

- 5) Ginhoux, F. et al. : J. Exp. Med., 204 : 3133-3146, 2007
 6) Poulin, L. F. et al. : J. Exp. Med., 204 : 3119-3131, 2007
 7) Wollenberg, A. et al. : J. Invest. Dermatol., 119 : 1096-1102, 2002
 8) Kissenpfennig, A. et al. : Immunity, 22 : 643-654, 2005
 9) Hemmi, H. et al. : Int. Immunol., 13 : 695-704, 2001
 10) Sigmundsdottir, H. et al. : Nat. Immunol., 8 : 285-293, 2007
 11) Randolph, G. J. et al. : Annu. Rev. Immunol., 26 : 293-316, 2007
 12) Kabashima, K. et al. : Am. J. Pathol., 171 : 1249-1257, 2007
 13) Bacci, S. et al. : Eur. J. Immunol., 27 : 442-448, 1997
 14) Bennett, C. L. et al. : J. Cell. Biol., 169 : 569-576, 2005
 15) Kaplan, D. H. et al. : Immunity, 23 : 611-620, 2005
 16) Schroder, J. M. et al. : Exp. Dermatol., 15 : 913-929, 2006
 17) Kissenpfennig, A. & Malissen, B. : Trends Immunol., 27 : 132-139, 2006
 18) Allan, R. S. et al. : Science, 301 : 1925-1928, 2003
 19) Lemos, M. P. et al. : J. Exp. Med., 199 : 725-730, 2004
 20) Liu, Y. J. et al. : Annu. Rev. Immunol., 25 : 193-219, 2007
 21) Liu, Y. J. et al. : J. Allergy Clin. Immunol., 120 : 238-244; quiz 245-236, 2007
 22) Loser, K. et al. : Nat. Med., 12 : 1372-1379, 2006
 23) Fujita, S. et al. : Blood, 110 : 3793-3803, 2007
 24) Akbari, O. et al. : Nat. Med., 8 : 1024-1032, 2002
 25) Kabashima, K. et al. : Immunity, 22 : 439-450, 2005

<著者プロフィール>

梶島健治：1996年京都大学医学部卒。横須賀米海軍病院インターン、京都大学皮膚科研修医、米国ワシントン大学臨床研修、京都大学神経細胞薬理学博士課程（成宮 周教授）、京都大学皮膚科助教（宮地良樹教授）、UCSFポスドク（Dr. Cyster）、産業医科大学皮膚科准教授（戸倉新樹教授）を経て2008年より現職。皮膚の免疫臓器としての多様性と制御機構の解明に打ち込んでいる。趣味は面白くないと不評のブログ更新（<http://cabio.cocolog-nifty.com/blog/>）。

皮膚の抗原提示細胞の分類と免疫・アレルギーの制御

京都大学大学院医学研究科皮膚科学(主任:宮地良衛教授)

梶 島 健 治

西日本皮膚科別冊

平成20年10月発行

(第70巻第5号)

綜 説

皮膚の抗原提示細胞の分類と免疫・アレルギーの制御

京都大学大学院医学研究科皮膚科学(主任:宮地良樹教授)

梶 島 健 治

はじめに

皮膚は生体を外界と隔てる最大の臓器であり, Th1, Th2, Th17 型免疫応答や免疫寛容を誘導する。このように多彩な免疫応答制御がなされるため, 免疫臓器としての皮膚のことを SALT (skin associated lymphoid tissue) と表すこともある¹⁾。S-100 抗体により皮膚を免疫染色すると (図 1), 表皮には 1 mm² あたり約 1000 個のランゲルハンス細胞が存在し, さらに真皮にも真皮樹状細胞やマクロファージが密に存在する。また, 皮膚は外来抗原や細菌などの外敵から生体を保護するのみならず, 過剰な反応が接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患を引き起こすため, 生体における皮膚免疫の功罪は表裏一体である。また, 近年 flaggrin の遺伝子異常による皮膚バリアの破壊が気管支喘息の発症につながる事が報告され, 皮膚を介した外来抗原による感作が他臓器のアレルギー疾患の発症にも関与することが明らかにされた²⁾。本項では, 多彩な免疫応答を制御する上で司令塔的な役割を果たす皮膚に存在する樹状細胞を中心とする皮膚樹状細胞サブセットとそれらの免疫・アレルギーにおける機能について最近の知見を交えて述べる。

1. 皮膚の抗原提示細胞サブセット

1) 表皮の抗原提示細胞

表皮に存在する抗原提示細胞として主な役割を果たすランゲルハンス細胞は, 表皮を構成する細胞の約 1~3% をなし, Langerin や MHC class II, CD80, CD86 などの共



図 1 免疫染色を用いた皮膚の抗原提示細胞の分布
表皮にはランゲルハンス細胞, 真皮には真皮樹状細胞が存在する。近年真皮には Langerin 陽性樹状細胞が存在することが報告された

刺激分子, E-cadherin を発現し, ATPase や S-100 も有している。ランゲルハンス細胞は, 表皮内で自身が細胞増殖を行い, また, 放射線の照射に対しても耐性であるため, 放射線照射後の骨髄キメラマウスにおいて, 骨髄由来細胞に置換されない。ところが, 紫外線照射などの激しい炎症下ではランゲルハンス細胞は一時的に減弱し, 表皮角化細胞により産生される CXCL14 や CCL20 が CCR6 や CCR2 陽性の骨髄由来前駆細胞の皮膚への homing に重要な役割を果たす³⁾⁴⁾。

一方, transforming growth factor (TGF)- β 欠損マウスや Id2 欠損マウスではランゲルハンス細胞は欠失するが真皮樹状細胞には影響がない。以上より, 表皮角化細胞のみならず, ランゲルハンス細胞自身が産生する TGF- β がランゲルハンス前駆細胞に Id2 を誘導し, 最終分化に重要な役割を果たしていることが示唆される⁵⁾。

また, IA- β -EGFP 遺伝子改変マウスを用いてランゲルハンス細胞の樹状突起を可視化させると, ハプテン刺激や TNF- β 刺激はランゲルハンス細胞の樹状突起の表皮角化細胞間における伸縮を著しく充進させ, ランゲルハンス細胞が相互作用していることをうかがわせる⁶⁾。

表皮角化細胞も活性化と共に MHC class I/II をどちらも上昇させるため, ランゲルハンス細胞に比べ抗原提示能は著しく弱い, 抗原提示機能があると考えられているが, その生理的意義の詳細は明らかではない。

2) 真皮の抗原提示細胞

真皮における主な抗原提示細胞は, Langerin 真皮樹状細胞であるが, 抗原提示細胞としては真皮マクロファージも存在する。ヒト真皮樹状細胞は, factor XIIIa, C type lectin の DC-SIGN やマンノース受容体を発現している。従来 Langerin はランゲルハンス細胞にのみ存在しており, 真皮に存在する Langerin 陽性細胞はランゲルハンス細胞がリンパ管に入る途中の状態であると考えられていたが, ランゲルハンス細胞とは異なる Langerin 陽性真皮樹状細胞が主に真皮上層の毛包周囲に存在することがマウスで示された^{7)~9)}。さらに Langerin 陽性樹状細胞が血中のみならず肺や肝臓にも存在することが示され, 今後ランゲルハンス細胞以外の Langerin 陽性細胞の機能の解明が待たれる。

2. 皮膚抗原提示細胞の遊走と局在

皮膚の抗原提示細胞の主役をなす皮膚樹状細胞は抗原を取り込んだ後, 所属リンパ節へ遊走し, ナイーブ T 細胞



図2 接触過敏反応のスキーマ

抗原に暴露されると皮膚樹状細胞は活性化し、成熟しながらリンパ節に遊走し、ナイーブT細胞をプライミングする。皮膚樹状細胞が産生するIL-12がTh1/Tc1への分化に必要である。感作相成立後のメモリーT細胞は同一抗原に暴露時に皮膚局所に遊走し、そこで炎症を惹起する

をprimingする。ランゲルハンス細胞は、ハプテンなどの外来抗原や機械的刺激により活性化し、metalloproteinase (MMP)-2やMMP-9を産生して基底膜コラーゲンを破壊し真皮内に浸潤する。表皮角化細胞の産生するTNF- α 、GM-CSF、IL-1、PGE2、さらにはランゲルハンス細胞自身の産生するIL-1 β により活性化した皮膚樹状細胞はCCR7やCXCR4の発現を上昇してそのリガンドであるCCL21やCXCL12が存在するリンパ管を介し、さらにCCL19、CCL21が存在するリンパ節内のT細胞領域に遊走する(図2)。この所属リンパ節への遊走能はマクロファージに比較して樹状細胞ははるかに強い。

蛍光色素であるTRITCの皮膚塗布後、Langerin⁺樹状細胞は、24~48時間後をピークに所属リンパ節のparacortexのB細胞領域に近いところに存在し、Langerin⁺樹状細胞は4日後をピークにparacortexのより内側かつ深部のT細胞領域に存在する¹⁰⁾。また、通常の樹状細胞の半減期が1~3日であるの比べ、ランゲルハンス細胞の半減期は約2カ月であり、さらに定常状態で皮膚から遊走してきたリンパ節における樹状細胞の半減期も2週間ほどと長いことが知られている¹¹⁾。

3. 皮膚抗原提示細胞の免疫・アレルギーにおける役割

皮膚樹状細胞の生理的機能を考えるモデルの一つとして、接触過敏反応が挙げられる。皮膚はハプテンに暴露されると表皮角化細胞がpro-inflammatoryメディエーターを産生し、皮膚樹状細胞を活性化させる。皮膚樹状細胞は抗原を取り込み、CD86、CD80、CD40、ICAM-1などを発現し成熟しながら所属リンパ節へ遊走する¹²⁾¹³⁾。そこ

でナイーブT細胞と免疫シナプスを形成し、ナイーブT細胞からメモリーT細胞へと分化・成熟を誘導させ、感作相を成立させる。この感作には皮膚樹状細胞が産生するIL-12がTh1/Tc1へのT細胞の分化に重要とされる。感作成立後、同一抗原に暴露されるとメモリーT細胞は皮膚が産生するIP-10、Migなどのケモカインにより皮膚局所に集積し炎症を惹起する(図2)。

この接触過敏反応における皮膚樹状細胞の役割について、以前よりランゲルハンス細胞の重要性が指摘されていた¹⁴⁾。実際*in vitro*においてランゲルハンス細胞が強力な抗原提示能を示す。ところが遺伝子改変マウスの作製により、Langerin陽性樹状細胞を特異的に除去したところ、接触過敏反応が、異なる3つのグループにより、亢進、不変、減弱という相異なる結果が得られた¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。この結果は、Langerin陽性樹状細胞が接触過敏反応において、時に負的作用を発揮していることを示唆する¹⁷⁾¹⁸⁾。さらには、真皮に存在するLangerin陽性樹状細胞が接触過敏反応のinitiationに重要であることが近年示された。一方、惹起相における抗原提示細胞の詳細な同定はなされていない。

近年、アトピー性皮膚炎などのTh2型病において、表皮角化細胞からthymic stromal lymphopoietin (TSLP)が産生され、樹状細胞に作用しTARCやMDCなどのTh2ケモカインの産生を促し、IL-4、IL-5、IL-13を産生するTh2反応を促進すること¹⁹⁾、また、その際にTSLPがOX40-Lを樹状細胞上に誘導し、Th2型反応を促進することが示された²⁰⁾。また、皮膚樹状細胞が産生するIL-12はTh1型反応の分化を誘導するし、IL-4はTh2型、IL-6、TGF- β はTh17型免疫反応を誘導する。一方、樹状細胞

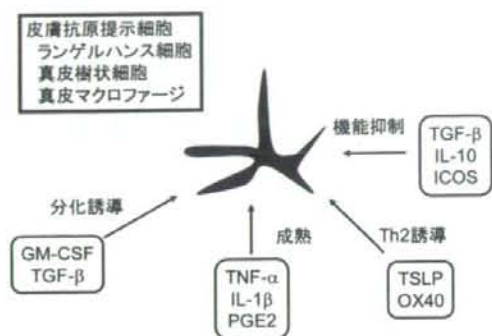


図3 皮膚抗原提示細胞の機能調節
図に示すような刺激などに伴い皮膚樹状細胞は多様な機能を発揮する

の分化や機能を抑制する因子として、IL-10、TGF-βなどが挙げられる。また、共刺激分子の一つである樹状細胞上のICOS-Lを介したシグナルが制御性T細胞を誘導させることも知られている²¹⁾。

また、high affinity IgE受容体であるFcεRIが、肥満細胞のみならず、アトピー性皮膚炎局所のランゲルハンス細胞にも発現し、抗原とcomplexを形成したIgEを効率良く取り込み非常に高いT細胞刺激能を誘導することが明らかとなった。

終わりに

樹状細胞をはじめとする皮膚抗原提示細胞は、皮膚という外界との最前線において、ホメオスタシスの維持、感染や外来物からの防御、炎症性皮膚疾患の発症など、様々な役割を担う(図3)²²⁾。特に、皮膚免疫やアレルギー反応において、皮膚樹状細胞は司令塔的な役割を担っていると云える。今後は皮膚抗原提示細胞の分化成熟における表皮角化細胞をはじめとする他の皮膚構成細胞との相互作用の解明などが大きな課題となって来るであろう。近い将来、皮膚抗原提示細胞の機能制御を介した免疫・アレルギー疾患の制御が期待される。

文 献

- 1) Streilein JW: Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol* 80 (suppl): 12s-16s. 1983.
- 2) Palmer CN et al: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38: 441-446. 2006.
- 3) Schaeferli P et al: Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity* 23: 331-342. 2005.
- 4) Charbonnier AS et al: Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 190: 1755-1768. 1999.
- 5) Hacker C et al: Transcriptional profiling identifies Id2 function

- in dendritic cell development. *Nat Immunol* 4: 380-386. 2003.
- 6) Nishibu A et al: Behavioral responses of epidermal Langerhans cells *in situ* to local pathological stimuli. *J Invest Dermatol* 126: 787-796. 2006.
- 7) Bursch LS et al: Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 204: 3147-3156. 2007.
- 8) Ginhoux F et al: Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 204: 3133-3146. 2007.
- 9) Poulin LF: The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204: 3119-3131. 2007.
- 10) Kissenpfennig A et al: Dynamics and function of Langerhans cells *in vivo*: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643-654. 2005.
- 11) Vishwanath M et al: Development of intravital intermittent confocal imaging system for studying Langerhans cell turnover. *J Invest Dermatol* 126: 2452-2457. 2006.
- 12) Randolph GJ, Ochoaño J, Partida SNS: 2007. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu Rev Immunol*.
- 13) Kabashima K et al: CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 171: 1249-1257. 2007.
- 14) Bacci S et al: High and low doses of haptens dictate whether dermal or epidermal antigen-presenting cells promote contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 27: 442-448. 1997.
- 15) Bennett CL et al: Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169: 569-576. 2005.
- 16) Kaplan DH et al: Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23: 611-620. 2005.
- 17) Schroder JM et al: Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances-lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? *Exp Dermatol* 15: 913-929. 2006.
- 18) Kissenpfennig A, Malissen B: Langerhans cells-revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol* 27: 132-139. 2006.
- 19) Liu YJ et al: TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25: 193-219. 2007.
- 20) Liu YJ: Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 120: 238-244: quiz 245-246. 2007.
- 21) Akbari O et al: Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8: 1024-1032. 2002.
- 22) Kabashima K et al: Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22: 439-450. 2005.

別刷請求先: 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54
京都市立大学大学院医学研究科
皮膚科学/創薬医学融合拠点
梶島 健治



話題

樹状細胞のプロスタグランジンE₂による Th1細胞の分化誘導*

梶 島 健 治**

Key Words : prostaglandin E₂, EP1, dendritic cell, Th1

はじめに

生体が刺激を受けると、細胞膜リン脂質よりアラキドン酸が放出され、シクロオキシゲナーゼ(COX)と各合成酵素によりプロスタノイドと呼ばれるプロスタグランジン(PG)D₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGL₂やトロンボキサン(TX)A₂に変換されたり、5-リポキシゲナーゼ(5-LO)などによりロイコトリエン(LT)B₄やシステニル(cys)LT(LTC₄, LTD₄, LTE₄)に変換されたりする(図1)。また、PGE合成酵素(PGES)により合成されるPGE₂は基本的に生理的に不安定であり、その作用は近傍に存在する細胞表面のG蛋白結合型受容体であるPGE受容体のEPを介してなされる(図1)¹⁾。また、EPにはEP1からEP4という4つのサブタイプ受容体が存在しており、これら受容体は、EP1は細胞内Ca²⁺濃度上昇系に、EP2, EP4はG_s蛋白と共役し細胞内cAMP上昇系に、EP3はG_i蛋白と共役しcAMP抑制系にそれぞれ働くことで細胞内にシグナルを伝達する(図1)¹⁾。PGE₂の免疫系における役割については、1980年代より抗原提示細胞からPGE₂が産生され、インターロイキン(IL)-2やインターフェロン(IFN)-γの産生やヒトやマウスのT細胞増殖を抑制することが*in vitro*の実験で知られていた²⁾。さらに、PGE₂はTh1サイトカインの産生を抑制するもののTh2サイトカインの産生には影響を及ぼさないことも報告された³⁾。すなわち、PGE₂のT細胞への効果としては、cAMP

の上昇が着目され、EP2とEP4受容体を介したcAMP上昇が、T細胞の増殖抑制やサイトカイン産生抑制の誘導機序であると*in vitro*で報告された⁴⁾。

ところが、COX阻害薬である非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)によりTh1反応が必ずしも増悪するわけではない。唯一EP4欠損マウスを用いてマウス炎症性腸疾患モデルが増悪すること⁵⁾が報告された以外はむしろ、PGE₂受容体欠損マウスでは炎症が抑制されている。EP4受容体欠損マウスでは皮膚樹状細胞の機能が障害を受け接触過敏反応が減弱したり⁶⁾、EP2/EP4受容体の阻害により、紫外線照射により誘発される紅斑の形成が弱まること⁷⁾*in vivo*で示されてきた。以上のように、PGE₂のシグナルを阻害することはむしろ免疫応答を弱めることが*in vivo*では認められることから、PGE₂にはcAMP上昇による免疫応答減弱以外の作用があることが推察される。

本稿では、EP1欠損マウスの作製とEP1特異的薬物を用いて従来明らかにされていなかったT細胞に発現しているEP1受容体の免疫における新たな役割について述べたい。

T細胞分化について

CD4陽性T細胞にはIFN-γを産生するTh1, IL-4, 5, 13を産生するTh2, IL-17, IL-22を産生するTh17や、制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)サブセットが存在する⁸⁾⁹⁾。これらの分化において、

* Facilitation of Th1 mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1.

** Kenji KABASHIMA, M.D., Ph.D.: 京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座(〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54); Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, JAPAN

*** 京都大学大学院医学研究科創薬医学融合拠点

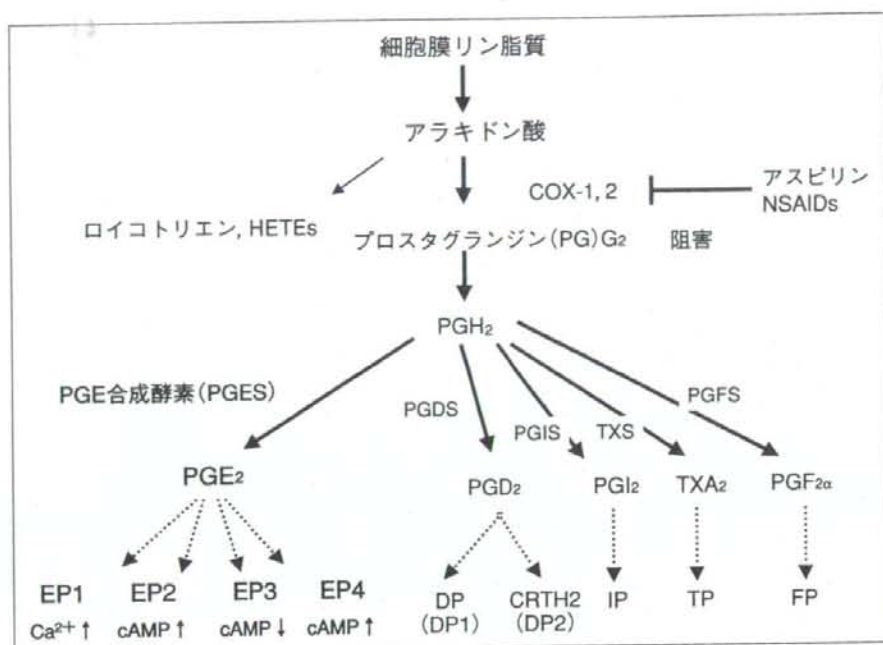


図1 アラキドン酸代謝経路

PGE₂は細胞膜リン脂質から切り出されたアラキドン酸がCOX, PGESにより代謝された脂質メディエーターの一つである。PGE₂には4種類のサブタイプ受容体であるEP1, EP2, EP3, EP4が存在し、それぞれ異なるシグナル伝達系を有する。

Th1ではIL-12, Th2ではIL-4, Th17ではTGF-βとIL-6, TregではTGF-βが重要であり、さらに転写因子では、Th1はT-betやStat4, Th2はStat6, Th17はStat3やROR-γ, TregではFoxp3が重要である¹⁰⁾。同様にCD8陽性T細胞においても、IFN-γを産生するTc1, IL-4を産生するTc2が存在する。これらのT細胞サブセットはさまざまな疾患に密接に関与しており、Th1・Tc1は接触過敏症やツベルクリン反応, Th2・Tc2はアトピー性皮膚炎や気管支喘息などのIgEを介するアレルギー疾患全般, Th17は多発性硬化症, 尋常性乾癬, 自己免疫疾患などの発症に関与している。また, 制御性T細胞とエフェクターT細胞の生体におけるバランスも免疫・アレルギー疾患の発症にかかわっているようである¹¹⁾。

EP受容体の発現とPGESの発現

PGESには誘導タイプの膜型PGES(mPGES-1)と恒常的に発現している細胞質型PGES(cPGES)の2種類が存在しており、皮膚感作を行った後の所属リンパ節においてmPGES-1陽性かつCD11c

陽性樹状細胞数が増加している(図2)。すなわち、皮膚由来の活性化した樹状細胞がPGE₂を所属リンパ節で産生していることを示唆する¹²⁾。一方、受容体であるEPは、CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞において、EP2とEP4の発現が強く認められているが、EP1受容体の発現も認められる(表1)。これまで*in vitro*の解析より、EP2, EP4からのシグナルがcAMPの上昇を介してT細胞の増殖やIL-2などのサイトカインの抑制を介してT細胞の機能を抑制することが知られるが⁵⁾、EP1受容体の役割は不明であった。

EP1によるTh1分化誘導の促進

そこで、われわれは、EP受容体の役割を解明するために、*in vitro*でのT細胞分化誘導実験を行った。野生型C57BL/6マウスあるいはEP1欠損マウスよりCD4⁺CD44⁻ナイーブT細胞を分離し、Th1誘導条件下(IL-12, 抗IL-4抗体, IL-2), あるいはTh2誘導条件下(抗IFN-γ抗体, IL-4, IL-2)で抗CD3抗体刺激とともに分化誘導を行った。すると、EP1アゴニストであるDI-004(白カラム)

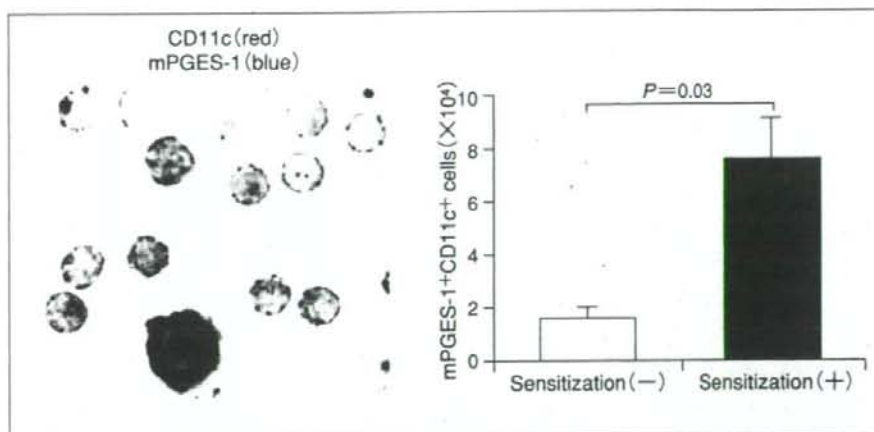


図2 mPGES-1の発現

- A: サイトスピン後のリンパ節細胞をCD11c(赤), mPGES-1(青)で免疫染色すると, CD11c陽性樹状細胞において強くmPGES-1が発現していることがわかる。
 B: マウス腹部に感作群(n=5), 非感作群(n=5)の5日目の所属リンパ節においてCD11cとmPGES-1をフローサイトメーターで展開すると, 感作群において, double positiveサブセット, すなわちmPGES-1を発現するCD11c陽性樹状細胞が有意に高いことが示された。Data are representative of three independent experiments. Data are presented as the mean \pm the SEM.

では細胞内IFN- γ 陽性細胞の割合がフローサイトメーター解析で増加していた。ところが, EP1欠損マウス由来のナイーブT細胞にEP1アゴニストを加えても(黒カラム)このような効果は認められなかった。一方, 野生型マウス由来ナイーブT細胞にEP2アゴニストであるbutaprost(灰色カラム), あるいはEP4アゴニストであるAE-1-329(縦縞カラム)を添加すると, IFN- γ 陽性細胞数は有意に減少した。さらに, Th2誘導条件下でEP1アゴニストを添加すると野生型マウス由来のCD4陽性ナイーブT細胞ではIL4陽性細胞数は減弱するが, その効果はEP1欠損マウス由来の細胞においては認められなかった(図3)。同様の結果がCD8陽性ナイーブT細胞においても認められた⁴⁾。

以上の結果は, 従来どおりEP2, EP4はTh1分化を抑制するものの, EP1はTh1/Tc1分化誘導を亢進し, Th2誘導を抑制する作用があることを示唆する。

EP1欠損マウスにおける接触過敏反応の亢進

次に, マウス接触過敏反応(contact hypersensitivity)モデル¹³⁾¹⁴⁾を用いて, EP1シグナルが外来

表1 EP受容体のT細胞サブセットにおける発現

	EP1	EP2	EP3	EP4
CD4 ⁺	0.64	2.04	0.01	3.95
CD8 ⁺	0.77	1.93	0.01	3.08

Arbitrary expression unitsを示す。CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞を分離し, EP1~4受容体mRNAの発現レベルをquantitative real time PCRにより解析した。

抗原に対するTh1・Tc1型免疫反応にどのような影響を与えるかを*in vivo*で検証した。接触過敏反応モデルはTh1・Tc1型反応(=遅延型過敏反応)の代表であり, ヒトでいうところの「かぶれ」に相当する。

接触過敏反応は感作相と惹起相の2つの相よりなる¹³⁾¹⁴⁾。感作相では, 抗原に曝露された皮膚において, 表皮に存在するランゲルハンス細胞や真皮に存在する真皮樹状細胞などの皮膚樹状細胞が抗原を取り込み成熟しながら所属リンパ節へ遊走する。そして, 所属リンパ節において, 皮膚樹状細胞は抗原提示や活性化シグナルなどをナイーブT細胞に伝達する。この樹状細胞とナイーブT細胞との相互作用を介してナイーブT細胞はメモリーT細胞へと分化成熟し, 末梢へと移動していく。この感作相にはおよそ5日

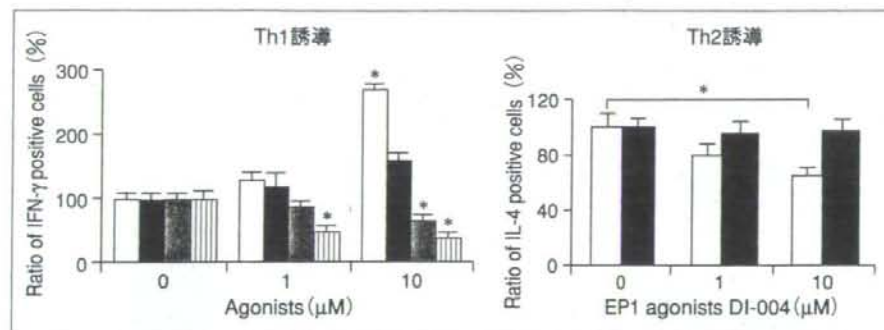


図3 Th分化誘導におけるEPアゴニストの作用

C57BL/6マウスよりCD44陰性CD4陽性ナイーブT細胞を分離し、Th1誘導環境下においてEP1アゴニスト(白カラム)、EP2アゴニスト(灰色カラム)、EP4アゴニスト(縦縞カラム)を加えた際のIFN- γ 陽性細胞をフローサイトメーターで解析した(左)。EP1アゴニストの選択性を検証するために、EP1欠損マウス由来の細胞にもEP1アゴニストを加えた(黒色カラム、左)。同様に、Th2環境下において、EP1アゴニストを野生型マウス(白カラム)、EP1欠損マウス(黒カラム)に添加した(右)。EP1アゴニストはIFN- γ 陽性細胞を増加させ、IL-4産生細胞を減弱させた。Data are representative of three independent experiments. Data are presented as the mean \pm the SEM. * $P < 0.05$

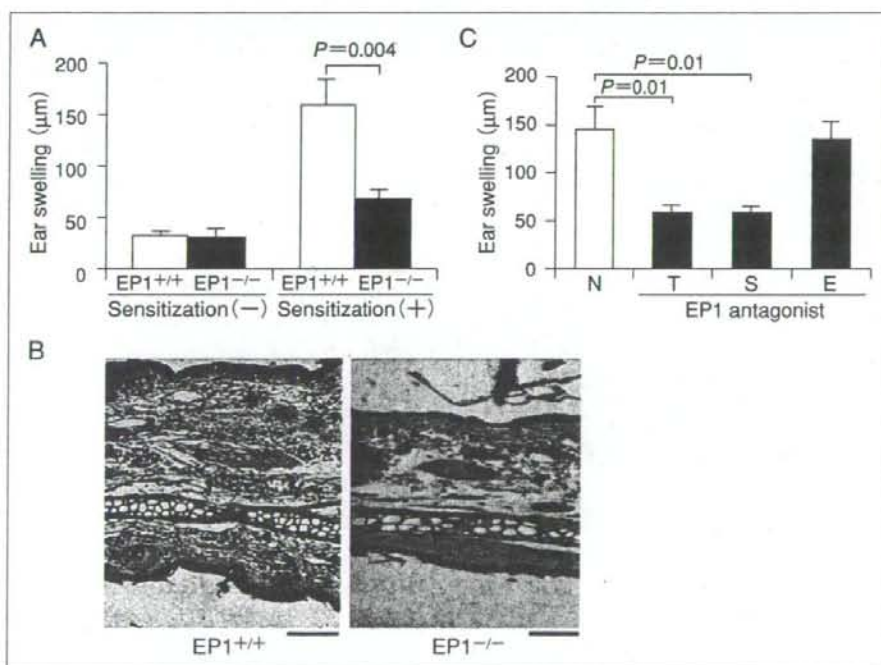


図4 接触過敏モデルにおけるEP1欠損マウスの表現型

- A: DNFBで腹部に感作し、5日後に耳介に惹起し、24時間後の耳介腫脹の変化を検証した。野生型マウス(白カラム, $n=5$)に比べ、EP1欠損マウス(黒カラム, $n=5$)では耳介腫脹反応が有意に減弱していた。
- B: 惹起24時間後の耳介をHE染色すると、EP1欠損マウスでは表皮肥厚、真皮へのリンパ球浸潤、真皮浮腫がともに減弱していた。Bar: 100 μ m。
- C: EP1アンタゴニストであるONO-8713を感作相のみ(S)、惹起相のみ(E)、感作相と惹起相(T)あるいはsham処理(N)すると、感作相にEP1アンタゴニストを投与することにより耳介腫脹反応が減弱することが明らかにされた($n=5$, each)。Data are representative of three independent experiments. Data are presented as the mean \pm the SEM。

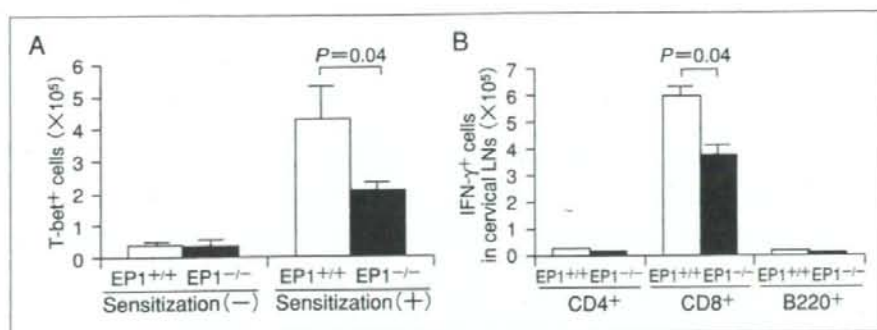


図5 感作後のT-bet, IFN- γ 陽性細胞数

- A: DNFBによるマウス腹部への感作5日後に、所属リンパ節である鼠径と腋窩リンパ節を採取し、T-bet陽性細胞数をフローサイトメーターで解析した。感作によりT-bet陽性細胞数は野生型、EP1欠損マウスともに増加したが、感作に伴うT-bet陽性細胞数の増加は、EP1欠損マウスにおいて、野生型マウスに比べて有意に低かった。
- B: 耳介惹起後の所属リンパ節である頸部リンパ節におけるIFN- γ 陽性細胞数をフローサイトメーターにより解析した。IFN- γ は主にCD8陽性T細胞により産生されており、この陽性細胞数は、EP1欠損マウスにおいて野生型マウスに比べて有意に低かった(n=5, each)。Data are representative of three independent experiments. Data are presented as the mean \pm the SEM.

間を要する。次に惹起相では、同一の抗原が皮膚に曝露されると、表皮細胞などが産生するpro-inflammatoryサイトカインやケモカインによりメモリーT細胞が局所に集まり、抗原提示細胞に抗原を提示され、炎症性のサイトカインなどを放出し、炎症が惹起される。この惹起相には24~48時間を要する。

マウス接触過敏反応モデルでは、ハプテンであるdinitrofluorobenzene (DNFB)を腹部に塗布し、5日後に同一ハプテンを耳介に塗布して炎症を惹起する。遅延型過敏反応の程度は24時間後の耳介の厚さの変化を測定して評価する。この接触過敏反応がEP1欠損マウスでは減弱し(図4A, B), しかも野生型マウスにEP1アンタゴニストであるONO-8713を投与しても同様に炎症の減弱が認められた(図4C)。このEP1アンタゴニストは、惹起相ではなく、感作相で投与した場合のみ耳介の腫脹の減弱が認められた(図4C)。また、感作5日後の所属リンパ節におけるリンパ球では、Th1誘導に重要な転写因子であるT-bet陽性細胞が、野生型マウスに比べ有意に低下していることがフローサイトメーター解析により明らかとなった(図5A)。また、耳介への炎症惹起後の所属リンパ節である頸部リンパ節細胞における細胞内サイトカイン染色により、CD8陽性細胞におけるIFN- γ 陽性細胞数が、野生型マウスに比べてEP1欠損マ

ウスでは低下していた(図5B)。

おわりに

以上の結果は、接触過敏反応の感作相においてリンパ節へ遊走してきた皮膚樹状細胞よりプロスタグランジン(PG) E_2 が産生され、T細胞上のEP1に作用することにより、免疫反応をTh1分化へ促進していることを示唆しており、従来のPGE $_2$ の作用がEP2/EP4受容体を介してTh1反応を抑制するという報告とは逆の作用を呈示している。

このように、遺伝子改変マウスや受容体選択的薬物などの作製に伴い各プロスタノイドの役割が受容体レベルで明らかにされてきており¹⁵⁾、同じPGE $_2$ でありながら作用する受容体により相異なる作用を発揮するという本結果は、すべてのプロスタノイドの産生を阻害する非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)が有効でない疾患ではプロスタノイドの役割はないものと軽視されてきたことに対して警鐘をならす一例となろう。今後は、どのステップでいかなる脂質メディエーターが産生され、どの受容体を介したシグナル経路が優位に作用しているかを網羅的に検証するシステムバイオロジーの導入が重要となると思われる。また、本稿ではすでに概念の確立されたTh1とTh2分化における役割を中心に述べた

が、近年明らかにされたTh17やTregの分化誘導におけるPGE₂の役割も興味深いテーマであり、今後の研究成果が待たれるところである。

また、PGE₂のヒトにおける役割の解明も急務である。これまでのヒト疾患を対象にした研究は症例数の少ない報告が中心であり、反応にも個人差が多く認められ、一定の見解を得るにはまだ不十分である。今後、大規模かつ長期間における臨床研究や、罹患率や薬剤反応性に関する遺伝子多型などに関する研究が待たれる。PGE₂をはじめとする脂質メディエーターは局所で作用するオータコイドの一種であるため、受容体レベルでの作用の制御は副作用の少ない薬剤となりうる可能性が高い。今後、特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いた新たな抗アレルギー・免疫疾患薬の開発が進むことが期待される。

謝辞：筆者は当該領域において、長年にわたり、京都大学大学院医学研究科神経・細胞薬理学教室・成宮周教授に多大なるご指導を受けてきた。ここに深甚の感謝の意を表したい。

文 献

- 1) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors : structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999 ; 79 : 1193.
- 2) Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 1983 ; 3 : 295.
- 3) Betz M, Fox BS. Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991 ; 146 : 108.
- 4) Nataraj C, Thomas DW, Tiley SL, et al. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 1229.
- 5) Kabashima K, Saji T, Murata T, et al. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 883.
- 6) Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, et al. Prostaglandin E₂-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 2003 ; 9 : 744.
- 7) Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, et al. Prostaglandin E₂ is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest* 2007 ; 87 : 49.
- 8) Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989 ; 7 : 145.
- 9) Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008 ; 28 : 454.
- 10) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007 ; 25 : 821.
- 11) Reiner SL. Development in motion : helper T cells at work. *Cell* 2007 ; 129 : 33.
- 12) Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, et al. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 2865.
- 13) Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 1998 ; 19 : 37.
- 14) Kabashima K, Miyachi Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. *J Dermatol Sci* 2004 ; 34 : 177.
- 15) Matsuoka T, Narumiya S. Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* 2007 ; 7 : 1329.

* * *

2 皮膚免疫と脂質 メディエーター

かばしま けんじ
梶島 健治
産業医科大学 皮膚科学



梶島 健治
1996年京都大学医学部卒業。同年横須賀米海軍病院インターン、97年米国ワシントン大学内科・皮膚科レジデント、2003年京都大学皮膚科助手、05年産業医科大学皮膚科助教授。
研究テーマは皮膚科免疫学アレルギーの機序解明と臨床応用。
趣味はゴルフ、海外放浪。

Key words : skin, prostaglandin, lenicotriene, immunology, allergy

Abstract

生体が刺激にさらされると脂質メディエーターは細胞膜より放出され、ホメオスタシスの維持や病態形成に重要な役割を果たしていると考えられてきたがその詳細は長年不明であった。近年これらの合成酵素、受容体の遺伝子改変マウスや選択的アゴニスト、アンタゴニストの開発により、脂質メディエーターの皮膚免疫・アレルギー疾患における生理的・病態的役割の解明とその臨床応用が目覚しく進んでいる。本稿では最新の知見を交えて主要な皮膚免疫・アレルギー疾患における脂質メディエーターの役割を解説する。

はじめに

生体が刺激を受けると、細胞膜リン脂質よりアラキドン酸が放出され、シクロオキシゲナーゼ(COX)と各合成酵素によりプロスタノイドと呼ばれるプロスタグランジン(PG)D₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂やトロンボキサン(TX)A₂に変換されたり、5-リポキシゲナーゼ(5-LO), ロイコトリエン(LT)A₄ hydrolase, LTC₄ synthaseなどによりLTB₄やシステニル(cys)LT(LTC₄, LTD₄, LTE₄)に変換されたりする。また、スフィンゴシン1リン酸(SIP)やリポキ

シン、血小板活性化因子(PAF)なども脂質メディエーターの一つである。これらは一般に、近傍に存在する標的細胞上のG蛋白結合型受容体を介して生理的役割を發揮する(表1)。脂質メディエーターの受容体は様々な皮膚免疫担当細胞に発現しており、近年これらの合成酵素や受容体の遺伝子改変マウスや選択的アゴニスト、アンタゴニストの開発により、免疫・アレルギーにおける生理的・病態的役割の解明とその臨床応用が目覚しく進んでいる(表1, 2)。本稿では皮膚免疫における各脂質メディエーターの役割について概説してみたい。

1. 接触皮膚炎と脂質メディエーター

接触皮膚炎とは、金属アレルギーなどのいわゆる‘かぶれ’のことであり、T細胞を介する遅延型過敏反応(delayed type hypersensitivity reactions; DTH)の典型で、感作相と惹起相という2相からなる。感作相においては、皮膚がハプテンなどの外来抗原に暴露されると表皮細胞がTNF-αやIL-1βなどの前炎症性メディエーターを産生し、皮膚樹状細胞(dendritic

表1 免疫関連細胞における脂質メディエーターとその受容体の発現

脂質メディエーター その受容体	PGD2		PGE2				PGF2a	PGI2	TXA2	cysLT		LTB4	
	DP	CRTH2	EP1	EP2	EP3	EP4	FP	IP	TP	cys LT1	cys LT2	BLT1	BLT2
表皮角化細胞													m,h
ランゲルハンス細胞	m, h		m	m	m	m							m, h
樹状細胞				m, h		m, h							
T cell		m(Th2)	m	m	m	m, h		m	m	h		m (Effector T)	
B cell			m, h	m, h	m, h	m, h						m, h	
マクロファージ		m	m	m	m	m, h				h	h	m, h	
好酸球		m		h		h			h	m, h	h	m	
マスト細胞・好塩基球	m	m	m	m	m	m				h	h	m	
好中球	h			m, h		m				h		m, h	
Blood vessels			m, h	m, h	m, h	m, h		m, h	m, h				

各合成酵素	PGDS	PGES	PGFS	PGIS	TXS	LTA4 hydrolase	LTG4S
表皮角化細胞	m	m, h				m, h	m, h
ランゲルハンス細胞	h	m, h			m		
樹状細胞	h	m, h			m, h		
T cell							
B cell							
マクロファージ	h	m, h		m	m, h		m, h
好酸球	h	h	h		h		m, h
マスト細胞・好塩基球	m, h				h		m, h
好中球		h			h	h, m	
Blood vessels							

m, mouse; h, human, ここに記した以外にも多くの受容体が各細胞で発現されることが報告されている

表2 脂質メディエーター受容体の免疫・アレルギーにおける役割のまとめ

脂質メディエーター	その受容体	これまで報告された生理的作用
PGD2	DP	卵白アルブミン誘発アレルギー喘息反応の亢進 (マウス)
	CRTH2	TH2細胞や好酸球の化学遊走能の促進
PGE2	EP1	(-)
	EP2	リンパ球混合試験反応におけるT細胞反応の抑制 (マウス、ヒト)
	EP3	発熱物質に対する発熱反応形成 (マウス)
	EP4	マウスデキストラン硫酸ナトリウム誘導性炎症性腸疾患の抑制、樹状細胞機能の亢進による接触過敏反応形成 (マウス)
PGF2a	FP	(-)
PGI2	IP	マウス炎症性腫脹、酢酸ライジング反応、卵白アルブミン誘発アレルギー喘息反応の抑制 (マウス)
TXA2	TP	T細胞と樹状細胞の免疫シナプスの阻害、アトピー性皮膚炎の抑制、そう痒の誘発 (マウス)
LTB4	BLT1	メモリーCD4、エフェクターメモリーCD8陽性T細胞の遊走 (マウス)
	BLT2	表皮角化細胞の遊走
	責任受容体不明	好中球の遊走や活性化→尋常性乾癬・尋常性ざ瘡に関与？ 膨疹と紅斑反応の誘発 (ヒト)
cys LT (LTB4, D4, E4)	cys LT1	好酸球の遊走・炎症局所への浸潤 (ヒト)→遅発型反応 (late phase reaction) の形成?、血管拡張・透過性の亢進、マクロファージ・好酸球・肥満細胞の活性化、受身皮膚アナフィラキシー反応 (マウス)
	cys LT2	IL-8の産生を介した好中球の浸潤、血管内皮細胞の活性化
	責任受容体不明	ランゲルハンス細胞の所属リンパ節への遊走 (マウス)
PAF	PAFR	卵白アルブミン誘発アレルギー喘息反応誘発 (マウス)
S1P	S1P1	胸腺やリンパ節からのリンパ球の遊出 (マウス、ヒト)

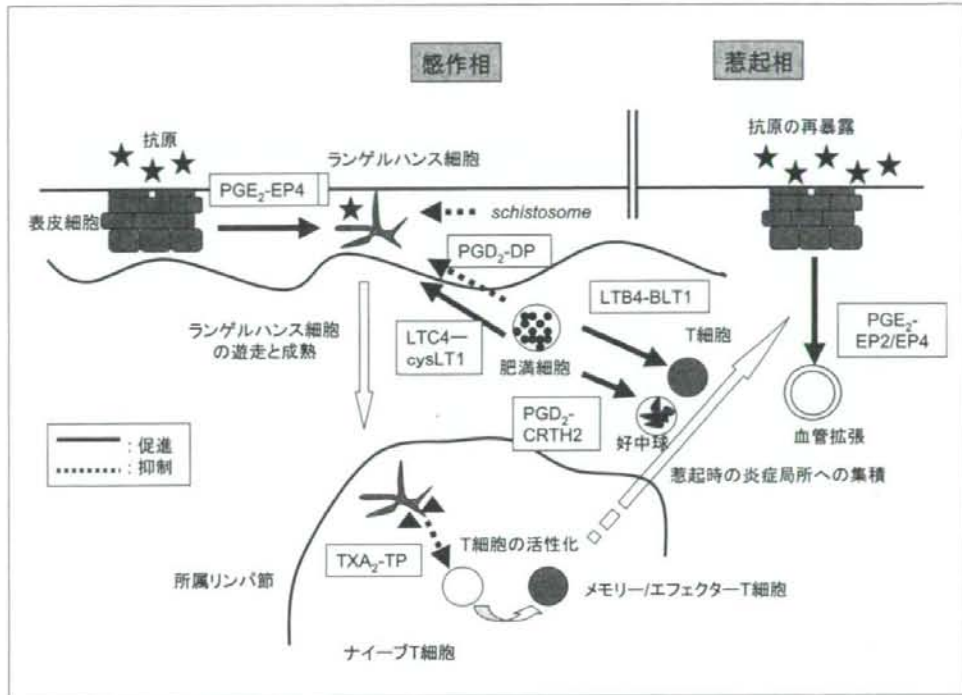


図1 接触過敏反応における脂質メディエーターの役割

抗原の皮膚への暴露に伴い、炎症性のメディエーターが表皮細胞から放出され、ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞などの皮膚樹状細胞は活性化し抗原を取り込み成熟しながら所属リンパ節へ遊走する。この際表皮細胞からPGE₂が、また、肥満細胞よりLTC₄やPGD₂が、さらに寄生虫感染時には寄生虫からPGD₂が産生され、皮膚樹状細胞に対し図に示すようなさまざまな働きを行う。また、所属リンパ節において皮膚樹状細胞はナイーブT細胞を活性化させメモリー/エフェクターT細胞へと分化・成熟させる。このときに皮膚樹状細胞より産生されるトロンボキサンはT細胞と皮膚樹状細胞の相互作用を阻害し、免疫応答を負に制御する。

再度同一抗原に皮膚が暴露されると表皮細胞は炎症性のメディエーターやケモカインを産生する。炎症性のメディエーターは血管に作用し血管拡張や血管における接着因子の誘導などを行いリンパ球の皮膚への集積を促す。ここでメモリー/エフェクターT細胞は抗原提示細胞に抗原を提示され、Th1サイトカインなどを産生し、遅延型過敏反応が引き起こされる。LTB₄はおそらく肥満細胞より産生され、メモリー/エフェクターCD8陽性T細胞をBLT1により血管から皮膚へホーミングさせる。

cell; DC)である表皮ランゲルハンス細胞や真皮DCは活性化、抗原取り込み、プロセッシングを行いながら所属リンパ節へと遊走する。リンパ節で皮膚DCは、ナイーブT細胞を、メモリーT細胞へと分化・成熟を誘導させ、リンパ節から血液中に遊出し、抗原特異的な免疫反応を引き起こす準備を整える。以上の感作相成立にはおよそ3-5日間要する。惹起相では、同一抗原暴露に対し、表皮細胞

は各種メディエーターを産出し局所の血管の接着因子の活性化や、表皮細胞によるCCL27などのケモカインを産生し、メモリーT細胞を皮膚の局所へ引き寄せ、IFN-γなどのTh1サイトカインなどを産生し炎症を引き起こす(図1)。

この接触皮膚炎における脂質メディエーターの役割がマウスを中心とした小動物実験より明らかになりつつある。例えば、抗原暴露

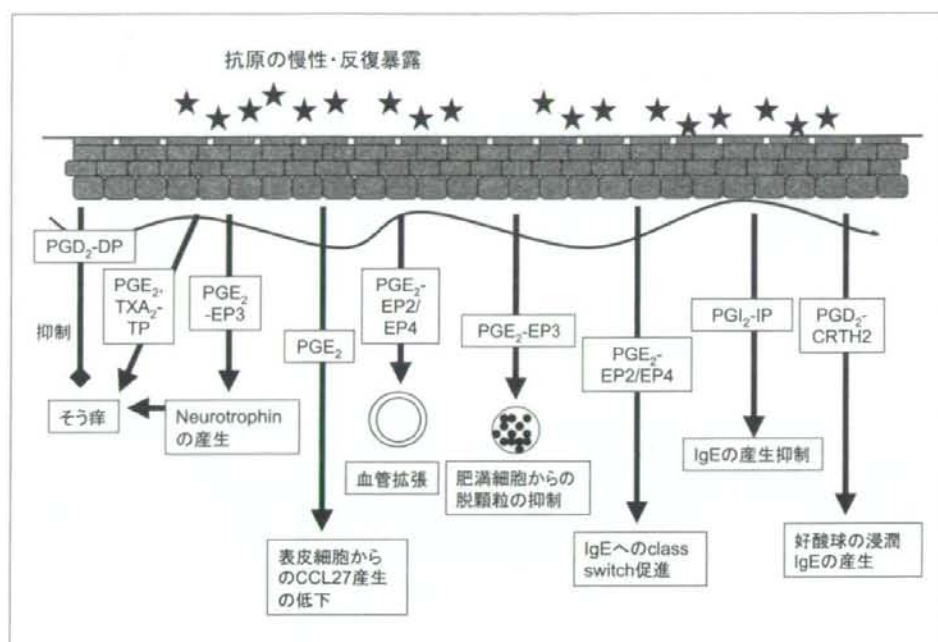


図2 アトピー性皮膚炎における脂質メディエーターの役割

アトピー性皮膚炎の原因の一つとして慢性抗原暴露が挙げられ、動物実験モデルを用いてその病態の発症機序の解明が進みつつある。アトピー性皮膚炎の病態形成には肥満細胞からの脱顆粒に起因する反応、T細胞、好酸球の浸潤、そう痒などが複雑に関与しているが、これらにおいて、脂質メディエーターの関与が図に示すように次々と報告されている。

により表皮角化細胞から大量に産生されるPGE₂は、EP₄受容体を介してマウス皮膚DCの所属リンパ節への遊走や抗原提示能を亢進させる。一方、経皮感染した*Schistosoma mansoni*は自らPGD₂を産生し、DC上のDPに作用して、遊走能を阻害するというPGE₂と逆の作用を有する。一方、活性化した皮膚DCはTXA₂を産生するが、TXA₂はナイーブT細胞上のTP受容体に作用してDCとT細胞の相互作用を阻害し、免疫反応を抑制に導く。一方、LTC₄を細胞外に放出するMRP1遺伝子を欠失したマウスでは皮膚DCの遊走が減弱するが、このマウスにLTC₄あるいはLTD₄を投与するとその作用が回復する。さらに、マウス骨髄細胞由来DCにcys LT1受容体や5-LO,

LTC₄が存在し、cys LT1受容体アンタゴニストによりDCからのIL-10の産生が抑制され、Th1型反応を誘導するIL-12の産生が亢進する。従って、DC自身あるいは肥満細胞が産生するcys LTが、DCの所属リンパ節への遊走やTh2型反応への誘導を促進していることが示唆される。これに関連して、抗ロイコトリエン薬は抗原特異的マウスTh1型T細胞による炎症は抑制しないが、Th2型T細胞による炎症反応を抑制するという報告もある。一方、惹起相において活性化肥満細胞あるいは表皮角化細胞の産生するLTB₄が血管拡張を引き起こし、メモリーT細胞上のBLT1に作用して血管内皮細胞へtransmigrateさせ、炎症局所への集積を亢進させることがしられ

る。さらに、マウス好中球の皮膚への局所浸潤にCRTH2が関与していることも示された。以上の結果は脂質メディエーターが獲得免疫反応の感作相と惹起相において多彩な役割を果たしていることを意味している(図1)。

2. アトピー性皮膚炎と脂質メディエーター

アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis; AD)は痒みを伴う慢性湿疹であり、皮膚のバリア機能異常やIgEを介したTh2型アレルギー反応が関与する。以前よりAD病変部や患者血清中のPGE2やTXA2, LTB4, cys LTなどの脂質メディエーターが上昇していること、末梢血中の好塩基球数が高く、好塩基球や好酸球からLTC4が産生されやすいこと、アレルゲンチャレンジ後の皮膚において5-LOやcys LTが亢進していること、AD患者の尿中のLTE4値が血清中IgE量と正相関を示すことなどが報告されている。

ADと一部共通のメカニズムを有するマウスアレルギー喘息モデルにおいて、EP3欠損マウスにおける肥満細胞の機能亢進に伴う症状の増悪、IP欠損マウスにおけるIgEの亢進、DP欠損マウスにおける症状の軽減が認められた。また、CRTH2に好酸球や好塩基球の遊走や脱顆粒誘発作用があり、CRTH2遺伝子欠損マウスでは、ADモデルにおける炎症細胞の浸潤、好酸球の遊走因子であるRANTES、血清IgE値の減弱が認められた。またAD患者においてCRTH2陽性T細胞数の増加が認められていることも興味深い。さらにTP欠損マウスは、ハプテン反復塗布誘発ADモデルにおける皮膚局所IgEと即時型反応の亢進が誘発される。一方、PGE2がT細胞を皮膚局所へ遊走させるCCL27の産生を阻害することが*in*

*vitro*で示された。この結果は炎症反応の終結にPGE2が関与することを示唆する。また、LTB4やLTC4は好酸球の化学遊走作用を有しており、ADの遅発相の形成に重要な役割を果たすことが示唆され、抗LT薬が好酸球顆粒タンパクであるECP値を減少させることも報告された。以上よりアレルギー炎症において、EP3やIP, TPが抑制性、DP, CRTH2, cys LT, LTB4が亢進性のメディエーターや受容体として作用することが推測される。

強いそう痒を呈するAD患者では、痒みを知覚する神経終末が表皮と真皮の境界まで発達している。PGE2にはEP3受容体を介して表皮角化細胞からの神経の分化や生存を促すneurotrophin-4の産生を促進することが知られ、PGE2の痒み過敏への関与も示唆されている。さらに、自然発症型ADモデルであるNC/Ngaマウスにおける痒みの発症をCOX-1由来のPGD2がDP受容体を介して抑制し、一方、サブスタンスPによる痒みの誘発にLTB4が関与しているというマウスでの実験報告もある。ところが、ヒトにおいては5-LO阻害薬であるzileutonはADの痒みに対し、またpranlukastは成人ADに対し無効であったため、現在ヒトの痒みにおけるLTの役割は明らかにされていない。

以上のようにこの数年で小動物を用いたADにおける脂質メディエーターの役割に関する報告が相次いだ(図2)。これまでのところ脂質メディエーター関連の薬物がADにおいて有効とする確実な報告はないが、今後、ADの病態形成における脂質メディエーターの役割の更なる解明と、DP, CRTH2, cys LT1, cys LT2やBLTのアンタゴニストやEP3, IP, TPのアゴニストなどの臨床応用への可能性に期待したい。

3. 蕁麻疹と脂質メディエーター

蕁麻疹は喘息と同じく肥満細胞を中心とするI型のアレルギー機序によるところが大きく、これまでは肥満細胞が産生するヒスタミンを阻害する抗ヒスタミン薬が治療の中心を占めてきた。一方で、活性化肥満細胞が産生するcys LTを局注すると、持続性の紅斑・血管拡張が誘発され、この作用は抗ロイコトリエン薬で阻害できる。また、cys LTはcys LT1受容体を介して、好酸球からのIL-4産生や肥満細胞からのIL-5、TNF- α 、MIP-1 β 産生を促し、さらに肥満細胞のcys LT2受容体を介してIL-8産生を行う。またLTC4合成酵素あるいはcys LT1受容体欠損マウスにおいて受身皮膚アナフィラキシー反応が約5%0抑制されることより、LTC4—cys LT1シグナルの関与が推測される。実際、慢性蕁麻疹にLO阻害薬やロイコトリエン拮抗剤が有効であったという報告や抗ヒスタミン剤に抗LT剤を追加することで有効性が向上したという報告が散見されるが、反応性に個人差が認められるようである。

4. その他の皮膚疾患と脂質メディエーター

元来循環系において研究が進められてきたSIPが、近年免疫において重要な役割を果たしていることが明らかになった。SIP受容体の一つであるSIP1をリンパ球で欠損させたマウスではT細胞が胸腺や二次リンパ組織からリンパ管や末梢血中に戻れない。実はSIPにはリンパ球に対する化学誘引作用があり、リンパ球は二次リンパ組織からSIPが高濃度で存在している血中やリンパ管に誘引されるこ

とにより末梢に戻るができるのである。新たな免疫抑制剤として注目されているFTY720は、血中でリン酸化されSIPと類似した構造になり、リンパ球上のSIP1に作用して受容体の発現レベルを低下させ、lymphopeniaを引き起こしその作用を発揮する。FTY720には植皮の生着の延長効果が報告されている。炎症細胞のlocalization機序は従来ケモカインを中心に進められてきたが、脂質メディエーターにも同様の生理的役割があることは興味深い。

一方、12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)をマウス耳介に塗布すると急性炎症により耳介腫脹を誘発する。その際初期(塗布後約3時間)には浮腫が、また後期(6-24時間後)には細胞浸潤が認められるが、初期相ではTNF- α が、後期相ではプロスタノイドが関与しているとされる。紫外線照射もTPAと同様の皮膚腫脹を誘発するが、紫外線照射により表皮角化細胞より産生されたPGE2がEP2とEP4受容体を介して血管拡張と細胞浸潤を誘発し、炎症を惹起することが近年報告された。以上より、外的刺激に伴う表皮角化細胞由来のPGE2が、EP2、EP4受容体を介して血管拡張あるいは細胞浸潤を誘発し、急性炎症反応の形成に関与することが示唆される。

その他の皮膚疾患として、尋常性乾癬では以前、好中球の皮膚への浸潤にLTB4が重要であるとされたが、現在のところ抗LT薬の有効性は明らかにされていない。また、近年、国内未承認ではあるが、5-LO阻害薬(zileuton)が皮脂の分泌を抑え、尋常性ざ瘡の患者に有効であったという報告がある。このように脂質メディエーターはさまざまな皮膚免疫・アレルギー疾患で役割を果たしていることが推測される。

おわりに

脂質メディエーターの皮膚免疫における新たな役割を述べてきたが、ここで一つ注目していただきたいのは、脂質メディエーターが context-dependent に様々な、そして時には全く異なる役割を果たすことである (図1)。このため全プロスタノイド産生を阻害する NSAID の効果のみからは捕らえることのできなかった新たな脂質メディエーターの生理的役割を今後明らかにしていくことが重要であると考えられる。さらには、小動物実験にとどまらずヒトでの機能解析や、各種生体刺激後の各脂質メディエーターの産生とその受容体発現変化を網羅的に解析していくことも求められるであろう。脂質メディエーターは局所で

作用するオータコイドの一種であるため、受容体レベルでのその作用の制御は副作用の少ない薬剤となりうる可能性が高い。今後、特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いて抗アレルギー・免疫疾患薬の開発が進むことが期待される。

文献

- 1) 横溝岳彦著 脂質メディエーターと免疫・アレルギー 脂質生物学がわかる (清水孝夫編) p90-97, 2004 羊土社
- 2) 梶島健治 皮膚疾患とロイコトリエン アレルギー・免疫 p76-82 vol.11 No11.2004 医薬ジャーナル
- 3) 梶島健治・成宮周 プロスタノイドと免疫 プロスタグランジン研究の新展開 (室田誠逸, 山本尚三編) 現代医学 増刊 38 p53-56, 2001 東京化学同人
- 4) 梶島健治 脂質メディエーターと免疫, アレルギー疾患 ダイナミックに新展開する脂質研究 (清水孝夫, 新井洋由編) 実験医学増刊 vol 23 No6 p211-217, 2005 羊土社

<BIO Information>

第42回日本成人病(生活習慣病)学会

日本成人病(生活習慣病)学会は下記日程で学術総会を開催します。

会 期：2008年1月12日(土)～13日(日)

会 場：東京・日本都市センター会館(都市センターホテル)

会 長：熊谷 一秀 (昭和大学附属豊洲病院 外科)

特別講演：「萎縮性胃炎と胃癌」 上西 紀夫(東京大学消化管外科学教授)

会長講演：「胃切除後の病態を求めて」 熊谷 一秀(昭和大学附属豊洲病院外科)

教育講演：1. 「小児肥満とメタボリックシンドローム」 大関 武彦 (浜松医科大学)

2. 「脂肪肝から肝臓へ・・・NASHの病態を考える」 渡辺 純夫 (順天堂大学)

3. 「病理からみた生活習慣病」 諸星 利男 (昭和大学)

プレナリーレクチャー：「EDと生活習慣病」 佐々木春明 (昭和大学藤が丘病院)

「生活習慣病と睡眠時無呼吸症候群」 美濃口健治 (昭和大学) 他 講演多数

連絡先：昭和大学附属豊洲病院外科：TEL (03) 3534-1151 / FAX (03) 3534-1545

※ バックナンバーを会場で販売予定です。お立ち寄り下さい。

Short Communication

Functional Role of Na⁺/H⁺ Exchanger in Ca²⁺ Influx Mediated via Human Endothelin Type A Receptor Stably Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells

Takahiro Horinouchi¹, Yumie Miyake¹, Tadashi Nishiya¹, Arata Nishimoto¹, Shigeru Morishima², Ikunobu Muramatsu², and Soichi Miwa^{1,*}

¹Department of Cellular Pharmacology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

²Division of Pharmacology, Department of Biochemistry and Bioinformative Sciences, School of Medicine, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan

Received May 27, 2008; Accepted June 18, 2008

Abstract. This study examines the functional role of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) in Ca²⁺ influx mediated by human endothelin type A receptor (ET_AR) expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Endothelin-1 (ET-1) increased extracellular acidification rate (ECAR), which was abolished by 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA), an NHE inhibitor. EIPA and KB-R7943, a Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) inhibitor, inhibited ET-1-induced sustained increases in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i), and EIPA had no effect on [Ca²⁺]_i after KB-R7943 treatment. ET-1-elicited sustained [Ca²⁺]_i increase was suppressed by reducing extracellular Na⁺ concentration. These results suggest that possible coupling of NHE with NCX via Na⁺ transport is involved in ET_AR-mediated sustained [Ca²⁺]_i increase.

Keywords: endothelin type A receptor, Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular free Ca²⁺ concentration

The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) family consists of nine isoforms (NHE1–NHE9) that function in an electroneutral countertransport of extracellular Na⁺ for intracellular H⁺ in 1:1 stoichiometry (1). Unlike other members, NHE1 is ubiquitously expressed in the plasma membrane of mammalian cells where it regulates intracellular pH and cell volume (2). In cardiac cells, activation of NHE1 causes physiological or pathological events including intracellular alkalinization, sensitization of contractile proteins to Ca²⁺, and an increase in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) through reversal of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) driven by an increase in intracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_i) (3). Recent findings have also shown that NHE1 is activated by diverse classes of cell-surface receptors, including G protein-coupled receptors (GPCRs) in most cell types (2). There is accumulating evidence suggesting that stimulation of GPCRs such as G_q protein-coupled α₁-adrenoceptors (4) and G_i protein-coupled β₃-adrenoceptors (5) expressed

in Chinese hamster ovary (CHO) cells activates NHE, which is sensitive to the selective NHE1 inhibitor 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) (2).

Endothelin type A receptor (ET_AR) is a member of the seven membrane spanning receptors that couple to G proteins, G_s, G_α, and G₁₂ (6, 7). In cardiac myocytes abundantly expressing ET_AR, stimulation with endothelin-1 (ET-1) elicits various responses such as Ca²⁺ entry via Ca²⁺ channels and NCX and Na⁺ influx via NHE (8). Recently, it has been proposed that Na⁺ entry through NHE contributes to the ET-1-induced increase in [Ca²⁺]_i via reversal of Na⁺/Ca²⁺ exchange (9). However, there is little evidence for the functional role of NHE in Ca²⁺ influx triggered by stimulation of ET_AR with ET-1.

The present study, therefore, examined the involvement of NHE in the ET-1-induced Ca²⁺ influx by measuring [Ca²⁺]_i in CHO cells stably expressing ET_AR where functional NCXs are present (10, 11). Furthermore, the NHE activity was evaluated by continuous monitoring of extracellular acidification rate (ECAR) with the Cytosensor™ microphysiometer (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA), which allows the analysis of signaling molecules regulating NHE activity

*Corresponding author. smiwa@med.hokudai.ac.jp
Published online in J-STAGE on August 2, 2008 (in advance)
doi: 10.1254/jphs.081355C

in living cells (12).

For the analyses of ECAR and [Ca²⁺]_i, the Cytosoft™ (Molecular Devices Corp.) and a MacLab/8s with Chart (v. 3.5) software (ADInstruments Japan, Tokyo) were used, respectively. Results of Cytosensor™ microphysiometer studies are expressed as a % of the basal ECAR prior to exposure to vehicle [0.2% dimethylsulfoxide (DMSO)] or EIPA. All data are presented as means ± S.E.M. where n refers to the number of experiments. The significance of the difference between mean values was evaluated with GraphPad PRISM™ (version 3.00; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) by Student's paired or unpaired *t*-test. A *P* value less than 0.05 was considered to indicate significant differences.

To clarify activation of NHE upon stimulation with ET-1, the change in ECAR was measured by the eight-channel Cytosensor™ microphysiometer according to the method of Hutchinson et al. (5) with some modifications. In CHO cells stably expressing human ET_AR, 0.3 nM ET-1 induced an increase in ECAR (Fig. 1). The ECAR response to ET-1 was inhibited by 10 μM EIPA, a selective NHE1 inhibitor (2). Thus the increase in ECAR induced by stimulation of ET_AR with ET-1 was solely mediated by NHE1, since EIPA shows higher selectivity for NHE1 rather than other members of NHE (2).

In general, stimulation of G_q protein-coupled ET_AR is well-known to evoke an increase in [Ca²⁺]_i consisting of

two phases: an initial transient increase and a subsequent sustained increase (6, 7). It is believed that the initial transient increase is due to inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release from the intracellular Ca²⁺ store, whereas the sustained increase is due to Ca²⁺ influx through several types of voltage-independent (non-voltage-gated) Ca²⁺-permeable channels such as store-operated channels (SOCs) and receptor-operated channels (ROCs) (13). On the other hand, it is speculated that increased NHE1 activity results in an increase in [Na⁺]_i by extruding H⁺ in exchange for Na⁺ influx, leading to an increase in [Ca²⁺]_i via NCX (14). The plasma membrane NCX that transports Na⁺ in exchange for Ca²⁺ with a stoichiometry of 3:1 is the key signaling element, which serves as a link between Na⁺ entry and Ca²⁺ signaling. Therefore, we focused on the possible coupling of Na⁺ influx via NHE with Ca²⁺ influx via the reverse mode of NCX.

In CHO cells stably expressing ET_AR, stimulation of ET_AR with 0.3 nM ET-1 evoked a biphasic increase in [Ca²⁺]_i consisting of an initial transient peak (259.7 ± 29.9 nM, n = 5) and a subsequent sustained increase (303.5 ± 15.3 nM, n = 5) (10). The transient response to ET-1 was unaffected by pretreatment with EIPA at concentrations up to 10 μM (data not shown). To determine whether NHE and NCX are responsible for the sustained [Ca²⁺]_i increase triggered by ET-1, EIPA and KB-R7943, a NCX inhibitor (11), were added during the sustained phase after stimulation of ET_AR

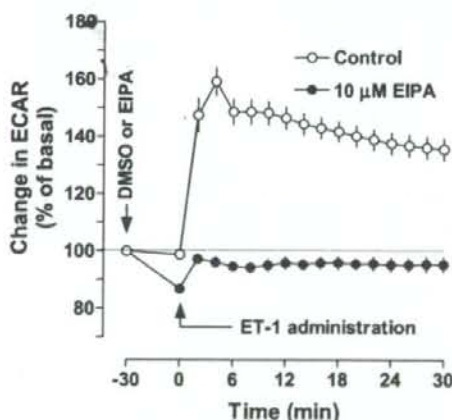


Fig. 1. Characterization of the ET-1-induced increase in ECAR in the CHO cells stably expressing human ET_AR. The change in ECAR was measured by the Cytosensor™ microphysiometer every 2 min. The cells were treated with either vehicle (0.2% DMSO) or 10 μM EIPA for 30 min before stimulation with ET-1 (ET-1 administration) for 30 min. Data are presented as means ± S.E.M. of the results obtained from 4 separate experiments.

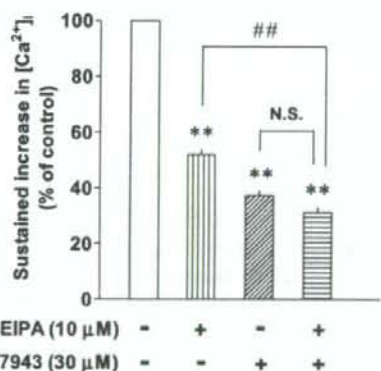


Fig. 2. Effects of EIPA, an inhibitor of NHE1, and KB-R7943, an inhibitor of NCX, on the sustained increases in [Ca²⁺]_i induced by 0.3 nM ET-1. These inhibitors were added during the sustained phase after stimulation with ET-1. The [Ca²⁺]_i level of the sustained phase generated by 0.3 nM ET-1 before administration of either inhibitor and the basal [Ca²⁺]_i level before administration of ET-1 were set at 100% and 0%, respectively. Data are presented as means ± S.E.M. of the results obtained from 4–8 separate experiments. ***P* < 0.01, vs its control (0.3 nM ET-1 alone, open column). ##*P* < 0.01, between both groups indicated. N.S., no statistically significant difference.