皮膚疾患と同様、いかにヘルペスウイルスが皮膚病変発現にかかわっているかを再認識させる。

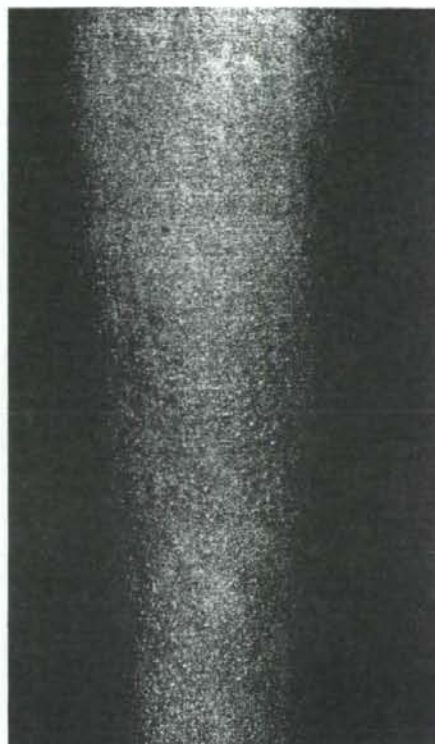


図2 AGEPの形態をとるDIHS例

4. 合併症

合併症の種類についても報告が増加している。腎障害、脳炎など中枢神経障害、肺炎(図3)、甲状腺炎、心筋炎、I型糖尿病などが、DIHSの提唱後に注目を集めている。今後とも思わぬ合併症が見出されることも予想される。

5. 検査値

通常、肝機能障害があり、白血球増多(11,000/mm³以上)、異型リンパ球(5%以上)、好酸球増多(1,500/mm³以上)のうちいずれかがみられる。HHV-6の再活性化は、ベア血清でHHV-6 IgGの抗体価が4倍以上の上昇であることが必要となる。ベア血清は発症後14日以内と28日以降の2点行うと確実である。免疫グロブリンの低下も報告され⁷⁾、これが病態にどのような影響を与えるかについても考察されている。

HHV-6再活性化の機序

薬剤に対するアレルギーで始まるこの疾患が、HHV-6などの再活性化を導くのは非常に興味深

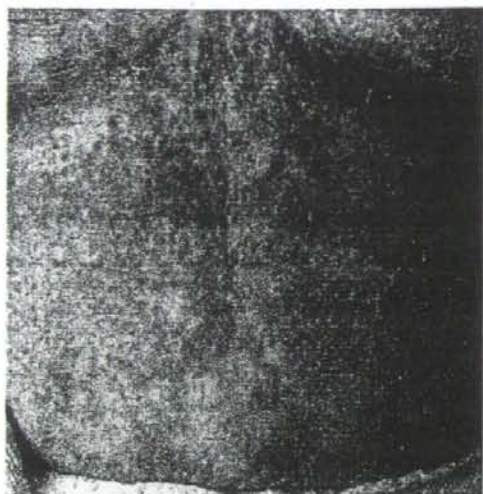


図3 HHV-6とCMVの再活性化を伴い高度の呼吸器不全、肝障害を起こしたDIHS例

い。薬剤反応とウイルス再活性化の順序において、第1イベントとして薬剤に対する反応、第2イベントとしてHHV-6の再活性化、というのが当然の見方であろう。これを支持するいくつかの現象をあげてみたい。

第一に、好酸球増多に引き続いて2相目の反

応、すなわち皮疹の再燃や肝酵素の上昇がみられる症例がある。これは薬剤の反応に引き続いて、ウイルスに対する反応が起こることを示唆する。

第二に、薬疹患者の末梢血リンパ球のサブセットであるTh1(CD4⁺CXCR3⁺)、Th2(CD4⁺CCR4⁺)、Tc1(CD8⁺CXCR3⁺)、Tc2(CD8⁺CCR4⁺)を経時的に追ってみる。播種状紅斑丘疹型ではTh2とTc2の増加があり、多形紅斑型/SJS型の薬疹ではTh2とTc1の増加がある(図4)⁸⁾。これに対しDIHSでは、最初にCD4陽性T細胞の活性化が起こり、次にCD8陽性T細胞の活性化が起こる(図5)。これを薬剤反応性CD4陽性T細胞の活性化に続いて、ウイルス感染細胞に対するCD8陽性T細胞の活性化が起こっていると読み解くこともできる。さらに、DIHSの臨床経過ではTh2/Tc2優位の状態がTh1/Tc1優位の状態に変化する(図6)⁸⁾。

第三に、皮疹の組織像についても、第1相目でCD4陽性T細胞の浸潤が優位にみられ、第2相目の皮疹ではCD8陽性T細胞浸潤が優位になる例もある。

播種状紅斑丘疹型や多形紅斑型/SJS型の薬疹

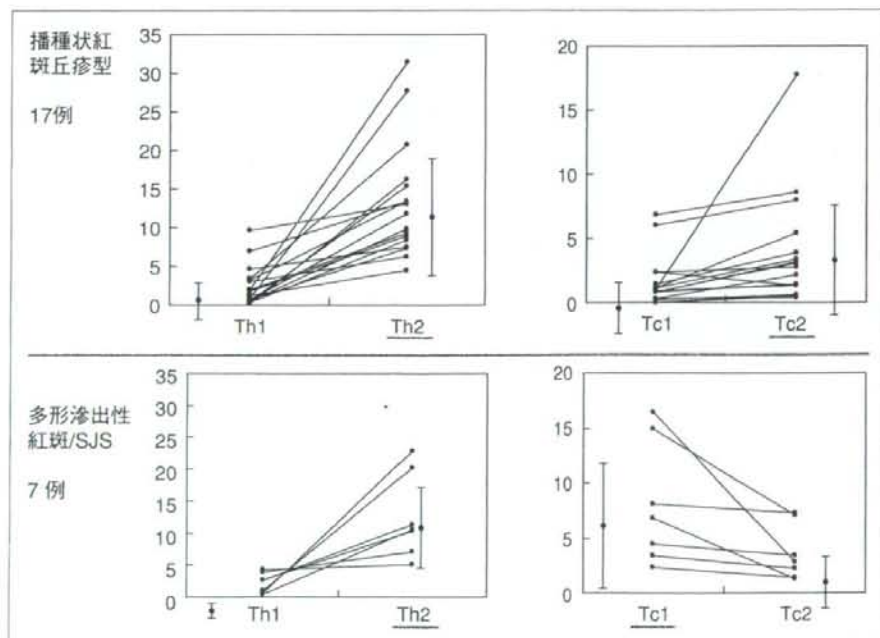


図4 薬疹の末梢血T細胞サブセット

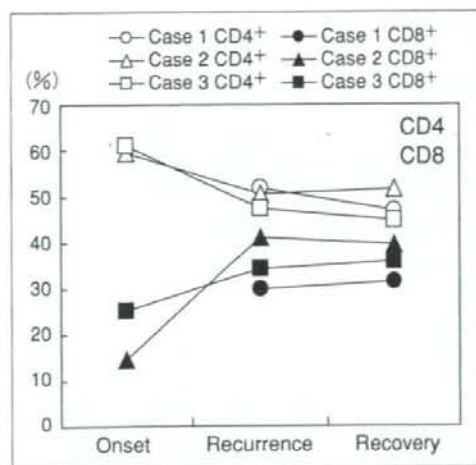


図5 DIHSにおけるCD4⁺細胞(Th)とCD8⁺細胞(Tc)の経過による変化

と比べると、DIHSでは最初にTh2細胞の増加があり、それがHHV-6の再活性化に伴い、Tc1やTh1の増加に変化していくのが特徴的である。すなわち、薬剤反応とウイルス再活性化の順序において、第1イベントとして薬剤に対する反応、第2イベントとしてHHV-6の再活性化、というのが当然の見方である(図6)。ウイルスが再活性化するためには、ウイルス感染細胞を攻撃する細胞傷害性T細胞(CTL)の機能が抑制されていることが必要であり、CTLはTh2サイトカインで抑制されるため、薬剤に対する反応がTh2優位の環境をつくっていることがDIHS発症の基礎となる。

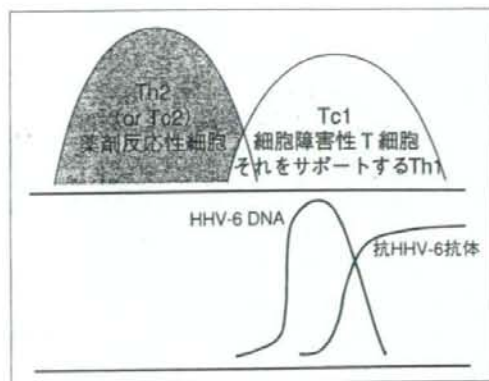


図6 DIHSにおけるT細胞サブセットの変化

つまり、薬剤反応性T細胞がTh2あるいはTc2であることが必須となる(図7)。一言でいえば、Th2優位型の薬疹がDIHSを発症させるということになる。

このことを考える上で比較する疾患として蚊アレルギー(蚊刺過敏症)がある。蚊アレルギーでは、蚊唾液腺中の抗原にまずCD4陽性T細胞が反応する。このCD4陽性T細胞はTh2サイトカインであるIL-4産生性である⁹⁾。それに引き続いてNK細胞内に潜伏感染しているEBウイルスが再活性化する。これになぞらえると、DIHSでは薬剤反応性Th2細胞が、単球内などのHHV-6を再活性化するという図式が浮かび上がってくる。

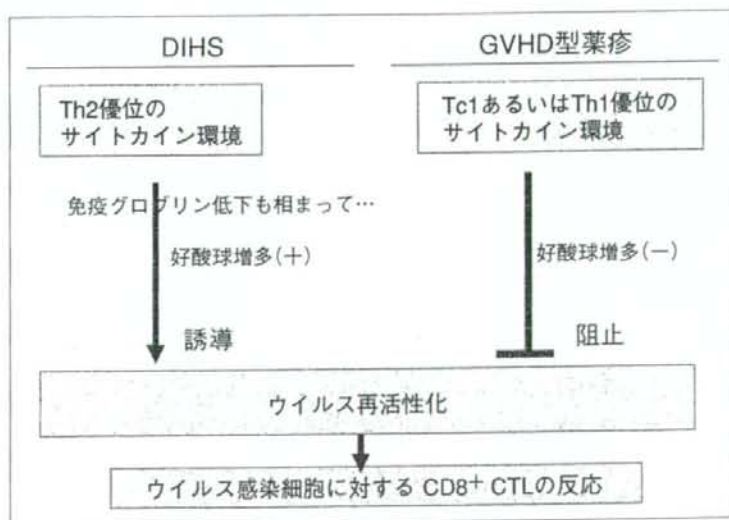


図7 薬疹型とウイルスの再活性化の関係

そもそもGVHD型の薬疹はDIHSになりにくい。GVHD型薬疹は最初からCTLが活性化されており、Tc1優位のサイトカイン環境にある。このためウイルス感染細胞に対する排除機構がセッティングされており、ウイルスのはなはだしい再活性化を許さないということになろう(図7)。たとえ、GVHD型でDIHSが起こったとしても2相目の反応は弱いということになる。この仮説に従うと、DIHSにみられる好酸球増多は1相目の反応であって、Th2優位状態の結果であり、2相目のウイルスの再活性化の反応が起こりやすい下地を提供しているといえる。事実、DIHSにまつわる検査値の異常の中で、好酸球増多は早期にみられることが多い。

ウイルスをはじめとする微生物はただ感染症としてわれわれの疾患をつくるのではない。生体の複雑で多岐にわたる反応が症状の本態であることが少なくない。ある種の皮膚疾患でも、まさにその対微生物反応が皮疹を形成しているといえよう。

まとめ

薬剤性過敏症候群(drug-induced hypersensitivity syndrome; DIHS)は、薬疹であるがウイルスの再活性化でもある。カルバマゼピン、フェニトイン、フェノバルビタール、ゾニサミド、それからジアフェニルスルホン、サラゾスルファピリジン、メキシレチン、アロプリノール、ミノサイクリンが原因薬として多く、肝障害、発熱、異型リンパ球出現などをみる。薬剤に対するアレルギーで始まるこの疾患が、human herpes virus-6(HHV-6)[加えてサイトメガロウイルス(CMV)やEBウイルスの報告もあり]の再活性化を導くのは非常に興味深い。末梢血のリンパ球のサブセットについて播種状紅斑丘疹型や多形紅斑型/Stevens-Johnson症候群(SJS)型の薬疹と比べると、DIHSでは最初にTh2細胞の増加があり、それがHHV-6の再活性化に伴い、Tc1やTh1の増加に変化していくのが特徴的である。すなわち、薬剤反応とウイルス再活性化の順序において、第1イベントとして薬剤に対する反応、第2イベントとしてHHV-6の再活性化、というのが当然の見方である。ウイルスが再活性化す

るためには、ウイルス感染細胞を攻撃する細胞傷害性T細胞(CTL)の機能が抑制されていることが必要であり、CTLはTh2サイトカインで抑制されるため、薬剤に対する反応がTh2優位の環境をつくっていることがDIHS発症の基礎となる。つまり、薬剤反応性T細胞がTh2あるいはTc2であることが必須となる。Graft-versus-host disease(GVHD)型の薬疹ではDIHSが起こりにくいことを考え合わせると、Th2優位型の薬疹がDIHSを発症させるということになろう。

文 献

- 1) Suzuki Y, Inagi R, Aono T, et al. Human herpesvirus 6 infection as a risk factor for the development of severe drug-induced hypersensitivity syndrome. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1108.
- 2) Tohyama M, Yahata Y, Yasukawa M, et al. Severe hypersensitivity syndrome due to sulfasalazine associated with reactivation of human herpesvirus 6. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1113.
- 3) 山野朋子, 相原道子, 池澤善郎. AGEPに一致したDIHS. *Visual Dermatology* 2005; 4: 994.
- 4) 藤山幹子, 橋本公二. 薬剤誘発性過敏症候群(DIHS: drug-induced hypersensitivity syndrome). *日本医事新報* 2006; 4275: 62.
- 5) 西尾大介, 伊豆邦夫, 戸倉新樹. スピルリナ製品によるDIHS. *皮膚病診療* 2004; 26: 995.
- 6) Shiohara T, Kano Y. A complex interaction between drug allergy and viral infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33: 124.
- 7) Shiohara T, Inaoka M, Kano Y. Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and antidrug immune responses. *Allergol Int* 2006; 55: 1.
- 8) Nishio D, Izu K, Kabashima K, et al. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci* 2007; 48: 25.
- 9) Tokura Y, Matsuoka H, Koga C, et al. Enhanced T-cell response to mosquito extracts by NK cells in hypersensitivity to mosquito bites associated with EBV infection and NK cell lymphocytosis. *Cancer Sci* 2005; 96: 519.

アトピー性皮膚炎の病態からみた早期介入の意味

産業医科大学皮膚科学

戸倉 新樹

アトピー性皮膚炎の病態からみた早期介入の意味

戸倉 新樹

アトピー性皮膚炎 (AD) は、外因性ADと内因性ADとに分けられる。外因性ADは、バリアが破綻し、外来抗原の侵入を許し、アレルギーが発症する機序である。この外因性ADのバリア異常とそれに引き続くアレルギー機序のメカニズムは、フィラグリン遺伝子変異の発見、遅発型・遅延型反応の理解、Th17細胞を含むTh細胞亜群への理解、特異的IgE上昇などによりかなり判ってきた。一方、内因性ADの機序は、金属アレルギーか、かゆみ機序の異常か、あるいは他の機序か判然としない。例えば複雑なかゆみ機序での異常を逐一検証するのは容易ではないだろう。ADへの早期介入を考える上で、外因性・内因性を別々に論ずる必要がある。それはtopical immunomodulatorなど外因性ADをターゲットにするもの、教育介入など両方をターゲットにするもの、というように、異なるからである。
(皮膚の科学, 増10:1-4, 2008)

キーワード: アトピー性皮膚炎, 外因性, 内因性, フィラグリン, Th17, 早期介入

はじめに

アレルギー疾患に対する医行為には治療 (treatment) と介入 (intervention) がある。治療は現在の症状を改善させるものであり、介入は今後の疾患の進展を抑制するものである。他疾患に比べてアレルギー疾患では介入とくに早期介入 (early intervention) が注目される。なぜならアレルギー疾患は進展して病気があり、徐々に完成する病気だからである。

ここではアトピー性皮膚炎 (AD) について最近の知見を踏まえてこの介入の意味を考えてみたいと思う。

1. ADはバリア病が先かアレルギー病が先か:

フィラグリン遺伝子変異の発見

ADがバリア病かアレルギー病かという論争は、20年以上前から為されているものであり、両意見の調和が諮られた最近10年間はあまり議論の対象にされてこなかったように思われる。バリア異常があればアレルギー反応も増強するし¹⁾、アレルギー反応があればバリアにも異常を来すという理解である²⁾。この卵と鶏の関係に先

行性は無いと思われていた。

ところが2006年にMcLeanら³⁾のグループから重要な発見が為された。それはAD患者にはフィラグリン遺伝子の変異があるというものであった。この発見が契機となり非常に多くの論文が発表された。それらは新しい変異部位に関すること、ひいてはADの何%がフィラグリンの遺伝子変異をもつかということ、人種的な偏りはどうかということ、に集約される。我国でも北海道大学皮膚科がこの研究を推進し、最近の論文⁴⁾では20%以上の日本人ADでもフィラグリンの遺伝子変異をもつという。新しい変異部位が発見されれば、当然この%も上昇していく訳であり最終的に何%になるかが注目される。フィラグリン遺伝子変異を示すADの特徴は、尋常性魚鱗癬を合併しやすいこと (そもそもフィラグリンは尋常性魚鱗癬の責任遺伝子としてMcLeanらにより同定された)、乳児から発症し成人まで存続すること、重症型が多いこと、IgEが高値であること、喘息を合併しやすいことである。

フィラグリン遺伝子変異の発見は、ADの病態を考えるときに、フィラグリン自体のインパクトを提示するだけにとどまらない。バリア異常が先かアレルギー異常が先かという風化しかかった問いに対して、最初にバリア異常ありき、と答えを出したかに思えるのだ。つまりフィラグリンを典型例とするバリア異常があって、アレルギーが皮膚を通過しやすくなり、アレルギーが起こっていくということを強く暗示している。この概念的転換はのちに述べる外因性ADと内因性ADの話にも繋がって

Yoshiki TOKURA, M.D., Ph.D.

産業医科大学皮膚科学

〒807-8555 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

いく。

2. アレルギー病としての面での新しい展開

ADはTh2病といわれる。しかしそれでは説明できないことも多々あることは事有るごとに論じられてきた。全身の免疫状態がTh2に変調しているのは確かとしても、皮膚炎形成にはTh1サイトカインとくにインターフェロン- γ (IFN- γ) の存在なくしては成立するのが困難だからである³¹。このIFN- γ のソースを求めて、“スーパーTh1細胞”なる概念も生まれている。

そもそもADは遅発型反応 (late phase reaction) と遅延型反応 (delayed-type reaction) の間を揺れ動く疾患と捉えることができる (Fig. 1)。遅発型反応は、臨床的には浮腫性紅斑であって好酸球とTh2細胞が媒介する。一方、遅延型反応は湿疹を形成しTh1細胞とTc1細胞が媒介あるいはエフェクター細胞となる。もしADがTh2病であるならば、浮腫性紅斑のみを起し、湿疹反応は起こらないことになる。加えて表皮細胞に由来するケモカインにはTh1を引き寄せるTh1ケモカインもTh2を引き寄せるTh2ケモカインもあるが、その実質的なソースが異なっていることが判明しつつある³²。ケラチノサイトはTh1ケモカインもTh2ケモカインも産生するが、表皮細胞全体からすれば、Th2ケモカインの量は圧倒的にLangerhans細胞由来のものが多く、すなわち単純に言えば、Th1ケモカインソースはケラチノサイト、Th2ケモカインソースはLangerhans細胞ということになる。IFN- γ はケラチノサイトのTh1ケモカイン産生を増強させるが、Langerhans細胞のTh2ケモカイン産生は減弱させる³³。Langerhans細胞の遅発型反応への役割は今後の課題であろう。

現在、CD4陽性T細胞亜群は、Th1、Th2、Th17、regulatory T細胞 (Treg) に分かれる。Th17細胞はIL-23

などに維持され、IL-17、IL-20、IL-22を産生する細胞である。通称“proinflammatory T cell”と呼ばれるように、Th1細胞やTh2細胞、あるいは顆粒球の反応が起こるために必要なT細胞とされる。元来、膠原病や癌で有名になった細胞であり、皮膚科領域では乾癬においてまず注目された³⁴。このTh17細胞はADにおいても重要な役割を果たしている可能性がある。我々が調べた結果では、Th17細胞はADの急性期病変では慢性期の3倍以上浸潤し、末梢血では病勢に応じてその割合が高まる³⁵。IL-17はケラチノサイトからのGM-CSF、IL-8、VEGFといったサイトカインや血管成長因子の産生を促進させるため、皮膚での炎症の起爆剤的な存在である。

それではTh17細胞は、遅発型反応、遅延型反応においてどのような病態的位置を占めるのであろうか。恐らく遅発型反応が遅延型反応に移るステップを促進させ、amplifierとして機能しているのではあるまいか (Fig. 1)。

3. 外因性ADと内因性AD

フィラグリンの遺伝子変異はADの発症をもたらす。このようにバリア異常があって、外界からのアレルゲンが侵入しやすくなり、アレルギーとしての皮膚炎を起こすタイプのADを外因性ADと呼び、IgEが高値である。一方、IgEが正常値のADは成因がバリア異常ではないと考えられ、内因性ADと呼ばれてきた。つまり、フィラグリン遺伝子変異の発見以前から、外因性ADの概念はあったのである。外因性ADの機序に、バリア異常、Th2、IgE、Th17が全て絡むことになる。

それでは内因性ADはどうして起こるのであろうか。これは明確には判っていない。AD患者には金属アレルギーが多いということは古くから言われ³⁶、これが原因ではないかという憶測もあるが、IgE正常のAD患者で金属アレルギーが多いか筆者は知らない。内因性ADではかゆみのメカニズムに異常がある可能性もある。Fig. 2に示すようにC線維、肥満細胞、ケラチノサイト、T細胞、好酸球などを中心とするかゆみ機構には多くの分子が関わっている。ヒスタミン、トリプターゼ、サブスタンスP、神経成長因子 (NGF)、神経反撥因子、IL-31等々である。これら分子およびその受容体のどこに異常があっても、かゆみ過敏といわれる状態も含めてかゆみが増強する。内因性ADにおいて、異常箇所を検討することも重要なテーマかもしれない。加えて内因性ADには女性が多いことも説明されるべきであろう。

4. ADにおける介入の意味

ADにおける介入の方法については現在まで種々のも

即時型反応 Immediate	遅発型反応 Late phase	遅延型反応 Delayed-type
15~20分	4~12時間	24~48時間
膨疹	浮腫性紅斑	湿疹
IgE マスト細胞	Th2 好酸球	Th1 Tc1
	ADはこの両者をさまざまな配分で起こす疾患 急性病変型	
		慢性病変型
低	IFN- γ の必要性	高

Fig. 1 アレルゲンに対する反応

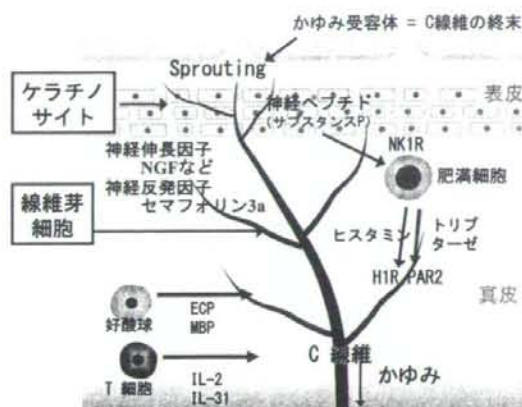


Fig. 2 末梢性のかゆみのメカニズム：内因性ADではこのどこかに異常？

Table 1 ADにおける介入

- | |
|------------------|
| 1. 薬物介入 |
| 2. 食物介入 |
| 3. Probiotics介入 |
| 4. 被覆剤介入 |
| 5. 日用品 (寝具など) 介入 |
| 6. 教育介入 |
| 7. 心理的介入 |
| 8. その他 |

のが試みられている (Table 1)。薬物介入では、第二世代抗ヒスタミン薬、ステロイド外用薬、topical immunomodulator (TIM) 外用薬 (タクロリムス、ピメクロリムス)、保湿剤外用、などが考えられる。喘息ではADが起こってしまった患者に喘息に対する介入ができるが、ADではできない。ADの場合、慢性化・難治化への介入を検討する研究が困難という背景がある。内服薬・外用薬がADの臨床経過を短縮させたデータはない。抗ヒスタミン薬がすでにADを発症している患者で、喘息の発症を遅らせ、その頻度を低下させた報告はある。早期介入のデータにおいて、ピメクロリムスはADの増悪回数と増悪なしの期間を延長させており⁹⁾、TIMは効果があるかもしれない。教育がADに治療的、介入的效果を起すエビデンスはある。むしろ他の方法より効果が高いとも言える。

アトピー性皮膚炎の難治化・慢性化に対する介入を考える上で、ADを一括して論ずることはできない。それは前述のように、外因性ADと内因性ADがあるからである。外因性ADの一部のものはフィラグリンの遺伝子変異による。こうした患者では、遺伝子治療を行わない限り、難治化・慢性化を防ぐことは事実上困難とも考えられる。しかし継続的に行えば、バリア障害に引き続い

Table 2 外因性、内因性ADからみた難治化・慢性化への介入

外：外因性に有効と期待される。内：内因性に有効と期待される	
1. 薬物介入	保湿剤 外 ステロイド 外 不明 TIM 外 抗ヒスタミン薬 外・内 不明 (治療的效果か)
2. 食物介入	内 or 外 不明 (発症率抑制か)
3. Probiotics介入	内 or 外 不明 (発症率抑制か)
4. 被覆剤介入	外 不明 (治療的效果か)
5. 日用品 (寝具) 介入	外 期待しにくい
6. 教育介入	内・外 あり
7. 心理的介入	内 不明

て起こるアレルギーへの進展を遅らせるかもしれない。外因性の中でバリア機能の回復を望めるものは介入の意味があるであろう。内因性ADの中で破壊により悪化するものは、難治化・慢性化に対しての介入の意味がある。しかし内因性ADの機序が判然としていないため、介入の意味は今後の問題である。異論があることは承知で、現在の知見からいえる外因性・内因性別の介入の評価をTable 2にまとめた。

文 献

1. Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, et al : Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1997 ; 109 : 175-182
2. Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K : Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2005 ; 124 : 786-792
3. Palmer CN, Irvine CN, Terron-Kwiatkowski, et al : Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006 ; 38 : 441-446
4. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al : Specific Filaggrin Mutations Cause Ichthyosis Vulgaris and Are Significantly Associated with Atopic Dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* 2008 ; 128 : 1436-1441
5. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, et al : Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol* (I press).
6. Ma HL, Liang S, Li J, et al : IL-22 is required for Th17

- cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 597-607
7. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y : Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* (in press).
8. Giordano-Labadie F, Rancé F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP : Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases. *Contact Dermatitis* 1999 ; 40 : 192-195
9. Thestrup-Pedersen K : Atopic eczema. What has caused the epidemic in industrial countries and can early intervention modify the natural history of atopic eczema? Treatment strategies and compliance for the adult patient with atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh) 2005 ; 215 : 36-40

Significance of Early Intervention in Relation to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis

Yoshiki Tokura

Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health
1-1, Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu, Fukuoka 807-8555, Japan

Key words : *atopic dermatitis, extrinsic, intrinsic, filaggrin, Th17, early intervention*

Atopic dermatitis (AD) is divided into extrinsic and intrinsic ones according to its pathogenesis and causative agents. Extrinsic AD is based on the barrier disruption, which allows external allergens to invade into the skin, leading to allergic or immunological consequences. This barrier damage-associated allergic mechanisms of extrinsic AD have been evident and supported by the discovery of filaggrin mutation, understanding of late-phase and delayed-type reactions, consensus of Th17 cells, and regulation of IgE. On the other hand, the mechanisms underlying intrinsic AD remain to be elucidated, and metal allergy, itch hypersensitivity, and others have been vaguely put forward to explain the pathogenesis. Since AD is thus heterogeneous, each early intervention should be evaluated on the basis of the paradigm of extrinsic and intrinsic AD. For example, topical immunomodulators seems to be therapeutically beneficial for extrinsic AD, while education intervention may be effective for both types of AD.

Skin Research, Suppl. 10 : 1-4, 2008

光線療法の作用機序：

UVBとPUVA療法の細胞学的メカニズム

戸倉 新樹

日本皮膚科学会雑誌 第118巻 第13号 第2865-2867頁（平成20年12月）別刷
Reprinted from the Japanese Journal of Dermatology
Vol. 118, No. 13, pp. 2865-2867, December 2008

EL26—1 光線療法の現状と展望

光線療法の作用機序：

UVB と PUVA 療法の細胞学的メカニズム

戸倉 新樹

1. はじめに

光線療法は乾癬、アトピー性皮膚炎、尋常性白斑などに使われている。ここでは短波長紫外線 (UVB) とくにナローバンド UVB (NB-UVB) 療法と、ソラレン+長波長紫外線 (PUVA) 療法について、その炎症性皮膚疾患に対する奏効機序を概説する。

UVB, PUVA の標的細胞には、ケラチノサイト (角化細胞, KC), Langerhans 細胞 (LC)・真皮樹状細胞 (dDC), T 細胞, 肥満細胞, その他, 血管, 線維芽細胞などがあり, 大まかには表 1 に示す影響を及ぼす。より詳細に, KC と T 細胞に対する UVB, PUVA の作用についての比較を表 2 に示す。UVB は cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), 6-4 光産物を DNA 上に形成し, PUVA は 8-メトキシソラレン-DNA 光結合物を形成する。従ってどちらも DNA に傷を作り, アポトーシスを誘導するが, 照射量またはソラレンの量によっては一部の機能の促進作用も示す。KC の前炎症性サイトカイン産生に対する作用は, UVB と PUVA では逆であることに注目されたい。

以下, UVB と PUVA について個々に記す。

2. UVB (NB-UVB) 療法

1) KC のサイトカイン・ケモカイン産生への影響

UVB には broadband (BB)-UVB と NB-UVB がある。BB-UVB と NB-UVB の照射量を比較する上で, MED, 治療域とも NB-UVB は BB-UVB の 8~10 倍であるため, NB-UVB : BB-UVB = 10 : 1 で行うのが妥当であろう (表 3)¹⁾。両 UVB とも高い照射量ではアポトーシスを誘導し前炎症性サイトカイン (IL-1 α , TNF- α) の産生が低下するが, 低い照射量では産生が増強する (表 4)。しかし NB-UVB は前炎症性サイトカインの産生を穏やかにしか増強せず, 炎症惹起は BB-UVB に比べ少ないと考えられる。Th1/Th2 ケモカイン産生

に対する UVB の影響においては, 両 UVB とも Th1 ケモカインである CXCL9 産生を増強, Th2 ケモカイン (CCL17, CCL22) 産生を減弱させる¹⁾。

前炎症性サイトカイン亢進という点においては, UVB は乾癬とアトピー性皮膚炎の治療に不利である。しかし NB-UVB は産生亢進が穏やかであるため, 過剰な炎症惹起を回避することができよう。CXCL9 促進ということについては乾癬に不利であり, Th2 ケモカイン産生抑制という観点からはアトピー性皮膚炎に有利である。UVB の乾癬への奏効機序に関してはサイトカイン・ケモカイン産生変調という観点からは論ずることができない。乾癬にとっては, KC の増殖抑制, 真皮でのリンパ球のアポトーシスなどといった作用が重要であろう。

最近我々は, 表皮の主な Th1 ケモカインソースは KC, Th2 ケモカインソースは LC 細胞であることを示した²⁾。従って UVB の LC への影響も調べるべきであろう。

2) KC の RANKL 発現誘導, LC の抗原提示能への影響, Treg の誘導

皮膚樹状細胞を UVB 照射しハプテン刺激すると, UVB 無しの場合と比べて, LC は成熟化し, かつ IL-10 産生は亢進する (Yoshiki R et al, 投稿準備中)。一方, dDC は成熟化するが, IL-10 産生の亢進レベルはそれ

表 1 UVB, PUVA の標的細胞

ケラチノサイト
増殖抑制, サイトカイン・ケモカイン・プロスタノイド・神経成長因子の産生変調
Langerhans 細胞 (LC)・真皮樹状細胞 (dDC)
抗原提示能の変調
T 細胞
増殖抑制・アポトーシス, Th1/Th2 変調, regulatory T 細胞 (Treg) 誘導
肥満細胞
脱顆粒抑制
その他, 血管, 線維芽細胞など

産業医科大学皮膚科学

著者連絡先：〒807-8555 北九州市八幡西区医学生ヶ丘

1—1 産業医科大学皮膚科学 戸倉 新樹

表2 UVB, PUVAの角化細胞(KC)とT細胞に対する作用

	DNA 損傷	KC・T細胞 アポトーシス	KC 前炎症性 サイトカイン	T細胞
UVB	CPD, 6-4 光産物	+	産生増加	↓, Treg 誘導
PUVA	8-MOP-DNA 光結合物 (monoadduct, cross link)	+	産生減弱	Th2 → Th1 MHC class I ↑

CPD: cyclobutane pyrimidine dimer

表3 BB-UVBとNB-UVBの照射量の比較
(mJ/cm²)

	MED	治療域
BB-UVB	70 ~ 150	50 ~ 150
NB-UVB	500 ~ 1,200	400 ~ 1,200

NB-UVBはBB-UVBの(8~)10倍

表4 ケラチノサイトの前炎症性サイトカインとTh1/Th2ケモカイン産生に対するUVBの影響

	前炎症性サイトカイン		Th1ケモカイン		Th2ケモカイン	
	IL-1 α	TNF- α	CXCL10	CXCL9	CCL22	CCL17
BB-UVB	↑↑	↑↑	⇒	↑	↓	↓↓
NB-UVB	↑	↑	⇒	↑	↓	↓↓

ほど強くない。従ってLCはregulatoryな細胞となる。LCがregulatoryとなる機序については、UVB照射KCにRANKLが発現し³⁾、LC上のRANKとの相互作用により、IL-10産生が亢進しOX40も発現し、regulatory T細胞を誘導する能力を得るようになる。

3) KCの酸化的損傷(8-OH-dG産生)への影響

治療線量では、NB-UVBはBB-UVBに比べて酸化的DNA損傷の程度が低い⁴⁾。同様にPUVAに比べても酸化的DNA損傷の程度が低い。酸化的ストレスに関してはNB-UVBは安全かもしれない。

3. PUVA療法

1) KCの8-MOP-DNA光産物産生

ソラレン(8-MOP)は光感受性物質の中で例外的に光毒性が強く、UVAの働きにより蛋白ではなくDNAに結合する(表5)。通常、光アレルギー反応を起こさないため治療に適する。8-MOPは塩基のATGCのうちTに光共有結合し、UVAの照射量が低い場合にはsingle strand上のTのみに(monoadduct)、照射量が高い場合にはdouble strand上の2つのTを橋渡しして(cross link)結合する。

この8-MOP-DNA光産物の形成量は、基底細胞と分化したKCとでは差がない。しかしphorbol esterで培養したKCやトランスフォームでは低い³⁾。KCのDNAに結合した8-MOPは、20時間で54%がDNA修復機構によって排除され、高カルシウムの方が低カルシウムより排除されやすい。またレチノイド添加により8-MOP排除は遅延し、RePUVA療法の効果の一機序となっている⁵⁾。

2) KCのサイトカイン産生への影響

8-MOPとUVAによるPUVAは、KCにおいて前炎症性サイトカインであるIL-1 α 産生を抑制する⁶⁾。UVBはIL-1 α 産生を促進するため、対比される(表5)。15ng/ml 8-MOPと1J/cm² UVA処理で、0.52 photoadducts/million DNA basesの光産物が生成されるが、この低い生成量でもIL-1 α の産生は抑制される。

3) Th1/Th2サイトカイン産生への影響

PUVAはT細胞に対して、Th2からTh1への変調を誘導する(表5)。これは、インターフェロン γ 産生の増加と、IL-4やIL-10の産生低下に基づき、相対的にTh1に変調することによる⁷⁾。Th2の腫瘍細胞である

表5 NB-UVBとPUVAのケラチノサイトへの影響

	DNAへの傷	酸化的DNA損傷	前炎症性サイトカイン産生	ケモカイン産生
NB-UVB	CPD形成	比較的小	↑ (mild)	Th1 ↑ Th2 ↓
PUVA	8-MOP-DNA photoadduct形成	比較的大	↓	Th1 ↓ Th2 ↓ (多分)

CPD: cyclobutane pyrimidine dimer

Sézary 症候群の末梢血も、Th2 から Th1 へのサイトカイン産生パターン変化がみられ、サイトカインという観点からの奏効機序となり得る⁷⁾。

4. 今後の課題

乾癬のみならずアトピー性皮膚炎でも Th17 細胞の

役割が注目されている⁸⁾。またこの Th17 細胞の維持には DC 由来の IL-23 が必要である。UVB、PUVA の Th17 細胞サイトカイン産生への影響、あるいは DC の IL-23 産生への影響が今後の課題となろう。

文 献

- Hino R, Kobayashi M, Mori T, et al: Narrowband UVB inhibits the production of Th2 chemokines and modestly augments proinflammatory cytokines in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*, **156**: 830-837, 2007.
- Moti T, Kabashima K, Yoshiki R, et al: Cutaneous hypersensitivities to hapten are controlled by IFN- γ -upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN- γ -downregulated Langerhans cell Th2 chemokines. *J Invest Dermatol*, **128**: 1719-1727, 2008.
- Loser K, Mehling A, Loeser S, et al: Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med*, **12**: 1372-1379, 2006.
- Orimo H, Tokura Y, Hino R, Kasai H: Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A. *Cancer Sci*, **97**: 99-105, 2006.
- Tokura Y, Edelson RL, Gasparro FP: Formation and removal of 8-MOP-DNA photoadducts in keratinocytes: effects of calcium concentration and retinoids. *J Invest Dermatol*, **96**: 942-949, 1991.
- Tokura Y, Yagi J, Edelson RL, Gasparro FP: Inhibitory effect of 8-methoxypsoralen plus ultraviolet-A on interleukin-1 production by murine keratinocytes. *Photochem Photobiol*, **53**: 517-523, 1991.
- Tokura Y, Seo N, Yagi H, et al: Treatment of T lymphocytes with 8-methoxypsoralen plus UVA induces transient but biologically active Th1-skewing cytokine production. *J Invest Dermatol*, **113**: 202-208, 1999.
- Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y: Possible Pathogenic Role of Th17 Cells for Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, (in press).

IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulatory T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin

Ryutaro Yoshiki¹, Kenji Kabashima¹, Kazunari Sugita¹, Kenji Atarashi¹, Takatoshi Shimauchi¹ and Yoshiki Tokura¹

Although skin grafting is a common surgical technique, the immunological state of grafted skin remains unelucidated. An experimental model has shown that the development of murine contact hypersensitivity (CHS) is depressed when mice are sensitized with a hapten through full-thickness grafted skin. We explored the immunological mechanisms underlying this hyposensitization, focusing on the fate of Langerhans cells (LCs). When FITC was applied to grafted skin, FITC-bearing LCs were capable of migrating to the draining lymph nodes. Epidermal cell suspensions isolated from the grafted skin produced a high amount of IL-10 as assessed by real-time PCR. Adoptive transfer of immune lymph node cells from the sensitized mice suppressed the CHS response of recipients in an antigen-specific manner. CD4⁺CD25⁺ but not CD4⁺CD25⁻ T cells purified from lymph node cells were responsible for this suppression. Finally, we detected high expression of receptor activators of nuclear factor κ -B ligand (RANKL) in the grafted skin, and found that recombinant RANKL stimulated LCs to produce IL-10. These findings suggest that the hyposensitization of CHS through the grafted skin is not attributable merely to the reduction of LC number but that IL-10-producing LCs exert a downmodulatory effect by inducing regulatory T cells.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 9 October 2008; doi:10.1038/jid.2008.304

INTRODUCTION

Skin grafting is frequently employed in dermatology and plastic surgery. Skin grafts from the same individual can be successfully implemented 7 days after an operation, and they survive throughout the patient's life. Full-thickness skin grafts exhibit a well-matched appearance, whereas thin-thickness grafts match poorly in texture. Although there have been many cosmetic studies on skin grafting, little is known about the immunological state or the fate of immunocompetent cells in grafted skin. In particular, the function of Langerhans cells (LCs) in grafted skin is poorly understood. Clinical observations have suggested impaired immunity in grafted skin (Doiurmon *et al.*, 2001), and the lack of dermatitis on the graft is empirically known; therefore, some immunological alterations are thought to take place in the graft. Only one

study has demonstrated that murine contact hypersensitivity (CHS) to a hapten cannot develop upon sensitization through full-thickness grafted skin (Yasuda *et al.*, 1996).

LCs are the major immunocompetent cells in the skin (Katz *et al.*, 1979; Stingl *et al.*, 1980) and have a positive (Silberberg-Sinakin and Thorbecke, 1980) or, in certain conditions, suppressive (Kaplan *et al.*, 2005) role in the development of CHS. They take up external antigens, migrate to draining lymph nodes, and present the antigenic determinant to naive T cells in the context of major histocompatibility complex (MHC) molecules. Thus, LCs are critical in sampling and presenting antigens in the skin. Recent studies have disclosed an immunoregulatory role of LCs. These epidermal dendritic cells (DCs) may exert a suppressive effect when they produce IL-10 (Kang *et al.*, 1998; Flacher *et al.*, 2006). This is consistent with the observation that IL-10 production by pulmonary DCs is critical for the induction of tolerance (Akbari *et al.*, 2001). Recently, it has been shown that receptor activators of nuclear factor κ -B ligand (RANKL) produced in UV light-irradiated epidermis mediate immunosuppression by modulating LCs (Loser *et al.*, 2007).

In this study, we explored the fate and functional alterations of LCs in full-thickness grafted skin using a murine CHS experimental system. Our results suggest that the immunological tolerance induced by sensitization through the grafted skin is mediated by IL-10-producing LCs after the

¹Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan

Correspondence: Dr Ryutaro Yoshiki or Dr Kenji Kabashima, Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan.
E-mail: yockey@med.uoeh-u.ac.jp, kkabashi@med.uoeh-u.ac.jp

Abbreviations: CHS, contact hypersensitivity; DC, dendritic cell; dDC, dermal DC; EC, epidermal cell; LC, Langerhans cell; mAb, monoclonal antibody; MACS, magnetic cell sorting; MHC, major histocompatibility complex; PE, phycoerythrin; PCl, picryl chloride; Treg, regulatory T cell; TNF, tumor necrosis factor; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ -B ligand

Received 30 January 2008; revised 12 July 2008; accepted 17 July 2008

induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T (Treg) cells. Over-expressed RANKL in the keratinocytes of grafted skin may stimulate LCs to produce IL-10.

RESULTS

Poor development of CHS in mice sensitized with PCI through grafted skin

To confirm the previous observation by Yasuda *et al.* (1996) and to further examine whether the suppression of CHS by sensitization through skin grafting is a local or systemic phenomenon, mice were sensitized with picryl chloride (PCI) through grafted dorsal skin or non-grafted abdominal skin after skin graft implementation (on day 7 after operation). When PCI was applied to the grafted area for sensitization, the ear swelling challenge response was significantly lower than that of the positive control without skin graft (Figure 1). In contrast, sensitization of the skin-grafted mice through the non-grafted abdominal area did not abrogate CHS response. Similar data were obtained from three independent series of experiments. Thus, the depressed CHS response occurred only when sensitization was performed through the grafted local area.

Numerical alteration and apoptosis of LCs in grafted skin

LCs are critical for CHS, as they serve as antigen-presenting cells and migrate to the draining lymph nodes (Romani *et al.*, 2003). We therefore investigated the change in number of LCs in the grafted skin along with the draining lymph nodes. Epidermal sheets were taken from the grafted skin on days 7 and 14 after operation and stained with phycoerythrin (PE)-labeled anti-I-A monoclonal antibody (mAb). The number of LCs was lower in the grafted skin (200–300 mm⁻²) on day 7 than in the untreated control skin (800–1,000 mm⁻²). Moreover, the number of LCs in grafted skin returned to normal on day 14 (data not shown). These results indicate that the LC number was reduced at the time of sensitization. Morphologically, LCs in the grafted skin exhibited a round appearance. This reduction in LC number was not due to the migration of LCs from the skin, as the number of DCs was not increased in the regional lymph nodes (data not shown). Epidermal cell (EC) suspensions from normal skin or grafted skin were

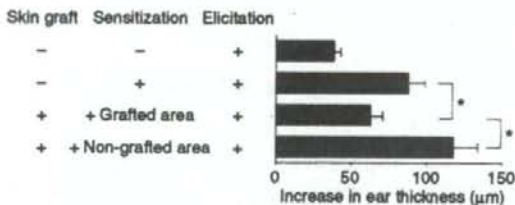


Figure 1. CHS responses in mice sensitized with PCI through grafted or non-grafted skin. Mice were sensitized with PCI on the grafted back skin or non-grafted abdominal skin 7 days after skin grafting. PCI was challenged on each earlobe 5 days after sensitization. The change in ear thickness was measured 24 hours later. Data are representative of three independent experiments. Each group consisted of more than four mice. **P*<0.05.

assessed for apoptosis by flow cytometry. The fraction of apoptosis in LCs was demonstrated as the Annexin-V-positive propidium iodide-negative subset in the grafted skin (Figure 2a). The percentage of apoptotic LCs was significantly increased on day 1 after grafting, but returned to the baseline on day 4 (Figure 2b).

Phenotypes and numbers of migrating LCs and dermal DCs in grafted skin

LCs are capable of migrating from the epidermis into the lymph nodes on sensitization (Kabashima *et al.*, 2003). The migratory ability of LCs in grafted skin was examined with FITC, which is not only a hapten but also a cell-tracking marker. On day 7 after skin grafting, FITC was applied to the grafted area. Draining lymph node cells were taken 24 hours later and labeled with allophycocyanin-labeled anti-I-A mAb, anti-mouse CD205 rat IgG, followed by PE-conjugated anti-rat IgG mAb. FITC⁺ MHC class II⁺ cells were defined as migrating DCs from the skin. CD205 is expressed by LCs as well as by dermal DCs (dDC; Henri *et al.*, 2001). In fact,

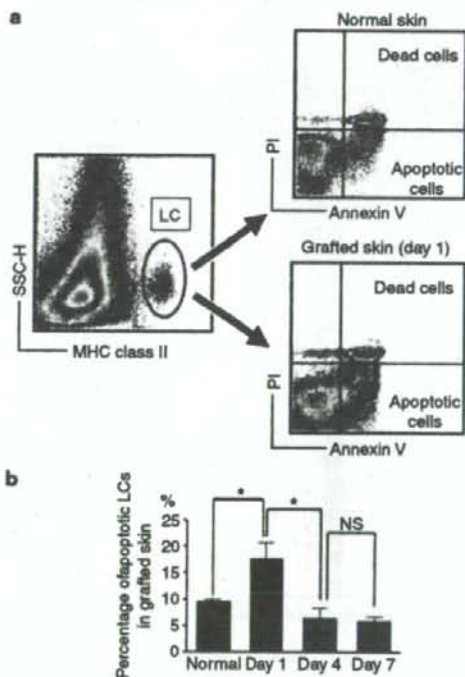


Figure 2. Numerical and morphological alterations and apoptosis of LCs in grafted skin. (a) Apoptosis of Langerhans cells in the grafted skin. EC suspensions from the 1-day grafted or non-grafted skin were stained with FITC-conjugated MHC class II, APC-conjugated Annexin V and PI. Apoptotic LCs were defined as MHC class II⁺ Annexin V⁺, but PI⁻, whereas necrotic cells were double positive. (b) Percentage of apoptotic LCs after grafting procedure. Day 0 represents normal skin and day 1, 4, or 7 shows the day after grafting. Data are representative of three independent experiments. Each group consisted of five mice. **P*<0.05.

migrating DCs were divided into a CD205⁺ Langerin⁺ subset and a CD205⁻ Langerin⁻ subset. Therefore, the vast majority of FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁺ cells represent LCs, whereas FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁻ cells are mostly dDCs (Figure 3a).

To determine whether migrating LCs/dDCs in grafted skin retained their antigen-presenting capacity, migrating DCs were stained with PE-conjugated mAbs to CD80 and CD86. CD80 and CD86 were present on both LCs and dDCs. Thus, LCs/dDCs in grafted skin retained their antigen-presenting capacity for naive T cells.

Compared to the control mice painted with FITC on normal skin, the mice sensitized at the skin-grafted site had reduced numbers of both FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁺ and FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁻ populations in the draining lymph nodes (Figure 3c). From three independent series of experiments, the number of LCs and/or DCs in the lymph nodes of grafted skin-sensitized mice was approximately one-fourth that of normal skin-sensitized mice (Figure 3c). Considering that the grafted skin originally had about

one-fourth the LCs of normal skin, the migratory ability of LCs in grafted skin was virtually the same as that in normal skin.

Increased IL-10 expression in grafted skin

It is well known that UV B (UVB) radiation has immunosuppressive effects on normal cutaneous processes (Elmets *et al.*, 1983; Yagi *et al.*, 1996) and this UV-induced immunosuppression is associated with upregulation of anti-inflammatory Th2 cytokines, IL-4 and IL-10 (Rivas and Ullrich, 1992; Shreedhar *et al.*, 1998). Among cytokines, IL-10 is critical for CHS suppression (Simkin *et al.*, 2000), and both LCs (Takashima, 1995; Flacher *et al.*, 2006) and keratinocytes (Rivas and Ullrich, 1992) are possible candidates for the IL-10 source. To address the involvement of IL-10, mice receiving skin grafts (day 0) were either sensitized with PCI (day 7) on the dorsal grafted skin or untreated. As control, mice without skin grafts were sensitized with PCI on the dorsal skin or untreated. EC suspensions were obtained from the dorsal skin of these four experimental groups (day 8). As shown in Figure 4a, whereas the normal skin had little or no ability to elaborate IL-10 irrespective of PCI sensitization, the grafted skin expressed high levels of IL-10 mRNA, as assessed by real-time PCR. Relative amounts of mRNA were measured by the $\Delta\Delta C_t$ method (Atarashi *et al.*, 2007). Although both grafted skin samples with and without subsequent PCI painting yielded IL-10 mRNA, the nonsensitized epidermis was more productive; it may be that IL-10 produced by keratinocytes was reduced in proportion to

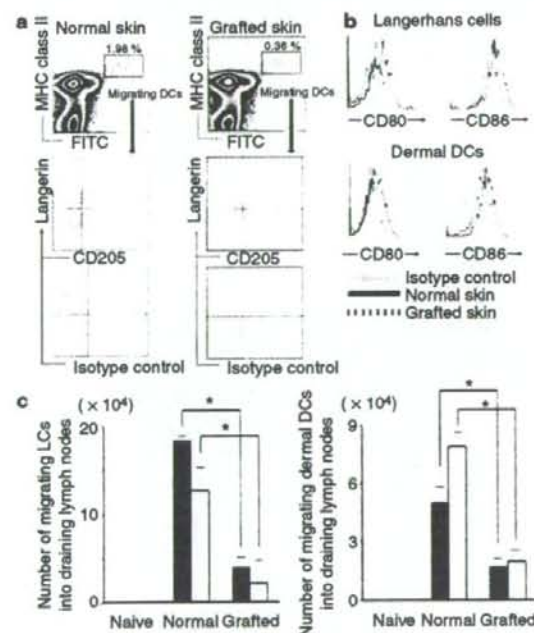


Figure 3. Expression of co-stimulatory molecules and number of migrating DCs in grafted mice. (a) Draining lymph node cells were taken from mice painted with FITC on the grafted or normal skin and stained with anti-MHC class II, CD205 and Langerin mAbs. CD205⁺ cells are virtually the same population as Langerin⁺ cells. (b) After being stained with anti-CD205, CD80, and CD86 mAbs, lymph node cells were subjected to flow cytometric analysis to assess the expression of co-stimulatory molecules. (c) Numbers of FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁺ cells (mainly LCs) and FITC⁺ MHC class II^{hi} CD205⁻ cells (mainly dDCs) migrating from the skin to the draining lymph nodes. The numbers are calculated based on flow cytometric analysis gated as seen in Figure 3a. Each group consisted of more than four mice. **P*<0.05.

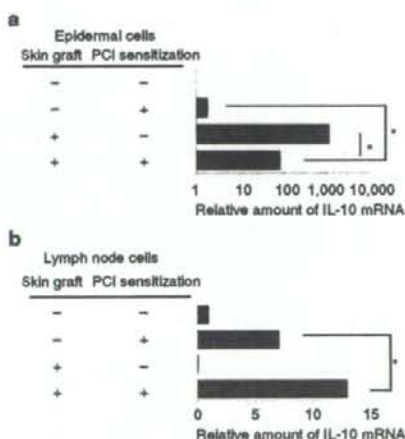


Figure 4. IL-10 expression in ECs and lymph node cells from grafted mice. (a) Epidermal sheets were prepared from grafted (7 days after operation) or non-grafted skin that was painted with PCI or left untreated. IL-10 mRNA expression was measured by real-time PCR. (b) Draining lymph node cells were obtained 5 days after sensitization of mice through grafted or non-grafted skin. IL-10 mRNA expression was measured by real-time PCR. The relative amounts of mRNA expression were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Each group consisted of more than four mice. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. **P*<0.05.

PCI sensitization or, alternatively, IL-10-producing LCs emigrated on sensitization.

Along with ECs, we examined the expression of IL-10 mRNA in the draining lymph nodes. Lymph node cells were prepared from mice receiving skin grafts and/or subsequent PCI painting. Skin grafting alone did not augment IL-10 production by lymph node cells (Figure 4b). PCI sensitization on the grafted skin dramatically enhanced the production of IL-10. This increase of IL-10 was considered to be derived from LCs or proliferative T cells in the draining lymph nodes. As the PCI-painted grafted skin produced less IL-10 than the PCI-non-painted grafted skin (see Figure 3a), we postulate that IL-10-producing LCs emigrated from the grafted skin to the lymph nodes on sensitization with PCI.

LCs as a source of IL-10 in grafted skin

To dissect the cytokine-producing populations in grafted skin, EC and dermal cell suspensions were prepared from grafted (day 7) or normal skin. EC suspensions and dermal cell suspensions were fractionated to CD11c⁺ (containing 70-80% LCs or dDCs and <0.01% T cells) and CD11c⁻

(containing mainly keratinocytes or fibroblasts and <0.05% DCs) subsets with magnetic cell sorting (MACS). As shown in Figure 5, both CD11c⁺ and CD11c⁻ fractions produced a high amount of IL-10, indicating that not only keratinocytes but also LCs from the grafted skin were stimulated to produce IL-10. In contrast, CD11c⁻ cells secreted more IL-6 in grafted skin than normal skin, suggesting that keratinocytes in the graft produced IL-6. Both CD11c⁺ and CD11c⁻ cells produced higher amounts of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the grafted skin than in the normal skin. Surgical trauma induces an early hyperinflammatory response, which is characterized by proinflammatory TNF- α , IL-1, and IL-6 cytokine release (Menger and Vollmar, 2004). IL-6 has a crucial role in the neutrophil and macrophage infiltration in the wound healing process (Lin et al., 2003). Thus, this increase of IL-6 and TNF- α is considered to be a hyperinflammatory response of the wound healing process.

Induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by sensitization through grafted skin

The presence of IL-10-producing LCs in the epidermis and lymph nodes raised the possibility that Treg cells were induced in mice sensitized with PCI through grafted skin. We performed an adoptive transfer study to evaluate this possibility. Donor mice were sensitized with PCI on the grafted skin, and lymph nodes and spleen cells were taken from the mice 5 days later (Figure 6, top). CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ subsets were purified from the pooled cells by

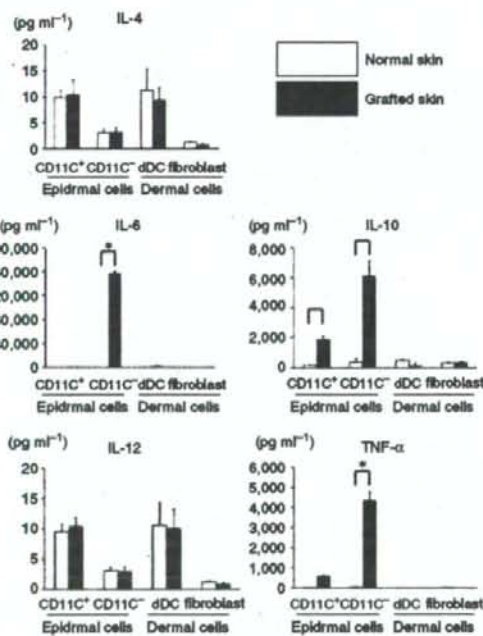
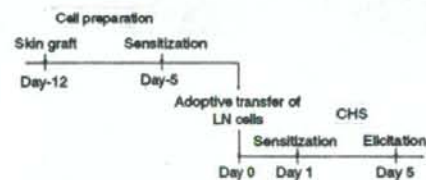


Figure 5. Cytokine production by ECs and dermal cells. EC suspensions were obtained from grafted or non-grafted skin, and fractionated to CD11c⁺ cells (70-80% LCs) and CD11c⁻ cells (LC-depleted cells, mainly keratinocytes) with auto-MACS using CD11c microbeads. Dermal cell suspensions were centrifuged with Ficol-Paque, followed by auto-MACS, to fractionate dDCs and other cells (mainly fibroblasts). Each subset was cultured for 24 hours. The amounts of IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF- α in the culture supernatants were quantified using cytometric beads array. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. Each group consisted of more than four mice. * $P < 0.05$.



Donors		Recipients		Increase in ear thickness (μ m)
Sensitization area	Cell subset	Sensitization	Elitiation	
-	(No transfer)	-	PCI	~0
Non-grafted	Whole	PCI	PCI	~150
Grafted	Whole	PCI	PCI	~150
Grafted	CD4 ⁺ CD25 ⁺	PCI	PCI	~150
Grafted	CD4 ⁺ CD25 ⁻	PCI	PCI	~150
Non-grafted	Whole	DNFB	DNFB	~150
Grafted	CD4 ⁺ CD25 ⁺	DNFB	DNFB	~150
Grafted	CD4 ⁺ CD25 ⁻	DNFB	DNFB	~150

Figure 6. Transfer study of CD4⁺CD25⁺ cells from donor mice sensitized through grafted skin. Mice were sensitized with PCI on the grafted (7 days after operation) or non-grafted area. Five days after sensitization, draining lymph nodes and spleen cells were taken from the mice. Whole cells, CD4⁺CD25⁺ sorted cells, or CD4⁺CD25⁻ sorted cells were transferred into syngeneic naive mice (5×10^6 for each mouse). Then, the recipients were sensitized on the dorsum and challenged on the ears with hapten (PCI or DNFB) as indicated in the figure. Change in ear thickness was measured 24 hours later. Each group consisted of more than four mice. Data are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$.

MACS. Whole unfractionated cells or cells of each subset were transferred into syngeneic naive recipients (5×10^6 for each mouse), which were then sensitized and challenged with PCI. The transfer of $CD4^+CD25^+$ T cells decreased the CHS response of the recipients, whereas $CD4^+CD25^-$ T cells were not suppressive (Figure 6, bottom). When recipient mice were sensitized and challenged with another hapten dinitrofluorobenzene, such suppression was not observed, suggesting that the immunosuppression was antigen specific. Thus, the depressed sensitization through the grafted skin was associated with the appearance of $CD4^+CD25^+$ Treg cells.

Augmentation of IL-10 production by LCs exposed to RANKL

It has been recently reported that LCs express receptor activators of nuclear factor κ -B, that UVB irradiation upregulates cutaneous RANKL, and that RANKL activates DCs as well as Tregs in the skin (Loser et al., 2006). We

hypothesized that the grafted skin expresses RANKL and activates LCs to produce IL-10. When the grafted skin was stained with anti-RANKL and MHC class II antibodies, we found that ECs of the grafted skin expressed RANKL (Figure 7a, RANKL, blue; LCs, red). Notably, RANKL was strongly expressed around LCs (merged purple), suggesting that receptor activators of nuclear factor κ -B/RANKL interactions might be important for the induction of hyposensitization in grafted skin. To identify the function of receptor activator of nuclear factor κ -B/RANKL in the skin immune system, we tested the ability of LCs to produce IL-10 when they were exposed to recombinant RANKL. EC suspensions were cultured with or without recombinant RANKL (R&D Systems, McKinley, MN) for 24 hours, and stained with anti-MHC class II antibody. Then, the cells were permeabilized and stained with anti-IL-10 antibody. We found that the addition of RANKL increased the fraction of IL-10-positive LCs (Figure 6b) and the mean fluorescence intensity of IL-10 in LCs (Figure 6c). These findings indicated that RANKL expressed by keratinocytes of grafted skin stimulates LCs to produce IL-10.

DISCUSSION

This study addressed the immunological mechanism underlying impaired sensitization through grafted skin. CHS was depressed only when mice were immunized with hapten through grafted skin, and even skin graft-bearing mice fully developed CHS when sensitized through non-grafted skin. Therefore, the induction of immunosuppression is local, whereas its effects are specific. The local immunological condition of the grafted skin is responsible for impaired induction. The fate of LCs in the graft seems to be a key to resolving the mechanism. Mainly because of the apoptotic death of LCs, the number of LCs in freshly implemented skin was up to one-fourth that of normal skin. However, when FITC was applied to the grafted skin, FITC-bearing LCs were present in the draining lymph nodes, again at a cell number one-fourth that of normal skin-sensitized mice. Thus, LCs were capable of migrating efficiently from the grafted skin to the draining lymph nodes. As LCs can serve as both positive and negative antigen-presenting cells depending on the surrounding milieu (Silberberg-Sinakin and Thorbecke, 1980; Kaplan et al., 2005), not only the numerical but also functional changes of LCs determine CHS development. We further investigated whether the hyposensitization of CHS through grafted skin was attributable merely to the reduction of LC number, or whether some function of LCs was altered.

DCs in peripheral tissues, such as epidermal LCs, remain immature in the steady state, and express small quantities of MHC class II and co-stimulatory molecules and produce low levels of immunostimulatory cytokines. During the process of antigen capture/presentation and migration into T-cell areas of regional lymph nodes, maturation of DCs simultaneously occurs, as they express high amounts of these surface molecules and cytokines (Inaba et al., 1997; Huang et al., 2000; Lutz and Schuler, 2002). Recent studies have revealed that peripheral tolerance is induced by immature DCs (Steinman et al., 2000; Lutz and Schuler, 2002) or partially

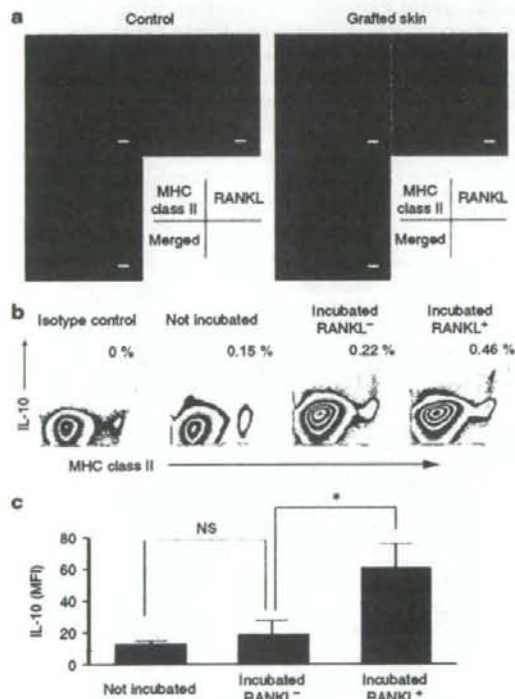


Figure 7. Induction of RANKL in grafted skin and stimulation of LCs to produce IL-10 by RANKL. (a) The grafted or non-grafted skin was stained with antibodies to MHC class II and RANKL. Red, MHC-class II; blue, RANKL. Merged image is shown in purple. (b, c) EC suspensions were cultured with or without recombinant RANKL for 2 days. Cells were fixed, permeabilized, stained with IL-10 and MHC class II antibodies, and analyzed by flow cytometry (b). The mean fluorescence intensity of IL-10 in MHC class II⁺ LCs existing in EC suspensions. Bars indicate the mean \pm SD. Data are representative of three independent experiments. Each group consisted of more than four mice. Scale bar = 50 μ m * P < 0.05.

by mature DCs that express MHC class II, CD80 and CD86 molecules but lack secretion of IL-12, IL-6, and TNF- α (Groux, 2003). On the basis of their migrating ability, it seemed that nonapoptotic, live LCs in the grafted skin were functionally mature.

Given that surgical trauma is one of the injuries that induce a hyperinflammatory response, the skin graft employed in this study likely leads to the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6. However, the skin graft is not merely surgical trauma, because living skin is applied to the raw surface. More specifically, the intact ECs produce high amounts of IL-6 and TNF- α (see Figure 5), suggesting that skin grafting induces inflammatory cytokine production more vigorously than simple trauma. In wound healing after skin grafting, the exaggerated inflammatory response should be downregulated in due course. Among various factors that suppress the inflammatory response, IL-10 is one of the most important candidates, because it is a potent inhibitor of the activation of monocytes/macrophages and of the expression of TNF- α and other proinflammatory mediators (Denys et al., 2002). In fact, IL-10 was produced at a high level by keratinocytes in grafted skin. We explored the possibility that LCs have a polarized cytokine production pattern in the graft, which leads to peripheral tolerance. In this scenario, IL-10 is a strong candidate as a skewing cytokine.

LCs in grafted skin exhibited a rounder and less dendritic appearance than those in normal skin. Along with this morphological change, LCs in grafted skin expressed IL-10 at a higher level than those in non-grafted skin, suggesting that IL-10-producing LCs have an important role in depressed CHS. Many studies have shown that IL-10 is an essential cytokine in depression of CHS (Annacker et al., 2001; Girolomoni et al., 2004; Ghoreishi and Dutz, 2006). Similarly, IL-10 production by pulmonary DCs is critical for the induction of tolerance (Akbari et al., 2001). Besides LCs, keratinocytes also secrete IL-10, which causes CHS suppression when overexpressed by certain stimuli such as UVB radiation (Schwarz et al., 2004; Ghoreishi and Dutz, 2006). Keratinocyte-derived IL-10 might further condition LCs to be regulatory as well as suppress the injury-associated inflammation.

Conversely, the adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells from the tolerant mice induced CHS suppression, whereas CD4⁺CD25⁻ T cells had no effect. This suggests that CD4⁺CD25⁺ Treg cells as well as IL-10-producing LCs participate in the skin graft-induced suppression of CHS. At present, at least four types of Treg cells can be identified based on the expression of cell-surface markers, secretion of cytokines, and suppression mechanisms (Groux, 2003). Recent accumulating evidence has indicated that Treg cells have a key role in peripheral tolerance (Takahashi et al., 1998; Shevach, 2001; Taylor et al., 2001; Thorstensen and Khoruts, 2001; Zhang et al., 2001) under the influence of immature or maturing DCs (Min et al., 2003; Roelofs-Haarhuis et al., 2003).

The relationship between IL-10-producing LCs and Treg cells remains partly elucidated. In UVB-induced tolerance,

intravenous transfer of Treg cells suppresses CHS, and this phenomenon is dependent on host-derived IL-10 (Ghoreishi and Dutz, 2006). Other groups have reported that Treg cells regulate the expansion of peripheral CD4⁺ T cells with IL-10 (Annacker et al., 2001). These findings have suggested that IL-10 is essential for Treg cells for successful downmodulation, and the source of IL-10 is a constituent of the immunological milieu, such as epithelial cells, or Treg cells *per se*. However, we found that LCs are the IL-10 producer, raising the possibility that IL-10-producing LCs are an inducer of Treg cells. In addition, IL-10 released from LCs also might inhibit effector T cells concerned with CHS.

A group of investigators have found that RANKL, which is expressed in the keratinocytes of inflamed skin, controls Treg cell numbers by activation of DCs (Loser et al., 2007). In this study, we showed that both epidermal CD11c⁺ LCs and CD11c⁻ cells (keratinocytes) produce high amounts of representative proinflammatory cytokine TNF- α in the grafted area, which might lead to the expression of RANKL on keratinocytes. Our finding that LCs exposed to recombinant RANKL produced a high level of IL-10 suggests that RANKL from keratinocytes in the grafted skin can induce IL-10-producing LCs at the initiation stage of immunosuppression. The reduction in LC number may cause impaired sensitization, but in accordance with recent observations (Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005), the altered function of LCs is more likely involved in the depression of CHS.

Our study is clinically relevant in two aspects. First, grafted skin provides a specialized immunological status, in which T cells do not respond well to external stimuli such as contactants, as a result of skewed function and a reduced number of LCs. In this context, contact dermatitis cannot easily develop in the grafted skin. Second, the skin graft may be used for the induction of antigen-specific peripheral tolerance by application of antigen through the grafted skin. This strategy may have great potential for controlling allergic diseases and autoimmune disorders. Further investigation of this skin graft-associated immunosuppression may develop safe and effective methodologies for tolerance induction.

MATERIALS AND METHODS

Mice

BALB/c (7- to 10-week-old) female mice were obtained from Kyudo Co. Ltd (Kumamoto, Japan). Mice were maintained on a 12-hour light/dark cycle under specific pathogen-free conditions. Protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Occupational and Environmental Health.

Preparation of skin graft

One day before skin grafting, the back of each mouse was clipped and hairs were removed with depilatory cream (Shiseido Cosmetic Co., Tokyo, Japan). A 25 × 20 mm area of full-thickness back skin was resected under intraperitoneal anesthesia with ketamine and dolmicam. The same skin was grafted onto the back of each mouse. The graft was sutured and fixed with a tie-over dressing. The dressing was removed on day 7 after operation.