

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

皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の解明

及びアレルギー疾患の治療

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 玉置 邦彦

平成 14 (2002) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告

- 皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の解明及びアレルギー疾患の治療----- 1
主任研究者 玉置邦彦

II. 分担研究報告

1. 表皮からのアレルギー炎症誘導因子産生の制御機構の解析と----- 5
治療への応用に関する研究
分担研究者 玉置邦彦
研究協力者 柿沼 誉、湧川基史、佐伯秀久
2. 表皮細胞の活性化に及ぼすヒスタミン・神経ペプチドの解析と----- 8
種々の阻害剤の治療への応用に関する研究
分担研究者 古江増隆
研究協力者 古賀哲也、幸田 太
3. 表皮特異的ケモカイン発現マウスの作成及び表皮細胞からの TARC 産生に----- 12
関わる転写因子の検討とその治療への応用
分担研究者 中村晃一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 17

皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の解明及びアレルギー疾患の治療

主任研究者 玉置 邦彦 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

分担研究者 古江 増隆 九州大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
中村晃一郎 福島県立医科大学皮膚科助教授

研究要旨 本研究は、皮膚アレルギー形成機序における表皮角化細胞（ケラチノサイト：KC）の機能の解析を主として、サイトカイン・ケモカイン産生制御に焦点を当てて検討し、治療への応用を考えることを目的としている。アトピー性皮膚炎（AD）では、Th2 ケモカインである TARC, MDC の著明な上昇が血清中で認められ、これが KC 由来であることが示唆された。また、末梢血中では TARC, MDC の受容体である CCR4 を発現した CD4⁺CD45RO⁺T 細胞（Th2）の増加がみられることも明らかとなった。同様の病態は水疱性類天疱瘡においても認められることが示唆された。KC からのサイトカイン産生はヒスタミンによって誘導され、IFN- γ や IL-4 によって異なる調節を受けることも明らかになった。KC はこのように皮膚でのアレルギー炎症形成上重要な役割を果たしていることが示唆されており、KC からのサイトカイン・ケモカイン産生制御について現在検討している研究は、その治療への応用も含めて重要であろうと考えている。

A. 研究目的

本研究班では、皮膚アレルギー形成機序における表皮角化細胞（ケラチノサイト：KC）の機能の解析とそれに基づいたアレルギー疾患治療の可能性について検討することを目的にしている。特に、KC からのサイトカイン・ケモカイン産生について検討する。

B. 研究方法

アレルギー性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎（AD）患者を中心として、AD と同様の臨床検査成績（末梢血好酸球数増多と血清 IgE 値高値）を示す水疱性類天疱瘡（BP）や菌状息肉症（MF）患者における血清中 Th2 ケモカイン（TARC, MDC）値を、健常人を対照として比較検討する。

In vitro において、正常ヒト KC（NHKC）や KC cell line である HaCaT 細胞を用いて、

TARC, MDC 産生制御機構について検討する。また、炎症に伴って産生されるヒスタミンが炎症の修飾に関与している可能性について、ヒスタミンによる KC からのサイトカイン産生を対象として検討する。

表皮特異的にケモカインを発現させたマウスを作成し、その皮膚アレルギー形成への関与について検討する。また、表皮細胞における炎症性ケラチンの発現調節機構を明らかにすることにより、炎症性皮膚疾患における表皮細胞の分化・増殖過程の異常を解析する。

C. 研究結果

(1) AD 患者においては、<1> 末梢血中 CD4⁺CD45RO⁺T 細胞中 CCR4⁺細胞の割合が AD の病勢と相関して上昇しており、皮膚へのホーミング分子とされる CLA も CCR4⁺細胞において強い発現が認められた。<2>

CCR4 のリガンドである TARC は血清中で著明に増加しており、乾癬患者や健常人では増加はみられなかった。血清中 TARC 値は AD の病勢と相関し、末梢血好酸球数や sE-selectin と強い相関がみられた。免疫組織学的に TARC 発現は AD 病変部表皮で強く認められた。<3> CCR4 の別のリガンドである MDC 血清中で著明に上昇しており、乾癬患者や健常人では上昇はみられなかった。血清中 MDC 値は AD の病勢、末梢血好酸球数、血清中 TARC 値と相関していた。

(2) BP 患者においては、<1> 血清中 TARC 値は著明に上昇していたが、尋常性天疱瘡 (PV) 患者血清中での上昇はみられなかった。<2> 水疱内容液中の TARC 値は BP で特に著明に上昇していたが、PV や熱傷、吸引水疱中では上昇はみられなかった。<3> 水疱内容液中 TARC 値は血清中 TARC 値より高値であった。<4> 水疱蓋の表皮細胞には TARC 発現が免疫組織学的に確認された。

(3) In vitro による検討からは、<1> HaCaT 細胞における TARC 産生は、TNF- α +IFN- γ によって著明に誘導され、この産生は IL-4 によって抑制される。一方、IP-10 産生も TNF- α +IFN- γ によって誘導されるが、IL-4 によって増強される。しかし、IL-13 によっては影響を受けないことが示された。<2> NHKC におけるヒスタミンの影響については、まず NHKC が H1R と H2R を発現していることを明らかにした。また、ヒスタミンは NHKC から IL-6, IL-8 産生を誘導するが、TARC 産生は誘導しないこと、この産生は H1R antagonist で完全に抑制され、H2R antagonist で部分的に抑制されることを明らかにした。さらに、IFN- γ と IL-4 がヒスタミンによる IL-6 産生を増強するが、IL-8 産生を抑制することを見出した。<3> AD 患者由来の表皮細胞株の樹立に成功した。この表皮細胞株は GM-CSF を大量に産生することが明らかとなった。<4> CX-659S と

呼ばれる薬剤が KC からの GM-CSF 産生抑制作用のあることを見出ししている。

(4) トランスジェニックマウスの作成に関しては、<1> K14-VEGF のコンストラクトの作成に成功した。現在、トランスジェニックマウス作成中である。<2> K14-TARC についても現在作成中である。

(5) 炎症性ケラチンの発現調節に関しては、IL-1 α によってKCに in vitro でケラチンK6 が誘導され、この誘導は K6 プロモーター上の C/EBP 結合分子を介しており、培養液中の EGF により抑制がかかることが示された。

D. 考察、E. 結論

アレルギー性皮膚疾患のうちのいくつかについて、その形成機序に KC 由来のケモカインである TARC, MDC が関与している可能性が示唆された。しかし TARC, MDC が KC 由来でない可能性もあるため、さらに検討を進めている。皮膚の掻痒に関与するヒスタミンが KC からのサイトカイン産生に関与している結果が得られた。このことはヒスタミン-KC circuit が皮膚アレルギーの増悪に関与している可能性を示唆しており、これも治療の対象になると考えられる。HaCaT 細胞からの TARC 産生が IL-4 によって抑制されることが示された。この制御機構を明らかにすることは K14-TARC トランスジェニックマウスの作成と合わせて、TARC の皮膚アレルギー形成機序への関与と治療を考える上で重要なことと考えられる。AD の KC が GM-CSF の過剰産生を行なうとする報告は既にあり、今回得られた細胞株と CX-659S とは AD の治療上有用である可能性が示唆されると考えている。これらの点について次年度以降、さらに研究を進めていくことにしている。また、炎症性サイトカインによる KC の分化増殖の異常、特にその転写因子レベルでの解析は、ケラチン発現の異常によって炎症が遷延化あるいは難治化している可能性があり、

その点をさらに検討することは新たな治療の可能性を拓くものと考えている。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*, in press.
- 2) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Asahina A, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 107: 535-541, 2001.
- 3) Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4⁺ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 117: 188-196, 2001.
- 4) 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-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology.* 202:239-245, 2001.
- 5) 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 vivo and in vitro--upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci.* 25:229-235, 2001.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Tamaki K, Nakamura K: The role of lymphocytes in healthy and edematous skin. *Curr Opinion Allergy Clin Immunol* 1: 455-60, 2001.
- 9) Tamaki K, Sugaya M, Tada Y, Yasaka N, Uehara M, Nishimoto H, Nakamura K: Epidermal and dermal γ - δ T cells. *Chem Immunol* 79: 43-51, 2001.
- 10) Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Miyazono K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K: Transforming growth factor- β up-regulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 31: 294-300, 2001.
- 11) 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.
- 12) Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor α induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NF κ B and C/EBP β . *J Biol Chem.* 275: 32077-88, 2000.

2. 学会発表

- 1) Furue M: New approach to treatment of dermatitis by modulating keratinocyte-Langerhans cell interaction. The 26th Annual Meeting of the Chinese Dermatological Society. Taipei, 2000.
- 2) Kohda F, Koga T, Uchi H, Imafuku S,

Furue M : Histamine enhances IL-6 and IL-8 production by human keratinocyte HaCaT cell lines. The Society for Investigative Dermatology 61st Annual Meeting. Chicago, 2000.

H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

表皮からのアレルギー炎症誘導因子産生の制御機構の解析と治療への応用に関する研究

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

研究協力者 柿沼 誉 東京大学医学部附属病院皮膚科助手

湧川 基史 帝京大学溝口病院皮膚科助手

佐伯 秀久 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師

研究要旨 表皮細胞の主体をなすケラチノサイト (KC) からのケモカイン産生とその皮膚アレルギー形成への関与について、Th2 ケモカインと考えられている TARC, MDC を中心に検討した。その結果、アトピー性皮膚炎 (AD) 患者血清中の TARC, MDC は病勢を反映し、それは KC 由来である可能性を明らかにした。また、TARC, MDC の受容体である CCR4⁺CD4⁺CD45RO⁺T 細胞が AD 患者末梢血中及び病変部皮膚において増加していることが示され、AD は Th2 に偏倚した病態であると考えられた。さらに、AD 以外の自己免疫疾患である水疱性類天疱瘡や皮膚悪性リンパ腫である菌状息肉症においても、同様の機序が働いている可能性が示唆された。

A. 研究目的

表皮細胞の主体をなすケラチノサイト (KC) は多くのサイトカイン・ケモカインを産生しており、これらがアレルギー性皮膚疾患の病態に関与している可能性が高い。このうち、Th2 ケモカインと呼ばれる TARC, MDC に着目し、その皮膚アレルギーへの関与について明らかにし治療に応用することを考え研究を進めている。さらに、炎症性サイトカインによる表皮細胞の分化・増殖異常とそこに関わる転写因子について解析し、治療に反映させる可能性を検討する。

B. 研究方法

これまでに、アトピー性皮膚炎 (AD) のモデルマウスとされる NC/Nga マウスの皮膚病変部において TARC, MDC とその受容体である CCR4 の発現増強のみられることを報告した (J Clin Invest 104: 1097, 1999)。本研究では、(1) ヒト AD において血清中 TARC 値の変動と皮膚病変部における TARC, MDC 発現について乾癬 (Th1 優位と考えら

れている慢性皮膚疾患) 患者と比較検討する。

(2) ヒト AD 末梢血及び皮膚病変部における CD4⁺CD45RO⁺T 細胞での CCR4 および CXCR3 の発現を乾癬と比較検討する。(3) AD 以外で末梢血好酸球数増多、血清 IgE 増加を特徴とする自己免疫疾患である水疱性類天疱瘡 (BP) や皮膚悪性リンパ腫である菌状息肉症 (MF) についても、血清中 TARC, MDC 値と皮膚病変部における TARC, MDC, CCR4, CXCR3 の発現について検討する。(4) ヒト KC 及び cell line である HaCaT 細胞からの TARC, MDC 産生とその制御機構について検討する。(5) ヒト表皮培養 KC における炎症性ケラチンの発現調節機構について検討し、KC の分化・増殖に関わる転写因子とその阻害による変化について解析する。

C. 研究結果

(1) ヒト末梢血における CD4⁺CD45RO⁺T 細胞のうち、CCR4⁺細胞は IL-4 を発現し IFN- γ は発現せず、逆に CXCR3⁺細胞は IFN- γ を発現し IL-4 を発現しない。そして

AD では、CD4⁺CD45RO⁺CCR4⁺T 細胞の割合は AD の病勢に応じて発現が著明であり、乾癬では CXCR3⁺T 細胞が多い。

(2) AD では血清中 TARC 値は病勢に応じて高値を示し、ステロイド外用治療によって低下する。TARC は病変部の KC で急性・慢性湿疹の所見にかかわらず強く発現している。

(3) AD の血清中 MDC 値は TARC 値とよく相関し、病勢を反映する。

(4) HaCaT 細胞からの TARC 産生は IP-10 の産生と同様、TNF- α と IFN- γ によって強く誘導され、さらに IL-4 によって TARC 産生は抑制され IP-10 産生は増強される。

(5) KC において IL-1 α によりケラチン K6 発現が誘導され、この誘導は K6 プロモーター上の C/EBP 結合分子を介しており、培養液中の EGF により抑制がかかる。

D. 考察、E. 結論

AD は(1)~(3)によって、急性・慢性病変にかかわらず Th2 ケモカインが強く発現している病態であることが示唆された。これらは、J Invest Dermatol, J Allergy Clin Immunol, Clin Exp Immunol に報告した。また、(4)については現在投稿中である。AD における血中 TARC の産生については KC からを想定している。これは、BP の水疱中及び血中の値が前者で有意に高いというデータを得ており、それを支持している所見と考えている。しかし、それ以外の可能性についても検討を行なっている。IL-4 による HaCaT 細胞からの TARC 産生制御は、その細胞内シグナルについて検討を進めている。また AD で TARC, MDC 値が非常に高いことから、AD における遺伝子多型についても検討を始めている。次年度においては、これらの点についてさらに解析していきたいと考えている。(5) は J Invest Dermatol に報告した。このような炎症による KC の分化・増殖の異常は炎症の遷延化と関わっている可能性もあり、そこ

に関与する転写因子とその阻害による KC の変化についてさらに検討する予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. Clin Exp Immunol, in press.
- 2) Tamaki K, Nakamura K: The role of lymphocytes in healthy and edematous skin. Curr Opin Allergy Clin Immunol 1: 455-60, 2001.
- 3) Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Miyazono K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K: Transforming growth factor- β up-regulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells. Eur J Immunol. 31: 294-300, 2001.
- 4) Tamaki K, Sugaya M, Tada Y, Yasaka N, Uehara M, Nishimoto H, Nakamura K: Epidermal and dermal γ - δ T cells. Chem Immunol 79: 43-51, 2001.
- 5) Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4⁺ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 117: 188-196, 2001.
- 6) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitui H, Tada Y, Saeki H, Tirii H, Asahina A, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated

- chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 107: 535-541, 2001.
- 7) 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-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology*. 202:239-245, 2001.
- 8) 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 vivo and in vitro--upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci*. 25:229-235, 2001.
- 9) Wakugawa M, Hayashi K, 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.
- 10) 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.
- 11) 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. *Brit J Dermatol*. 143: 112-6, 2000.
- 12) Tamaki K. Antipruritic effect of macrolide antibiotics. *J Dermatol*. 27: 66-7, 2000.
- 13) Tamaki K, Miyachi Y, Kumano Y. Research on Langerhans cells takes a new turn. *J Dermatol Sci*. 24: S39-40, 2000.
- 14) Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor α induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NF κ B and C/EBP β . *J Biol Chem*. 275: 32077-88, 2000.

H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

表皮細胞の活性化に及ぼすヒスタミン・神経ペプチドの解析と
種々の阻害剤の治療への応用に関する研究

分担研究者 古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授
研究協力者 古賀哲也 九州大学大学院医学研究院皮膚科学助教授
幸田 太 九州大学大学院医学研究院皮膚科学

研究要旨 表皮角化細胞の IL-6 および IL-8 産生にヒスタミンがおよぼす影響について検討した。ヒスタミン刺激により表皮角化細胞からの IL-6、IL-8 産生は濃度依存性、時間依存性に有意に上昇した。また、その変化は強力な H1 受容体阻害剤（フマル酸エメダスチン）により完全に抑制された。より効果の弱い H1 受容体阻害剤（ピリラミン）と H2 受容体阻害剤（シメチジン）はそれぞれ単独ではヒスタミンによる IL-6、IL-8 産生亢進を部分的に抑制し、また、共同で完全に抑制した。ヒスタミンとサイトカインの共作用について検討した。IFN- γ 単独では、表皮角化細胞の IL-6 産生を有意に亢進し、IL-8 産生を抑制した。興味深いことに IFN- γ 、IL-4 はヒスタミンによる表皮角化細胞の IL-6 産生増強効果をさらに亢進し、一方、IL-8 産生亢進を完全に抑制した。これらの結果よりヒスタミンにより誘導された表皮角化細胞の IL-6、IL-8 の産生亢進は IFN- γ 、IL-4 により異なった調節を受けていると考えられた。ヒスタミンは表皮角化細胞からの IL-6 や IL-8 などのサイトカイン産生を調節する重要な物質の一つであると考えられた。

A. 研究目的

表皮角化細胞は様々なサイトカインやケモカインを産生することによって炎症の発現や遷延化に寄与しているのではないかと考えられるようになってきた。乾癬に対してはこのようなコンセプトから表皮角化細胞の増殖やサイトカインの産生を抑制するビタミンD3 外用剤が開発され、免疫抑制剤・調整剤とともにその有用性が確立されている。しかしながらアトピー性皮膚炎や接触皮膚炎の領域では、表皮角化細胞の研究から新しい治療薬を開発していこうという動きは現段階ではまだ未熟である。そこで表皮角化細胞の活性化（サイトカインやケモカイン産生、接着分子の発現など）に対するヒスタミン、神経ペプチド、汗分泌

物の作用を検討するとともに、種々の阻害剤の影響を検討し新しい治療薬の開発に寄与しようと考えた。

B. 研究方法

- 1) 表皮角化細胞(ヒト正常表皮角化細胞及び表皮角化細胞の cell line である HaCaT cell) を 24 穴プレート中でヒスタミンを加えた培養液を用いて培養し、その培養液中のサイトカイン (IL-6、IL-8) の濃度を ELISA 法を用いて測定し、ヒスタミン非存在下と比較した。
- 2) 上記の系で H1 受容体阻害剤と H2 受容体阻害剤の抑制効果について検討した。
- 3) 上記の系で IFN- γ と IL-4 の影響についても

検討した。

C. 研究結果

1) HaCaT cell は、mRNA レベルと蛋白レベルで IL-6,IL-8 を発現していた。(RT-PCR 法を用い mRNA レベルで、また、confocal laser microscopy を用い蛋白レベルでこれらを確認した。)

2) HaCaT cell は、mRNA レベルでヒスタミンに対する H1 receptor と H2 receptor を発現していた。

3) HaCaT cell はヒスタミン刺激により、ある程度生理的濃度で IL-6,IL-8 産生が有意に亢進した。ヒスタミン刺激による HaCaT cell からの IL-6、IL-8 産生は濃度依存性、時間依存性に有意に上昇した。また、ヒト正常表皮角化細胞においてもヒスタミン刺激により IL-6,IL-8 産生が有意に亢進した。

4) このヒスタミンにより引き起こされる HaCaT cell の IL-6,IL-8 産生亢進は、H1 受容体阻害剤(フマル酸エメダスチン)により完全に抑制された。より効果の弱い H1 受容体阻害剤(ピリラミン)と H2 受容体阻害剤(シメチジン)はそれぞれ単独ではヒスタミンによる HaCaT cell の IL-6,IL-8 産生亢進を部分的に抑制し、また、二剤共同で完全に抑制した。

5) IFN- γ 単独では、HaCaT cell の IL-6 産生を有意に亢進し、IL-8 産生を抑制した。IFN- γ 、IL-4 はヒスタミンによる HaCaT cell の IL-6 産生増強効果をさらに亢進し、一方、IL-8 の産生亢進を完全に抑制した。

D. 考察

ヒスタミンは毛細血管拡張作用を持つ物質とし

て発見され、今日では即時型免疫反応の、また、蕁麻疹やアトピー性皮膚炎、乾癬等の炎症性皮膚疾患の重要なメディエーターとして知られている。多量のヒスタミンが皮膚浅層の肥満細胞に貯蔵され、種々の刺激により放出されている。しかしながら、ヒスタミンの表皮角化細胞におよぼす影響については未だ不明な点が多く残されており、また表皮角化細胞、ヒスタミン、サイトカインの共同作用についての報告は非常に少ない。

そこで、今回の研究では表皮角化細胞からの IL-6 および IL-8 の産生にヒスタミンがおよぼす影響について検討した。その結果、ヒスタミン刺激により表皮角化細胞の IL-6、IL-8 の産生は、ある程度生理的濃度で有意に上昇した。興味深いことに IFN- γ 、IL-4 はヒスタミンによる表皮角化細胞の IL-6 産生増強効果をさらに亢進し、一方、IL-8 の産生亢進を完全に抑制した。これらの結果よりヒスタミンにより誘導された表皮角化細胞の IL-6、IL-8 の産生は IFN- γ 、IL-4 により異なった調節を受けていると考えられる。表皮角化細胞の IL-6 や IL-8 産生の異なった調整機構については、今後分子レベルでの解明が必要である。このように、ヒスタミンは表皮角化細胞のサイトカイン産生を調節する重要な物質の一つであると考えられた。表皮角化細胞、ヒスタミン、サイトカインのネットワークを解明することは、アレルギー性皮膚疾患の機構解明に大変有意義であると考えられる。

また、神経ペプチドによる表皮角化細胞のサイトカイン産生調節はかなりのデータを集積したが、非常に複雑であり、現在まとめつつある。

ところで、既にイタリアの Giannetti らのグループはアトピー性皮膚炎患者由来の表皮角化細胞

株は GM-CSF を大量に産生することを報告している。ジュネーブ大学との共同研究で得られた我々のアトピー性皮膚炎患者由来の表皮角化細胞株も GM-CSF を大量に産生することが確認された。また、CX-659S と呼ばれる薬剤に GM-CSF 産生を阻害する作用があることを発見した。その細胞内シグナルの特異的阻害部位は現在検討中である。次年度は、表皮角化細胞の IL-6、IL-8、IL-1 α 、TNF- α 、TARC の産生と GM-CSF の産生を比較しながら、細胞内シグナルの異常や CX-659S の作用点について解析する予定である。

E. 結論

ヒスタミンにより誘導された表皮角化細胞の IL-6、IL-8 の産生亢進は IFN- γ 、IL-4 により異なった調節を受けていると考えられた。ヒスタミンは表皮角化細胞からの IL-6 や IL-8 などのサイトカイン産生を調節する重要な物質の一つであると考えられた。

F. 研究発表

1. 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) 古江増隆、力久 航、寺尾 浩、古賀哲也、網川直子、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.
- 3) 古江増隆、力久 航、寺尾 浩、古賀哲也、網川直子、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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M: Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci* 24:29-38, 2000.

2. 学会発表

- 1) Furue M: New approach to treatment of dermatitis by modulating keratinocyte-Langerhans cell interaction. The 26th Annual Meeting of the Chinese Dermatological Society. Taipei, 2000.
- 2) Koga T, Kohda F, Furue M: Histamine and skin allergic disease. International Sendai Histamine Symposium. Sendai, 2000.
- 3) Uchi H, Koga T, Goto Y, Hayashi H, Furue M: The immunosuppressive effects of an antioxidant, CX-659S, on Langerhans cells. The 9th European Academy of Dermatology and Venereology. Geneva, 2000.
- 4) Kohda F, Koga T, Uchi H, Imafuku S, Furue M: Histamine enhances IL-6 and IL-8

production by human keratinocyte HaCaT cell lines

The Society for Investigative Dermatology
61st Annual Meeting. Chicago, 2000

5)古江増隆: アトピー性皮膚炎治療の現況と今後の治療. 第 63 回日本皮膚科学会東京支部学術大

会. 東京, 2000.

G. 知的所有権の取得状況 なし

表皮特異的ケモカイン発現マウスの作成及び表皮細胞からの TARC 産生に関わる
転写因子の検討とその治療への応用

分担研究者 中村晃一郎 福島県立医科大学皮膚科助教授

研究要旨 TARC は Th2 細胞を特異的に誘導するケモカインであり、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の病態形成に重要である。TARC 産生制御、転写因子の関与に関して、HaCaT 細胞の TARC 産生が IFN- γ +TNF- α によって著明に亢進し、IL-4 によって抑制されることを明らかにした。また Th1 ケモカインである IP-10 産生に関しては、IFN- γ +TNF- α 、IL-4 によって亢進するなど TARC と異なる調節機序が存在すると考えられた。

また VEGF は血管新生、リンパ管新生などを通じて皮膚アレルギー反応において重要であると考えられる。PUC18 ベクターに組み入れたヒト VEGF 遺伝子 (0.6Kb) を用いて、K14 プロモーター下に VEGF cDNA コンストラクトを作成した。作成した K14 / VEGF cDNA を培養表皮 KC cell line である HaCaT 細胞に in vitro でトランスフェクトし、HaCaT 細胞から VEGF 蛋白が過剰産生されることを確認した。現在 K14 / VEGF 遺伝子を用いて K14 / VEGF トランスジェニックマウスを作成中である。またマウス TARC cDNA を用いて、同様に K14 プロモーター下流域に TARC cDNA をサブクローンしている。K14 / VEGF, TARC マウスを用いてアレルギー性皮膚疾患における TARC, VEGF の調節機構を解析することが可能であると考えている。

A. 研究目的

皮膚を構成する細胞には表皮角化細胞 (KC)、血管内皮細胞、線維芽細胞などがあり、また炎症時に浸潤する細胞としてリンパ球などがある。これらの細胞は互いにサイトカインやケモカインを産生し、アレルギー反応における皮膚局所の炎症調節に働いている。KC は IL-1 α を産生し炎症を惹起するほか、MCP-1 あるいは IL-8 などケモカインを産生し炎症細胞浸潤を誘導する。これまで KC を target とした MCP-1 トランスジェニックマウスで樹状細胞の表皮への遊走亢進を明らかにしている。また CCケモカインである TARC (thymus and activation regulated chemokine) が表皮 KC から産生されること、さらにアトピー性皮膚炎において表皮 KC が TARC を過剰産生することを明らかにした。そこで本研究では KC からの TARC 産生に関わる転写因子を検討し TARC の皮膚

アレルギー反応における調節機構を明らかにすること、さらに表皮 KC が過剰産生する TARC トランスジェニックマウスを作成し解析することを目的としている。また VEGF (vascular endothelial growth factor) は血管内皮細胞やリンパ管を増生するサイトカインであり、アレルギー性皮膚疾患においても炎症の制御に重要であると考えられる。表皮 KC に VEGF を発現するトランスジェニックマウスを作成、検討することによって皮膚アレルギー反応における VEGF の機能を解明することができる。表皮におけるこれらのサイトカイン・ケモカイン発現機構を明らかにすることがアレルギー性皮膚疾患の治療に結びつくと思われる。

B. 研究方法

本年度は、ヒト表皮角化細胞である HaCaT 細胞をサイトカイン (TNF- α , IFN- γ , IL-

4) による TARC 産生調節機構について検討した。またヒト VEGF cDNA を用いてケラチン 14 (K14) 遺伝子を target とした DNA コンストラクトを作成することを試みた。作成した K14 プロモーター・VEGF (K14 / VEGF) cDNA を、培養表皮 KC cell line である HaCaT 細胞にトランスフェクトし、HaCaT 細胞から VEGF 蛋白が過剰産生されるかについて検討した。マウス TARC cDNA に関しても同様に K14 遺伝子下に導入することを試みた。

C. 結果、D. 考察、

ヒト表皮角化細胞である HaCaT 細胞で、サイトカインによる TARC 産生制御、転写因子に関して検討した。HaCaT 細胞の TARC 産生量は、IFN- γ +TNF- α によって著明に亢進し、IL-4 によって抑制された。また HaCaT 細胞の IP-10 産生は、IFN- γ +TNF- α によって著明に亢進し、IL-4 投与によってさらに亢進した。以上の結果は、Th2 サイトカインである TARC と Th1 サイトカインである IP-10 の間には、IL-4 からみて異なる調節機構が存在すると考えられた。

PUC18 ベクターに組み入れたヒト VEGF 遺伝子 (0.6Kb) を取り出し、PGEM3 ベクターに組み入れた K14 プロモーター遺伝子下にサブクローンし、K14 / VEGF cDNA コンストラクトを作成した。作成した K14 / VEGF cDNA を培養表皮 KC cell line である HaCaT 細胞に in vitro でトランスフェクトし、HaCaT 細胞から VEGF 蛋白が過剰産生されることを確認した。現在 K14 / VEGF 遺伝子を用いて K14 / VEGF トランスジェニックマウスを作成中である。またマウス TARC cDNA を用いて、同様に K14 プロモーター遺伝子下流域に TARC cDNA をサブクローンしており、今後マウス作成を進めていく予定である。K14 / VEGF, TARC マウスを用いてアレルギー性皮膚疾患における

TARC, VEGF の調節機構を解析することが可能であると考えている。

E. 結論

ヒト表皮角化細胞である HaCaT 細胞の TARC 産生量は、IFN- γ +TNF- α によって著明に亢進し、IL-4 によって抑制された。また HaCaT 細胞の IP-10 産生は、IFN- γ +TNF- α によって著明に亢進し、IL-4 投与によってさらに亢進した。

新たに作成した K14 / VEGF cDNA を HaCaT 細胞に in vitro でトランスフェクトし、HaCaT 細胞から VEGF 蛋白が過剰産生されることを確認した。現在 K14 / VEGF 遺伝子を用いて K14 / VEGF トランスジェニックマウスを作成中である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest.* 104: 1097-105, 1999.
- 2) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitui H, Tada Y, Saeki H, Tirii H, Asahina A, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 107: 535-541, 2001.
- 3) Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K: CC chemokine

receptor 4 expression on peripheral
blood CD4+ T cells reflects disease
activity of atopic dermatitis. J Invest
Dermatol. 117: 188-196, 2001.

H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kakinuma T, et al.	Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity.	J Allergy Clin Immunol	107	535-41	2001
Wakugawa M, et al.	CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis.	J Invest Dermatol	117	188-96	2001
Wakugawa M, et al.	Interferon- γ -induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1 β , TNF- α , IL-4 and IL-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus.	Dermatology	202	239-45	2001
Wakugawa M, et al.	Expression of CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes in vivo and in vitro--upregulation by RANTES.	J Dermatol Sci	25	229-35	2001
Furue M, et al.	Effects of cetirizine and epinastine on the skin response to histamine iontophoresis.	J Dermatol Sci	25	59-63	2001
Kohda F, et al.	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	2001

(倫理面への配慮)

本研究の過程で取扱った個人情報については、漏洩することのないように主任研究者が責任を持って保護致します。

20010805

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
P15「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください

- leukin-6 production by human keratinocytes. Similarity with interleukin-4. *FEBS Lett* 1994;343:32–6.
- [29] Nicola NA, Greenhalgh CJ. The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action. *Exp Hematol* 2000;28(10):1105–12.
- [30] Sehgal PB. STAT-signaling through the cytoplasmic compartment: consideration of a new paradigm. *Cell Signal* 2000;12(8):525–35.
- [31] Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon- γ , interleukin-2, and tumor necrosis factor- α , defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation basis is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999;113(5):752–9.