

厚生労働科学研究研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cellに
よる生体防御機構のアレルギー疾患における役割の
解析に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 小川 秀興

平成15（2003）年 3月

I. 総括研究報告

- 皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cell による生体防御
機構のアレルギー疾患における役割の解析に関する研究 -----3
小川秀興

II. 分担研究報告

1. Toll様受容体を介したマスト細胞の活性化に関する研究 -----7
小川秀興
2. 皮膚及び粘膜におけるバリア機構とダニ抗原等の透過性についての
解析に関する研究 -----10
奥田峰広
3. 皮膚血管内皮細胞機能とアレルギーに関する研究に関する研究
坪井良治 -----13
4. Transforming growth factor- β (TGF- β)に対する皮膚角化細胞
ならびに気道上皮細胞の応答性とアレルギー性疾患とのかかわり
に関する研究 -----15
中尾篤人
5. 鼻粘膜上皮におけるアレルギー性サイトカイン及びその他の修飾
因子による反応性の解析に関する研究 -----18
花沢豊行

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----23

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防治療研究事業）

総括研究報告書

皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cellによる
生体防御機構のアレルギー疾患における役割の解析に関する研究

主任研究者 小川秀興

順天堂大学・学長・医学部皮膚科学講座・教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症などでは、皮膚・気道・鼻粘膜における臓器・組織特異的な病態の形成が観察される。このような病態の形成には、白血球等の免疫系細胞による全身的な生体防御機構のほかに、それぞれの組織に固有なresidential cellによる局所的な生体防御機構／生理機構の関与が重要であると推測されるが、その実態はあまり明らかにされていない。我々は本研究で、皮膚、気道、鼻粘膜局所のresidential cellによる生体防御機構（あるいはその生理的機能）がアレルギー疾患の病態において果たす役割について明らかにする。本研究によってアレルギー疾患における臓器／組織特異的な病態に対する理解が深まりアレルギー疾患に対する新規治療法の開発につながることを期待される。本年度の研究の成果について以下に示す。

- 1) 皮膚バリア機能（皮膚角化細胞の水分保持機能）を簡便に測定するための手法を開発し実験皮膚炎における妥当性、ヒト皮膚における有用性を明らかにした。
 - 2) 黄色ブドウ球菌が、皮膚局所肥満細胞の活性化を介して、アレルギー反応を惹起することを分子レベルで明らかにした。
 - 3) 神経伝達物質ノルアドレナリンが、ヒト皮膚微小血管内皮細胞における炎症性サイトカインによる皮膚炎惹起作用を増強することを見出した。
 - 4) サイトカインの一つである Transforming growth factor- β (TGF- β)が皮膚角化細胞からの炎症性サイトカインによるケモカイン産生に対して強い抑制活性をもつことを見出しアトピー性皮膚炎の治療につながる可能性を見いだした。
 - 5) 気管支上皮細胞における TGF- β シグナルの活性化が喘息の気道リモデリングに関与していることを明らかにした。
 - 6) 炎症性サイトカインが鼻粘膜上皮細胞における Nitric oxide(NO)産生を惹起し、アレルギー性鼻炎の発症に関与することを示した。
- これらの成果は、皮膚・気道・鼻粘膜局所の生体防御機構／生理的機構が、アレルギー疾患の病態形成において重要な役割を果たしていることを示すものであり、アレルギー疾患の新規治療薬の開発にとって有用な知見である

分担研究者 奥田峰広 花王株式会社
安全性評価研究センター
主任研究者
坪井良治
東京医科大学皮膚科学講座
教授
中尾篤人
順天堂大学医学部
アトピー疾患研究センター
講師
花沢豊行 千葉大学大学院
医学研究院頭頸部腫瘍学
講師

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症などでは、皮膚・気道・鼻粘膜における臓器・組織特異的な病態の形成が観察される。このような病態の形成には、白血球等の免疫系細胞による全身的な生体防御機構のほかに、それぞれの組織に固有な residential cell による局所的な生体防御機構／生理機構の関与が重要であると推測されるが、その実態はあまり明らかにされていない。我々は本研究で、皮膚、気道、鼻粘膜局所の residential cell による生体防御機構（あるいはその生理的機能）がアレルギー疾患の病態において果たす役割について明らかにする。

B. 研究方法

1) 非侵襲的に皮膚粘膜バリア機能（皮膚角化細胞の水分保持機能）を測定するために、ビタミンB2であるリボフラビンの経皮吸収率を測定する手法を開発し

た。この手法の妥当性、アトピー性皮膚炎の臨床における有用性についてラット皮膚炎モデル、ヒト皮膚検体を用いて検討した。2) Toll-like receptor2 欠損マウスを用いて、グラム陽性球菌の代表的抗原である PGN に対する皮膚局所肥満細胞の反応性を検討した。3) ヒト皮膚微小血管内皮細胞を用いて、神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンの、炎症性サイトカイン作用への影響を検討した。4) ヒト皮膚角化細胞における炎症性サイトカイン作用への TGF- β の影響について検討した。5) 気管支喘息患者肺組織サンプルを用いて、気管支上皮細胞における TGF- β シグナル分子(Smad)の活性化と気道リモデリングについての相関を検討した。6) アレルギー性鼻炎患者由来の鼻粘膜上皮細胞を用いて、炎症性サイトカインが鼻粘膜上皮細胞に与える影響を検討した。

（倫理面への配慮）

喘息患者、アレルギー性鼻炎患者組織検体の取得に当たってはインフォームドコンセントによる患者さんからの本研究への承諾を徹底した。

C. 研究結果

1) 皮膚バリア機能を簡便に測定するための新規手法は、ラット皮膚炎モデル、ヒト皮膚におけるバリア機能測定に有用であった。2) Toll-like receptor2 を介した皮膚局所肥満細胞の活性化によってアレルギー反応（脱顆粒、サイトカイン産生等）が惹起された。3) ノルアドレナリンは、炎症性サイトカインによるヒト

皮膚微小血管内皮細胞におけるケモカイン MCP-1 産生を増強した。4) TGF- β が皮膚角化細胞からの炎症性サイトカインによるケモカイン TARC 産生に対して強い抑制活性を示した。5) 気管支上皮細胞における TGF- β シグナルの活性化と喘息の気道リモデリングの臨床パラメータは相関した。6) 炎症性サイトカインが鼻粘膜上皮細胞における NO 産生を惹起し、アレルギー性鼻炎の発症に関与することを示した。

D. 考察

本研究によるいくつかの知見が、アレルギー疾患における臓器／組織特異的な病態に対する理解を深め、新規治療法の開発につながることを期待される。

E. 結論

皮膚・気道・鼻粘膜それぞれの局所における生体防御機構／生理的機構が、アレルギー疾患諸相の病態形成において重要な役割を果たしていることが本研究によって示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109:1351-1359, 2002

2) Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Cutting Edge; VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 168:2603-2607, 2002

3) Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H. TGF- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy* 31:309-314, 2002

4) Okuda M, Yoshiike T, Ogawa H. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention. *J. Dermatol. Sci.* 30:173-179, 2002

5) Sagara H, Okada T, Okumura K, Ra C, Ogawa H, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:249-254, 2002

6) Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease. *Trends in Molecular Medicine (Formerly; Mol. Med. Today)* 8:361-363, 2002

7) Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway hyperresponsiveness in patients with

asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*
110:873-878, 2002

7) Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H,
Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C,
Ogawa H. TGF- β 1 suppresses atopic
dermatitis-like skin lesions in NC/Nga
mice. *Clin. Exp. Allergy*31:309-314,
2002

8) Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y,
Tsuboi R, Okumura K, Ogawa H. TGF-
 β /Smad signaling inhibits IFN- γ and
TNF- α -induced TARC (CCL17) production
in HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.*
31:53-58, 2003

2. 学会発表

1) Supajatura Volaluck、牛尾博子、
中尾篤人、審良静男、奥村康、羅智靖、
小川秀興 *Staphylococcus aureus* 由来の
peptideglycan による Toll-like
receptor (TLR)2 を介したマスト細胞の

活性化 第 52 回日本アレルギー学会
2002. 11. 28

2) Atsuhito Nakao. Role of TGF- β /SMAD
signaling pathway in homeostatic
regulation of the immune system.
Symposium 8: Homeostatic regulation
and cytokines. 第 32 回日本免疫学会
総会学術集会 2002. 12. 5

3) 中尾篤人、相良博典、岡田武則、奥
村康、小川秀興、福田健
気道上皮細胞での Smad7 の発現は喘息患
者上皮基底膜肥厚と負に相関する
第 52 回日本アレルギー学会 2002. 11. 28

4) 花澤豊行. 気道過敏性亢進のメカ
ニズムとその制御 —鼻過敏性発現のメ
カニズムとその制御— 第 14 回日本ア
レルギー学会春季臨床大会 2002. 3. 21

H. 知的財産権の出願／登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防治療研究事業）
分担研究報告書

Toll 様受容体を介したマスト細胞の活性化に関する研究

主任研究者 小川秀興

順天堂大学・学長・医学部皮膚科学講座・教授

研究要旨 マスト細胞は高親和性 IgE 受容体を介する刺激により、脱顆粒反応やサイトカインを産生することでアレルギー反応に深く関与する。しかし、それ以外の刺激による活性化のメカニズムやその役割については不明である。我々は、マスト細胞における Toll 様受容体の発現を検討し、それらを介した細菌産物によるマスト細胞の活性化機構を検討した。マスト細胞は Toll 様受容体 4 を介してグラム陰性菌由来のリポポリサッカライドにより活性化され炎症性サイトカインの産生を通じ宿主の細菌感染防御に寄与した。一方、マスト細胞は、Toll 様受容体 2 を介して、グラム陽性菌由来のペプチドグリカンにより活性化され、脱顆粒反応や皮膚の炎症などを引き起こした。本知見は、細菌によるマスト細胞活性化のメカニズムを、初めて明らかにしたものである。またペプチドグリカンにおける知見はアトピー性皮膚炎患者にしばしばみられる黄色ブドウ球菌感染の合併がアトピー性皮膚炎の増悪因子であることについての分子的な基礎を説明した。

協力研究員

牛尾博子 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター・講師

Volaluck Supajatura 順天堂大学医学部皮膚科学講座・研究生

A. 研究目的

マスト細胞は高親和性 IgE 受容体を介する刺激により、脱顆粒やサイトカインを産生することでアレルギー反応に深く関与する。しかし、それ以外の物質による活性化のメカニズムやその役割については不明である。一方、Toll 様受容体は、さまざまな病原微生物の構成成分を異なる受容体で認識し自然免疫に深く関与する。我々は、マスト細胞における Toll 様受容体の発現を検討し、それらを介した

バクテリアの産物によるマスト細胞の活性化機構を解明し、マスト細胞の自然免疫における役割について考察した。

B. 研究方法

1. マウス骨髄由来培養マスト細胞を用いて、Toll 様受容体の発現を RT-PCR 法を用いて検討し Toll 様受容体 1-9 発現を検討した。また、グラム陰性菌由来のリポポリサッカライドやグラム陽性菌由来のペプチドグリカンを加えた際のマスト細胞の活性化を、脱顆粒（ β -ヘキソースアミニダーゼ放出法）、サイトカインの産生（ELISA 法）を指標に検討した。
2. In vivo でのマスト細胞の Toll 様受容体を介した活性化について、マスト細胞欠損マウスの腹腔や皮膚を、Toll 様受容

体を欠損するマウス由来の培養マスト細胞で修復し、急性腹膜炎モデル、即時型及び遅延型皮膚反応を誘導して検討した。

C. 研究結果

1. Toll 様受容体 1-9 発現を検討した。のうち、1、2、4、6 の発現を認めた。リポポリサッカライドとペプチドグリカンのいずれの刺激においてもマスト細胞からの IL-6、IL-13、TNF- α の産生が観察された。脱顆粒、IL-4、IL-5 産生はペプチドグリカン刺激のみで観察された。
2. 急性腹膜炎モデルでは、Toll 様受容体 4 を欠損したマスト細胞の修復で有意な生存率の低下が観察された。また、ペプチドグリカンによる皮膚の即時型及び遅延型反応は、Toll 様受容体 2 を欠損したマスト細胞の修復で有意に低下していた

D. 考察

マスト細胞は Toll 様受容体 4 を介してグラム陰性菌由来のリポポリサッカライドにより活性化され炎症性サイトカインの産生を通じ宿主のバクテリア感染防御に寄与する。一方、Toll 様受容体 2 はグラム陽性菌由来のペプチドグリカンで活性化され、皮膚の炎症などをひきおこす。ペプチドグリカンにおける知見はアトピー性皮膚炎において黄色ブドウ球菌感染の合併が増悪因子であることについての分子的な基礎を説明する。

E. 結論

グラム陽性菌、陰性菌の菌体成分はマスト細胞上に発現する Toll 様受容体によって認識され、マスト細胞は活性化する。

菌体成分の違いによってマスト細胞の反応は異なる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H.

Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109:1351-1359, 2002

2. Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Cutting Edge; VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 168:2603-2607, 2002

3. Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H. TGF- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy* 31:309-314, 2002

2. 学会発表

1) Supajatura Volaluck, 牛尾博子、中尾篤人、審良静男、奥村康、羅智靖、小川秀興 *Staphylococcus aureus* 由来の peptidoglycan による Toll-like receptor (TLR)2 を介したマスト細胞の活性化 第 52 回日本アレルギー学会 2002. 11. 28

H. 知的財産権の出願／登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

皮膚及び粘膜におけるバリア機構とダニ抗原等の透過性について
の解析に関する研究

分担研究者 奥田峰広 花王株式会社安全性評価研究センター主任研究員

研究要旨 生体の防御機能である、皮膚粘膜部位のバリア機能をより正確に測定することが、アレルギー反応の個体差、部位差の解明に有用であると考えた。バリア機能の測定には各種測定法が知られているが、生体へのアレルゲンの侵入をより正確にかつ非侵襲で測定できる有用かつ簡便な方法がなかった。そこでリボフラビンの角層内浸透を指標としたバリア機能測定法を開発・応用した。

1) 洗浄モデル系を用いた、皮膚バリア機能破綻モデルにおけるリボフラビンを指標としたバリア機能測定法の有用性を、従来法である経皮水分蒸散量（TEWL）と比較したところ相関性が高い評価法であることが確認された。また、本方法を用いることで従来のTEWL測定装置の適用が不可能であった屈曲部位や指背等の微小部位あるいは鼻腔内等の測定が可能となった。

2) ヒト顔面および上腕内側を用いてバリア機能の測定した結果を解析した結果、上腕内側においては加齢によるリボフラビン浸透量の増加傾向が認められたが、顔面においては個体差が大きくアレルギー反応の部位差を示唆させる結果であった。

A. 研究目的

アレルギー反応は皮膚粘膜バリア機構、免疫反応、自律神経反応などの広義の生体防御機構が破綻し、ヒトにとって本来無害であるはずの抗原に対して過剰反応してしまう状態であると考えられる。本研究の目的は、非免疫学的生体防御機構の一部である皮膚、気道、鼻粘膜局所における皮膚粘膜バリア機能が、アレルギー反応において果たす役割を解析することである。同一抗原に暴露されていても、皮膚、気道、鼻粘膜局所それぞれに同様なアレルギー反応が認められるわけでは

ない。この違いの一つとして非免疫学的生体防御機構の一部である皮膚、気道、鼻粘膜局所における皮膚粘膜バリア機能に差があるのではないかと考える。皮膚粘膜バリア機能を正確に測定するための手法としては、放射性標識化合物を用いた経皮吸収率測定や、非侵襲的手法としての経皮水分蒸散量測定等があるが、適応部位など臨床応用の面で困難な点もある。そこでまず、非侵襲的手法を用いた皮膚粘膜バリア機能の測定法の開発を行い、アレルギー反応の部位差解析を行うこととした。さらにはダニ抗原等の経皮

吸収挙動を明らかにすることで非免疫学的生体防御機構の解析を行うこととした。侵襲のより少ない手法として、すでにビタミンB₂であるリボフラビンの経皮吸収量を元に皮膚バリア機能を測定する手法を開発している。この手法は、リボフラビンを用いることで放射性標識化合物に匹敵する検出感度を利用し、かつ測定対象への影響の少ない測定法である。本年度はその応用検討を重ねることにより測定法の正確性を確保すると共に皮膚以外の気道、鼻粘膜への応用の可能性を検討し、より有用な皮膚粘膜バリア機能の測定法の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

- ①バリア機能測定； リボフラビン（和光純薬製、特級）は30 μg/mlとなるように蒸留水で希釈したものをを用いた。脱脂綿にリボフラビン溶液を含浸させたものを皮膚に接触させ、角層中に浸透したリボフラビンをセロハンテープ（ニチバン製）により角層ごと採取した。このテープから1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬製）によりリボフラビンを再抽出し、励起波長483 nm、測定波長526 nmで測定した。
- ②皮膚シート； ブタ皮膚は小型ヘアレス種であるユカタンマイクロブタの凍結保存された皮膚を購入して用いた。皮膚表面に付着している汚れなどを除くためにヘキサン（和光純薬製、特級）を含ませた脱脂綿で軽くふき取りを行った。
- ③バリア破壊モデル； アセトン（和光

純薬製、特級）とジエチルエーテル（和光純薬製、特級）を1対1の比率で混合した溶液、もしくは5% SDS溶液を用いて、一定時間皮膚を処理することでバリア破壊モデルとした。

- ④ダニ抗原標識； ダニ抗原の経皮吸収性を測定する目的で、市販ダニ抗原溶液を蛋白標識キット(Alexa Fluor 546)を用いて蛍光標識した。この標識したダニ抗原を皮膚シートに塗布し、一定時間後にテープストリッピング法により角層を回収、あるいは蛍光顕微鏡下で観察した。

- ⑤ヒトでの測定； 市販洗顔料を用いて、顔面および前腕部を通常の使用法に従って洗浄し、30分間23℃40%の恒温恒湿室で順化した後に、測定部位にリボフラビン溶液を含浸させた脱脂綿を接触させ、一定時間後表面に残存する水滴を軽く押さえて除去した上でテープストリッピング法により角層を回収し、リボフラビン量を測定した。

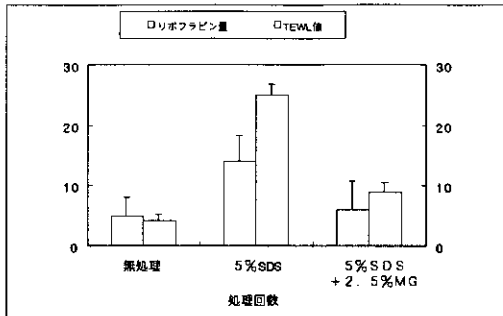
（倫理面への配慮）

動物を用いる試験については、動物倫理委員会の規定に従った。またヒトを用いる試験については、自発的に参加を申し出た被験者に規定に従い試験内容、権利を説明した上で、試験実施の同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

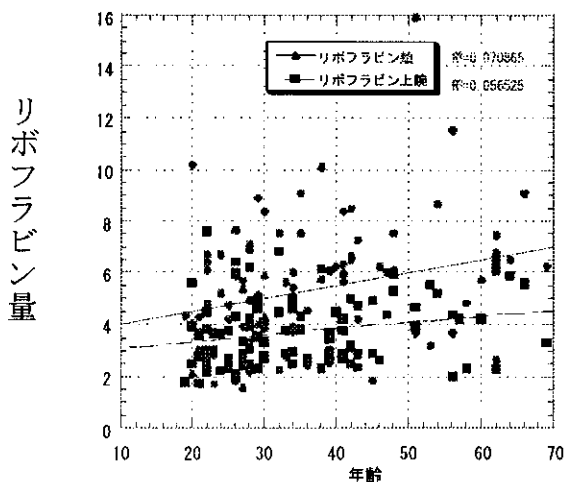
1. 洗浄処理により誘導した皮膚バリア機能破壊モデルにおけるリボフラビンを指標としたバリア機能測定法の有用性を、従来法である経皮水分蒸散量（TEWL）と比較したところ相関性が高い評価

法であることが確認された。また、本方法を用いることで従来のTEWL測定装置



置の適用が不可能であった屈曲部位や指背等の微小部位あるいは鼻腔内等の測定が可能となった。

2. ヒト顔面および上腕内側を用いてバリア機能の測定を行ったところ、上腕内側においては加齢によるリボフラビン浸透量の増加傾向が認められたが、顔面においては個体差が大きくアレルギー反応の部位差を示唆させる結果であった。



3. 蛍光標識ダニ抗原の皮膚シートに対する浸透性を評価したところバリア破壊処理を行わなくとも経皮吸収されることが確認された。定量法について検討を行っている。

D. 考察

リボフラビンを用いた経皮浸透量を指標とするバリア機能測定法の有用性が確認できた。ヒトへの実際の応用についてもその有用性が確認できた。

E. 結論

非免疫的生体防御機能の解析を行うための手法として経皮浸透量測定に基づく評価法が確立できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okuda M, Yoshiike T, Ogawa H. Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention, J. Dermatol. Sci. 30:173-179, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

皮膚血管内皮細胞機能とアレルギーに関する研究

分担研究者 坪井良治 東京医科大学皮膚科教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎発症に及ぼす神経系と血管系の関与を明らかにする目的で、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMEC）のケモカイン産生と接着分子発現に対するノルアドレナリン（NA）とサイトカインの影響を検討した。その結果、NAはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-4との共作用によりケモカインの産生と接着分子の発現を増強させ、IL-10、IL-13との共作用で減少させた。以上のことから、アトピー性皮膚炎では神経伝達物質であるNAが血管内皮細胞に作用し、起炎性サイトカインの産生を増加させて病像悪化因子の一つとなっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の病因としては、免疫学的異常だけでなく、皮膚のバリア機能異常などの非免疫学的要因も指摘されている。また、心理的ストレス、搔爬、発汗によっても皮疹が悪化することも知られている。自律神経系がストレスに対する重要な血管運動性の神経調節機構として働いていることから、我々は遅延蒼白反応に代表されるアトピー性皮膚炎の血管収縮反応に着目した。これまでの研究から、アトピー性皮膚炎患者の皮疹部では健常人に比較して神経伝達物質であるノルアドレナリン（NA）濃度が有意に高いことをすでに報告した。本研究では、アトピー性皮膚炎発症に及ぼす神経系と血管系の関与を明らかにする目的で、*in vitro*の実験系を用いてNAをはじめとする種々の神経伝達物質の皮膚血管内皮細胞に対する影響を検討した。具体的に

は培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞

（HDMEC）のケモカイン産生と接着分子発現に対するNAとサイトカインの影響を検討した。

B. 方法

Cell Systems社から購入したヒト皮膚微小血管内皮細胞（HDMEC）を単層培養し、各種サイトカイン、特にIL-1 α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-13、とNA単独、またはその組合せで刺激した。HDMEC培養上清中へのケモカイン（MCP-1、IL-8、RANTES、Eotaxin）の分泌や接着分子（VCAM-1、ICAM-1、E-selectin）の発現を、ELISAとFACSで解析した。

（倫理面での配慮）

使用した細胞は購入したものであり、倫理面での問題はないと考える。

C. 結果

NA、IL-1 α 共刺激は NA あるいは IL-1 α 単独刺激に比べて IL-8 産生、ICAM-1 発現が増加し、NA、IL-1 β 共刺激は IL-1 β 単独刺激に比べて E-selectin の発現が増加した。IL-1 α または IFN- γ と NA の共刺激により無刺激や NA 単独刺激に比べ IL-8、MCP-1 産生および VCAM-1 発現が増強された。一方、IL-10 または IL-13 と NA は共刺激により無刺激やサイトカイン単独刺激に比べ MCP-1 産生や ICAM-1、VCAM-1 発現を減少させた。

D. 考察

NA は HDMEC に対し、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4 との共作用によりケモカインの産生と接着分子の発現を増強させ、IL-10、IL-13 との共作用で減少させた。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4 は主に単球、マクロファージから産生される炎症性サイトカインであり、IL-10、IL-13 はマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制する。従って、自律神経から放出される NA は HDMEC に対して炎症性サイトカインの産生を増加させる方向に作用することが判明した。

E. 結論

アトピー性皮膚炎の病変部では、自律神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンが皮膚微小血管内皮細胞に作用し、細胞からの起炎性サイトカインの産生を増加させて病像悪化因子の一つとなっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

この研究から得られた成果で、健康に直接危害を与えるような情報は含まれていなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato Y, Saito M, Isobe T, Koga M, Tsuboi R. Noradrenaline modulates cytokine-induced chemokine production and adhesion molecule expression in human dermal microvascular endothelial cells. (submitted)

H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究に関して新たな実用新案・特許の申請は現在のところない

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防治療研究事業）
分担研究報告書

Transforming growth factor- β (TGF- β)に対する皮膚角化細胞ならびに
気道上皮細胞の応答性とアレルギー性疾患とのかかわりに関する研究

分担研究者 中尾篤人

順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター講師

研究要旨 我々は、皮膚角化細胞/気管支上皮細胞が関与するアレルギー病態における Transforming growth factor- β (TGF- β)の役割について検討した。ヒト皮膚角化細胞を炎症性サイトカインである IFN- γ , TNF- α で刺激したときに分泌されるケモカイン TARC の発現が TGF- β によって抑制され、この抑制効果は Smad pathway を介するものであった。皮膚角化細胞による TARC 発現はアトピー性皮膚炎の病態に深く関与していることが知られていることから、TGF- β がアトピー性皮膚炎の治療に有用である可能性が示唆された。また気管支喘息患者における気道リモデリング病態の強さと気管支上皮細胞における TGF- β シグナルの強さ(Smad2 のリン酸化の程度)が相関することを見出した。さらに上皮細胞における TGF- β シグナルの強さは TGF- β シグナル抑制分子である Smad7 の発現と負の相関を示すことを見出し Smad7 の気管支上皮細胞における発現調節異常が気道リモデリングの形成に関与する可能性を見いだした。以上の結果は、TGF- β シグナルの制御がアレルギー疾患の制御につながる可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

皮膚、気道、鼻粘膜局所のresidential cellによる生体防御機構（あるいはその生理的機能）が、アレルギー疾患の病態において果たす役割を明らかにするための研究の一端として、ヒト皮膚角化細胞ならびに気管支上皮細胞のTGF- β 応答性について解析し、さらに気管支上皮細胞については喘息（気道リモデリング）の病態との関係について検討した。

B. 研究方法

1 ヒト皮膚角化細胞株HaCaTをIFN- γ ならびにTNF- α にて刺激するとTh2ケモカインTARCの発現が顕著に誘導される。この

系にTGF- β あるいはそのシグナル伝達分子Smad3、あるいはシグナル抑制性分子Smad7を強発現させそれぞれがTARCの発現に及ぼす効果について検討した。

2 ヒト気管支上皮細胞株BEAS2BをTGF- β で刺激するとplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), tenascinが顕著に発現される。この系にTGF- β シグナル抑制性分子Smad7を強発現あるいはアンチセンスSmad7オリゴヌクレオチドを加えそれぞれの効果について検討した。また喘息患者肺検体を用いてのSmad7の免疫染色を行い、その染色活性と臨床的パラメータとの相関について解析した。

（倫理面への配慮）

喘息患者検体の取得に当たってはインフォームドコンセントによる患者さんからの本研究への承諾を徹底した。

C. 研究結果

- 1 IFN- γ ならびにTNF- α 刺激によるTARCの発現は、TGF- β 共刺激あるいはSmad3を強発現させると有意に抑制され、Smad7を強発現させると、その抑制は解除された。
- 2 TGF- β 刺激によるPAI-1の発現はSmad7強発現によって抑制され、アンチセンスSmad7オリゴ投与によって増強された。また気道上皮細胞におけるSmad7の発現レベルは喘息患者基底膜肥厚度ならびに気道過敏性と負の相関を示した。

D. 考察

- 1 皮膚角化細胞を炎症性サイトカインである IFN- γ , TNF- α で刺激したときに分泌されるケモカイン TARC の発現は TGF- β によって抑制されさらにこの抑制効果は Smad pathway を介する。角化細胞による TARC 発現はアトピー性皮膚炎の病態に深く関与していることが知られていることから TGF- β による TARC の抑制が患者病変部において機能しているか否か今後検討する。
- 2 気管支患者における気道リモデリング病態の強さと気管支上皮細胞における TGF- β シグナル抑制分子である Smad7 の発現の強さは負の相関を示す。インビトロでの結果とあわせ、Smad7 の気管支上皮細胞における発現調節異常が、気道リモデリングの形成に関与する可能性がある。今後さらに気管支上皮細胞における Smad7 の発現調節機構について詳細な解

析を進めていく。

E. 結論

- 1 皮膚角化細胞による TARC 発現は TGF- β によって抑制され、この抑制効果は Smad pathway を介する。
- 2 気管支喘息患者における気道リモデリング病態には TGF- β シグナルの活性化が関与している。またシグナル抑制分子である Smad7 の気管支上皮細胞における発現調節異常が気道リモデリング患者に認められる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:249-254, 2002
- 2) Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease *Trends in Molecular Medicine (Formerly; Mol. Med. Today)* 8:361-363, 2002
- 3) Nakao A, Sagara H, Setoguchi Y, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Fukuda T. Expression of Smad7 in bronchial epithelial cells is inversely correlated to basement membrane thickness and airway

hyperresponsiveness in patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:873-878, 2002

4) Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Tsuboi R, Okumura K, Ogawa H. TGF- β /Smad signaling inhibits IFN- γ and TNF- α -induced TARC (CCL17) production in HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* 31:53-58, 2003

2. 学会発表

1) Atsuhito Nakao. Role of TGF- β /SMAD signaling pathway in homeostatic regulation of the immunesystem. Symposium 8: Homeostatic regulation and cytokines. 第32回日本免疫学会総会学術集会 2002. 12. 5

2) 中尾篤人、相良博典、岡田武則、奥村康、小川秀興、福田健
気道上皮細胞での Smad7 の発現は喘息患者上皮基底膜肥厚と負に相関する
第52回日本アレルギー学会 2002. 11. 28

H. 知的財産権の出願／登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

鼻粘膜上皮におけるアレルギー性サイトカイン及びその他の修飾因子による
反応性の解析に関する研究

分担研究者 花澤豊行

千葉大学大学院医学研究院頭頸部腫瘍学講師

研究要旨

アレルギー性鼻炎における一酸化窒素の産生が鼻粘膜にどのような影響を与えているかを、酸化ストレスの面から検討した。手術時に得られたヒト鼻粘膜片を用いて、組織培養を行い、組織培養液中に cytomix (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) および過酸化水素にて刺激した後、鼻粘膜上皮に発現する iNOS および nitrotyrosine の免疫染色性と培養液中の産生量を定量した。また、デキサメサゾン、iNOS 阻害薬 (1400W) および抗酸化作用を有するグルタチオンの枯渴薬(ブチオニンスルフォキサミン)で前処置した場合のそれぞれの発現および産生量を比較検討した。cytomix 刺激により、鼻粘膜上皮細胞に iNOS および nitrotyrosine の発現が誘導された。また、外因性の酸化ストレスである過酸化水素刺激によりさらに強い iNOS および nitrotyrosine の発現が上皮細胞内および鼻粘膜上皮内にもみとめ、それらはデキサメサゾンおよび 1400W の前処置によりほぼ抑制され、ブチオニンスルフォキサミン前処置により過酸化水素刺激時レベルまで増強した。以上より、NO による酸化ストレスが鼻粘膜上皮になんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。また、その酸化ストレスは、鼻粘膜上皮に存在するグルタチオンにより防御されている可能性が確認できた。今後は、この酸化ストレスが鼻粘膜上皮過敏性およびサイトカイン産生にどの程度の影響を及ぼしているかについて検討する。

A. 研究目的

アレルギー性鼻炎患者においては、鼻腔より産生される一酸化窒素 (NO) 濃度が、健常者に比べ推計学的に有意に増加している。好酸球の鼻粘膜内への集簇を特徴とする本疾患において、NO 産生の増大に対する好酸球の関与についてこれまで検討を加えてきた。その結果、好酸球遊走を促すケモカインであるエオキシンの鼻腔内投与によりヒトでは鼻腔内 NO 産生量が鼻腔内に遊走される好酸球数と相関して増加することを確認した。

そこで、気道における NO を中心とした酸化ストレスのアレルギー性炎症への関与に着目した。特に酸化ストレスとしての NO および外因性の過酸化水素が鼻粘膜上皮細胞に与える影響を鼻粘膜防御機構を中心に検討した。

B. 研究方法

手術時に得られた非アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜を用い、組織培養法にて培養液中に cytomix (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) および過酸化水素にて刺激した後、鼻粘膜上皮に発現する iNOS および

nitrotyrosine の免疫染色性と培養液中の産生量を定量した。また、デキサメサゾン、iNOS 阻害薬 (1400W) および抗酸化作用を有するグルタチオンの枯渇薬(ブチオニンスルフォキサミン)で前処置した場合のそれぞれの発現および産生量を比較検討した。

C. 研究結果

1) cytomix 刺激により、鼻粘膜上皮細胞に iNOS および nitrotyrosine の発現が誘導された。また、外因性の強い酸化ストレスである過酸化水素刺激によりさらに強い iNOS および nitrotyrosine の発現が上皮細胞内および鼻粘膜上皮下にもみとめられ、その染色性はアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜での発現に酷似していた。

2) cytomix 刺激により生じた nitrotyrosine の生成は、デキサメサゾンおよび 1400W の前処置によりほぼ抑制され、ブチオニンスルフォキサミン前処置により過酸化水素刺激時レベルまで増強した。

D. 考察

アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜上皮にみとめられる NO 由来の酸化ストレスは、nitrotyrosine の免疫染色性で評価することができ、NO による酸化ストレスが鼻粘膜上皮になんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。その免疫染色の状態は、正常コントロールに比べアレルギー性鼻炎患者では強く、さらにアレルギー性鼻炎患者に見られる染色性は、強い酸化ストレスを惹起する過酸化水素刺激により生じた染色性の変化に酷似しており、アレルギー性鼻炎患者においては鼻

粘膜内においてアレルギー炎症に伴い、強い酸化ストレスが生じていることが示唆された。これらの酸化ストレスは、NO 合成酵素阻害およびステロイドの前処置によりほぼ完全に抑制されることから、NO 合成酵素の鼻粘膜上皮内への誘導が関与している。また、その際生じた酸化ストレスは、鼻粘膜上皮細胞内に存在するグルタチオンにより防御されている可能性が確認できた。今後は、アレルギー炎症により生じた酸化ストレスが、鼻粘膜上皮過敏性や上皮細胞から産生されるサイトカインにどのような影響を与えているかを検討する必要がある。

E. 結論

鼻粘膜上皮細胞には、アレルギー炎症により生ずる NO 由来の酸化ストレスから鼻粘膜を守る防御機構が存在する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 花澤豊行. 気道過敏性亢進のメカニズムとその制御 —鼻過敏性発現のメカニズムとその制御— 第 14 回日本アレルギー春季大会 2002. 3. 21

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H.	Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity.	J. Clin. Invest.	109	1351-1359	2002
Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Ra C.	Cutting Edge; VacA, a vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines.	J. Immunol.	168	2603-2607	2002
Sumiyoshi K, Nakao A, Ushio H, Mitsuishi K, Okumura K, Tsuboi R, Ra C, Ogawa H.	TGF- β 1 suppresses atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice.	Clin. Exp. Allergy	31	309-314	2002
Okuda M, Yoshiike T, Ogawa H.	Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention.	J. Dermatol. Sci.	30	173-179	2002
Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A.	Activation of TGF- β /Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma.	J. Allergy Clin. Immunol.	110	249-254	2002
Nakao A, Okumura K, Ogawa H.	Smad7: a new key player in TGF- β -associated disease	Trends in Molecular Medicine. (Formerly; Mol. Med. Today)	8	361-363	2002