

論文内容の要旨

論文提出者氏名 中村 直美

論文題目

Toll-like Receptor 3 Increases Allergic and Irritant Contact Dermatitis

論文内容の要旨

自然免疫は病原体の初期認識に重要な役割を果たし、病原体固有に存在する構造 (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) を認識する。哺乳類では、Toll 様受容体 (Toll-like receptor :TLR) が PAMPs を認識する主な受容体であることが知られている。TLR はこれまでに少なくとも 11 種類同定されており、マクロファージや樹状細胞、顆粒球、NK 細胞、T 細胞、線維芽細胞、上皮細胞などに発現している。TLR3 は、ウイルスの 2 本鎖 RNA や Poly (I:C) を外因性リガンドとして認識し、1 型インターフェロン、炎症性サイトカインを産生し免疫反応を誘導する。近年 TLR3 はウイルス感染だけでなく、アレルギー炎症や創傷治癒への関与も報告されている。アレルギー性接触皮膚炎は、代表的なアレルギー性炎症性皮膚疾患であり、これまでに TLR2、TLR4 の関与は報告されているが、TLR3 の役割は未だ解明されていない。そこで著者は、初めにアレルギー性接触皮膚炎への TLR3 の関与を検討し、さらに非抗原特異的反応である刺激性接触皮膚炎における関与も調べ、炎症性皮膚疾患における TLR3 シグナルの果たす役割の解明を行うことを目的とした。

まず、アレルギー性接触皮膚炎に TLR3 が関与するかを調べるため、wild type、*Tlr3* Knockout (KO)、*TLR3* Transgenic (Tg) マウスを用い、アレルギー性接触皮膚炎のマウスモデルである接触過敏反応 (contact hypersensitivity: CHS) を誘導した。方法としてはマウスの腹部にハプテンである 2, 4, 6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) を 25 μ l 塗布し感作させ、7 日後に耳介前後に 20 μ l の 1% TNCB を塗布し、CHS を惹起した。誘導された炎症の評価として、24 時間後に耳介の厚さの変化を計測し、皮膚組織切片を作製して病理組織学的に検討を行い、浸潤した炎症細胞数をカウントした。その結果、wild type マウスに比べ、*Tlr3* KO マウスでは、有意に耳介の腫脹、炎症細胞の浸潤や浮腫が抑制されており、*TLR3* Tg マウスでは、それらの増強がみられ、TLR3 の CHS への関与が明らかとなった。

次に、アレルギー性接触皮膚炎は、感作相、惹起相から成り立つが、そのどちらの相に TLR3 が関与するのかを調べるため、TNCB にて感作した wild type マウス、*Tlr3* KO マウスから採取したリンパ球を、それぞれ、未感作の *Tlr3* KO マウス、wild type マウスに尾静注し、養子移入を行った。コントロールとして、感作した wild type マウスのリンパ球を、未感作 wild type マウスに養子移入した。その後直ちに、耳介前後に 20 μ l の 1% TNCB を塗布し、24 時間後に耳介の厚さの変化を計測、組織採取し、炎症反応を評価した。コントロール群と比較し、感作した *Tlr3* KO マウスから採取したリンパ球を、未感作の wild

type マウスに養子移入した群では、有意差が見られなかったが、感作した wild type マウスから採取したリンパ球を未感作の *Tlr3* KO マウスに養子移入した群では、有意に耳介の腫脹、炎症細胞の浸潤、浮腫が抑制されており、惹起相での TLR3 の関与が示唆された。

また、抗原非特異的な刺激性接触皮膚炎における TLR3 の役割を検討するため、wild type、*Tlr3* KO、*TLR3* Tg マウスに 2% クロトンオイルを 20 μ l 耳介前後に塗布し、6 時間後に耳介の厚さの変化を計測し、病理組織学的に検討を行ったところ、アレルギー性接触皮膚炎と同様に、wild type マウスに比べ、*Tlr3* KO マウスでは、有意に耳介の腫脹、炎症細胞の浸潤や浮腫が抑制されており、*TLR3* Tg マウスでは、それらの増強がみられ、抗原非特異的な炎症にも TLR3 が関与することが明らかとなった。

さらに、TLR3 がアレルギー性および刺激性接触皮膚炎を増強する機序を解明するため、各々の細胞における TLR3 の機能を検討した。まず、アレルギー性接触皮膚炎において主要な役割を担う抗原提示細胞である樹状細胞や、炎症を増強するリンパ球の機能を wild type、*Tlr3* KO マウスを用い調べた。樹状細胞の遊走能を調べるため、マウスの腹部に fluorescein isothiocyanate (FITC) を塗布し、これを食食し所属リンパ節へ遊走した樹状細胞を採取し、細胞数や割合をフローサイトメトリーにて解析した。wild type、*Tlr3* KO マウス間で、CD11c⁺、CD86⁺、MHC class II⁺ 樹状細胞数および割合はともに有意差を認めなかった。樹状細胞の抗原提示能は、wild type、*Tlr3* KO マウスの樹状細胞 (BALB/c 由来) を、CFSE で染色した allogeneic なリンパ球 (C57BL/6 マウス由来) と共に培養する mixed leukocyte reaction を行い、増殖したリンパ球をフローサイトメトリーにて解析した。wild type、*Tlr3* KO 間で、リンパ球の増殖に有意差を認めなかった。同様に、リンパ球の増殖能は、CFSE にて標識した Wild type、*Tlr3* KO マウスのリンパ球を allogeneic な樹状細胞で刺激し増殖させ解析したが、両者に有意差は見られなかった。以上より、TLR3 は樹状細胞、リンパ球の機能には関与しないことがわかった。

keratinocyte や fibroblast も TLR3 を発現し、種々のサイトカイン、ケモカインを産生することにより、炎症細胞を浸潤させ、炎症の増強に重要な役割を果たす。そこでサイトカイン、ケモカインの関与を解析するため、接触皮膚炎を起こしたマウス耳介組織や、poly (I:C) で刺激した keratinocyte、fibroblast の初代培養細胞より RNA を採取し、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎に重要とされる、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IP-10、RANTES、KC をリアルタイム定量 PCR にて測定した。その結果、IP-10 と RANTES が wild type マウスに比べ、*Tlr3* KO マウスでは産生が抑制されていた。

今回我々の研究では、TLR3 はアレルギー性および刺激性接触皮膚炎を増強することが明らかとなり、その分子学的機序の一因として、keratinocyte や fibroblast からの IP-10 や RANTES などのケモカイン産生亢進による可能性が示唆された。