慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ランゲルハンス細胞ニッシェの同定とアンカリングポイントの解析
Sub Title	Defining the Langerhans cell niche and the anchoring point
Author	永尾, 圭介(Nagao, Keisuke)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究課題では、表皮の樹状細胞であるランゲルハンス細胞(LC)の前駆細胞を同定し、毛嚢が物理的刺激に応答してケモカインを発現し、LC駆細胞を皮膚に動員する免疫機能を有することを明らかにした。この過程で無毛マウスであるTACE cKOマウスを解析し、独立した研究論文として発表した。本研究の流れで、LC機能を解析し、LCは表皮タイトジャンクションの間から樹状突起を伸ばして細菌抗原を獲得し、液性免疫を誘導することを証明した。この免疫応答は実験的ブドウ球菌性熱傷様皮膚剥脱症を予防した。
Notes	研究種目：若手研究(A) 研究期間：2009～2011 課題番号：21689032 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21689032seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2009～2011
課題番号：21689032
研究課題名（和文）
ランゲルハンス細胞ニッシェの同定とアンカリングポイントの解析
研究課題名（英文）
Defining the Langerhans cell niche and the anchoring point
研究代表者
永尾　圭介（NAGAO KEISUKE）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：40286521

研究成果の概要（和文）：　本研究課題では、表皮の樹状細胞であるランゲルハンス細胞（LC）の前駆細胞を同定し、毛嚢が物理的刺激に応答してケモカインを発現し、LC 前駆細胞を皮膚に動員する免疫機能を有することを明らかにした。この過程で無毛マウスである TACE cKO マウスを解析し、独立した研究論文として発表した。本研究の流れで、LC 機能を解析し、LC は表皮タイトジャンクションの間から樹状突起を伸ばして細菌抗原を獲得し、液性免疫を誘導することを証明した。この免疫応答は実験的ブドウ球菌性熱傷様皮膚剥脱症を予防した。

研究成果の概要（英文）：Langerhans cells (LC) are epidermal dendritic cells with incompletely understood origins that associate with hair follicles (HF) for unknown reasons. In this work, we showed that mouse HFs recruited Gr-1^{high} monocyte-derived LC precursors (pre-LCs), whose epidermal entry was CCR2/6 dependent, whereas CCR8 inhibited LC recruitment. Distinct HF regions differentially expressed CCR2/6 ligands. The isthmus expressed CCL2, the infundibulum expressed CCL20, and keratinocytes in the bulge produced the CCR8 ligand, CCL8. Thus, distinct HF keratinocyte subpopulations promote or inhibit LC repopulation via differential chemokine production, a feature also demonstrated in humans. LCs/Pre-LCs failed to enter hairless skin in both mice and humans, establishing HFs as LC portals, a new paradigm in leukocyte trafficking and regulation of skin inflammation (Nat Immunol, in press). To prove the above findings, we generated and characterized TACE/Sox9 mice, which develop progressive alopecia, and have reported mechanisms of hair loss as an independent manuscript (Stem Cells, in press). Furthermore, during this series of work, we functionally characterized LCs. We showed that LCs extend their dendrites through epidermal tight junctions to uptake skin surface bacteria-derived toxin to induce neutralizing antibodies that protected mice from experimental staphylococcal scalded skin syndrome (Ouchi et al. J Exp Med 2011).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
総　計	21,100,000	6,330,000	27,430,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学
キーワード：ランゲルハンス細胞、毛嚢、ケモカイン、タイトジャンクション

１．研究開始当初の背景

ランゲルハンス細胞(LC)は定常状態では皮膚局所で自己複製すると信じられているが、その niche は見つかっておらず、その存在は樹状細胞領域の最大の関心の一つであった。我々はこれまで langerin 陽性細胞を一過性に消去できる Langerin-DTR マウスを用い LC の復帰動態を詳細に解析してきた。また、Langerin-DTR を用いた骨髄移植モデルを確立し、LC の復帰動態には毛嚢を経由した二つの独立した経路が存在することを観察した。この過程で、最近報告された LC に分化する Gr-1^{high} 単球とは異なる表現型を持つ LC 前駆細胞候補を発見した。LC 前駆細胞は表皮に到達するまでに毛母部と毛嚢隆起部の二カ所を anchoring point としながら、 LC に分化していく過程が観察された。これらのことから毛嚢に LC を皮膚に動員する機序が存在することを考え、研究開始に至った。

２．研究の目的

(1) LC 前駆細胞の由来を明らかにする。
(2) LC 前駆細胞がどのようなメカニズムで毛嚢によって皮膚に動員され、表皮内に侵入するのかを明らかにする。
(3) LC 前駆細胞を動員する毛嚢側のメカニズムを明らかにする。
(4) ヒトの毛嚢で同様のメカニズムが存在するのかを明らかにする。

３．研究の方法

ランゲルハンス細胞消去後の復帰動態のモニタリング： LC を一過性に消去しうる Langerin-DTR マウスにて LC がどのように表皮に復帰するかをモニタリングする手法を用いた。

Langerin-DTR マウスを用いた骨髄移植： Langerin-DTR マウス表皮に復帰してくる LC が骨髄由来であることを示すために Langerin-DTR マウスをレシピエントとした骨髄移植の実験系を確立した。すなわち、Langerin-DTR マウスを CD45.1 背景に交配した。このマウスをレシピエントとし、コンジェニックマーカーである CD45.2 マウスの骨髄を移植し、骨髄由来の LC の復帰動態を確認した。

ランゲルハンス細胞前駆細胞の起源の解析：LC 前駆細胞の起源を明らかにするために、Lysozyme M-Cre マウスを利用した。このマウスと CAG-CAT-eGFP マウスを交配することで、単球・マクロファージ前駆細胞のマーカーの一つである Lysozyme M を発現した細胞を fate map することができる。また、Lysozyme M-Cre マウスを ROSA26-DTA（ジフテリア毒素 A）マウスに交配することで、Lysozyme M を発現した細胞を選択的に消去しうるマウスも作製した。これらのマウスの骨髄を利用して、Langerin-DTR マウスをレシピエントとして骨髄移植を行い、Lysozyme M を発現する細胞が LC になりうるかを検討した。また、Gr-1^{high} 単球が LC になりうることが過去に報告されている。我々の前駆細胞と Gr-1^{high} 細胞の関係を示すために、LysM-eGFP マウスの骨髄より CD115^{+} Gr-1^{high} 細胞を分離し、Langerin-DTR マウスに移植し、eGFP 陽性の LC が発生するか検討した。

ケモカイン依存性の解析： LC 前駆細胞が表皮復帰の際に必要とするケモカインレセプターの同定を試みた。すなわち、CCR1、2、5、6、8 をそれぞれ欠損する CD45.2 マウスの骨髄を上記の手法で Langerin-DTR マウスに移植し、その復帰動態を解析した。

ランゲルハンス細胞前駆細胞の復帰動態の生体内観察：LC 前駆細胞の復帰動態を２光子顕微鏡を駆使し、観察した。これを行うために、全ての組織で eGFP を発現するマウス（CAG-eGFP マウス）の骨髄を Langerin-DTR マウスに移植し、テープストリップ刺激を加えた後、直後もしくは数時間～十数時間以降から観察した。

毛嚢ケラチノサイトサブセットの分離：マウスの毛嚢を新しいマーカーも利用し、毛嚢間表皮、漏斗部、峡部、毛隆起部、毛隆起部基底層上部細胞に染め分け荒れるようマーカーを解析した。これらマーカーを利用し、フローサイトメトリーを用い毛嚢ケラチノサイトを５サブセットに分離し、リアルタイム PCR にてケモカインの発現を明らかにした。

無毛皮膚移植：LC 前駆細胞が表皮に浸潤するために毛嚢が必須の構造かを検討するため、まず無毛マウスを作製した。すなわち、Sox9-Cre マウスと TACE$^{fl/fl}$ マウスを交配し、毛嚢幹細胞で TACE を欠損する TACE/Sox9 マウスを作製した。TACE/Sox9 マウスの皮膚を用い、野生型コントロールとともにヌードマウスに移植し、LC の復帰を観察した。

ヒト毛嚢の遺伝子発現解析：ヒトの毛髪サンプルを利用し、LC もしくは LC 前駆細胞の動員に必要なケモカインの遺伝子発現解析を行った。検体は倫理申請のもと行った。ヒト毛嚢はマウスと解剖学的に若干異なり、数量も多く取れないため、実態顕微鏡下で必要な部位に分離し、遺伝子発現解析を行った.

ヒト無毛皮膚でのランゲルハンス細胞の解析：本研究では毛嚢と LC の関係を明らかにしたが、ヒト検体を利用し、毛嚢が無い状態が LC に及ぼす影響を検討した。正常頭皮、円形脱毛症、および瘢痕性脱毛症の毛嚢間表皮での LC の数を CD1a 染色を基に解析した。

ランゲルハンス細胞機能の解析：LC が司る経皮液性免疫応答の解析は、外来抗原の代表である ovalbumin (OVA)に加え、ブドウ球菌由

来毒素の表皮剥脱毒素（exfoliative toxin, ET）の組換え蛋白を抗原としてパッチテストの要領で行う「パッチ免疫」の手法を用いた。マウスの耳に5日おき、3回パッチ免疫を施行した後、ELISA法にて血中抗体を検出した。上記の方法で得られた液性免疫の機能を示すため、我々が過去の報告を改変して確立した実験的staphylococcal scalded skin syndrome(SSSSの)系を確立した。すなわち、成体マウスの腹腔内にETを投与すると投与後3時間程度で体幹皮膚にびらんを生じ、ヒトSSSSの病態を再現することが出来た。ETのパッチ免疫された野生型マウスと、LCを欠損させたLangerin-DTRマウスにてSSSSの発症を比較検討した。

４．研究成果

表皮唯一の樹状細胞であるLCの前駆細胞を同定し、毛嚢がこれらの細胞を動員する免疫機能を有することを明らかにした。毛嚢の免疫機能を明らかにしたのは本研究が初めてである。

(1) 骨髄移植の系を駆使し、LC前駆細胞がLysozyme Mでfate mapしうる細胞であることを突き止め、これらの細胞は炎症に反応して表皮に動員されることが分かった。Lysozyme M陽性細胞を恒久的に消去するLysozyme M-DTAマスを作成し、このマウスの骨髄をドナーとして用いた骨髄移植実験では、LC前駆細胞が出現しないことを確認した。以前骨髄のGr-1^{high} CD115^{high}細胞がランゲルハンス細胞の起源として報告された。我々が同定したpre-LCとGr-1high細胞との関係を明確にするため、Lysozyme M-eGFPマウスからGr-1^{high} CD115^{high}細胞をLangerin-DTRに移植した。レシピエントのLCを消去した後にTNCBでLC前駆細胞を誘導したところ、Lysozyme M-eGFP陽性のLC前駆細胞およびLCが表皮に浸潤し、我々の同定したLC前駆細胞はGr-1^{high}細胞に由来することが分かった。LC前駆細胞は表皮に動員される際、ケモカインレセプターであるCCR2とCCR6を必要とし、CCR8を欠損するとランゲルハンス細胞の数がむしろ増加した。

(2) CAG-GFPマウスの骨髄をLC欠損マウスに骨髄移植し、テープストリップ刺激を受けた耳にGFP陽性の白血球が浸潤する様子を２光子顕微鏡で観察すると、LC前駆細胞を含む骨髄系細胞は１時間以内に劇的に毛嚢に劇的な集積を示した。このデータは、毛嚢が骨髄系細胞を動員するメカニズムを有していることが強く示唆された。

(3) LC前駆細胞を動員する毛嚢側のメカニズムを明らかにするため、毛嚢ケラチノサイトサブセットを分離する必要が生じた。我々が発見した毛嚢マーカーであるEpCAMと既存のマーカーを利用し、毛嚢と表皮細胞を５サブセットに分離したところ、LC前駆細胞の動員に必要なケモカインが異なる場所で発現していることが分かった。進行性に脱毛を来すTACE cKOマウス皮膚を利用し、LC前駆細胞の復帰のためには毛嚢が必須であることを証明した。また、ヒト毛嚢内でもケモカインの発現は分担されており、LCの維持には毛嚢が必須であることを示した。

(4) ヒト毛嚢でも上記のようなメカニズムが存在するのか検討した。正常人頭髪サンプルから毛嚢を５つの部位に顕微鏡課にて分け、RNAを抽出した上で遺伝子発現解析をおこなった。マウスでLC前駆細胞を動員するために必要だったケモカインを解析したところ、ヒト毛嚢にもケモカイン発現に特化している部位が存在した。また、円形脱毛症において毛嚢を攻撃するT細胞はケモカインレセプターCXCR3を発現していることが知られている。このレセプターのリガンドであるCXCL4、CXCL9、CXCL10、CXCL11の発現解析を行ったところ、やはり毛嚢の特定の部位、毛球部上部に特異的に発現していることが解った。さらに、正常頭皮、円形脱毛症（可逆性脱毛）、瘢痕性脱毛症（不可逆性脱毛症）表皮にてLCの解析を行った。正常頭皮と円形脱毛症の毛嚢間表皮ではLCが存在したのに比較して、瘢痕性脱毛症では表皮内のLCがほぼ消失していた。これは、我々がマウスにて示したコンセプトがヒトにも応用できることを強く示唆した。(Nature Immunology, in press)。

また、本研究のために作成した無毛マウスであるTACE cKOを解析し、独立した研究論文として発表した（Stem Cells, in press)。その論文では、毛嚢幹細胞からTACEを欠損させると、毛嚢幹細胞を維持することができず、マウスは次第に完全脱毛となることを証明した。また、その機序にはEGFRシグナリングが関わっていることが示唆された。

本研究の流れで、ランゲルハンス細胞の液性免疫の機能を解析し、ランゲルハンス細胞は表皮タイトジャンクションの間から樹状突起を伸ばして細菌抗原を獲得し、液性免疫を誘導することを証明した。タイトジャンクションバリアが破綻していないマウスの耳にETをパッチ免疫すると、LCはタイトジャンクションを貫いてETを獲得しTh2型の液性免疫を誘導した。この免疫応答はETを全身投与する実験的SSSSを予防し得た。重要なことに、ETパッチ免疫を受けるも、LCを欠

損させた Langerin-DTR マウスは液性免疫を誘導することができず、ET 全身投与にて実験的 SSSS を発症した。LC が誘導した抗 ET IgG1 は in vitro にて ET の中和活性を有していることを証明した。これはより生理的な状態の *in vivo* 系で LC の抗微生物免疫を世界に先駆けて示した論文である。(Ouchi et al. J Exp Med, 2011)

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1) Keisuke Nagao, Tetsuro Kobayashi, Kazuyo Moro, Manabu Ohyama, Takeya Adachi, Daniela Y. Kitashima, Satoshi Ueha, Keisuke Horiuchi, Hideaki Tanizaki, Kenji Kabashima, Akiharu Kubo, Young-hun Cho, Björn E. Clausen, Kouji Matsushima, Makoto Suematsu, Glaucia C. Furtado, Sergio A. Lira, Joshua M. Farber, Mark C. Udey, and Masayuki Amagai: Stress-induced chemokine production by hair follicles regulate dendritic cell trafficking in skin. Nature Immunology, 2012 in press.査読有り

2) Keisuke Nagao, Tetsuro Kobayashi, Manabu Ohyama, Haruhiko Akiyama, Keisuke Horiuchi, Masayuki Amagai: Requirement of TACE/ADAM17 for hair follicle bugle niche establishment. Stem Cells, 2012 in press. 査読有り

3) Takeshi Ouchi, Akiharu Kubo, Mariko Yokouchi, Takeya Adachi, Tetsuro Kobayashi, Daniela Y. Kitashima, Hideki Fujii, Björn E. Clausen, Shigeo Koyasu, Masayuki Amagai, and Keisuke Nagao: Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. The Journal of Experimental Medicine: 208 (22143886) 2607-2613, 2011 査読有り

〔学会発表〕（計 4 件）

1) Tetsuro Kobayashi, Keisuke Horiuchi, Masayuki Amagai, Keisuke Nagao: Requirement of TACE/ADAM17 for the maintenance of hair follicle stem cell niche. 75th Annual Meeting for Society for Investigative Dermatology, Raleigh, NC, USA. 2012.5.9-12

2) Keisuke Nagao, Tetsuro Kobayashi, Kazuyo Moro, Kenji Kabashima, Manabu Ohyama, Young-hun Cho, Björn E. Clausen, Mark C. Udey, and Masayuki Amagai: Dendritic cell trafficking in skin is regulated by hair follicles via chemokine production. 75th Annual Meeting for Society for Investigative Dermatology, Raleigh, NC, USA. 2012.5.9-12

3) Takeshi Ouchi, Akiharu Kubo, Takeya Adachi, Tetsuro Kobayashi, Daniela Y. Kitashima, Hideki Fujii, Bjoern E. Clausen, Shigeo Koyasu, Masayuki Amagai, and Keisuke Nagao：Langerhans cells play an essential role in inducing protective humoral immune response subsequent to antigen uptake through tight junctions. 41th Annual ESDR meeting, Barcelona, Spain. 2011.9.6-10

4) Keisuke Nagao: Hair follicles regulate dendritic cell trafficking in skin. Cutting edge immunology and its clinical applications. Netherlands, 2011.3.1-6

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
永尾　圭介　(NAGAO KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：40286521