

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研究班

平成13年度総括・分担研究報告書

平成14年4月

主任研究者 西岡 清

目 次

I 平成 13 年度総括研究報告

- 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
研究班 1
(東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学) 西岡 清

II 平成 13 年度分担研究報告

1. STAT6 Decoy による IgE 誘導性遅発型反応抑制機序の解析 9
(東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学) 西岡 清
2. 樹状細胞を用いたアトピー性皮膚炎治療に関する研究 15
(東京大学大学院医学系研究科皮膚科学) 玉置 邦彦
3. 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 19
(東京医科歯科大学大学院感染分子制御学) 烏山 一
4. 小児アトピー性皮膚炎の発症に関わる因子および発症予測・予防に
関する実験的・文献的解析 23
(福井医科大学医学部小児科学) 眞弓 光文
5. 小児アトピー性皮膚炎の病態における酸化ストレスおよびレドック
ス制御機構の関与に関する研究 27
(福井医科大学医学部小児科学) 眞弓 光文
6. アトピー性皮膚炎とレプチンに関する研究 31
(浜松医科大学皮膚科学) 瀧川 雅浩

7. アトピー性皮膚炎患者線維芽細胞におけるエオタキシン産生パターンとその制御	37
(長崎大学医学部皮膚科学) 片山 一朗	
8. アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚病変部のT細胞レセプターの検討	41
(聖マリアンナ医科大学皮膚科学) 相馬 良直	
9. アトピー性皮膚炎の治療薬としての抗酸化剤 (CX-659S) ：表皮角化細胞とランゲルハンス細胞への作用について	47
(九州大学大学院医学研究院皮膚科学) 古賀 哲也	
10. T細胞のホーミング・レセプター発現の制御機構の解明	53
(杏林大学医学部皮膚科学) 塩原 哲夫	
III 研究成果の刊行一覧	57
IV 班員名簿	63

【 I 】

平成 13 年度総括研究報告

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
研究班

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 平成 13 年度の活動において以下のごとき価値ある研究成果が得られた。その成果は、①アトピー性皮膚炎におけるアレルギー炎症の病態解析に基づく治療法開発の標的の策定、②アトピー性皮膚炎の免疫反応の解析と治療法の開発および③アトピー性皮膚炎の治療薬の開発の3分野の分けることが出来る。

1. アトピー性皮膚炎のアレルギー炎症における浸潤細胞の解析から、CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) 陽性 T リンパ球の皮膚への浸潤が、soluble E-selectin、E-selectin ligand (ESL) の発現と連携しており、それらの発現に関与している Fucosyl transferase VII (Fuc-TVII) の活性が重要な役割を果たしていたことから、Fuc-TVII が治療薬開発の標的となりうること。
2. IgE 遺伝子 transgenic mouse の高 IgE 血症下では、肥満細胞状の高親和性受容体が安定化し、この安定化に IgE の α 鎖が関与していること。また、このような安定化した状態では、肥満細胞に結合した IgE の作用が長期に保存されたことから、IgE の α 鎖発現調節が治療薬開発の標的となること。
3. IgE 遺伝子 transgenic mouse の皮膚反応に、炎症反応が長期に持続する第 3 の反応を発見したこと。
4. アトピー性皮膚炎患者の皮膚線維芽細胞が、サブスタンス-P、ヒスタミンと IL-4 の存在下でエオタキシン産生の増強が起こること。また、この形質が何らかの遺伝的背景を持っていること。
5. アトピー性皮膚炎で、酸化ストレス-レドックス制御を検討し、本症患者に NOx 産生不全があることから、抗酸化薬の治療薬としての可能性を示唆したこと。
6. 臍帯血の IL-13 産生がアトピー性皮膚炎発症予知因子となること。

7. アトピー性皮膚炎患者の皮膚浸潤細胞が血中のTリンパ球と同じT細胞受容体を持っていることをモデルマウスを用いた実験で証明し、抗原ペプチドワクチンによる治療法の可能性を示したこと。
8. 免疫反応の Th1-Th2 バランスにランゲルハンス細胞が重要な役割を持っていること。ランゲルハンス細胞に加わるサイトカインの作用によって Th1-Th2 の偏位が起こること。サイトカインのうち TGF- β が、ランゲルハンス細胞に作用して Th1 型に変位させること。
9. アトピー性皮膚炎患者で血中レプチンが低値となり、この現象が本症の免疫反応の Th2 型化に関与している可能性があること。
10. アトピー性皮膚炎のアレルギー炎症反応モデルである IgE による遅発型反応が、IL-4 受容体のシグナル伝達を司る STAT-6 欠損マウスで抑制されることから、STAT-6 のおとり (decoy) 核酸を作成して、遅発型反応を抑制し、アトピー性皮膚炎の治療薬になる可能性を明らかにしたこと。
11. 抗酸化薬 CX-659S が、表皮細胞からの GM-CSF 産生を抑えてランゲルハンス細胞機能を抑制することによってアレルギー炎症を抑制することを明らかにし、抗酸化薬がアレルギー炎症の治療薬となることを示したこと。

分担研究者

玉置邦彦	東京大学大学院医学系 研究科皮膚科学 教授
鳥山 一	東京医科歯科大学大学院 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学 教授
滝川雅浩	浜松医科大学皮膚科学 教授
真弓光文	福井医科大学小児科学 教授
片山一朗	長崎大学医学部皮膚科学 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
相馬良直	聖マリアンナ医科大学 皮膚科学 助教授

A. 研究目的

本研究班の研究目的は、患者の増加傾向が著しい難治性アトピー性皮膚炎の病因・病態を解析し、アトピー性皮膚炎の新しい治療法を開発することにある。アトピー性皮膚炎の病態として①IgE 抗体過剰産生に基づくアレルギー炎症と②皮膚バリア機能異常による皮膚の易刺激性に基づく非特異的炎症が指摘されている。後者の皮膚易刺激性に対しては、すでに、スキンケアを中心とした治療法が確立され、日常診療に繁用されているが、前者のアレルギー炎症は、皮膚バリア機能異常によって発症した皮膚炎症反応を増幅、遷

延化し、アトピー性皮膚炎の難治化の中心的役割を果たしている。本研究班では、難治化したアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を行うため、アトピー性皮膚炎の難治化の要因となっているアレルギー炎症の病因・病態を解析し、得られた知見に基づく新しい治療法を開発することを目的として活動している。

B. 研究方法 C. 研究結果

1) アレルギー炎症の病態解析と治療法開発への標的の方策

アトピー性皮膚炎の炎症局所に浸潤する T リンパ球は CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) を発現しており、CLA 陽性 T リンパ球がアレルギー炎症の重要な役割を果たすとされ、治療法開発の標的の一つとなっている。しかし、果たして CLA が新しい治療法開発の標的となりうるのかについてはまだ多くの問題点が残している。塩原班員は、皮膚局所に CLA 陽性 T 細胞が多く浸潤するが、患者末梢血中の T 細胞の多くも CLA を発現している事に注目し、CLA 発現調節機構の解析を行った。CLA の発現には Fucosyl transferase VII (Fuc-TVII) が関与し、この酵素は CLA に糖鎖を添加し、E-selectin との結合が可能になる。Fuc-TVII は、CLA のみでなく、E-selectin ligand (ESL)

にも糖鎖を付与する役割を持っており、IL-12 により発現が増強し、IL-4 により発現が減弱する。Fuc-TVII によって CLA の発現が増強されるとすると、アトピー性皮膚炎の炎症局所に大量に放出される IL-4 とのかかわりで矛盾が生じる。そこで naive T 細胞を活性化し、E-selectin と ESL、CLA の発現を経時的に観察した。T 細胞活性化の過程で、E-selectin が発現され、ついで ESL の発現が起こる。CLA の発現は T 細胞が resting stage に入った時点で起ることがわかり、T 細胞の CLA 陽性化は T 細胞の浸潤とは別の現象で、局所への浸潤には E-selectin と ESL の反応が関与していることを明らかにした。この結果から、アレルギー炎症を阻止するためには CLA を標的とするのではなく、E-selectin-ESL あるいは Fuc-TVII を標的とすべきであることを提案した。

鳥山班員は、IgE 遺伝子 transgenic mouse が高 IgE 血症を示し、このような状態では、肥満細胞表面の FcεRI が IgE と結合することによって安定化し、かつ、この安定化の鍵は FcεRI の α 鎖が担っていたことから、IgE の α 鎖の発現調節によって治療薬の開発が可能であることを示唆した。さらに、FcεRI の動きを解析するため、マウスに IgE を静脈投与したところ、IgE は 1 週間以内に急速に血中から消

失した。しかし、血中 IgE が消失した状態のマウスに抗原投与を行ったところ、アレルギー反応が引き起こされた。すなわち IgE 炎症のメモリーは1ヵ月以上にわたって残存し、異なった抗原特異性をもつ IgE を追加投与してもメモリーはかわらず持続していることを明らかにした。この現象は、アレルギー炎症の遷延化を考える上で重要な知見である。また、鳥山班員が今年の成果で発見した IgE による第3相反応である遷延化する皮膚反応との関連性で興味深いものであり、また、アレルギー炎症を抑制する治療法を開発する上で考慮すべき重要な知見といえる。

片山班員は、昨年に引き続きアトピー性皮膚炎患者の線維芽細胞からのエオタキシン産生を検討した。アトピー性皮膚炎患者の皮膚には、Th2サイトカインである IL-4 が多く放出されており、これに表皮細胞から産生されるサブスタンス P と肥満細胞からのヒスタミンの作用によって、線維芽細胞がエオタキシン産生を亢進する。エオタキシンは局所に炎症細胞を引き寄せ、アレルギー炎症を増幅・拡大して炎症の遷延化をきたす。アトピー性皮膚炎の線維芽細胞は、健常者線維芽細胞に比して、細胞の継代数の増加によるエオタキシン産生の減弱が見られず、また、患

者の健常皮膚から得た線維芽細胞にも同様のエオタキシン産生の亢進が持続することを見い出しており、本症患者の線維芽細胞のエオタキシン産生機構にも何らかの遺伝的背景が存在することを示した。

真弓班員は、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ついて検討し、すでにアトピー性皮膚炎患者で、酸化ストレスの防御を行う役割を持つ NOx の産生が減少していることを見い出している。そこで、アトピー性皮膚炎患者に感染症が併発した場合のレドックス制御を検討したところ、やはり、NOx の合成不全が認められ、これがアトピー性皮膚炎の難治化に大きく関わりを持っている可能性を示唆した。さらに、血管内皮細胞の接着分子は、NOx 放出薬によって発現が抑制され、抗酸化薬によって TNF などのサイトカインにより引き起こされる血管内皮細胞の接着分子発現の亢進が抑制されることを示し、アトピー性皮膚炎でのレドックス制御を行う NOx 合成不全がアトピー性皮膚炎の病態に大きく関連しており、この側面からの治療薬の開発の必要性を示した。

また、アトピー性皮膚炎の発症予知を行う指標を見つけるため、臍帯血 T 細胞からの IL-13 産生を検討した。臍帯血 T 細胞の IL-13 産生と両親のア

トピー家族歴、2ヶ月以上続く湿疹の間に特異性 84%、感度 55%の相関がみられ、臍帯血T細胞のIL-13産生がアトピー性皮膚炎発症予知の指標となることを明らかにした。

2) アトピー性皮膚炎の免疫反応の解析と治療法の開発

相馬班員は、昨年度に続き、皮膚局所へ浸潤するT細胞のクロナリティーを検討し、皮膚病巣から抽出したmRNAの解析によるT細胞受容体(TCR)のクロナリティーと患者が持つ抗原特異的末梢血T細胞のTCRのそれが一致することを示した。さらに、ダニ抗原で感作したマウスにダニ抗原で誘発した皮膚炎を同様に検討し、皮膚と脾臓細胞のTCR解析結果から、オリゴクローナルなT細胞が炎症局所に浸潤していることを明らかにした。この解析結果をもとにして、相馬班員は、抗原ペプチドによるワクチン療法の可能性を示唆している。

玉置班員は、アトピー性皮膚炎に見られるTh2優位の免疫反応をTh1優位の反応に偏位させる方法を、抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞(LC)機能の調節によって開発することを試みている。すでに、LCが、抗CD40抗体とインターフェロンの存在下でIL-12を産生し、GM-CSF

の添加によってIL-12産生(Th1型反応への偏位)が抑制されることを明らかにしている。さらに、TGF- β はGM-CSFによるLCのIL-12産生低下を解除することを明らかにしている。そこで、LPS刺激によるIL-6、IL-12産生を、脾臓樹状細胞(DC)、腹腔マクロファージと比較したところ、DC、マクロファージはともに反応したが、LCは、LPS刺激下でも、IL-6、IL-12産生ともにみられず、LCの抗原提示細胞としての特異性を明らかにした。さらに、LCをTGF- β 処理した後ナイーブT細胞と培養し、産生されるサイトカインを検討したところ、T細胞はインターフェロン γ を多く産生をし、IL-4を少なく産生した。このことは、LCがその存在する環境によってIL-12産生量を変化させること、TGF- β 処理によってTh1型の免疫反応へと偏位させることができ、LC操作による治療法開発の可能性が示すものである。

滝川班員は、レプチンによるTh1型免疫反応の活性能に注目し、アトピー性皮膚炎患者における血清中レプチンの動態を検討し、アトピー性皮膚炎患者の重症例で血中レプチンの低下を見いだした。血中レプチン/BMI (body mass index) 比は、血清IgE値と皮膚症状の重症度を示すSCORAD値と逆相関した。この結果

は、レプチン分泌は、アトピー性皮膚炎に加わる種々のストレスによって影響されるものであり、アトピー性皮膚炎でのレプチンの低下は、免疫反応を Th2 型へ偏位させ、より重症化を招来する因子の一つとなっていることを示すものである。

3) アトピー性皮膚炎の新しい治療薬の開発

アトピー性皮膚炎の新しい治療薬の開発として、西岡班員は、すでに開発した IgE 投与によるアレルギー炎症モデルにおける遅発型反応が、IL-4 受容体からの転写因子である STAT6 の欠損マウスで抑制されたことから、STAT6 のおとり (decoy) 核酸医薬を調整し、その投与によって、IgE によって引き起こされる遅発型反応部位での炎症細胞浸潤と IL-4、IL-5 の産生が抑制され、炎症反応が抑制されることを示した。この成果は、STAT6 のおとり核酸医薬がアトピー性皮膚炎でのアレルギー炎症抑制のための治療薬となりうることを示すものである。

古賀班員は、すでに、抗酸化剤である CX-659S がランゲルハンス細胞機能を抑制することによってアレルギー性接触皮膚炎を抑制することを明らかにしており、その作用機序の解明を昨年引き続いて行った。

CX-659S は、高濃度では LC の IL-1 β 産生を抑制したが、これは薬理的濃度よりも遙かに高いことから、さらに検討を加え、CX-659S が薬理的濃度で表皮細胞の GM-CSF 産生を抑制し、その結果、LC 機能を抑制してアレルギー炎症を抑制していることを明らかにした。CX-659S は治験の段階に入りつつあることも明らかにし、治療薬として臨床使用の可能性を示した。

D. 考察 E. 結論

平成 13 年度のアレルギー炎症の解析から、①アトピー性皮膚炎の炎症局所への T リンパ球浸潤を調節している因子として Fucosyl transferase VII が標的となること、②IgE を介する炎症反応にメモリー現象が存在して炎症反応の遷延化をきたすこと、③線維芽細胞からのエオタキシン産生亢進がアトピー性皮膚炎の炎症の遷延化を来すこと、また、この形質に遺伝的背景が考えられること、④アトピー性皮膚炎患者において NOx 合成不全が潜在し、炎症反応の遷延化をきたすこと、⑤アトピー性皮膚炎発症予知因子として臍帯血 T リンパ球の IL-13 産生が指標となることが明らかになった。これらの治療法開発の標的を中心に、アトピー性皮膚炎治療法の開発に向かった研究を継続す

る予定である。また、アトピー性皮膚炎の免疫現象として、①アトピー性皮膚炎の炎症皮膚局所に抗原特異的オリゴクローナルなT細胞が浸潤していること、②ランゲルハンス細胞のサイトカイン処理によって Th1型免疫反応への偏位が可能であることが明らかとなり、新しい治療法開発への可能性を示唆する知見と考えられる。また、③アトピー性皮膚炎患者の血清レプチン量に低下は、非免疫学的にとらえられている現象が免疫現象と複雑に絡み合っていることを示唆する知見であり、本症の病態を考える上で興味あるものである。

さらに、新しい治療薬の開発として、①STAT6 のおとり (decoy) 核酸医薬によるアレルギー炎症の抑制と②抗酸化薬 CX-659S の治療薬としての検討結果並びに臨床治験への進行は、アトピー性皮膚炎の新しい治療薬開発を可能にするものであり、本研究班の大きな研究成果であると考ええる。これらの薬物の臨床応用に向かって今後の研究活動を継続する予定である。

【Ⅱ】

平成 13 年度分担研究報告

STAT6 Decoy による IgE 誘導性遅発型反応抑制機序の解析

分担研究者 西岡 清

東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野 教授

研究要旨 STAT6 Decoy を組み込んだ liposome を筋肉内もしくは皮下に投与することにより IgE 誘導性遅発型反応が抑制できることを確認した。まず、STAT6 Decoy liposome を皮下投与した後、DNP-IgE 感作マウスの耳介に DNFB を塗布した惹起部において、STAT6 の DNA への結合が阻害されていることを Gel shift assay で証明した。また、STAT6 Decoy liposome 投与群では、Scramble Decoy liposome 投与群と比較して、惹起部の皮膚の抽出物中の Th2 サイトカインレベルの低下と、惹起部における好酸球、好中球、リンパ球の浸潤の減弱が見られた。以上より、STAT6 Decoy liposome がアトピー性皮膚炎の治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

前回の班会議では、抗原特異的 IgE 抗体（抗 DNP-IgE 抗体）により誘導した遅発型反応の発症機序を明らかにするため、STAT6 欠損マウスとワイルドタイプ(WT)のマウスに抗 DNP-IgE 抗体を静脈投与した後、耳介に DNFB 塗布により誘導した皮膚反応を経時的に比較検討した結果を報告した。その結果、抗原特異的 IgE により誘導された耳介腫脹反応は即時型反応、遅発型反応ともに Stat6 欠損マウスでは WT に比べて減弱していることが明らかになった。今回、

STAT6 の核 DNA への結合を制御することによって遅発型反応が制御できるか否かを明らかにするため、STAT6 のおとり型核酸医薬(Decoy)による IgE 誘導性遅発反応の抑制を検討した。

B. 方法

HSV-liposome に組み込んだ STAT6 Decoy, Scramble Decoy を、Balb/C マウスの皮下、筋肉内、腹腔内に投与すると同時に、抗 DNP-IgE 抗体の静脈内投与による感作を施行した。感作 24 時間後、耳介に DNFB を塗布す

ることにより惹起した耳介腫脹反応を経時的に比較検討した。まず、STAT6 Decoy liposome が STAT6 の核への結合を阻害するか否かを明らかにするため、Balb/C マウスの脾細胞を STAT6 Decoy liposome, Scramble Decoy liposome と 6 時間 37 度 C で培養後、さらに IL-4 で刺激した後 gel shift 法を用いて解析した。また、惹起した耳介皮膚抽出物の Stat6 の核への結合も gel shift で解析した。さらに皮膚病変部の炎症反応を解析するため、腫脹した耳介の凍結切片を用いて浸潤細胞 (T 細胞、好酸球、好中球、肥満細胞) を病理組織学的に、また、IL-4、IL-5 などのサイトカイン量は ELISA 法を用いて解析した。

C. 結果

まず、作製した STAT6 Decoy liposome が STAT6 の核への結合を阻害することを明らかにするため、Balb/C マウスの脾細胞を STAT6 Decoy liposome, Scramble Decoy liposome で処理した後 IL-4 で刺激し、gel shift 法を用いて解析した。STAT6 Decoy liposome 処理により STAT6 の核への結合が抑制された。また、in vivo で皮下に STAT6 Decoy liposome を投与しても、皮膚の浸潤細胞における STAT6 の核への結合が阻止できることも明らかになった (図 1)。STAT6

Decoy liposome、Scramble Decoy liposome を皮下、筋肉内、腹腔内に投与した Balb/C マウスに、さらに抗 DNP-IgE 抗体の投与による感作を行い、24 時間後の耳介腫脹反応を経時的に比較検討したところ、STAT6 Decoy liposome を皮下、筋肉内に投与したマウスでは、Scramble Decoy liposome 投与マウスに比較して、惹起 1 時間後の即時型反応は有意な差は見られなかったが、24 時間後の遅発型反応では、耳介腫脹の有意な減弱が認められた (図 2、3)。惹起 24 時間後の遅発型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検討を行った。その結果、STAT6 decoy liposome 投与マウスでは、scramble Decoy liposome 投与マウスに比較して、単核細胞、好酸球、好中球の浸潤が有意に減少していた (図 4)。さらに惹起皮膚局所のサイトカインを解析したところ、ELISA による蛋白レベルでの解析では、WT マウスに比較して、STAT6 Decoy liposome 投与マウスの惹起部で IL-4、IL-5 共に減少していた (図 5)。

D. 考案

IL-4 シグナル伝達系に重要な役割を果たす STAT6 の発現を STAT6 Decoy liposome で抑制することにより、抗

原特異的 IgE 抗体で誘導される遅発型反応を制御できることが明らかになった。また、惹起 1 時間後に誘導される即時型反応は、STAT6 Decoy liposome 投与マウスで軽度減少していたが、その差に有意差はなく、即時型反応に対して STAT6 Decoy liposome は抑制作用を発揮しないと考えられた。病理組織学的な解析で、STAT6 Decoy liposome 投与マウスの惹起 24 時間後の反応部位に好酸球、好中球の浸潤がほとんど認められないことから、マスト細胞などからのケモカイン、サイトカインの分泌に STAT6 が関与している可能性が考えられる。また、Scramble Decoy liposome 投与マウスの惹起 24 時間後の反応部位では IL-4、IL-5 が産生されていたが、STAT6 Decoy liposome 投与マウスではそれらサイトカインの産生はほとんど認められなかった。この結果は、遅発型反応に IL-4、IL-5 依存性の Th2 細胞の関与を示唆するものと考えられる。今後、免疫組織学的検討を行い、種々のケモカイン、Th2 サイトカインの産生細胞を明らかにする必要がある。

E. 結論

STAT6 Decoy liposome の皮下、筋肉内投与により STAT6 発現を調節することにより、抗原特異的 IgE 抗体

誘導性の遅発型反応が抑制できた。このことは将来、STAT6 Decoy liposome を投与することによりアトピー性皮膚炎の皮膚病変を治療できる可能性を示唆する結果と考えられた。

F. 研究発表

1) 研究論文

- 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-1a through NF-kB 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
- 5) Igawa K, Yokozeki H, Miyazaki Y, Minatohara K, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Topical glucocorticoids application induced an augmentation in the expression of IL-1 α while inhibiting the expression of IL-10 in the epidermis in murine contact hypersensitivity. Clin. Exp. Allergy 31:485-494, 2001
- 6) Obi M, Miyazaki Y, Yokozeki H, Nishioka K: Allergic contact dermatitis due to guava tea. Contact dermatitis 44:116,2001
- 7) Yokozeki H, Watanabe K, Igawa K, Miyazaki Y, Katayama I, Nishioka K: gd T cells assist ab T cells in the adoptive transfer of contact hypersensitivity to para-phenylenediamine. Clin. Exp. Immunol. 125:351-359,2001
- 8) 横関博雄、呉 明花 : STAT6 欠損マウスを用いた IgE 関与遅発型反応の発症機序の解析、臨床免疫,36(4):547-551, 2001
- 9) 横関博雄 : 遅延型アレルギーにおける STAT6 の関与 臨床免疫,36 (2) :260-265,2001
- 2) 学会発表
- 1) 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. The 61st SID, 2000
- 2) 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. The 30th annual meeting of ESDR, 2000
- 3) Igawa K, Yokozeki H, Miyazaki Y, Minatohara K, Satoh T, Katayama I, Nishioka K: Topical glucocorticoids application induced an augmentation in the expression of IL-1 α while inhibiting the expression of IL-10 in the epidermis in murine contact hyper-sensitivity. The 26th Annual Meeting JSID, 2001

G.知的財産の出願、登録の現況

なし



図 1

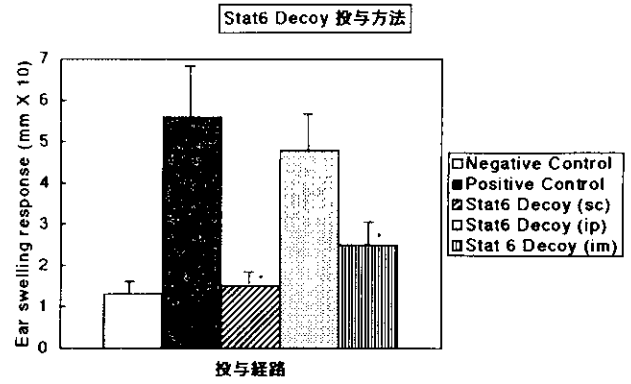


図 2

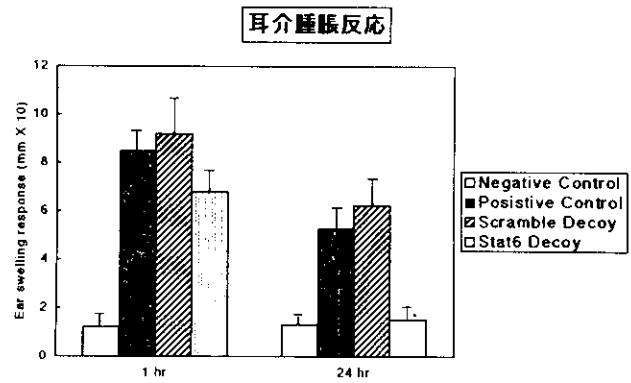


図 3

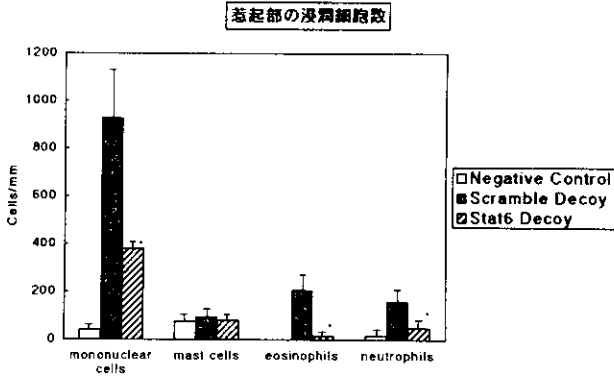


図 4

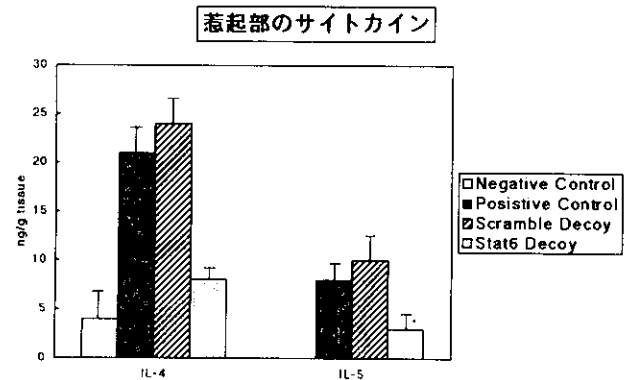


図 5

図 1. Gel shift assay による STAT6 の DNA 結合能の解析

- 1 : 正常皮膚、 2 : DNP-IgE 感作マウスの惹起部皮膚、 3 : STAT6 Decoy 10mM 投与
- 4 : STAT6 Decoy 5mM 投与、 5 - 7 : 抗 STAT6 抗体による supershift
- 8 : cold STAT6 OND による阻害

図 2. STAT6 Decoy の投与方法による抑制効果の検討

図 3. STAT6 Decoy 投与により 24 時間後の遅発反応のみ抑制

図 4. 惹起部皮膚における浸潤細胞数の検討

図 5. 惹起部皮膚抽出物のサイトカイン量の検討

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

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（AD）は、その多くは高 IgE 蹴血症を伴い、慢性に経過する湿疹性病変である。AD は急性湿疹部位は Th2 であるが、慢性湿疹部位では Th1 であるとする考え方が提示されている。しかし、我々が Th2 ケモカインである TARC, MDC およびその受容体である CCR4 の発現について検討した限りでは、Th2 に偏位した疾患であることが示唆されている。一方、表皮に存在する樹状細胞（DC）であるランゲルハンス細胞（LC）の IL-12 産生について検討してみると、GM-CSF によって LC からの IL-12 産生が強く抑制されるのに対し、TGF- β によって IL-12 産生は LC からの IL-12 産生が強く抑制されるのに対し、TGF- β によって IL-12 産生は増強されることが明らかとなった。そこで、LC を TGF- β 存在下で培養することによって Th1 を誘導できるか否かについて検討してきた。その結果、OVA トランスジェニックマウスを用いた研究によって *in vitro* では Th1 の誘導が可能である結果が得られた。現在、この条件下で *in vivo* でも Th1 の誘導が可能であるか否かについて検討を進めると共に、DC の分化に影響を与えるとされている LPS などによって刺激した場合の IL-12 産生についても検討し、TGF- β と同様 Th1 が誘導される条件を検討している。

A. 研究目的

皮膚の表皮に存在するランゲルハンス細胞（LC）は表皮細胞（EC）の 1~3%を占める細胞である。LC は、樹状細胞（DC）に属するとされており、強い抗原提示能を有する抗原提示細胞（APC）である。酵素処理に

よって単離した直後の LC (fLC) は、immature DC であり、培養 2-3 日後の LC (cLC)は matureDC であるとされている。我々は、マウス表皮から LC を 95%以上の純度で採取し、研究を進めている。（J Invest Dermatol, 113 : 1021, 1999 J. Lcukocyte

Bio,66:28,1999). 本研究は、このようにして採取した LC を、アトピー性皮膚炎 (AD) の治療に用いる可能性を検討しようというものである。AD のモデルマウスとされている NC/Nga マウスにおいては皮膚炎局所で、Th₂ ケモカインである TARC, MDC やその受容体 CCR4 が強発現していることは既に報告した (J Clin Invest 104:1097,1999)。このことは、AD が Th₂ にシフトした病態であることを示唆している。そこで、マウス LC によって Th₁ を誘導する条件をつくり、それを in vitro に応用しようというものである。

B.C.研究方法と結果

①BALB/c マウス LC を採取し、in vitro で抗 CD40+INF+ γ 刺激を加え、培養上清中の IL-12p40 を測定する。この IL-12p40 は bioactive であることは 2D6 cell assay で証明してある。②ここに GM-CSF を加えると、LC からの IL-12 産生はほぼ完全に抑制される (J Immunol 164:5113,2000)。③それに対し、LC の分化に重要とされる TGF- β を加えると逆に LC からの IL-12 産生は増強され LC からの IL-12 産生は GM-CSF と TGF- β のバランスによって決定される。(Eur J Immunol 31:294, 2001)
④このように異なる刺激によって、LC

からの IL-12 産生が修飾されることが明らかとなったので更に LPS 刺激による IL-12 産生と IL-6 産生への影響を脾臓 CD11c+DC と腹腔 m Φ について行なった。その結果、低濃度 LPS 刺激では(1ng/ml)m Φ の IL 産生も IL-6 産生も強く誘導され、DC では産生が誘導されたが、それほど強くはなかった。しかし、LC ではいずれも誘導はされなかった。興味あることに、TGF- β も LPS も LC からの IL-6,IL-12 産生に影響しなかったが、m Φ では LPS による IL-6 や IL-12 産生を TGF- β は抑制した。⑤更に、LC を in vitro で TGF- β 刺激した後、naïve T 細胞と共に培養し、培養上清中のサイトカインを測定し Th₁/Th₂ への誘導について検討した。このために、①LC は OVA ペプチド (323-339) 存在下で α CD40 又は α CD40+TGF- β で培養後、②OVA(323-339)特異的 TCR を発現させたトランスジェニックマウス由来の CD4+CD62Lhigh T 細胞と共培養し、IL-2,IL-4,IFN- γ を測定した。その結果、TGF- β 処理群では IFN- γ 産生を多し IL-4 を少なく産生した。一方、IL-2 の産生には差がみられなかった。

(倫理面への配慮)

以上の研究遂行中は、動物愛護の精神に則って実験を行なった。

D.E.結論と考察

このように、LC からの IL-12 産生は、LC への刺激（あるいは LC の置かれた微少環境）によって異なることが示唆された。そして⑤からは TGF- β 処理した LC を用いて in vitro において naive T 細胞から Th₁ 細胞を誘導できる可能性が示されたと考えている。しかし、②～④にみるように LC の刺激によって、その outcome は異なるため更に詳細な検討が必要と考えられた。既に我々のヒト AD、ヒトケラチノサイトの検討からヒト AD は Th₂ にシフトした病態であることが示唆されており更に研究を進めることにしている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K. TGF- β upregulates IL-12 production by mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 31:294-300,2001
- 2) Tamaki K, Sugaya S, Tada Y, Yasaka N, Uchara M, Nishimoto M, Nakamura K. Epidermal and dermal gamma-delta T cells. *Chem Immunol.* 79:43-51,2001
- 3) Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Nakagawa H, Tamaki K. Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-3 and is inhibited by dexamethasone and IL-3 and is inhibited by dexamethasone and 2002
- 4) Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Kim SS, Yamada Y, Kawasaki H, Tamaki K, Furue M. Expression of CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes in vitro-upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci.* 25:229-35,2001
- 5) 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 Immunology* 164:5113-9,2000
- 6) Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Toyama K, Hattori N, Okochi H, Yamada H, hirai K, Tamaki K, Furue M. Elevated levels of cotaxin and interleukin-5 in blister fluid of bullous pemphigoid: correlation with tissue eosinophilia. *brit J Dermatol.* 143:112 -6,2000
- 7) Tamaki K. Antipruritic effect of macrolide antibiotics. *J Dermatol.* 27: