

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明及び  
新治療法の開発に関する総合研究班

平成12年度総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成13年4月

アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明及び  
新治療法の開発に関する総合研究班班員名簿

班長	西岡 清	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学	教授
班員	玉置邦彦	東京大学医学部皮膚科学	教授
	烏山 一	東京医科歯科大学大学院感染分子制御学	教授
	眞弓光文	福井医科大学小児科学	教授
	瀧川雅浩	浜松医科大学皮膚科学	教授
	片山一朗	長崎大学医学部皮膚科学	教授
	相馬良直	聖マリアンナ医科大学皮膚科学	助教授
	古賀哲也	九州大学大学院医学研究院皮膚科学	助教授
	塩原哲夫	杏林大学医学部皮膚科学	教授

## 【目次】

総括研究報告	1
分担研究報告	
STAT6欠損マウスを用いたIgEを介する遅発型反応発症機序の解析	6
東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学 西岡 清	
樹状細胞を用いたアトピー性皮膚炎治療に関する研究	9
東京大学医学部皮膚科 玉置邦彦	
遺伝子改変モデル動物を用いたアレルギー病態の解析と 治療への応用に関する研究	12
東京医科歯科大学大学院感染分子制御学 烏山 一	
小児アトピー性皮膚炎における酸化ストレスと レドックス制御に関する研究	16
福井医科大学医学部小児科 真弓 光文	
アトピー性皮膚炎とストレスに関する研究	20
浜松医科大学皮膚科 瀧川雅浩	
ストレスによるアトピー性皮膚炎の増悪機序の検討 ーサブスタンスPによる線維芽細胞からの エオタキシンの誘導とその抑制機序の解析ー	23
長崎大学医学部皮膚科 片山一朗	
アトピー性皮膚炎患者の皮膚病変部のT細胞レセプターの検討	25
聖マリアンナ医科大学皮膚科 相馬良直	
アトピー性皮膚炎の治療薬としての抗酸化剤(CX-659S) 接触皮膚炎に対するin vivo効果と表皮ランゲルハンス細胞への作用について	28
九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 古賀哲也, 内博史, 陳其潔, 古江増隆	
アトピー性皮膚炎の動物モデルにおける タイプ1/タイプ2 T細胞の動態	32
杏林大学医学部皮膚科 塩原哲夫	
研究成果の刊行一覧	34

# 総括研究報告

## アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明及び新治療法開発に関する総合研究

主任研究者 西岡 清

東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学 教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎の病因・病態の解析から以下の研究成果が得られた。

- ① 遺伝子導入マウスを用いた研究から、高IgE血症を示すマウスは、抗原曝露によって即時型と遅発型の2相性の炎症反応に加えて、炎症反応が長期に持続する3相目の炎症反応を示すことが明らかになった。また、遺伝子導入マウスにおいてIgE受容体発現にともなう炎症反応の出現と増幅が、FcεRIのα鎖によって制御されていることが明らかになった。
- ② STAT-6欠損マウスを用いた実験から、IgE抗体を介する2相性炎症反応にIL-4が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、IL-4のシグナル伝達の転写因子であるSTAT6を制御することができる薬物を開発することによってアトピー性皮膚炎の治療薬を開発できる。
- ③ 化学物質繰り返し塗布によるTh1型からTh2型反応への変換は、繰り返し塗布後期において、IL-4を産生するCD4+T細胞の3倍程度の増加とIL-12を産生する樹状細胞の減少によることが明らかとなった。
- ④ 免疫反応の抗原提示を行うランゲルハンス細胞は、抗CD40とIFNγ存在下でIL-12を産生し、Th1型反応を誘導する。このIL-12産生は、GM-CSFによって抑制され、TGF-βによって増強する。この結果、サイトカイン操作によって、アトピー性皮膚炎でのランゲルハンス細胞の抗原提示をTh2型反応からTh1型反応に調節できる。
- ⑤ アトピー性皮膚炎病変部には、抗原刺激によって誘導されたオリゴクローナルなT細胞の浸潤が起こっていることを見いだした。さらに、病変部に浸潤するTh2細胞の浸潤動態を制御するために、接着分子発現を制御する数種の多糖体を検索したが、今年度の研究では、効果的な多糖体は見いだせなかった。
- ⑥ アトピー性皮膚炎患者のSTAI (State-Trait Anger Expression Scale) を用いた調査で、本症患者が不安状態にあることが見いだされた。
- ⑦ ヒト角化細胞はサブスタンスP (SP) の刺激によってSPを過剰産生し、皮膚の炎症反応を増幅し、さらに、SPは、ヒスタミンとともに線維芽細胞からのIL-4誘導性エオタキシン産生が増強し、炎症反応を増幅することが明らかになった。
- ⑧ アトピー性皮膚炎の遷延化と重症化における酸化ストレスの役割を比較的症状が安定している小児アトピー性皮膚炎患者で検討し、患者の尿中8(OH)dG (酸化ストレスの指標) は健常者に比して増加し、NOx- (NO産生の指標) は低下し、セレン (セレン備蓄の指標) には変化はないことが明らかになった。
- ⑨ 抗酸化薬 (CX-695S) は、ランゲルハンス細胞からのIL-1β産生をmRNAレベル、蛋白レベルの両方で抑制して接触皮膚炎反応を抑制することが明らかになり、抗酸化薬CX-695Sがアトピー性皮膚炎の治療薬となりうる可能性が示した。

### 分担研究者

玉置邦彦 東京大学医学系研究科皮膚科学教授  
鳥山 一 東京医科歯科大学  
医歯学総合研究科感染分子制御学教授  
塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科教授  
滝川雅浩 浜松医科大学皮膚科教授  
真弓光文 福井医科大学皮膚科教授  
片山一朗 長崎大学医学部皮膚科教授  
相馬良直 聖マリアンナ医科大学皮膚科学助教授  
古賀哲也 九州大学大学院医学院皮膚科学助教授

皮膚炎の病態として、IgE抗体過剰産生によるアレルギー炎症と皮膚バリア機能異常による皮膚易刺激性が挙げられ、後者についてはすでに研究が進行し、スキンケアを中心とする治療法が行われている。しかし、現状では、本症の難治例・重症例が増加する傾向にあり、これら患者では、日常生活の質(QOL)が大きく障害されている。本症の難治化・重症化においてアレルギー炎症が重要な役割を果たしていることが考えられていることから、アトピー性皮膚炎における免疫学的背景の実態を解明するため、アトピー性皮膚炎の動物モデルの開発とその解析、アレルギー機序を介する湿疹反応の解析、アレルギー炎症におけるTh1/Th2シフト機序の解明、ストレスならびに酸化ストレスのアレルギー炎症への影響の検討を行い、その研究成果に基づいてアト

### A. 研究目的

本研究班の柱とする研究テーマは、「アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明を行い、その研究結果に基づく新しい治療法の開発」である。アトピー性

ピー性皮膚炎の新治療法を開発することを研究目的とした。

## B. 研究方法と結果

### 1) アトピー性皮膚炎の免疫学的背景の検討

アトピー性皮膚炎の動物モデルの開発で、烏山班員は、化学物質あるいはダニ抗原に特異的に反応するIgE抗体の遺伝子を導入したマウス、ヒトIgE受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子を導入したマウスをそれぞれ作成し、アトピー性皮膚炎のIgE抗体を中心とした免疫学的背景について検討した。IgE抗体遺伝子を導入したマウスでは、抗原投与によって、即時型と遅発型の2相性の炎症反応が起こり、さらに引き続いて3相目の炎症反応が起ることを明らかにした。この炎症反応は、長期にわたって持続するものであることから、アトピー性皮膚炎の炎症反応の難治化・長期化を考える上で重要な発見と考えられる。

アトピー性皮膚炎に伴う高IgE血症が、肥満細胞のIgE高親和性受容体(Fc $\epsilon$ RI)の発現を亢進させ、この高発現したFc $\epsilon$ RIがアレルギー炎症の出現・増幅に相関することから、遺伝子導入マウスを用いて、Fc $\epsilon$ RI発現を調節する方法を確立することによってアトピー性皮膚炎でのアレルギー炎症の治療法を開発することが可能となる。高IgE血症を示すアレルギー特異的IgEトランスジェニックマウスの骨髄由来肥満細胞は、 $\mu$ m-/-マウスの肥満細胞に比して20-30倍のFc $\epsilon$ RIの発現増強を示した。Fc $\epsilon$ RIの発現はIgEの受容体への結合によって促進され、IgEと結合した受容体はdegradationに対して抵抗性を示した。また、ヒト $\alpha$ 鎖遺伝子を導入したマウス肥満細胞は、ヒトIgEとの結合によってヒト $\alpha$ 鎖を持つFc $\epsilon$ RIが高発現することから、Fc $\epsilon$ RIの高発現に受容体の $\alpha$ 鎖の発現が重要な関わりをもつことが推定された。そこで、 $\alpha$ 鎖の膜貫通部分の安定性を操作することによってIgEとの結合を阻害する、あるいは、 $\alpha$ 鎖の発現を操作することによってアレルギー反応を抑制できる可能性が示された。

IgE抗体受動転嫁により引き起こされる即時型反応と遅発型反応の2相性の炎症反応が、アトピー性皮膚炎におけるアレルギー炎症反応に重要な役割を果たしていることが考えられることから、西岡は、単クローンIgE抗体受動転嫁による炎症モデルを作成し、この反応を阻害できる薬物を探索することによってアトピー性皮膚炎の新しい治療薬開発の可能性を考えた。2相性反応、特に、遅発型反応の発現には、IL-4の作用が関与している可能性があることから、IL-4の細胞内シグナル伝達を担うSTAT-

6を欠損したマウスを用いて遅発型反応の発現を検討した。STAT-6ノックアウトマウスは、野性型マウスに比して、IgE抗体受動転嫁による即時型反応と遅発型反応の有意な減弱を示した。このことから、STAT-6分子の作用を阻害する薬物を探索することによって、アトピー性皮膚炎のアレルギー反応の治療薬を開発できる可能性が示された。

塩原班員は、化学物質アレルギーの繰り返し塗布によって、塗布初期にはTh1型反応を、また、塗布回数増加にともないTh2型反応に移行する現象を発見し、繰り返し塗布後の皮膚反応がアトピー性皮膚炎のモデルとなることを明らかにしている。このTh型反応からTh2型反応へのシフトの状態を、リンパ節細胞のサイトカインの発現で調べると、塗布後期では、IL-4を産生するCD4+T細胞が3倍程度に増加したが、IFN $\gamma$ を産生するCD8+T細胞の減少は見られなかった。さらに、樹状細胞について検討したところ、塗布後期でIL-12を産生する樹状細胞が減少していることを見だし、塗布後期のTh2型反応へのシフトは、IL-4産生CD4+T細胞の増加とIL-12産生樹状細胞の減少によると考えられた。この知見は、樹状細胞機能を調節する薬物を開発することによって、アトピー性皮膚炎の治療薬開発の可能性を示すものである。

玉置班員は、アトピー性皮膚炎患者末梢血のCD4+CD45RO+T細胞のCXCR3とCCR4のケモカイン受容体発現を検討し、Th2細胞のマーカーとされるCCR4+T細胞の増加が見られ、アトピー性皮膚炎の重症度と平行することを明らかにした。さらに、ランゲルハンス細胞はIL-12を産生してT細胞をTh1に分化させることから、ランゲルハンス細胞のIL-12産生機構を解析した。ランゲルハンス細胞によるIL-12産生は、GM-CSFによって濃度依存的に抑制され、TGF- $\beta$ によって増強した。この知見は、ランゲルハンス細胞機能を調節することによって、アトピー性皮膚炎でのTh2型反応を制御できることを示すものであり、アトピー性皮膚炎治療法の開発につながるものである。

相馬班員は、アトピー性皮膚炎患者の皮膚病変部の浸潤細胞のT細胞受容体発現を検討し、アトピー性皮膚炎病変部にオリゴクローナルなT細胞の浸潤が起こっていることを見出した。さらに、同一患者の末梢血をダニ抗原で刺激すると、末梢血T細胞にも同様のオリゴクローナルなT細胞受容体の発現することを見出した。このことからアトピー性皮膚炎では抗原刺激によってオリゴクローナルなT細胞が誘導され、皮膚に浸潤することが示された。また、滝川班員は、アトピー性皮膚炎病変部へのTh2

細胞の浸潤を制御するため、血管内皮細胞に発現する接着分子の発現を制御する多糖体を検索した。今年度の研究では効果的な多糖体は見いだせなかったが、今後も引き続き検討を行う予定である。

## 2) アトピー性皮膚炎におけるストレスの役割検討

アトピー性皮膚炎において心因的ストレスが増悪因子として作用することが知られているが、ストレスによる増悪機構は明らかにされていない。滝川班員は、アトピー性皮膚炎患者の精神活動を客観的に評価するために、STAI (State-Trait Anger Expression Scale) を用いて調査し、本症患者はSTAI値が高く、不安状態にあることを見いだした。

片山班員は、アトピー性皮膚炎病態の修飾においてストレスの作用機序を神経ペプチドとの関連で解析した。ヒト角化細胞は神経ペプチドの一つであるサブスタンス P (SP) の刺激によって SP を過剰産生するようになり、皮膚の炎症反応を増幅する。さらに、SP は、ヒスタミンとともに IL-4 によって誘導される線維芽細胞からのエオタキシン産生が増強して炎症細胞の局所への浸潤を増強し、炎症反応を増幅させることが明らかになった。神経ペプチドの作用を調整する薬物の開発の必要性を示すものである。

## 3) アトピー性皮膚炎における酸化ストレスの役割検討

生理的環境下では活性酸素やフリーラジカルは他のオキシダントやアンチオキシダントと共に統一のとれたレドックス制御が行われているが、アトピー性皮膚炎の病態においてはレドックス制御が崩れ、酸化ストレスが症状の遷延化と重症化に影響することが予測される。真弓班員は、アトピー性皮膚炎での酸化ストレス亢進による活性酸素/活性窒素の役割を検討した。比較的症状が安定している小児アトピー性皮膚炎患者の尿中 8-hydroxy 2-deoxyguanosine {8(OH)dG ; 酸化ストレスの指標}、NOx- (NO 産生の指標)、セレン (セレン備蓄の指標) を測定した。8(OH)dG はアトピー性皮膚炎群が健康者に比して増加していた。NOx- は健康者に高く、セレンは両群で差は見られなかった。NOx- の低下は慢性ストレスによる NO ドナーの低下、IL-4 による iNOS 産生の低下などが考えられ、酸化ストレスによる症状の遷延化を抑制する治療薬の検討の必要性を示した。

古賀班員は、抗酸化薬 (CX-695S) の湿疹反応に対する作用を、表皮ランゲルハンス細胞機能を標的として検討を行った。抗酸化薬 CX-695S は、接触

皮膚炎の湿疹反応を抑制し、ランゲルハンス細胞からの IL-1 $\beta$  産生を mRNA レベルと蛋白レベルの両方で抑制することが明らかにした。この知見は、アトピー性皮膚炎の湿疹反応に酸化ストレスが関与していることを示すと同時に、抗酸化薬がアトピー性皮膚炎の治療薬となりうる可能性を示すものである。

## C. 考案と結論

平成 12 年度の研究において、アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明を、アトピー性皮膚炎の免疫学的背景の解析、ストレス、酸化ストレスのアトピー性皮膚炎への関与の解析を中心として研究を行い、本症病因・病態の解明のための重要な多くの研究成果が得られた。これらの成果は、いずれも新しい治療薬開発の方向性を示唆するものであった。遺伝子導入モデルマウスを用いた研究成果から、高親和性 IgE 受容体  $\alpha$  鎖の発現と膜安定性を操作する治療薬の開発、遅発型反応機序の解析成果から、IL-4 シグナル伝達に必須の STAT-6 の作用を調節する治療薬の開発、アレルゲン繰り返し塗布モデルの炎症反応の解析結果とランゲルハンス細胞機能の解析成果から、樹状細胞機能を調節するサイトカイン、薬物の開発、神経ペプチドの角化細胞、線維芽細胞への影響の検討成果から、神経ペプチドの産生調節を行う薬物の開発、酸化ストレスの検討成果に基づく抗酸化薬の開発など、アトピー性皮膚炎治療のための新しい戦略が得られた。中でも、抗酸化薬は、すでにアトピー性皮膚炎に対する治療効果が予測できる段階にまできており、今後の研究の進展が期待される。これらの治療戦略は、いずれもアトピー性皮膚炎治療薬開発への礎を築くものであり、引き続き、アトピー性皮膚炎治療法開発に向けての研究を推進する予定である。

# 分担研究報告



## STAT6欠損マウスを用いたIgEを介する遅発型反応発症機序の解析

主任研究者 西岡 清

東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学 教授

**研究要旨** STAT6欠損マウスとワイルドタイプマウス(C57BL/6)に抗DNP-IgE抗体を静脈内に投与した後、DNFB塗布による耳介腫脹反応を経時的に比較検討した。その結果、惹起後9時間をピークとする早期反応、48時間後をピークとする遅発反応ともに欠損マウスで減弱していた。惹起皮膚病変部の炎症反応を解析するため、腫脹した耳介の浸潤細胞数を解析したところ、STAT6欠損マウスでは好酸球、好中球が著明に減少し、また、局所のIL-4蛋白量もSTAT6欠損マウスでは減少していた。IgEを介する遅発型反応の誘導にSTAT6が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

抗原特異的IgE抗体（抗DNP-IgE抗体）の投与による遅発型反応が組織学的に湿疹反応がみられることから、アトピー性皮膚炎のモデルマウスとして用いることができることを報告している(Katayama I et al: Int Arch Allergy Apl Immunol ,93: 148,1990)。しかし、この遅発型反応の発症機序は未だ明らかにされていない点が多い。この反応が肥満細胞欠損マウスに誘導できないことから、肥満細胞から産生されるサイトカインが重要な役割を果たすことが考えられている。この遅発型反応の誘導にTh2型サイトカインであるIL-4, IL-5, IL-13の役割が予測される。一方、STAT6はIL-4のみならずIL-13シグナル伝達系にも必要であることは周知のことである(Takeda K et al.: Nature,380:627,1996)。

今回、遅発型反応誘導におけるTh2型サイトカインの役割を明らかにするため、STAT6欠損マウスに抗DNP-IgE抗体を静脈投与し、24時間後に耳介にDNFBを塗布して誘導した惹起反応を経時的に検討した。

### B. 方法

STAT6欠損マウスとワイルドタイプマウス(C57BL/6)に抗DNP-IgE抗体の投与による感作を行い、24時間後にDNFBを塗布して、耳介腫脹反応を誘発した。耳介腫脹反応を経時的に計測した。また、腫脹部位の炎症反応を解析するため、腫脹した耳介の凍結切片を作成し、浸潤細胞（T細胞、好酸球、好中球、肥満細胞）を病理組織学的に、また、

IELISA法を用いてL-4,IL-5,IFN-gなどのサイトカイン蛋白を測定し、サイトカインmRNA発現をRT-PCR法を用いて解析した。

STAT6欠損マウスとワイルドタイプマウス、(WT)に抗DNP-IgE抗体を投与し、DNFB惹起による耳介腫脹反応を経時的に比較検討したところSTAT6欠損マウス、WTともに惹起後、9時間後と48時間後にピークを示す2峰性の耳介腫脹が認められたが、STAT6欠損マウスでは早期反応、遅発反応ともにWTに比べ、統計的有意差をもって減弱していた(図1)。惹起9時間後、48時間後の耳介腫脹反応が減弱しているメカニズムを解析するため、惹起部の病理組織学的解析を行ったところ、9時間後の反応では、STAT6欠損マウスWTともに細胞浸潤は乏しく、真皮の浮腫が主体の反応であったが、惹起48時間の耳介の病理組織では、単核細胞、好酸球、好中球の浸潤が認められたが、STAT6欠損マウスでは浸潤細胞数が減少していた(図2)。特に好酸球、好中球の浸潤はSTAT6欠損マウスでは著明に減少していた(図2)。この顆粒球の減少がTh2サイトカイン発現の低下と関連するか否かを検討するため、惹起皮膚局所のサイトカイン発現を解析した。ELISAによる蛋白レベルでの解析では、IL-5はWT、STAT6欠損マウスともに検出できなかったが、IL-4は惹起48時間後の皮膚局所にWTで5 ng/g tissue、STAT6欠損マウスでは2.3 ng/g tissueと明らかに欠損マウスで減少していた(図3)。惹起48時間後のWTの惹起部ではIL-4mRNAは強く発現しているが、STAT6欠損マウスではほとんど認められなかった(図4)。

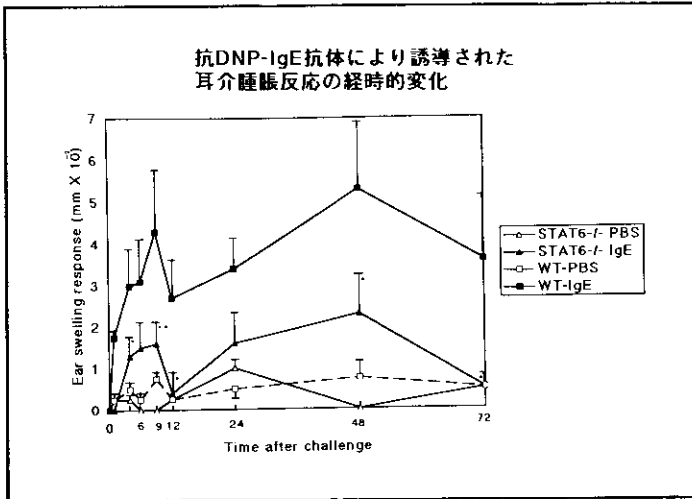


図1 抗DNP-IgE抗体投与後の惹起反応の経時的変化

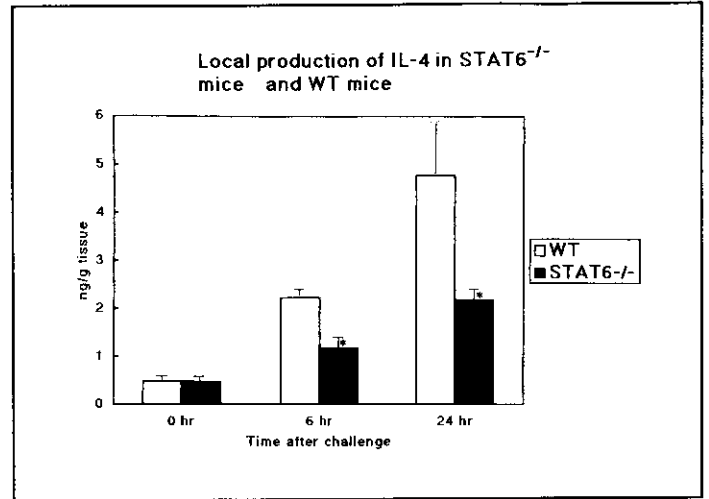


図3 惹起48時間後の惹起部のIL-4蛋白

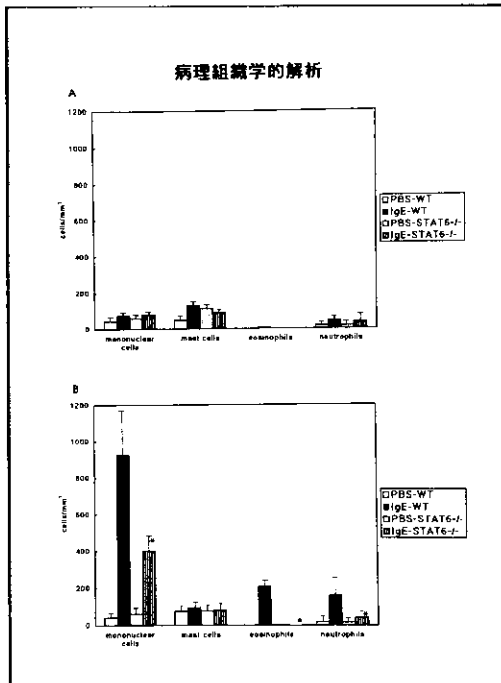


図2 惹起48時間後の惹起部の浸潤細胞数

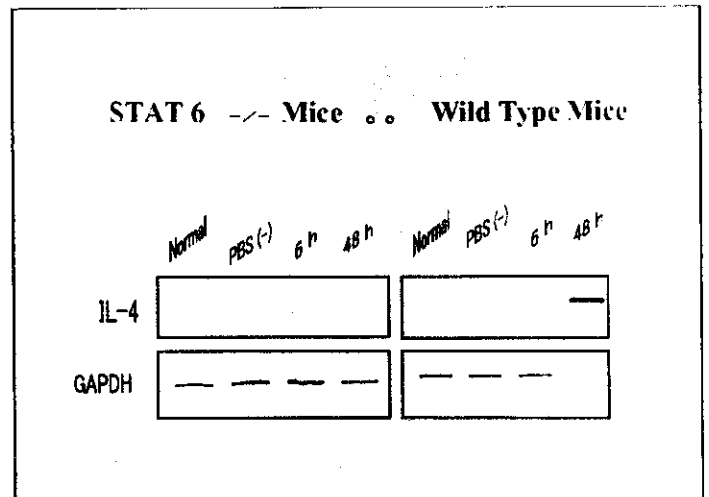


図4 惹起48時間後の惹起部のIL-4 mRNA発現

### C. 考案

IL-4 シグナル伝達系に重要な役割を果たす STAT6 が、抗原特異的IgE抗体で誘導される遅発型反応の発現に必要であることが明らかになった。また、惹起9時間後に誘導される早期反応でも STAT6 欠損マウスで減弱していることにより、早期反応にも STAT6 が関与している可能性が考えられる。病理組織学的解析で、STAT6 欠損マウスの惹起48時間後に好酸球、好中球の浸潤がほとんど認められないことにより肥満細胞、線維芽細胞などからの Eotxin などのケモカインの産生に STAT6 が関与している可能性が考えられる。また、惹起24、48時間後の WT の惹起部では IL-4 の蛋白、mRNA とともに強く発現しているが、STAT6 欠損マウスではほとんど認められない。このことより IL-4 依存性の Th2 細胞の関与も考えられる。今後、免疫組織染色にて種々のケモカイン、Th2 型サイトカインの産生細胞を明らかにする必要がある。

### D. 結論

抗原特異的 IgE 抗体で誘導される遅発型反応に STAT6 が重要な働きをすることが明らかになった。今度、STAT6 発現を調節することによってアトピー性皮膚炎の炎症反応の一部を制御できる可能性が示唆された。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Takayama, K., Takagawa, S., Katayama, I., Takeda, K., Akira S. and Nishioka, K.: STAT6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 191: 995-1004, 2000
- 2) Ghoreishi, M., Yokozeki, H., Hua W.M., Nishioka, K.: Expression of 27 Kd, 65 Kd, and 72/73 Kd Heat Shock Protein in atopic dermatitis: Comparison with those in normal skin and contact dermatitis, *J. Dermatol.*, 27 (6):370-379 (2000)
- 3) Miyazaki Y, Yokozeki H, Awad S, Igawa K, Minatohara K, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Glucocorticoids augment the chemically induced production and gene expression of IL-1 $\alpha$  through NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in murine epidermal cells. *J Invest Dermatol*, 115: 746-752 (2000)
- 4) Satoh T, Yokozeki H, Nishioka K: Pathogenic roles of eosinophils in guinea-pig contact

sensitivity: regulation of dermal eosinophilia with remotely administered IL-5. *Clin Exp Immunol*, 122:300-307, (2000)

#### 2. 学会発表

- (1) 横関博雄、高山かおる、西岡清、竹田潔、審良静男: マウス接触過敏症誘導における STAT6 シグナル伝達系の役割解析、第28回日本免疫学会、1998
- (2) 横関博雄、高山かおる、西岡清、竹田潔、審良静男: マウス接触過敏症の誘導に Th2 サイトカインは必要である、第29回日本免疫学会、1999年
- (3) Yokozeki H, Miyazaki Y, Igawa K, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Glucocorticoid enhances hapten- or irritant induced IL-1 $\alpha$  expression and nuclear factor NF- $\kappa$ B activation, *IID*, 1998(13) Yokozeki H, Ghreish M, Takayama K, Nishioka K: STAT6 play a crucial role in contact sensitivity, 60 th SID, 1999
- (4) Yokozeki H, Katayama I, Takeda K, Akira S, Nishioka K: Signal transducers and activators of transcription 6 are essential in the induction of contact hypersensitivity, 61 st SID, 2000
- (5) Yokozeki H, Hua W, Katayama I, Takeda K, Akira S, Nishioka K: Th2 cytokines and mast cells play a crucial role in the induction of PPD induced contact hypersensitivity, 30 th annual meeting of ESDR, 2000

課題名 樹状細胞を用いたアトピー性皮膚炎治療に関する研究

分担研究者 玉置邦彦

所属機関 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎（以下 AD）はその多くは高 IgE 血症を伴い、慢性に経過する湿疹性病変である。AD は Th2 に偏位した疾患であるとされていたが、最近では急性湿疹性病変を示す皮膚病変部では Th2 であるが、慢性湿疹性病変を示す部位では Th1 優位になるとする考えが出され、必ずしも明確ではない。そこで今回の研究では AD が Th1/Th2 偏位からみた場合の病態を検討した。その結果ヒト AD は Th2 ケモカインである TARC の受容体である CCR4 および Th1 受容体とされる CXCR3 からみた限り Th2 に偏位した病態であると考えられた。いっぽう表皮に存在するランゲルハンス細胞（以下 LC）は抗原提示細胞である樹状細胞（以下 DC）に属する細胞である。最近 DC には myeloid DC と lymphoid DC があり、前者が Th2 を誘導し、後者が Th1 を誘導することが報告された。我々は Th1、Th2 偏位に重要な IL-12 産生について検討しているが、そのなかでマウス LC からの産生制御について検討し、GM-CSF がマウス IL-12 産生を抑制するのに対して、TGF- $\beta$  が IL-12 産生を増強することを見出した。このような条件下で LC がそれぞれ LC1、LC2 として作用し、Th1、Th2 を誘導し、AD の治療に応用できる可能性を検討している。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（以下 AD）は、そう痒を伴い慢性に経過する湿疹であるが、その多くは高 IgE 血症を伴う疾患である。AD は、Th2 に偏位した病態であるといわれているが、最近の研究によると皮膚病変が急性湿疹の病変では、Th2 タイプであり、慢性湿疹の病変では Th1 タイプであるとする報告があるなど必ずしも明らかではなく、症状によって Th1、Th2 が複雑に絡み合う病態であろうとされている。

ランゲルハンス細胞（以下 LC）は抗原提示細胞（APC）である樹状細胞（DC）に含まれる細胞であるが、DC が Th1、Th2 偏位に大きく関わっているとする報告がなされ、それぞれを DC1、DC2 と呼称することも行わ

れている。我々は、これまでマウス LC を純化して採取することに成功し、その手法を用いて LC の性状を解析してきた。また、一方では、ヒト AD の病態についても検討を加えてきた。今回の研究は、①ヒト AD の病態を特に Th1、Th2 偏位の観点から更に明らかにすると共に、②マウス LC あるいは DC を用いて Th1、Th2 偏位を誘導する可能性について検討を加え、更にその方法論によって③AD のモデルマウスといわれる NC/Ng マウスの AD 様皮膚疹の発症を抑制する可能性について検討することを考えている。このことが可能であれば、ヒト末梢血由来の DC/LC を用いた AD の治療が可能であろうと考える。

B. 研究方法

1. 純化したマウス LC を採取し、その LC からの IL-12 産生について検討する。そして、その LC からの IL-12 産生に関与するサイトカインの影響について解析を加えた。このことにより Th1 偏位の鍵となるサイトカイン産生制御が可能になると考えた。
2. ヒト AD の末梢血中のケモカイン受容体である CCR4 及び CXCR3 発現と IL-4, IFN- $\gamma$  産生との関係について検討した。このことにより AD における Th1, Th2 偏位が明らかにできると考えた。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では動物愛護の精神にのっとり実験を遂行した。ヒトにおける研究では、末梢血液および血清の採取に際して、十分に研究内容を患者にインフォームし、患者からの了承を得て行っている。

### C. 結果

1. BALB/c マウスから純化した LC を採取し、培養液中の IL-12p40 を ELISA によって測定したところ経時的に LC からの IL-12p40 産生が増強することが明らかとなった。LC からの IL-12p40 産生は抗 CD40 抗体と IFN-g 添加によって増強された。LC の生存、機能に重要とされている GM-CSF を添加したところ、IL-12p40 は用量 依存的に抑制された。更に LC からの IL-12p40 産生が生物活性と相関するかについて、IL-12 依存性の 2D6 細胞を用いたバイオアッセイを行ったところ、LC から産生される IL-12 はバイオアクティブであることが示された。更に、LC

への分化誘導に重要とされる TGF- $\beta$  を GM-CSF に代えて用いたところ GM-CSF とは反対に LC からの IL-12 産生は強く増強された。そして LC からの IL-12 産生は LC 培養液中の GM-CSF と TGF- $\beta$  のバランスによって規定されることも明らかになった。

2. まず、ヒト AD 患者末梢血の D4+ 細胞を CCR4+ と CXCR3+ とに FACS で分離し、それぞれの細胞質中の +IL-4 及び IFN- $\gamma$  発現について検討したところ、多くの CCR4 発現細胞が IL-4 を発現しており、IFN- $\gamma$  産生細胞は少なく、逆に CXCR3 発現細胞の多くは IFN-g を産生しており IL-4 産生細胞は少ないことが明らかとなった。そこで、AD の多数例についてその病勢と CCR4+ 細胞との関係を検討したところ AD 末梢血中の CCR4+CD4+ 細胞の割合は病勢と一致するが、CXCR3+ CD4+ 細胞は病勢と関係しないことが示された。

### D. 考察

1. マウス LC による研究から、LC の微小環境を GM-CSF, TGF- $\beta$  などの存在によって変化させることによって LC からの IL-12 産生を抑制したり、増強したりすることが可能であることが明らかとなった。このことは、現在広くいわれている Th1 反応は DC1 が、Th2 反応は DC2 が誘導し、DC1 と DC2 はそれぞれ cell lineage の異なるものであるという考えに修正が必要であることを示唆するものであり、我々は現在このように修飾した LC によって Th1, Th2 が誘導するか否かについて検討を加えている。AD は、その表

皮ケラチノサイト (KC) が GM-CSF を過剰産生することが明らかにされており、GM-CSF による LC からの IL-12 産生抑制 は AD の病態を考える上で重要なことと考えている。

2. ヒト AD 末梢血及び病変部皮膚からの T 細胞のクローニングについての研究では、殆どのクローニングされる細胞は IL-4 を産生し、IFN- $\gamma$  は産生しない性状をもつことが明らかにされている。今回の我々の研究も AD 末梢血では Th2 偏位がみられ、それは病態と関連することを明らかにした。

#### E. 結論

ヒト AD では Th2 偏位がみられることが示されたと考えている。マウスの研究から LC による Th1, Th2 偏位の誘導が可能であれば AD の新しい治療方法として提示できる可能性が強くなったと考えている。この考え方に沿った研究を更に行なうことにしている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K. Granulocyte/macrophage / colony stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells. *J Immunol.* 164: 5113-9, 2000.
2. Wakugawa M, Nakamura K, Tamaki K. Evaluation of mite allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis

patients: association between IL-13 and mite specific IgE levels. *J Dermatol Sci.* 25: 116-126, 2001.

3. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Miyazono K, Fujiwara H, Tamaki K. Transforming growth factor - $\beta$  upregulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 31: 294-300, 2001.

#### 学会発表

1. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Miyazono K, Fujiwara H, Tamaki K. Immunomodulatory effects of TGF- $\beta$  on murine mouse Langerhans cells: Regulation of IL-12 synthesis by TGF- $\beta$ . 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. Chicago, 2000.

#### G. 知的財産権の出願・特許状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

#### 研究協力者

中村晃一郎 東京大学皮膚科  
朝比奈昭彦 東京大学皮膚科  
多田弥生 東京大学皮膚科  
湧川基史 帝京大学溝口病院皮膚科

分担研究報告書

遺伝子改変モデル動物を用いたアレルギー病態の解析と治療への応用に関する研究

分担研究者 鳥山 一 東京医科歯科大学大学院感染分子制御学教授

**研究要旨** 高 IgE 血症を呈するアレルギー患者では、マスト細胞や好塩基球の細胞表面における高親和性 IgE 受容体 FcεRI の発現が亢進しており、その結果マスト細胞からのケミカルメディエーターの放出が増強することが報告されている。したがって、この IgE による FcεRI の発現亢進を阻害するような薬物は有望なアレルギー治療薬になると考えられる。このような薬剤の開発には IgE による FcεRI の発現亢進のメカニズムの解明が必須である。そこで本研究では遺伝子改変マウスを用いてそのメカニズムの解析をおこなった。その結果、FcεRI に IgE が結合すると FcεRI の安定性が亢進し、細胞表面での FcεRI の半減期が非常に延長することが判明した。一方、FcεRI に IgE が結合することによって FcεRI の蛋白合成や細胞表面への輸送が促進されるという知見は得られなかった。したがって、IgE による FcεRI の発現亢進は、IgE 結合した FcεRI の安定化とそれによる細胞表面での FcεRI の蓄積によって引き起こされると考えられる。さらに、FcεRI を構成する 3 種の鎖（α、β、γ）のうち α 鎖がこの FcεRI の安定性の決定に深く関与していることが明らかとなった。このことから FcεRI α 鎖をターゲットとした新規治療薬の可能性が強く示唆された。

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎をはじめとしてアレルギー疾患はいまや現代病として大きな社会問題となっている。しかしながら、その治療法に関してはいままなお対症療法にその主体を頼らざるをえないのが現状である。アレルギー性疾患に対する新しい治療法を開発するためにはヒトのアレルギー疾患を再現できるような動物モデルの樹立が必須である。我々はこれまでの研究で、世界に先駆けて、アレルゲン（卵白アルブミンおよびハプテン TNP）特異的な IgE を発現する遺伝子改変マウスの作製に成功した。このマウスではアレルゲンによる事前の感作なしに、たった一回のアレルゲンのチャレンジによって、全身性ならびに局所性の即時型アレルギー反応を誘発することができた。このマウスでは血中 IgE 値が恒常的に高く、マスト細胞上の FcεRI の発現亢進も認められることから、アレルギー患者の病

態を強く反映していると考えられる。アレルギー患者では、FcεRI の発現亢進によってマスト細胞からのケミカルメディエーターの放出が増強することが報告されており、IgE による FcεRI の発現亢進がアレルギーの増悪要因のひとつになっている。そこで本研究では、遺伝子改変マウスを用いて IgE による FcεRI の発現亢進のメカニズムを解明し、FcεRI 発現亢進を抑制するような新規アレルギー治療薬の開発に応用することを目的とした。

#### B. 研究方法

- ①遺伝子改変マウス：ハプテン TNP 特異的 IgE トランスジェニックマウスは我々の研究室で最近樹立されたものを使用した。ヒト FcεRI α 鎖を発現するトランスジェニックマウスを東京都臨床医学総合研究所の米川博通副所長との共同研究で作製した。μ 鎖ノックアウトマウスと FcγRIIb ノックアウトマウスはそれ

ぞれドイツ・ケルン大学の K. Rajewsky 教授と東北大学の高井俊之教授から供与された。

- ②骨髄由来マスト細胞株 (BMMC) の作製：遺伝子改変マウスならびに正常マウスの骨髄から単離した細胞を IL-3 存在下で培養して BMMC を樹立した。
- ③細胞表面の FcεRI の定量：遺伝子改変マウスならびに正常マウスの腹腔から採取したマスト細胞あるいは骨髄由来の BMMC を IgE と 4°C で反応させ洗浄後、FITC 標識抗 IgE 抗体で染色し、蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。
- ④細胞表面の FcγRIII の定量：FcγRIIb ノックアウトマウスの骨髄細胞から BMMC を作製し、FITC 標識抗 FcγRII/III 抗体 2.4G2 で染色し、蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。
- ⑤細胞表面での FcεRI と FcγRIII の安定性の計測：細胞内タンパク質輸送の阻害剤である brefeldin A (BFA) の存在下でマスト細胞ならびに BMMC を培養し、細胞表面の FcεRI と FcγRIII の発現量を経時的にフローサイトメーターで測定した。

なお、本研究における動物実験はすべて、本学で定めた動物実験ガイドラインに従って遂行された。

### C. 研究成果

最近我々が樹立に成功したアレルギー特異的 IgE トランスジェニックマウスでは、高 IgE 血症 (20-50 μg/ml) とともにマスト細胞上の FcεRI の発現が正常マウスの場合に比べ 5 倍も亢進していた。一方、IgE をまったく産生していない μ 鎖ノックアウトマウスでは FcεRI の発現が正常マウスの 1/4~1/6 と非常に低いことが明らかとなった。すなわち、IgE トランスジェニックマウスでは μ 鎖ノックアウトマウスに比べ、20~30 倍も FcεRI の発現が増強していることになる。また、μ 鎖ノックアウトマウスの腹腔に 300 μg の IgE を一回投与し、3 日後に腹腔マスト細胞上の FcεRI をみても 11 倍も発現が亢進しており、すべての FcεRI は IgE と結合していることがわかった。以上のことから、FcεRI に IgE が結合することによって FcεRI の発現が劇的に亢進するメカニズムが存在することが確認さ

れた。

そこで次に、腹腔マスト細胞ならびに BMMC を用いて、IgE による FcεRI の発現亢進のメカニズムを解析した。BMMC を 1 μg/ml の IgE と 48 時間培養すると 12 倍もの FcεRI の発現亢進が認められたが、この際に、小胞体からゴルジ装置への蛋白質輸送を阻害する薬剤である brefeldin A (BFA) を共存させると、FcεRI の発現亢進は完全に抑制された。すなわち、細胞内の FcεRI があらたに細胞表面に出現するのを BFA が阻害するために、FcεRI の発現亢進がおこらなかったものと考えられる。そこで次に、IgE 非存在下で BMMC を BFA とともに培養したところ、FcεRI の発現が時間とともに激減した。一方、あらかじめ BMMC を IgE と反応させてすべての FcεRI に IgE を結合させてから、BFA と共に培養すると、FcεRI の発現低下はごくわずかであった。μ 鎖ノックアウトマウスの腹腔マスト細胞を用いた解析でも同様の結果を得た。以上のことから、IgE が結合していない FcεRI は turnover が極めて速いものに対して、IgE が結合した FcεRI はマスト細胞表面上で極めて安定であることが判明した。一方、BFA 非存在下で、新生の FcεRI が細胞内から細胞表面に表出してくる程度を調べたところ、FcεRI の発現量の高低にかかわらずほぼ一定であり、FcεRI の発現が高いほど FcεRI のインプットが増大しているわけではないことが明らかとなった。

ヒト FcεRI α 鎖を発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このマウスの腹腔マスト細胞ならびに BMMC では、マウス FcεRI のみならず、ヒト FcεRI α 鎖がマウスの FcεRI β 鎖ならびに γ 鎖と会合して細胞表面に発現している。そこでこの BMMC をヒト IgE とともに培養したところ、予想通りヒト FcεRI の発現は約 6 倍に亢進したが、一方、マウス FcεRI の発現上昇は全く見られなかった。したがって、IgE が FcεRI に結合することによって細胞内にシグナルが伝達されて、その結果 FcεRI の発現亢進が誘導されるという可能性は否定的である。さらに、FcγRIIb ノックアウトマウス由来の BMMC を用いた解析から、FcεRI と β 鎖と γ 鎖を共有する FcγRIII



では IgG 非結合状態でも細胞表面上での半減期が非常に長いことが判明した。すなわち、FcεRI と FcγRIII の α 鎖の違いが細胞表面上での動態を決定づけており、FcεRI においては α 鎖がその安定性に深く関与していることが示された。

#### D. 考察

以前、ラット細胞株 RBL-2H3 を用いた生化学的解析から、IgE 結合による FcεRI の発現亢進は主に FcεRI 分子の安定化によるものであることが示された。しかし、この場合の FcεRI の発現亢進はただか 2 倍程度であり、正常マスト細胞上で認められる 10 倍以上の強烈な発現亢進が果たしてどのようなメカニズムによって達成されるのかは不明であった。IgE 結合による FcεRI の発現亢進のメカニズムとして、主として 2 つの可能性が考えられる。そのひとつは、IgE が FcεRI に結合することによって細胞内にシグナルが伝達され、その結果、FcεRI のタンパク質合成あるいは細胞表面への輸送が促進される可能性である。もうひとつは、IgE が FcεRI に結合することによって細胞表面での FcεRI の半減期が延長して、その結果、細胞表面で FcεRI が蓄積していくという可能性である。今回の我々の研究結果から、マスト細胞における IgE による FcεRI の発現亢進は主として前者のメカニズム、すなわち IgE 結合による FcεRI の安定化によるものであることが判明した。新生の FcεRI が細胞内から細胞表面に表出してくる割合は FcεRI の発現量の高低にかかわらずほぼ一定であり、FcεRI の発現が高いほど FcεRI のインプットが増大しているわけではないこと、またひとつのマスト細胞上に同時に発現したヒトとマウスの FcεRI の発現亢進がそれぞれに対応した IgE の結合によりまったく独立しておこることなどから判断して、IgE の発現亢進が FcεRI のタンパク質合成あるいは細胞表面への輸送の促進によって引き起こされている可能性は否定的である。

FcεRI の発現亢進にともなって、マスト細胞からのケミカルメディエーターの放出が増強することが示されている。これは寄生虫な

どの病原体に対する生体防御の観点からするとおおきな利点であると考えられるが、アレルギー疾患という状況下では反対に増悪要因となりおおきな欠点となる。逆に言えば、この IgE による FcεRI の発現亢進を薬物により抑制することができれば、大変大きな治療効果が期待できる。IgE による FcεRI の発現亢進が FcεRI の安定化に起因するとなると、FcεRI を構成する 3 種類の鎖 (α 鎖、β 鎖、γ 鎖) のうちどの鎖が FcεRI の安定化・不安定化を制御しているのかが、新薬の開発の上でキーポイントとなってくる。FcγRIII は FcεRI と β 鎖と γ 鎖を共有するが、IgG 非結合状態でも細胞表面上での半減期が非常に長いことが明らかとなった。したがって、FcεRI では α 鎖がその安定化と不安定化のスイッチを担っていると考えられる。このことは、FcεRI α 鎖をターゲットとした新規アレルギー薬の可能性を強く示唆するものである。

#### E. 結語

アレルギーの増悪要因となる IgE による FcεRI の発現亢進のメカニズムを解析した結果、それが主としてマスト細胞表面での FcεRI 分子の安定化と蓄積によるものであることが判明した。さらに、その FcεRI 分子の安定化には α 鎖、β 鎖、γ 鎖のうち α 鎖が深く関わっていることが明らかとなった。アレルギー治療のターゲットとして、α 鎖のどの部分が FcεRI の安定化・不安定化の変換に重要であるかを今後さらに解析していく必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 久保秀一、松岡邦枝、鳥山 一：IgE によるマスト細胞 FcεRI の表出制御。臨床免疫, 33: 654-658, 2000
- 2) 松岡邦枝、久保秀一、鳥山 一：アレルギーのモデル動物。組織培養工学, 26: 335-340, 2000
- 3) 久保秀一、松岡邦枝、鳥山 一：アトピー性皮膚炎モデル動物-IgE トランスジェニックマウス。アレルギー・免疫, 7: 61-69,

2000

4)久保秀一、松岡邦枝、烏山一：IgE トランスジェニックマウスにおける FcεRI の高発現. アレルギー科, 10: 232-238, 2000

5)Kubo, S. Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Yonekawa, H. and Karasuyama, H. IgE stabilizes its high affinity receptor (FcεRI) on mast cells in vitro and ex vivo: The mechanism of IgE-mediated FcεRI up-regulation and its physiological meaning. *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors*. Eds. Cooper M.D., Takai, T., Ravetch, J.V. Springer-Verlag Tokyo *in press*

6)Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Rapid and drastic up-regulation of high affinity IgE receptor on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of the receptor on the cell surface. *submitted*.

## 2. 学会発表

1)Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: Rapid and drastic upregulation of high affinity IgE receptor on mast cells is induced by IgE through stabilization and accumulation of the receptor on the cell surface.

The CREST International Symposium on Immunoglobulin-like Receptor, 2000. 9. 19- 20, Sendai.

2)久保秀一、松岡邦枝、多屋長治、北村ふじ子、高井俊行、米川博通、烏山一：IgE による FcεRI 発現上昇の機構とそれに伴うマスト細胞の短期記憶の形成、第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000.11.14-16. 仙台

3)佐藤英一郎、平原一樹、和田吉弘、小林和彦、安藤洋介、松岡邦枝、久保秀一、烏山一、白石明郎：IgE トランスジェニックマウスにおける抗原特異的な三相性耳浮腫反応、第 30 回日本免疫学会総会・学術集会 2000.11.14-16. 仙台

4)久保秀一、松岡邦枝、多屋長治、北村ふじ子、米川博通、烏山一：IgE による FcεRI の安定化：FcεRI の発現制御、第 30 回アレルギー学会総会 2000.11.30.-12.2. 横浜

5)松岡邦枝、久保秀一、多屋長治、北村ふじ子、米川博通、烏山一：ヒト型アレルギーモデルマウスの樹立と解析、第 50 回アレルギー学会総会 2000. 11. 30. - 12. 2. 横浜

## G. 知的財産権の出願・登録の状況

### 出願済み特許

1.平成9年11月14日特許願

特願平 9-313989 号

発明の名称

「トランスジェニック動物」

2.平成10年11月13日国内優先出願

特願平 10-323340 号

3.米国出願 09/192.545

"Transgenic animal allergy models and methods for their use"

4.欧州出願 98309340.2-2105

"Transgenic animal allergy models and methods for their use"

小児アトピー性皮膚炎における酸化ストレスとレドックス制御に関する研究

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学医学部小児科教授

**研究要旨** 本研究の目的は、小児アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）の病態形成と炎症性疾患の基本病態とされる酸化ストレスとの関連性を明らかにし、新しい効果的な治療法を開発するための基礎データを提出することである。他のアレルギー性／炎症性疾患を有さず、AD 歴が 2 年以上で皮膚病変が安定している AD 患児 27 名（年齢は 2.8-15.0 歳）と、正常対照として性と年齢を一致させた健常児 25 名（年齢は 2.8-13.3 歳）を対象とした。早朝尿中の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（以下 8-OHdG と略す；酸化ストレスの指標）、nitrite/nitrate（以下 NOx と略す；NO 産生の指標）、Se（セレン貯蓄の指標）を計測し、両群間で比較検討した。AD 患児では正常対照に比して尿中 8-OHdG 排泄が有意に増加していた（AD の重症度と 8-OHdG 排泄との間に有意な相関は見られなかった）。逆に、AD 患児では尿中 NOx 排泄が有意に低下していた。Se の尿中排泄には差が認められなかった。今回の結果から、AD 患児において酸化ストレスが全身レベルで増強している一方、内因性の NO 産生が低下していることが示された。アンチオキシダントである NO の産生低下は酸化ストレスを増加させ、炎症の vicious cycle を形成し、AD を慢性化させる一因になっていると考えられた。また、セレンを必須構成成分とするアンチオキシダントの欠乏が患児の酸化ストレス増強に寄与している可能性は少ないと思われる。以上のことから、酸化ストレスを特異的に抑制するレドックス制御薬剤による AD 治療の有用性が示唆された。

**A. 研究目的**

アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）は小児においてよく見られるアレルギー炎症性疾患であるが、皮膚病変には多様性があり、病変形成機序には不明な点も多い。その病態生理を的確に把握することが AD に対する適切な治療法の開発、ひいては患者の quality of life の向上につながると考えられる。

本研究の目的は、小児 AD の病態形成と炎症性疾患の基本病態とされる酸化ストレスとの関連性を明らかにし、新しい効果的な治療法を開発するための基礎データを提出することである。

**B. 研究方法**

他のアレルギー性／炎症性疾患を有さず、AD 歴が 2 年以上で皮膚病変が安定している AD 患児 27 名（男 12／女 15、年齢は  $6.8 \pm 3.6$  歳、2.8-15.0 歳）と、正常対照として性と年齢を一致させた健常児 25 名（男 13／女 12、年齢は  $7.4 \pm 3.6$  歳、2.8-13.3 歳）を対象とした。AD の重症度（厚生省「アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 1999」に基づく）は軽症が 7 名、中等症が 13 名、重症が 6 名、最重症が 1 名であった。患者群の 25 名がステロイドなどの抗炎症軟膏を使用し、13 名が抗アレルギー剤を服用していた（ステロイド剤を服用している患者はいなかった）。全対象児の親に対しては、本研究の意義と方法を十分に説明した上で研究参加についての同意を得ている。

早朝尿中の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(以下 8-OHdG と略す;酸化ストレスの指標)、nitrite/nitrate (以下 NOx と略す;NO 産生の指標)、Se (セレン貯蓄の指標)を、それぞれ、ELISA 法(8-OHdG check, Japan Institute for the Control of Aging、日本)、Griess 法(Bioxytech Nitric Oxide Non-Enzymatic Assay, OXIS International, 米国)、diaminonaphthalene 法を用いて計測した。すべてのパラメータは creatinine(以下 Cr と略す;Creatinine HR-II Test kit, Wako Pure Chemical, 日本)比を用いて示した。結果は平均±SD と範囲で表した。統計学的評価は t 検定あるいは linear regression analysis を用いて行った。p<0.05 をもって有意であると判定した。

### C. 研究結果

AD 患児では正常対照に比して尿中 8-OHdG 排泄 (ng/mg Cr) が有意に増加していた(患者:28.1±15.3, 9.8-58.0 vs. 対照:17.6±9.6, 6.4-46.8, p<0.005)。AD の重症度と 8-OHdG 排泄 (ng/mg Cr) との間に有意な相関は見られなかった(軽症:25.8±15.7, 9.8-57.4, n=7;中等症:29.1±16.7, 10.1-58.0, n=13;重症:30.4±14.7, 14.4-47.8, n=6;最重症:17.6, n=1)。逆に、AD 患児では尿中 NOx 排泄 (μmol/mg Cr) が有意に低下していた(患者:2.12±1.20, 0.67-5.73 vs. 対照:3.67±2.86, 0.59-10.94, p<0.05)。AD 患者と正常対照との差は 8-OHdG (ng/ml) /NOx (μmol/ml) 比を比較することによりさらに顕著になった(患者:16.2±12.1, 1.8-43.0 vs. 対照:7.6±5.8, 1.1-21.5, p<0.005)。

一方、Se (ng/mg Cr) の尿中排泄には差が認められなかった(患者:60.1±26.7, 9.2-114.5 vs. 対照:61.4±23.9, 27.3-125.0)。なお、Cr 排泄は両群ほぼ同等であった。

### D. 考察

生理的環境では O<sub>2</sub>、NO などの活性酸素やフリーラジカルは、他のオキシダントやアンチオキシダントと共に統一のとれたレドックス制御下にある。しかしながら、炎症性疾

患などの病的環境ではオキシダント作用がアンチオキシダント作用を凌駕し、レドックス制御機転に破綻をきたし、酸化ストレス状態が引き起こされ、生体への有害作用が進行する。

AD では局所に侵潤した T 細胞、マクロファージ、好酸球や微小血管内皮細胞、ケラチノサイトなどから産生されるサイトカイン、活性酸素、フリーラジカル、組織障害性蛋白が皮膚病変形成に大きな役割を果たすと考えられている。このような環境下にある皮疹部の微小血管内皮細胞上には接着分子発現が増加し、炎症細胞侵潤が促進される。AD 患者の循環白血球は(たとえ急性増悪期でなくても)活性状態にあり、O<sub>2</sub>産生が亢進していると報告されている。このような変化は言わば炎症の vicious cycle を形成し、酸化ストレスを増強させ、AD を慢性化させると考えられている。

今回の研究において AD 患児の尿中 8-OHdG 排泄が正常対照に比して有意に増加していたことは、患者において酸化ストレスが全身レベルで増強していることを示す。この結果は、先に示した AD の病態生理を反映したものであると解釈できる。一方、AD 患児で NOx 排泄が低下していたことは内因性の NO 産生が低下していることを示す。構成型 NO 合成酵素由来の NO の作用低下が酸化ストレスを増加させることが証明されており、アンチオキシダントとしての NO の役割が注目されている。一方、急性増悪時にある成人 AD の皮疹部では、侵潤白血球や血管内皮細胞で誘導型 NO 合成酵素が誘導されていると報告されている。今回の検討で明らかとなった NO 産生低下は、基質、補因子欠乏も含めて構成型/誘導型 NO 合成酵素の活性が低下していた可能性、薬物作用も含めて病状が安定していたことなどが関与したと推測される。また、今回の検討では AD 患児にセレン排泄の低下は見られなかったため、セレンを必須構成成分とするアンチオキシダントの欠乏が患児の酸化ストレス増加に寄与している可能性は少ないと思われる。