

分泌され、皮膚肥満細胞からのヒスタミンの遊離、炎症細胞の遊走、サイトカインの作用増強など多様な生物活性を示すが、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚炎症における神経内分泌的な側面からの増幅因子としても重要な役割を果たしていると考えられる。我々は既に SP が皮膚の角化細胞、線維芽細胞からも遊離されることと、SP 及びヒスタミンが正常の皮膚線維芽細胞における Th2 炎症の重要なメディエーターであるエオタキシン産生を増強することを報告している。本研究は、アトピー性皮膚炎患者由来の皮膚線維芽細胞からのエオタキシン産生に対する SP の働きと、ヒスタミンの IL4 誘導性エオタキシンへの増強効果の機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

アトピー性皮膚炎患者と健常人の同意を得て皮膚を生検し、線維芽細胞を初代から培養した。継代 2~9 の各線維芽細胞を用いて、IL4 存在下で SP、ヒスタミンにて刺激し、その上清中のエオタキシン蛋白を ELISA 法で測定した。同時に細胞も回収し、エオタキシン mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。さらに IL4 受容体の発現の変化を検討するため、各刺激後の FACS 分析を行った。

C. 研究結果

上記の刺激に対しいずれの細胞においても継代を続けるにつれ、エオタキシン産生は減少する傾向が見られた。IL4 存在下で SP とヒスタミンを添加した結果、継代 2~3 と 4~5 のアトピー性皮膚炎と健常人由来の線維芽細胞において、IL4 単独刺激群よりも SP、ヒスタミンを加えた群でエオタキシン産生が強く見られた。さらにいずれの刺激に対してもアトピー性皮膚炎由来の線維芽細胞でのエオタキシン産生は健常人由来の細胞より増強した。継代 4~5 の各細胞を用いて FACS 分析を行った結果、アトピー性皮膚炎由来の細胞では上記の刺激に対する IL4 受容体の発現が増強した。また継代 9~10 のアトピー性皮膚炎由来の細胞においては多量のエオタキシン産生機構を維持したが、健常人の細胞ではその産生量は著しく減少した。さらにエオタキシン mRNA の発現パターンにおいても同様な結果が得られた。

D. 考察

我々はストレスなどによって神経終末からのみ遊離されると考えられる SP が非神経組織（表皮細胞と線維芽細胞）からも遊離されることと、正常皮膚線維芽細胞における SP とヒ

スタミンがエオタキシン産生を増強することを報告した。このことより、神経のみならず非神経細胞からも遊離されると考えられる SP とアレルギー炎症に深く関与しているヒスタミンの、Th2 炎症の重要なメディエーターであるエオタキシン産生への増強効果が明らかになった。今回、我々はアトピー性皮膚炎におけるストレスと Th2 リンパ球性の炎症との関係を明らかにするため、アトピー性皮膚炎患者と健常人の線維芽細胞を用いてエオタキシン産生を検討した。継代 1~10 間の各細胞においてはエオタキシン産生量は継代による減少は認められなかったが、アトピー性皮膚炎由来の細胞で健常人より多量のエオタキシン産生が見られた。この結果は継代によって細胞表面に存在している IL4 受容体発現が減少することによるものと考えられる。次に IL4, SP, ヒスタミンによる IL4 受容体発現の増強を確認するため、FACS 分析を行ったところ、いずれの細胞においても刺激後の発現増強が見られたが、特にアトピー性皮膚炎線維芽細胞でより強い傾向が見られた。継代 9~10 の細胞においては、アトピー性皮膚炎由来の細胞は多量のエオタキシン産生力を維持したが、健常人の細胞ではその産生力は著しく減少した。

以上より IL4, SP, ヒスタミン刺激に対して、アトピー性皮膚炎由来の線維芽細胞では健常人の細胞と比して、高いエオタキシン産生力を維持、IL4 受容体の発現増強と遺伝多型などの機序を介してエオタキシン産生を増強し、アレルギー性の炎症に深く関与している可能性が考えられた。

E. 結語

アトピー性皮膚炎由来の線維芽細胞では健常人由来細胞より高いエオタキシン産生力を持っている可能性と、IL4, SP, ヒスタミンなどアレルギー性メディエーターに対する感受性が高い可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bae SJ, Tanaka Y, Ogawa F, Takenaka M, Hamasaki Y, Shimizu K, Katayama I: Inhibitory effect of cetirizine on histamine-induced cotaxin production in normal human fibroblasts. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2002; 63: 128-140
- 2) Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamasaki Y, Shimizu K, Katayama I: Substance P induce preprotachykinin-A mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int*

Arch Allergy Immunol, 2002: in press

3) Bac SangJae, 浜崎洋一郎、片山一
朗: 正常ヒト線維芽細胞からのヒス
タミン誘導性エオタキシンに対する
epinastine の抑制効果. 治療と診断,
2002: in press

G. 知的所有権の所得状況

なし

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

分担研究者 相馬良直 聖マリアンナ医科大学皮膚科学教室 助教授

研究要旨 我々は RT-PCR/SSCP 法を用いてアトピー性皮膚炎（以下AD）患者の皮膚病変にオリゴクローナルなT細胞の集積が存在することを報告した。今回、AD類似皮膚炎発症モデルマウスである NC/Nga を用いて同様の検討を行った。同マウスに自治医科大学、医動物学教室、松岡らの方法に従い自治医科大学にて作成されたヒョウヒダニ抽出抗原液（以下D液）300mg/ml を背部皮膚に3日間毎に8週間、塗布した。8週間飼育後、背部皮膚に紅斑、粗糠状落屑、苔癬化局面を呈してきた。いわゆるAD類似の病像と考えられた。同マウスの病変部皮膚に同一のT細胞クローンの誘導があるか RT-PCR/SSCP 法を用いて比較検討した。各々異なる2箇所皮膚病変部に一部のTCRのV β 領域ファミリーにおいて両検体間で同一の泳動度を示すバンドが存在した。脾臓にても同一のクローンの集積を認めた。以上より NC/Nga マウスの誘発皮膚炎で全身的免疫反応が発生し、皮膚病変に抗原特異的T細胞が集積し、均一な反応が発生し、これら集積しているT細胞がその病態の形成に関与している可能性があると考えられた。

A.研究目的

我々はこれまで免疫反応の中心であるTCRに注目して、病変部、あるいは末梢血中のリンパ球集団で集積しているクロナタイプを検出するシステム(RT-PCR/SSCP)を開発した。これを用い我々は *in vitro* で特異抗原刺激によって一定のT細胞クロナ

タイプが増加してくることを観察し得た。これまで、この方法を用いAD患者の皮膚病変にてオリゴクローナルなT細胞の集積が認められると報告した。同一の患者の末梢単核球分画を精製ヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 抗原で刺激することにより Dp 抗原特異

的T細胞クローンを誘導し、AD患者皮膚病変と比較し、オリゴクローナルな集積をするT細胞はDp抗原特異的であると示してきた。

AD類似皮膚炎の発症モデルマウスとして、NC/NgaマウスがADの治療薬の開発に汎用されてきている。このマウスはコンベンショナルな環境下での飼育にて加齢とともに、皮膚炎を発症し、血中IgE値が上昇してくる。実際、このモデルマウスを用いて、皮膚炎の治療法開発に用いられている。このモデルマウスのAD類似皮膚炎が我々が報告したヒトのADと同様の現象が生じているならば、このマウスを抗原特異的免疫制御療法を目標にT細胞クロナタイプの同定と合成ペプチドの確立に使用できると予測される。そこで、このマウスを用い、AD類似の皮膚炎を発症させ、このモデルマウスのAD類似皮膚炎のT細胞クロナタイプをRT-PCR/SSCP法を用いて検討した。

B.研究方法

1.対象

対象疾患：4週令のNC/Ngaマウス

2.皮膚炎誘発方法

1)コナヒョウヒダニ抗原腹腔内投与方法

順天堂大、Matsudaらの方法に従い、第0週にフロイド・コンプリート・

アジュバントと共にLSL社(USA)のコナヒョウヒダニ抗原(以下L液)10mg/mlをマウス腹腔内に投与した。第4週に5mg/mlをマウス腹腔内に投与しBoostした。

2)コナヒョウヒダニ抗原皮膚外用法

マウス背部皮膚にL液300mg/mlを3日間毎に8週間、塗布した。

3)ヒョウヒダニ抽出抗原液皮膚外用法

自治医科大学、医動物学教室、松岡らの方法に従いに自治医科大学にて作成されたヒョウヒダニ抽出抗原液(以下D液)300mg/mlを背部皮膚に3日間毎に8週間、塗布した。

4)正常対照群として無処置にて当施設の動物飼育室にて飼育した。

3.検体採取

背部皮膚の2箇所互いに離れた部分を選択し、皮膚検体採取した。全脾臓採取した。尾より採血し、全血採取した。

4.肉眼的観察

抗原液による皮膚炎誘発を開始後、毎週、皮膚の肥厚、落屑、紅斑により皮膚炎誘発を判定した。

5.RT-PCR/SSCP法

1) Total RNA抽出

凍結皮膚組織は1mlのIsogenに入れ、ホモジネーターにて1分間細碎。培養末梢単核球分画は0.5mlのIsogenに攪拌した。その後、AGPC法に従

い total cytoplasmic RNA を抽出した。

2) cDNA 合成

抽出 RNA 分画 5mg に reverse transcriptaset と randam hexamer oligonucleotide を添加し、40 度 2 時間 反応させ、抽出 RNA 分画より相補的 DNA を合成した。

3) PCR(polymerase chain rection)

合成した相補的 DNA を各々 Vb 部分と Cb 部分の primer の組み合わせにて増幅を施行。35 サイクルで Thermocycler で反応させた。

4) SSCP 法

PCR 産生 DNA は 5%glycerol 添加非変成 5%polyacrylanide gel を用い電気泳動し、PCR 産生 DNA の三次構造の差異を検出した。

C.結果

1.L液腹腔内投与法による皮膚炎誘発

フロイド・コンプリート・アジュバントと共に L 液 10mg/ml を腹腔内に投与したマウスでは 8 週間飼育後、皮膚症状は認められなかった。

2.L液皮膚外用法による皮膚炎誘発

背部皮膚に L 液外用したマウスでは 8 週間飼育後、皮膚症状は認められなかった。

3.D液皮膚外用法による皮膚炎誘発

8 週間飼育後、背部皮膚に紅斑、秕糠状落屑、苔癬化局面を呈してきた。いわゆる AD 類似の病像と考えられ

た。

4.無処置のマウスの未発症の正常背部皮膚よりの RT-PCR/SSCP 法

無処置のマウスの正常背部皮膚よりも TCR の mRNA は検出可能であった。ヒトの正常部と同様に、一部の BV サブファミリーに数個のバンドの存在を認めた。また、異なる 2ヶ所で同一のバンドも認めなかった。

5.AD 類似の皮膚炎発症マウス (D液皮膚外用法) の背部皮膚よりの RT-PCR/SSCP 法

D 液皮膚外用法を行い皮膚炎を誘発したマウスの背部皮膚より皮膚採取して RT-PCR/SSCP 法を行った。スメア状のなかに数個のバンドの描出を認めた。皮膚炎病変部では多くの BV サブファミリーにてオリゴクローナルな T 細胞の集積が存在した。

6.AD 類似の皮膚炎発症マウス (D液皮膚外用法) の脾臓細胞よりの RT-PCR/SSCP 法

D 液外用群の皮膚炎発症マウスの脾臓細胞よりの RT-PCR/SSCP 法を行った。スメア状のバンドの中に数個のバンドの描出を認めた。脾臓細胞では多くの BV サブファミリーにてオリゴクローナルな T 細胞の集積が存在しました。これは AD 患者とは異なる結果であった。

7.AD 類似の皮膚炎発症マウス (D液皮膚外用法) の皮膚病変部 2箇所、

脾臓細胞の RT-PCR/SSCP の比較

D液外用群の皮膚炎発症マウスの異なる病変部 2箇所注目し、同一のバンドが認められるか比較検討した。異なる 2箇所の病変部と脾臓細胞より採取した検体より PCR産物の RT-PCR/SSCP で、一部の BVサブファミリーに同位置に、同一のパターンのバンドが認められた。また、脾臓細胞にても同様のバンドを認めた。異なる 2ヶ所の皮膚炎病変部に同一の T細胞クローンの集積が存在することを示唆する所見を得た。これらの同一のパターンのバンドが認められた V β 領域ファミリーは特に一定の傾向を示さなかった。

D.考察

NC/Nga マウスの背部皮膚に D液を 8週間外用することにより AD 類似の皮膚炎誘発を誘発しえた。その背部皮膚は紅斑、秕糠状落屑、苔癬化局面を呈していた。いわゆる AD 類似の病像と考えられ、この方法が NC/Nga マウスの AD 類似の皮膚炎誘発に有効と考えた。

D液外用群の皮膚炎発症マウスでは、各々異なる 2箇所の皮膚病変部に TCRの CDR3 領域が同一のクロナタイプである T細胞が存在することが示された。これは、皮膚病変局所に T細胞の同一のクローンの集積が認

められる事を示す。これらは、脾臓にても同一のクローンの集積を認めた。

また、これらは同一の T細胞クローンの集積が脾臓細胞に認められたことより全身的免疫反応が発生していることを示唆していた。ヒトの ADとは異なる結果であった。

E.結論

以上の検討の結果より、D液外用法は NC/Nga マウスに AD 類似の皮膚炎発症するのに有効であり、D液外用群の皮膚炎発症マウスでは全身的免疫反応が発生し、皮膚病変に抗原特異的 T細胞が集積し、均一な反応が発生し、これら集積している T細胞がその病態の形成に関与している可能性があると考えられました。

F.学会発表

1) H.Takahama, Y.Kawa, K.Masuko-Hongo, T.Kato, K.Nishioka, M.Mizoguchi, Accumulation of dermatophagides pteronyssinus specific T cell clones in the atopic dermatitis skin lesion. Twenty second meeting of Pacific skin research club.Taipei,1999

2) 高濱英人、溝口昌子、加藤智啓、増子佳世、西岡久寿樹、尋常性乾癬皮膚病変の抗原特異的 T細胞クロナタイプの集積.第 16 回日本乾癬学会,

幕張,2001

H.誌上発表

1) H.Takahama, K.Masuko-Hongo, T.Kato, Y.Kawa, K.Nishioka, M.Mizoguchi, Accumulation of T cell clonotype in the skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. J Invest dermatol. 114:833,2000

2) T Kanbe, Y Soma, M Kashima, M Mizoguchi. Serum levels of soluble stem cell factor and soluble KIT are elevated in patients with atopic dermatitis and correlated with the disease severity. Br J Dermatol, 144:1148-53,2001

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

分担研究者 古賀哲也 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 助教授
研究協力者 内博史 古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野

研究要旨 ステロイド剤、免疫抑制剤以外のアトピー性皮膚炎の外用治療薬として、強い抗酸化作用を有する抗酸化剤(CX-659S)に注目し、その *in vitro* 効果を表皮角化細胞とランゲルハンス細胞に及ぼす影響を観察することで解析した。これまでの検討で、強い抗酸化作用を持つ化合物である CX-659S は、マウス接触皮膚炎を抑制すること、またその際ハプテン塗布部の IL-1 β と TNF- α の mRNA 発現を抑制すること、さらに *in vitro* でマウス表皮細胞中のランゲルハンス細胞の CD80, CD86 発現を抑制することが分かっている。今回さらに *in vitro* の検討を進め、ランゲルハンス細胞の CD80, CD86 抑制に伴い、CX-659S は表皮角化細胞からの GM-CSF 産生を抑制すること、また GM-CSF を添加することで CX-659S の作用が阻害されることが分かった。これらのことより CX-659S は表皮角化細胞への抑制作用を介して、ランゲルハンス細胞の機能を抑制していることが示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎はさまざまな接触抗原、環境抗原、刺激性物質の外的刺激に応じて生ずる生体の皮膚反応で、その病態形成には浸潤してくる免疫担当細胞、ランゲルハンス細胞、表皮角化細胞、線維芽細胞、肥満細胞など皮膚に局在する種々の細胞が総合的に複雑に関与することが明らかになりつつある。このような

観点からアトピー性皮膚炎の外用治療薬を考えた場合、ランゲルハンス細胞や表皮角化細胞をターゲットにした治療薬が想定可能である。アトピー性皮膚炎の治療では主に免疫担当細胞をターゲットにした治療薬としてステロイド軟膏、免疫抑制剤軟膏が用いられ、また、表皮角化細胞をターゲットにした治療薬として保湿性外用薬が用いられるが、その

治療効果や副作用の発現を考慮すると、作用を異にする治療薬の開発が望まれる。

ところで、アトピー性皮膚炎の病態における表皮角化細胞やランゲルハンス細胞の機能発現には、サイトカインや接着分子が重要な役割を演じている。最近、オキシダントが細胞内情報伝達や遺伝子の転写因子の活性化などに関与し、サイトカイン産生や接着分子発現といった炎症の病態を調節していることが示されている。このように、オキシダントは直接的あるいは間接的にアトピー性皮膚炎の病態にメディエーターとして関与している可能性がある。そこで、ステロイド剤、免疫抑制剤以外のアトピー性皮膚炎の外用治療薬として、強い抗酸化作用を有する抗酸化剤(CX-659S)に注目した。

表皮においてランゲルハンス細胞と表皮角化細胞は、接着分子を介した直接的な接触、サイトカイン、ケモカインなどを介した間接的な接触を通して、免疫反応の制御に極めて重要な役割を果たしている。ランゲルハンス細胞は主に表皮有棘層に分布し、表皮に侵入してきた抗原を捕捉すると所属リンパ節に移動し、ナイーブ T 細胞に抗原提示を行う。一方、表皮角化細胞は表皮の主要な構成成分であり、紫外線や、抗原、化

学物質などに対する最初の障壁として働くと共に、IL-1 α 、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 、GM-CSF、TGF- β などのサイトカイン、IL-8、LARC、TARC、RANTES などのケモカインを産生しランゲルハンス細胞や T 細胞を含む炎症細胞の遊走、機能に深く関与している。つまりランゲルハンス細胞や T 細胞を直接制御するのではなく、表皮角化細胞の機能制御を介して間接的にこれらの炎症細胞の機能を調整することも、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性炎症性皮膚疾患治療の戦略のひとつになりうる。そこでこれまでにマウスやモルモットのピクリルクロライド、オキサゾロンで誘発した接触性皮膚炎を抑制することが分かっている CX-659 の、表皮角化細胞とランゲルハンス細胞に対する作用を *in vitro* で解析した。

B. 研究方法

1. 動物：C3H/HeN マウスは日本 Charles River 社より購入した。

2. 試薬：CX-659S は Sumika Fine Chemical 社より、GM-CSF、IL-1 β は Genzyme 社より、抗マウス I-A^k、CD80、CD86、CD54 mAbs は PharMingen 社より、マウス GM-CSF、TNF- α 、IL-1 α ELISA kit は BioSource 社より購入した。

3. C3H マウス表皮より細胞浮遊液を作成し IL-1 β (100 ng/ml)存在下, 非存在下に 10 μ M から 500 μ M の CX-659S を添加して 48 h 培養し, 培養液中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。

4. マウス表皮細胞浮遊液を GM-CSF (20 ng/ml)存在下, 非存在下に CX-659S (10 μ M-500 μ M)で 72h 処理し, 表皮細胞中に含まれるランゲルハンス細胞の表面抗原を flowcytometer で測定した。

5. CX-659S で前処理した表皮細胞を stimulator として, allo T 細胞からの IL-2 産生に与える影響を ELISA 法で検討する。

C. 研究結果

1. マウス表皮細胞からは無刺激で GM-CSF, TNF- α , IL-1 α の産生が見られ, これは IL-1 β を添加することで著明に増強された。CX-659S は濃度依存的に GM-CSF の産生を抑制した。TNF- α , IL-1 α 産生への影響は GM-CSF と比較して弱かった。

2. アトピー性皮膚炎患者由来のケラチノサイトセルライン (GEDA) からは無刺激で GM-CSF の産生が見られ, これは IL-1 β , TNF- α を添加することで著明に増強された。CX-659S は濃度依存的に GM-CSF の産生を抑制した。

3. 表皮細胞中のランゲルハンス細胞は *in vitro* で培養することで活性化し MHC class II, CD80, CD86, CD54 などの発現が増強するが, CX-659S によって CD80, CD86 の増強は濃度依存的に抑制された。一方 CD54 の増強は抑制されず, MHC class II はわずかに抑制された。培養液の ELISA で強く抑制された GM-CSF を添加するとこの CX-659S の抑制効果は阻害された。

4. CX-659S で前処理した表皮細胞によって, allo T 細胞からの IL-2 産生は抑制された。この抑制作用も GM-CSF を添加することで回復した。一方 CX-659S は T 細胞からの PMA+ionomycin 刺激による IL-2 産生に影響を与えなかった。

D. 考察

CX-659S は表皮細胞からの GM-CSF の産生を強く抑制した。GM-CSF は表皮内で主に表皮角化細胞によって産生されるため, CX-659S は表皮細胞中の表皮角化細胞に作用しているものと考えられた。このことはアトピー性皮膚炎患者由来の表皮角化細胞株を用いた同様の検討からも確認された。GM-CSF はランゲルハンス細胞の生存, 抗原提示能に不可欠であることが知られている。またランゲルハンス細胞の CD80, CD86 の発現

が CX-659S によって抑制され、この抑制が exogenous に添加した GM-CSF をことで阻害されたことより、CX-659S は表皮角化細胞からの GM-CSF 産生を抑制することでランゲルハンス細胞の機能を制御していることが示唆された。一方過剰な GM-CSF はランゲルハンス細胞からの IL-12 産生を抑制することが知られている。アトピー性皮膚炎患者の表皮角化細胞は GM-CSF を過剰に産生しているという報告があり、この GM-CSF により Th1 反応を誘導する IL-12 が抑制され、アトピー性皮膚炎における Th2 優位の免疫反応を惹起する原因の一つとなっている可能性がある。CX-659S は表皮角化細胞からの GM-CSF 産生を抑制することで Th1/Th2 バランスを調整する、新しいアトピー性皮膚炎治療薬として用いる可能性があると考えられる。今後 CX-659S が NF- κ B や MAP kinase など、表皮角化細胞のサイトカイン産生に関する signaling pathway のどの分子を抑制しているかを検討する必要がある。

E. 結語

CX-659S は表皮角化細胞の機能を抑制することで抗炎症作用、抗免疫作用を示す、ステロイド外用薬や免疫抑制外用剤と作用機序の異なる新しい外用剤として用いる化合物

であると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Furue M, Terao H, Koga T: Effects of cetirizine and epinastine on the skin response to histamine iontophoresis. *J Dermatol Sci* 25:59-63, 2001.
- 2) Akikawa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Masutaka F, Hamasaki N, Ohsima K, Izuhara K : localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *CYTOKINE* 13:75-84, 2001.
- 3) 古江増隆、力久 航、寺尾 浩、古賀哲也、絹川直子、野瀬善明:アトピー性皮膚炎におけるステロイド外用薬の使用調査. *皮膚* 43(増 23):62-66, 2001.
- 4) 古江増隆、力久 航、寺尾 浩、古賀哲也、絹川直子、野瀬善明:実地診療におけるステロイド外用薬の長期投与と副作用. *アレルギー・免疫* 8:1219-1225, 2001.
- 5) Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M: In situ localization of IFN- γ positive cells in psoriatic lesional epidermis. *Eur J Dermatol* 12: 20-23, 2002.
- 6) Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, Furue M: Histamine-induced IL-6 and IL-

8 production are differentially modulated by IFN- γ and IL-4 in human keratinocytes. J Dermatol Sci 28: 34-41, 2002.

なし

7) 古賀哲也、古江増隆：他のアレルギー症状を有する患者－皮膚症状. 臨床と薬物治療 20:489-492, 2001.

8) 古賀哲也、古江増隆：アスピリン過敏症と慢性蕁麻疹.アレルギーの臨床 21 : 781-785, 2001.

9) 古賀哲也、古江増隆：ステロイド外用剤と抱える問題. MB Derma 54: 86-90, 2001.

10) 古賀哲也：アトピー性皮膚炎の内服療法. アレルギーナビゲーター. 森田寛、長倉俊和、宮地良樹、岡本美孝編、メディカルレビュー社：88-89 頁、2001.

11) 古賀哲也、古江増隆：アトピー性皮膚炎. 看護のための最新医学講座. 日野原重明、井村裕夫編、中山書店：48-52 頁、2001.

12) Goto Y, Inoue Y, Tsuchiya M, Isobe M, Ucno T, Uchi H, Furue M, Hayashi H. Suppressiv effect of topically applied CX-659S, a novel diaminouracil derivative, on the contact hypersensitivity reaction in various animal models. Int Arch Allergy Immunol. 123:341-348, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

T細胞のホーミング・レセプター発現の制御機構の解明

分担研究者 塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 本研究の目的は、アトピー性皮膚炎(AD)におけるT細胞の皮膚への遊走機序の制御機構を明らかにすることにより、新治療法の開発に結びつけることである。本研究により、従来皮膚へのホーミング・レセプターであると信じられてきた CLA 分子は、糖転移酵素 fucosyltransferase VII (Fuc-TVII)活性化のマーカーに過ぎず、E-セレクトインとの結合に直接関与する分子ではないことが示された。皮膚へ遊走するT細胞は、ナイーブT細胞からメモリーT細胞への分化過程において、Fuc-TVII、E-セレクトイン・リガンド(ESL)、CLA を次々に発現することが明らかになった。末梢血にはこのような様々な分化段階のT細胞が存在するが、正常人においては皮膚への遊走能力を有さない Fuc-TVII⁺ESL⁺CLA⁺が最も多いのに対し、AD 患者では遊走能力が高い Fuc-TVII⁺ESL⁺CLA⁺が最も増加していた。末梢血中のこの分画の増加は、AD においては血清中の可溶性 E-セレクトインの増加などの、制御メカニズムが発動していることを示唆するものと考えられた。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)では、Th2細胞が CLA 分子を発現することにより皮膚へ浸潤し、そこで活性化することが炎症の中心であるとの考えが広く受け入れられている。しかし最近の研究は、このコンセンサスが極めて矛盾に満ちたものであることを明らかにしている。そこで本研究では、皮膚へホーミングするT細胞には、どのような分子の発現が重要で

あり、その発現は分化に応じてどのように変化するか、そしてそれはどのように制御されているかを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. CLA、E-セレクトイン・リガンド(ESL)発現を制御する糖転移酵素 fucosyltransferase VII(Fuc-TVII) の発現を蛋白レベルで同定出来る単クローン抗体を樹立し、これ

- を用いてその発現を検討する。
2. E-セレクトインとの結合能を E-セレクトイン-Ig キメラ蛋白を用いてフローサイトメトリーにて測定し、あわせて Fuc-TVII、CLA 発現との関連を検討する。
 3. PBMC よりナイーブ CD4⁺T細胞を分離し、抗 CD3 抗体と IL-2 に IL-12 あるいは IL-4 を加え培養することによりメモリー T細胞への分化させ、その分化過程における上記のエピトープの経時的発現を検討する。

C. 研究結果

1. PBMC 中の CD4、CD8⁺T細胞には、Fuc-TVII⁺CLA⁻、Fuc-TVII⁺CLA⁺、Fuc-TVII⁻CLA⁺の3種の表現型の細胞が存在し、正常人では Fuc-TVII⁺CLA⁺が最も多いのに対し、AD では Fuc-TVII⁺CLA⁺分画が最も多く、正常人の約3倍の頻度で認められた。
2. フローサイトメトリーを用いた CLA/ESL の解析においても同様に ESL⁺CLA⁻、ESL⁺CLA⁺、ESL⁻CLA⁺の3種の表現型が認められ、正常人では ESL⁻CLA⁺が多く、AD では ESL⁺CLA⁺が最も増加していた。とくにこれら ESL⁺CLA⁺、Fuc-TVII⁺CLA⁺が著明に増加している患者では、血中可溶性 E-セ

- レクトインの増加が顕著であった。
3. ナイーブ T細胞からメモリー T細胞への分化過程において、初期に発現が増加するのが Fuc-TVII、ESL であり CLA 発現は遅れて誘導されることが示された。つまり分化の最終段階にあらわれる Fuc-TVII⁺ESL⁻CLA⁺細胞は、かなり分化の進んだ細胞であり、E-セレクトインとの結合を失った（皮膚に浸潤する能力を失った）細胞であることが明らかになった。ESL の発現を可視化するのに成功し、CLA と ESL の両者を発現する細胞を用いてその発現パターンを二重染色により検討したところ、両者は全く別の分布を示した。IL-12 の存在下において CD4⁺T細胞の抗 CD3 抗体刺激を繰り返したところ、Fuc-TVII/ESL/CLA の発現は恒常的に高値となった。一方、IL-4 の存在下での刺激により、Fuc-TVII/CLA の発現を全く伴わない一過性の ESL 発現を認めた。

D. 考察

皮膚にホーミングする T細胞は、活性化により速やかに Fuc-TVII の発現が亢進し、それにより ESL が細胞表面に発現し、CLA エピトープに関係なく E-セレクトインと結合すること

が明らかになった。AD では Fuc-TVII⁺ESL⁺CLA⁺分画が増加しているが、AD で認められる可溶性 E-セレクチンの増加はこれまでの考えとは逆に、皮膚への浸潤する能力の高い T 細胞がこれ以上皮膚へ浸潤するのを防ぐ自己防御的役割をしている可能性が考えられた。つまり我々は PBMC 中に増加している CLA⁺細胞を、これから皮膚へ浸潤する細胞と考えてきたが、むしろ皮膚へ浸潤する能力を失った細胞(ESL⁺CLA⁺)、あるいは、可溶性 E-セレクチンの増加などにより皮膚への浸潤を阻害されている細胞を反映していると考えべきなのだろう。

IL-12 は Fuc-TVII を活性化することにより ESL (CLA)の発現を高める結果として、T 細胞の皮膚への浸潤に関して促進的に働くことが確認された。これは最近マウスにおいて示された Th1 細胞の皮膚への浸潤しやすさと一致する所見と考えられた。一方、IL-4 は Fuc-TVII の発現を抑制することにより、CLA 発現を伴った高度の ESL 発現は誘導しないが、一過性の弱い ESL 発現は誘導することが明らかになった。つまり、Th2 サイトカインの環境下において、Fuc-TVII に依存しない ESL 発現が誘導され、これが Th2 細胞が皮膚へ遊走する機序であろうと考えられた。

E. 結語

CLA は皮膚へ浸潤する（能力を持っている、あるいは持っていた）T 細胞のマーカーにすぎず、PBMC 中に認められる CLA⁺T 細胞の多くは皮膚への浸潤能を失った、あるいはその能力が血清中の可溶性 E-セレクチンなどにより阻害されている T 細胞であると考えられる。つまりこれまで AD の PBMC から得られたデータを元に考えられた治療法は、かえって AD の病態の遷延化、増加につながる恐れがあり、我々は AD で観察されるどの免疫反応を制御すべきかについて再検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukawa Y, Shitara K, Yamazaki Y, Kudo T, Narimatsu H, Shiohara T: Immunohistochemical detection of skin-homing T cells expressing fucosyltransferase VII (Fuc-TVII) in vitro and in situ. *Lab. Invest.* 81:771-773, 2001.
2. Mizukawa Y, Shitara K, Yamazaki Y, Takahashi R, Narimatsu H, Shiohara T: Development and characterization of a monoclonal antibody specific for fucosyltransferase VII (Fuc-TVII): Discordant expression of CLA and

- Fuc-TVII in peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Invest. Dermatol.* 117:743-747, 2001.
3. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T: Skin-homing interleukin-4 and -13-producing cells contribute to bullous pemphigoid: Remission of disease is associated with increased frequency of interleukin-10-producing cells. *J. Invest. Dermatol.* 117:1097-1102, 2001.
 4. Shiohara T, Kano Y: Lichen planus and lichenoid dermatoses. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, Horn TD, Mascaro JM, Salasche SJ, eds. *Dermatology*, London, Harcourt Health Sciences Publishes Ltd, in press.
 5. Kano Y, Inaoka M, Shiohara T: Superficial lymphangitis with interface dermatitis occurring shortly after a minor injury: possible involvement of a bacterial infection and contact allergens. *Dermatology* 203:217-220, 2001.
 6. Mizukawa Y, Shiohara T: Trauma-localized fixed drug eruption: Involvement of burn scar, insect bites and venepuncture sites. *Dermatology*, in press.

【Ⅲ】

研究成果の刊行一覧

- 1) Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Takaya-ma, 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- κ 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
- 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-1a 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: $\gamma\delta$ T cells assist $\alpha\beta$ 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
- 10) 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
- 11) Tamaki K, Sugaya S, Tada Y, Yasaka N, Uehara M, Nishimoto M, Nakamura K. Epidermal and dermal $\gamma\delta$ T cells. *Chem Immunol.* 79:43-51,2001
- 12) Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Nakagawa H, Tamaki K. Interferon- γ -induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-3 and is inhibited by dexamethasone and IL-3 and is inhibited by dexamethasone and 2002
- 13) 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

- 14) 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
- 15) Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Toyama K, Hattori N, Okochi H, Yamada H, Hirai K, Tamaki K, Furue M. Elevated levels of eotaxin and interleukin-5 in blister fluid of bullous pemphigoid: correlation with tissue eosinophilia. *Br J Dermatol.* 143:112-6,2000
- 16) Tamaki K. Antipruritic effect of macrolide antibiotics. *J Dermatol.* 27: 66-7,2000
- 17) Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional, Bilimemgm M. Intra versus proliferative process in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBP beta. *J Biol Chem.* 275:32077-88, 2000
- 18) Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H. and Karasuyama, H.: 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. *J. Immunol.* 167: 3427-34, 2001.
- 19) 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. In *Activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors*. Eds. Cooper M.D., Takai, T, Ravetch, J.V. Springer-Verlag Tokyo, pp183-188, 2001.
- 20) 久保秀一、松岡邦枝、鳥山一：高 IgE 血症とモデルマウス、アレルギー科 11: 541-547, 2001
- 21) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M: Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69:223-228(2001)
- 22) Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* (in press)
- 23) Iio J, Katamura K, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol* (in press)
- 24) Yamada A, Ohshima Y, Tsukahara H, Hiraoka M, Kimura I, Kawamitsu T, Kimura K, Mayumi M: Two cases of anaphylactic reaction to gelatin induced by chloral hydrate suppository. *Pediatr Int* (in press)