

平成14年度

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

研究報告書

厚生労働省

表皮アレルギー炎症発症と治療におけるサイトカイン・ケモカインとその受容体に関する研究

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 義江 修 近畿大学医学部細菌学教授

古江 増隆 九州大学大学院医学系研究院皮膚科学教授

中村晃一郎 福島県立医科大学皮膚科助教授

研究要旨 アレルギー性皮膚疾患は多数にのぼるが、アトピー性皮膚炎(AD)、水疱症類天疱瘡(BP)、菌状息肉症(MF)は、血清 IgE の上昇、末梢血好酸球数の増加など共通した病態を示す特徴がある。本研究ではこれらの病態に対するサイトカイン・ケモカインの関与について検討した。これまでに、AD における TARC/CCL17, MDC/CCL20 とその受容体である CCR4 の関与を明らかにしてきたが、AD 患者では血漿に比べ血清での TARC 値がより高値を示すことを見いだした。さらに、AD の病変部皮膚では、慢性期に比べて急性期においてより多く、TARC mRNA 産生細胞や CCR4 陽性細胞が認められた。また、BP では水疱および血清中の TARC が高値を示し、病勢を反映して病変部角化細胞(KC)が TARC を強発現していることを明らかにした。MF でも血清 TARC が高値を示し、病期の進行と共に亢進することを示した。表皮 KC の cell line である HaCaT 細胞による TARC や MDC 産生は、IL-4 で抑制され IFN- γ で亢進することを示した。また、HaCaT 細胞からの TARC 産生が、TGF- β や紫外線(UVA)により抑制されることも明らかにした。一方線維芽細胞では、TNF- α +IL-4 の存在下で TARC 産生が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 の作用をさらに増強させた。また、TARC を表皮 KC に過剰発現させたマウスの作成に成功し、現在その形質を解析中である。今後はこれらケモカインの産生制御に関与する薬剤を利用することにより、皮膚アレルギー性疾患の新たな治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

皮膚アレルギー炎症には患者数の増加や難治化、治療の混乱などで社会的問題化しているアトピー性皮膚炎(AD)や、環境の変化によって新たな物質による皮膚障害として現れる接触皮膚炎など厚生労働行政上問題となるものが多い。このようなアレルギー炎症が皮膚に現れる機序は他臓器に比べて研究が進んでいる。これまでリンパ球に発現しているとされていた cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA)とそのリガンドを中心に研究されてきたが、近年サイトカインのうち白血球に対する遊走能を有するケモカ

インについての研究が注目を集めている。本研究班は、このサイトカイン、ケモカインとその受容体発現細胞に焦点をあてて皮膚のアレルギー炎症機序を明らかにし、発症予防を含めた治療の可能性を示そうというものである。具体的には Th2 ケモカインと呼ばれている TARC/CCL17, MDC/CCL22 とその受容体である CCR4 についての研究と、皮膚特異的ケモカインとされる CTACK /CCL27 とその受容体 CCR10 を中心に研究を進めることにしている。初年度である本年は主として TARC/CCL17, MDC/CCL22 について研究した。

B. 研究方法

(1) 皮膚アレルギー疾患における TARC /CCL17, MDC/CCL22 の関与に関する研究では、これまで玉置らは AD 患者血清中で TARC が高値を示しかつ病勢と相関し、TARC 産生細胞としては表皮ケラチノサイト(KC)であろうとする結果を報告してきた。義江らは AD 患者における TARC 値を血清と血漿を用いて比較し、MDC, eotaxin /CCL11 についても比較検討した。玉置らは AD における血清 MDC 値について検討するとともに、末梢血好酸球増多と血清 IgE 値上昇を伴う自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡(BP)の水疱内容液と血清中の TARC 値及び皮膚における TARC の発現について検討した。また皮膚悪性 T 細胞リンパ腫である菌状息肉症(MF)も同様の検査所見を呈するので、MF における血清 TARC 値についても検討した。AD 病変部皮膚における TARC と CCR4 の発現について中村らは in situ hybridization 法を用いて急性期病変、慢性期病変とを比較検討した。

(2) 表皮ケラチノサイト(KC)からの TARC, MDC 産生制御については正常ヒト培養表皮細胞(NHKC)及び細胞株 HaCaT 細胞を用いて検討した。義江らは各種抗体による mRNA 及び蛋白レベルでの産生について詳細に検討し、玉置らは IL-4 による産生制御を Th1 ケモカイン IP-10/CXCL10 と比較した。古江らは更にこのようにして産生された TARC が CCR4 発現細胞に対して遊走活性を有するか否かについて検討を行った。中村らは HaCaT 細胞からの TARC 産生について AD の治療で用いられる紫外線(UVA)による影響と TGF- β 1 による影響について検討した。

(3) 線維芽細胞からの TARC 産生制御を古江らは細胞株 NG1RGB 細胞を用いて HaCaT 細胞と比較検討した。(4) CTACK/CCL27 の関与について玉置らは ELISA による測定

法を作成し血清中の値について AD 及び乾癬患者について検討を始めた。(5) TARC の表皮での発現が皮膚アレルギー炎症に及ぼす影響を明らかにする目的で、玉置らは K14 TARC トランスジェニック(tg)マウスの作成を試みた。

C. 研究結果

(1) 皮膚アレルギー疾患における TARC, MDC : 義江らは TARC に関しては血漿と比べ血清の値が 5-20 倍程度高くなること、特に AD 患者で差が大きいことを見いだした(文献 5)。TARC の血清濃度は急激に上昇し、これは血小板からの放出によること、更に健常人と比べて AD 患者の血小板は TARC 含量が多いことを明らかにした。また eotaxin についても血清では値が若干上昇したが、これは赤血球のケモカインスカベンジャーレセプター-DARC からの遊離によることを明らかにした。MDC については血漿と血清で大きな違いはなかった。玉置らは BP の水疱内容、血清中 TARC 値、病変 KC の TARC の発現について検討し、TARC 値が水疱では 4000 pg/mL、血清では 1500 pg/mL と高値を示し、病勢を反映し、病変部 KC が TARC を強発現していることを明らかにした(文献 1)。また MF でも血清 TARC 値が高値を示し stage の進行と共に亢進することを示した(文献 2)。皮膚病変部では、中村らは急性期では KC に TARC mRNA 発現を認め、真皮浸潤細胞にも TARC mRNA、CCR4 mRNA 発現細胞を認めた。慢性期では KC の TARC mRNA 発現細胞、浸潤細胞の CCR4 mRNA 発現細胞は急性期と比べ数、強度ともに減少が認められた(文献 9)。

(2) KC からの TARC、MDC 産生 : 義江らは NHKC について TARC, MDC の mRNA 発現はともに Th1 型の IFN- γ で誘導され、TNF- α や IL-1 β あるいは Th2 型の IL-4 はほとんど効果がないことを明らかにした(文献

6)。更に培養上清中への分泌を測定したところ、MDC の分泌は認められたが TARC の分泌は検出限界以下であり、TARC については転写後の発現制御の存在が示唆された。玉置ら、古江らは KC の TARC 産生は TNF- α と IFN- γ によって濃度依存性に有意に増強され、IL-4 と IL-13 存在によって濃度依存性に有意に抑制されることを示した (文献 3, 8)。中村らは、HaCaT 細胞からの TARC 産生が、TGF- β や紫外線(UVA)により抑制されることを明らかにした (文献 10)。更に古江らは CCR4 を発現させた Jarcat 細胞に対して KC から産生された TARC が遊走能を有することを示した。

(3) KC と比較して線維芽細胞では、古江らは TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の存在下で TARC が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の作用を更に増強させたことを明らかにした (文献 8)。(4) CTACK は血清中で AD で有意な上昇があるようであり、更に検討を進める。(5) K14 TARC tg マウス作成に成功した。現在、形質を解析中である。

D. 考察

本年度は初年度であったが、皮膚アレルギー疾患における Th2 ケモカインである TARC, MDC の関与についてかなり明らかになってきたと考えている。この制御を in vitro でどのように検討するかという点についてのデータも得ることができたと思われる。In vitro で HaCaT 細胞を用いることによってその情報伝達機構についても解析が可能になると思われ、CX-659S や新たな NF κ B antagonist による検討が次年度以降に行われる予定である。また K14 TARC tg マウスなど動物モデルによる解析も次年度以降に行われることになっている。更に KC のみならず線維芽細胞の関与についても明らかになってきたことから、次年度以降真皮におけるこれらの細胞の

関与についても検討を行う予定である。

E. 結論

皮膚アレルギー性疾患の病態形成に、TARC や MDC などの Th2 ケモカインやそれらの受容体である CCR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、表皮 KC からの Th2 ケモカインの産生制御に各種サイトカインが関与することも明らかとなった。今後はこれらケモカインの産生制御に関与する薬剤を利用することにより、皮膚アレルギー性疾患の新たな治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K. High level of TARC (thymus and activation-regulated chemokine / CCL17) in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 148: 203-10, 2003.
- 2) Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC / CCL17) in mycosis fungoides: Serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 48: 23-30, 2003.
- 3) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Yano S, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. IL-4, but not IL-13, modulate TARC (thymus and activation regulated chemokine) / CCL17 and IP-10 (Interferon -induced protein of 10kDa) / CXCL10 released by TNF- α and IFN- γ in HaCaT cell line. *Cytokine* 20: 1-6, 2002.

- 4) 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* 127: 270-3, 2002.
- 5) Fujisawa T, Fujisawa R, Kato Y, Nakayama T, Morita A, Katsumata H, Nishimori H, Iguchi K, Kamiya H, Gray PW, Chantry D, Suzuki R, Yoshie O. Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 110: 139-46, 2002.
- 6) Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, Yamada H, Fujisawa R, Bito T, Harada S, Fukunaga A, Chantry D, Gray PW, Morita A, Suzuki R, Tezuka T, Ichihashi M, Yoshie O. IFN- γ -induced expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int Immunol* 14: 767-73, 2002.
- 7) Goto Y, Watanabe N, Kogawa N, Tsuchiya M, Takahashi O, Uchi H, Furue M, Hayashi H. CX-659S: a novel diaminouracil derivative that has antioxidative and acute anti-inflammatory activities. *Eur J Pharmacol* 438: 189-96, 2002.
- 8) Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M. Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *J Dermatol Sci* 30: 29-36, 2002.
- 9) Zheng X, Nakamura K, Furukawa H, Nishibu A, Takahashi M, Tojo M, Kaneko F, Kakinuma T, Tamaki K. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. *J Dermatol* 30: 26-32, 2003.
- 10) Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Oyama N, Nishibu A, Satoh M, Kakinuma T, Wakugawa M, Tamaki K, Kaneko F. TGF- β 1-mediated regulation of thymus and activation regulated chemokine synthesis and secretion by HaCaT cells co-stimulated with TNF- α and IFN- γ . *J Dermatol Sci* 30: 154-60, 2002.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 特許出願平 9-513294
2. 実用新案登録 なし

表皮アレルギー炎症発症と治療におけるサイトカイン・ケモカインとその受容体に関する研究

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 義江 修 近畿大学医学部細菌学教授

古江 増隆 九州大学大学院医学系研究院皮膚科学教授

中村晃一郎 福島県立医科大学皮膚科助教授

研究要旨 アレルギー性皮膚疾患は多数にのぼるが、アトピー性皮膚炎(AD)、水疱症類天疱瘡(BP)、菌状肉肉症(MF)は、血清 IgE の上昇、末梢血好酸球数の増加など共通した病態を示す特徴がある。本研究ではこれらの病態に対するサイトカイン・ケモカインの関与について検討した。これまでに、AD における TARC/CCL17, MDC/CCL20 とその受容体である CCR4 の関与を明らかにしてきたが、AD 患者では血漿に比べ血清での TARC 値がより高値を示すことを見いだした。さらに、AD の病変部皮膚では、慢性期に比べて急性期においてより多く、TARC mRNA 産生細胞や CCR4 陽性細胞が認められた。また、BP では水疱および血清中の TARC が高値を示し、病勢を反映して病変部角化細胞(KC)が TARC を強発現していることを明らかにした。MF でも血清 TARC が高値を示し、病期の進行と共に亢進することを示した。表皮 KC の cell line である HaCaT 細胞による TARC や MDC 産生は、IL-4 で抑制され IFN- γ で亢進することを示した。また、HaCaT 細胞からの TARC 産生が、TGF- β や紫外線(UVA)により抑制されることも明らかにした。一方線維芽細胞では、TNF- α +IL-4 の存在下で TARC 産生が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 の作用をさらに増強させた。また、TARC を表皮 KC に過剰発現させたマウスの作成に成功し、現在その形質を解析中である。今後はこれらケモカインの産生制御に関与する薬剤を利用することにより、皮膚アレルギー性疾患の新たな治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

皮膚アレルギー炎症には患者数の増加や難治化、治療の混乱などで社会的問題化しているアトピー性皮膚炎(AD)や、環境の変化によって新たな物質による皮膚障害として現れる接触皮膚炎など厚生労働行政上問題となるものが多い。このようなアレルギー炎症が皮膚に現れる機序は他臓器に比べて研究が進んでいる。これまでリンパ球に発現しているとされていた cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA)とそのリガンドを中心に研究されてきたが、近年サイトカインのうち白血球に対する遊走能を有するケモカ

インについての研究が注目を集めている。本研究班は、このサイトカイン、ケモカインとその受容体発現細胞に焦点をあてて皮膚のアレルギー炎症機序を明らかにし、発症予防を含めた治療の可能性を示そうというものである。具体的には Th2 ケモカインと呼ばれている TARC/CCL17, MDC/CCL22 とその受容体である CCR4 についての研究と、皮膚特異的ケモカインとされる CTACK /CCL27 とその受容体 CCR10 を中心に研究を進めることにしている。初年度である本年は主として TARC/CCL17, MDC/CCL22 について研究した。

B. 研究方法

(1) 皮膚アレルギー疾患における TARC/CCL17, MDC/CCL22 の関与に関する研究では、これまで玉置らは AD 患者血清中で TARC が高値を示しかつ病勢と相関し、TARC 産生細胞としては表皮ケラチノサイト(KC)であろうとする結果を報告してきた。義江らは AD 患者における TARC 値を血清と血漿を用いて比較し、MDC, eotaxin/CCL11 についても比較検討した。玉置らは AD における血清 MDC 値について検討するとともに、末梢血好酸球増多と血清 IgE 値上昇を伴う自己免疫性水疱症である水疱性類天疱瘡(BP)の水疱内容液と血清中の TARC 値及び皮膚における TARC の発現について検討した。また皮膚悪性 T 細胞リンパ腫である菌状息肉症(MF)も同様の検査所見を呈するので、MF における血清 TARC 値についても検討した。AD 病変部皮膚における TARC と CCR4 の発現について中村らは *in situ* hybridization 法を用いて急性期病変、慢性期病変とを比較検討した。

(2) 表皮ケラチノサイト(KC)からの TARC, MDC 産生制御については正常ヒト培養表皮細胞(NHKC)及び細胞株 HaCaT 細胞を用いて検討した。義江らは各種抗体による mRNA 及び蛋白レベルでの産生について詳細に検討し、玉置らは IL-4 による産生制御を Th1 ケモカイン IP-10/CXCL10 と比較した。古江らは更にこのようにして産生された TARC が CCR4 発現細胞に対して遊走活性を有するか否かについて検討を行った。中村らは HaCaT 細胞からの TARC 産生について AD の治療で用いられる紫外線(UVA)による影響と TGF- β 1 による影響について検討した。

(3) 線維芽細胞からの TARC 産生制御を古江らは細胞株 NG1RGB 細胞を用いて HaCaT 細胞と比較検討した。(4) CTACK/CCL27 の関与について玉置らは ELISA による測定

法を作成し血清中の値について AD 及び乾癬患者について検討を始めた。(5) TARC の表皮での発現が皮膚アレルギー炎症に及ぼす影響を明らかにする目的で、玉置らは K14 TARC トランスジェニック(tg)マウスの作成を試みた。

C. 研究結果

(1) 皮膚アレルギー疾患における TARC, MDC : 義江らは TARC に関しては血漿と比べ血清の値が 5-20 倍程度高くなること、特に AD 患者で差が大きいことを見いだした(文献 5)。TARC の血清濃度は急激に上昇し、これは血小板からの放出によること、更に健常人と比べて AD 患者の血小板は TARC 含量が多いことを明らかにした。また eotaxin についても血清では値が若干上昇したが、これは赤血球のケモカインスカベンジャーレセプター-DARC からの遊離によることを明らかにした。MDC については血漿と血清で大きな違いはなかった。玉置らは BP の水疱内容、血清中 TARC 値、病変 KC の TARC の発現について検討し、TARC 値が水疱では 4000 pg/mL、血清では 1500 pg/mL と高値を示し、病勢を反映し、病変部 KC が TARC を強発現していることを明らかにした(文献 1)。また MF でも血清 TARC 値が高値を示し stage の進行と共に亢進することを示した(文献 2)。皮膚病変部では、中村らは急性期では KC に TARC mRNA 発現を認め、真皮浸潤細胞にも TARC mRNA, CCR4 mRNA 発現細胞を認めた。慢性期では KC の TARC mRNA 発現細胞、浸潤細胞の CCR4 mRNA 発現細胞は急性期と比べ数、強度ともに減少が認められた(文献 9)。

(2) KC からの TARC, MDC 産生 : 義江らは NHKC について TARC, MDC の mRNA 発現はともに Th1 型の IFN- γ で誘導され、TNF- α や IL-1 β あるいは Th2 型の IL-4 はほとんど効果がないことを明らかにした(文献

6). 更に培養上清中への分泌を測定したところ、MDC の分泌は認められたが TARC の分泌は検出限界以下であり、TARC については転写後の発現制御の存在が示唆された。玉置ら、古江らは KC の TARC 産生は TNF- α と IFN- γ によって濃度依存性に有意に増強され、IL-4 と IL-13 存在によって濃度依存性に有意に抑制されることを示した (文献 3, 8)。中村らは、HaCaT 細胞からの TARC 産生が、TGF- β や紫外線(UVA)により抑制されることを明らかにした (文献 10)。更に古江らは CCR4 を発現させた Jarcac 細胞に対して KC から産生された TARC が遊走能を有することを示した。

(3) KC と比較して線維芽細胞では、古江らは TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の存在下で TARC が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の作用を更に増強させたことを明らかにした (文献 8)。(4) CTACK は血清中で AD で有意な上昇があるようであり、更に検討を進める。(5) K14 TARC tg マウス作成に成功した。現在、形質を解析中である。

D. 考察

本年度は初年度であったが、皮膚アレルギー疾患における Th2 ケモカインである TARC, MDC の関与についてかなり明らかになってきたと考えている。この制御を in vitro でどのように検討するかという点についてのデータも得ることができたと思われる。In vitro で HaCaT 細胞を用いることによってその情報伝達機構についても解析が可能になると思われ、CX-659S や新たな NF κ B antagonist による検討が次年度以降に行われる予定である。また K14 TARC tg マウスなど動物モデルによる解析も次年度以降に行われることになっている。更に KC のみならず線維芽細胞の関与についても明らかになってきたことから、次年度以降真皮におけるこれらの細胞の

関与についても検討を行う予定である。

E. 結論

皮膚アレルギー性疾患の病態形成に、TARC や MDC などの Th2 ケモカインやそれらの受容体である CCR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、表皮 KC からの Th2 ケモカインの産生制御に各種サイトカインが関与することも明らかとなった。今後はこれらケモカインの産生制御に関与する薬剤を利用することにより、皮膚アレルギー性疾患の新たな治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K. High level of TARC (thymus and activation-regulated chemokine / CCL17) in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. Br J Dermatol 148: 203-10, 2003.
- 2) Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC / CCL17) in mycosis fungoides: Serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. J Am Acad Dermatol 48: 23-30, 2003.
- 3) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Yano S, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. IL-4, but not IL-13, modulate TARC (thymus and activation regulated chemokine) / CCL17 and IP-10 (Interferon γ -induced protein of 10kDa) / CXCL10 released by TNF- α and IFN- γ in HaCaT cell line. Cytokine 20: 1-6, 2002.

- 4) 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* 127: 270-3, 2002.
- 5) Fujisawa T, Fujisawa R, Kato Y, Nakayama T, Morita A, Katsumata H, Nishimori H, Iguchi K, Kamiya H, Gray PW, Chantry D, Suzuki R, Yoshie O. Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 110: 139-46, 2002.
- 6) Horikawa T, Nakayama T, Hikita I, Yamada H, Fujisawa R, Bito T, Harada S, Fukunaga A, Chantry D, Gray PW, Morita A, Suzuki R, Tezuka T, Ichihashi M, Yoshie O. IFN- γ -induced expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int Immunol* 14: 767-73, 2002.
- 7) Goto Y, Watanabe N, Kogawa N, Tsuchiya M, Takahashi O, Uchi H, Furue M, Hayashi H. CX-659S: a novel diaminouracil derivative that has antioxidative and acute anti-inflammatory activities. *Eur J Pharmacol* 438: 189-96, 2002.
- 8) Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M. Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *J Dermatol Sci* 30: 29-36, 2002.
- 9) Zheng X, Nakamura K, Furukawa H, Nishibu A, Takahashi M, Tojo M, Kaneko F, Kakinuma T, Tamaki K. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. *J Dermatol* 30: 26-32, 2003.
- 10) Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Oyama N, Nichibu A, Satoh M, Kakinuma T, Wakugawa M, Tamaki K, Kaneko F. TGF- β 1-mediated regulation of thymus and activation regulated chemokine synthesis and secretion by HaCaT cells co-stimulated with TNF- α and IFN- γ . *J Dermatol Sci* 30: 154-60, 2002.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 特許出願平 9-513294
2. 実用新案登録 なし

表皮細胞からのケモカイン産生機序に関する研究

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

研究協力者 柿沼 誉 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
佐伯 秀久 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
小宮根真弓 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
渡邊 孝宏 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師

研究要旨 アレルギー性皮膚疾患は多数にのぼるが、アトピー性皮膚炎(AD)、水疱症類天疱瘡(BP)、菌状息肉症(MF)は、血清 IgE の上昇、末梢血好酸球数の増加など共通した病態を示す特徴がある。本研究ではこれらの病態に対するサイトカイン・ケモカインの関与について検討した。これまでに、AD における TARC/CCL17, MDC/CCL20 とその受容体である CCR4 の関与を明らかにした。今年度は、BP の水疱および血清中の TARC が高値を示し、病勢を反映して病変部角化細胞(KC)が TARC を強発現していることを明らかにした。また、MF でも血清 TARC が高値を示し、stage の進行と共に亢進することを示した。KC の cell line である HaCaT 細胞による TARC や MDC 産生は IL-4 で抑制され IFN- γ で亢進することを示した。更に、TARC を表皮 KC に過剰発現させたマウスの作成に成功し、現在その形質を解析中である。今後はこれらケモカインの産生制御を細胞内情報伝達機構も含めて検討を進めていくことにより、新たな治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

アレルギー性皮膚疾患は多数にのぼるが、血清 IgE の上昇、末梢血好酸球数の増加など共通した病態を示す特徴がある。本研究では、これらの病態に対するサイトカイン・ケモカインの関与について検討することにした。(1) アトピー性皮膚炎(AD)、水疱症類天疱瘡(BP)、菌状息肉症(MF)における TARC/CCL17, MDC/CCL20 および CTACK/CCL27 について検討する。(2) 表皮ケラチノサイト(KC)からの TARC, MDC, CTACK 産生制御機構について検討する。表皮に存在するランゲルハンス細胞(LC)についても同様に検討する。(3) AD を対象にサイトカインやケモカイン遺伝子多型の解析を行ない、疾患感受性遺伝

子の検討を行なう。(4) TARC, CTACK が表皮ケラチノサイトに過剰発現したマウス(K14 tg マウス)を作成し、アレルギー性皮膚疾患モデルマウスの作成を検討する。

B. 研究方法

これまで AD における TARC, MDC とその受容体である CCR4 の発現については報告してきた (J Allergy Clin Immunol 2001, Clin Exp Immunol 2002, J Invest Dermatol 2001)。本年度は、(1) BP の水疱および血清中 TARC 値を ELISA で測定し、病変部 KC の TARC 発現について免疫組織染色にて検討した。また、MF でも血清 TARC を測定した。更に、AD の血清 CTACK 値も測定して

いる。(2) KC の cell line である HaCaT 細胞を用いて、TARC および MDC 産生制御を ELISA により検討した。また、LC を用いて同様の検討を行なった。(3) 学内での倫理委員会での承認および患者からの同意を得たうえで、AD 患者の末梢血より genomic DNA を抽出し、IL-12 や IL-13 の多型性解析を PCR-RFLP 法により行なった。(4) human K14 promoter, mouse TARC cDNA, human GH polyA を用いてコンストラクトを作成し、TARC 過剰発現マウスを作成した。更に、CTACK を表皮に過剰発現させるコンストラクトの作成に着手した。

C. 研究結果

(1) BP 患者では、血清中の TARC 値が 1500 pg/ml と高値を示し、水疱液中では 4000 pg/ml と更に高値を示し、病勢を反映して病変部 KC が TARC を強発現していることを明らかにした(文献 1)。MF でも血清 TARC が高値を示し、stage の進行と共に亢進することを示した(文献 2)。(2) HaCaT 細胞による TARC 産生は IL-4 で抑制され IFN- γ で亢進することを示した(文献 4)。MDC 産生についても同様の結果が得られた(J Dermatol Sci, in press)。興味あることに、LC による MDC 産生は異なる制御を受けていた(投稿中)。(3) AD 患者の遺伝子多型を解析したところ、Eotaxin 遺伝子多型では健康人と比べて有意差は認められなかったが(文献 5)、IL-12 および IL-13 遺伝子多型では有意差が認められた(文献 6, 7)。(4) K-14 TARC tg マウスの作成に成功した。現在、形質の解析を進めている。

D. 考察

(1)の検討からアレルギー性皮膚疾患では、TARC, MDC, CCR4 など Th2 ケモカインの関与が明らかにされた。TARC, MDC は主に KC から産生され、CCR4 発現 Th2 細胞が皮膚に遊走して皮膚炎成立に至る病態が示唆された。CTACK の関与も想定され更に検討することになっている。これらの関与については(4)で試みているトランスジェニックマウスが作成できれば更に明らかにできるものと考えている。(2)で検討を進めている HaCaT 細胞からの TARC, MDC 産生制御はサイトカインによる制御の一端を明らかできたが、更に新たに作成された薬剤である NF κ B antagonist による制御を含めて、詳細な細胞内情報伝達機構について検討をすすめていく。(3)の解析から、IL-12 や IL-13 遺伝子多型が AD の発症に関与することが明らかとなった。今後は TARC, MDC の遺伝子多型解析も進めていく。

E. 結論

皮膚アレルギー性疾患の病態形成に、TARC や MDC などの Th2 ケモカインやそれらの受容体である CCR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、表皮 KC からの Th2 ケモカインの産生制御に各種サイトカインが関与することも明らかとなった。今後はこれらケモカインの産生制御を細胞内情報伝達機構も含めて検討を進めていくことにより、新たな治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K. High level of TARC (thymus and activation-regulated chemokine / CCL17) in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2003; 148: 203-10.
- 2) Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC / CCL17) in mycosis fungoides: Serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 23-30.
- 3) Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K. Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 403-10.
- 4) Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Yano S, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. IL-4, but not IL-13, modulate TARC (thymus and activation regulated chemokine) / CCL17 and IP-10 (Interferon -induced protein of 10kDa)/ CXCL10 released by TNF- α and IFN- γ in HaCaT cell line. *Cytokine* 2002; 20: 1-6.
- 5) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Kakinuma T, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Eotaxin gene single nucleotide polymorphisms in the promoter and exon regions are not associated with susceptibility to atopic dermatitis, but two of them in the promoter region are associated with IgE levels in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2002; 29: 222-228.
- 6) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Kishimoto M, Tanida Y, Kakinuma T, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 161-6.
- 7) Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Kakinuma T, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Interleukin-13 gene polymorphism G4257A is associated with atopic dermatitis in Japanese patients. *J Dermatol Sci*. 2002; 30: 100-7.
- 8) 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* 2002; 127: 270-3.

H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

皮膚特異的ケモカイン産生制御に関する研究

分担研究者 義江 修 近畿大学医学部細菌学教授

研究要旨 : Th2 タイプのメモリーT細胞に選択的に発現する CCR4 のリガンド TARC/CCL17 と MDC/CCL22 のアトピー性皮膚炎 (AD) における役割を検討した。血漿と血清での値の比較から、TARC/CCL17 は血小板に存在し、血清の形成過程で放出されることを見いだした。さらに AD の患者の血小板はより高値の TARC/CCL17 を含んでいた。血小板は CCR4 を発現してそのリガンドで凝集することが知られており、活性化により放出された TARC/CCL17 がさらに血小板の凝集を誘導することが示唆された。これらの結果から、流血中の TARC/CCL17 の値は血漿で測定する必要があることが分かった。一方、MDC/CCL22 の値は血漿と血清で大きな違いはなかった。また好酸球に選択的に発現する CCR3 のリガンド eotaxin/CCL11 の値は赤血球の発現するケモカインスカベンジャーレセプターDARC からの遊離により、血清で若干上昇した。そこで正常人と AD 患者の血漿でのこれらのケモカインの値を比較した。その結果、AD の患者で TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の値は有意に上昇しており、それは病勢と有意に相関し、さらに治療によって有意に低下した。一方、eotaxin/CCL11 の値にはそのような相関はみられなかった。さらに TARC/CCL17 と MDC/CCL22 は AD 患者の皮膚の上皮細胞で産生されており、また培養皮膚角化細胞からは Th1 型のサイトカイン IFN γ の作用により発現が誘導された。さらに MDC/CCL22 についてはタンパクの分泌も確認されたが、TARC/CCL17 のタンパクはほとんど検出されず、TARC/CCL17 の産生には転写後の調節が存在することが示唆された。

A. 研究目的

我々は世界に先駆けて新規 CC ケモカイン TARC/CCL17 をクローニングし、さらに TARC/CCL17 は MDC/CCL22 とともに CCR4 のリガンドであること、CCR4 は Th2 型のメモリーT細胞に選択的に発現すること、アトピー様皮膚炎を自然発症する Nc/Nga マウスでは発症にともなって皮膚角化細胞での TARC/CCL17 産生と皮下樹状細胞での MDC/CCL22 産生が見られること、マウスの角化細胞株 PAM212 は TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインとともに Th1 型のサイトカイン IFN- γ の刺激で TARC/CCL17 を産生すること (Th2 型のサイトカイン IL-4 は誘導しない)、などを報告してきた (J. Biol. Chem. 271:21514-21521, 1996; J. Biol. Chem. 272:15036-15042, 1997; J. Biol. Chem. 273:1764-1768, 1998; Int. Immunol. 11:81-88, 1999; J. Clin. Invest. 104:1097-1105, 1999)。そこで今回は実際のアトピー性皮膚炎 (AD) の患者での TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の役割およびヒト正常角化細胞でのこれらのケモカインの産生機構を検討した。

B. 研究方法

健常人および AD 患者から採血し、血漿および血清を調整した。これらの検体中のケモカイン量は ELISA により測定した。AD 患者の皮膚組織でのケモカイン

の産生はそれぞれに特異的な単クローン抗体を用いた免疫染色により検出した。ヒト角化細胞としては初代培養細胞および細胞株 HaCaT を用いた。mRNA の検出は RT-PCR を用いた。培養上清中のケモカイン量は ELISA により測定した。

C. 研究結果

AD 患者の血液中のケモカイン量を明らかにするため、健常人および AD 患者の血清と血漿をもちいて TARC/CCL17、MDC/CCL22 および eotaxin/CCL11 の測定を行った。その結果、TARC/CCL17 に関しては血漿と比べて血清の値が 5-20 倍程度高くなること、特に AD 患者で差が大きいことを見いだした。TARC/CCL17 の血清濃度は急激に上昇し、これは血小板からの放出によること、さらに健常人と比べて AD 患者の血小板では TARC/CCL17 含量が高いことを明らかにした。また eotaxin/CCL11 についても血漿と比べて血清で値が若干上昇したが、これは赤血球に発現するケモカインのスカベンジャーレセプターDARC からの遊離によることを明らかにした。MDC/CCL22 については血漿と血清で大きな違いはなかった。これらの結果から流血中ケモカイン量の判定には血漿が最も適していることが分かった。そこで健常人および AD 患者の血漿を用いて TARC/CCL17、MDC/CCL22、eotaxin/CCL11 の値

を測定した。その結果、TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の値は AD 患者で有意に上昇しており、さらに病状を示す SCORAD 指数と有意に相関し、治療によって有意に低下した。一方、好酸球を遊走する eotaxin/CCL11 の値については AD の患者で有意な上昇は見いだせなかった。さらに TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の値は血清 LDH 値および血小板数と有意に相関した。次に AD 患者の皮膚組織における TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の産生を RT-PCR と免疫組織染色により検討した。RT-PCR では TARC/CCL17、MDC/CCL22 および CCR4 のシグナルが AD 患者の皮膚組織で上昇していた。さらに免疫組織染色でも TARC/CCL17 および MDC/CCL22 の産生がともに皮膚角化細胞で認められた。角化上皮層では MDC/CCL22 の産生の方がより広範に認められた。さらに皮下の血管内皮細胞で TARC/CCL17 の産生、皮下の樹状細胞で MDC/CCL22 の産生が認められた。そこで次に、ヒト表皮角化細胞の初代培養と樹立株 HaCaT を用いて表皮角化細胞での TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の産生を検討した。その結果、正常表皮角化細胞では TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の mRNA 発現はともに Th1 型の IFN γ で誘導された。一方、TNF- α 、IL-1 β あるいは Th2 型の IL-4 はほとんど効果を示さなかった。さらに培養上清中への分泌を測定したところ、MDC/CCL22 の上清中への分泌は認められたが、TARC/CCL17 の分泌は検出限界以下であり、TARC/CCL17 については転写後制御の存在が示唆された。細胞株 HaCaT でもほぼ同様の結果が得られた。

D. 考察

血小板は CCR4 を発現し、CCR4 のリガンドにより凝集が誘導されることが報告されている。今回、血小板は TARC/CCL17 を保有しており、活性化にもなって放出することが明らかとなった。そのため TARC/CCL17 の放出はさらに血小板凝集を促進することになると考えられる。さらに、AD 患者の血小板では TARC/CCL17 の含量が増加しており、そのため TARC/CCL17 の放出による凝集が亢進していると考えられる。また AD 患者では骨髄の巨核球での TARC/CCL17 の産生が上昇していることが示唆される。

血小板からの放出があるため、TARC/CCL17 の値は血漿と血清で大きく異なる。そのため、流血中の TARC/CCL17 値の測定は血漿を用いて行う必要がある。

さらに CCR3 のリガンドである eotaxin/CCL11 についても血清での上昇が認められた。一方、MDC/CCL22 の値には血清と血漿で大きな変化なかった。これらの結果から、正常人と AD 患者の血漿を用いてケモカインの値を比較した。その結果、血漿中の TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の値は AD 患者で有意に上昇しており、さらに病勢 (SCORAD 指数) とも有意に相関していた。さらに治療によって有意に低下した。Eotaxin/CCL11 にはそのような変化はみられなかった。これらの結果は、TARC/CCL17 と MDC/CCL22 の産生が AD の病態形成に密接に関与していることを示唆する。

また表皮角化細胞は Th1 型の IFN γ 刺激により TARC/CCL17 と MDC/CCL22 を発現し、それによっておもに Th2 型の CCR4 発現 T 細胞の皮膚浸潤を誘導すると考えられる。アトピー性皮膚炎の患部でのサイトカインパターンを調べた報告によると急性期は Th2 ドミナントであるが慢性期は Th1 と Th2 が混ざった状態であることが報告されている。また IFN γ がアトピー性皮膚炎の病態形成に必須の役割を担っていることも報告されている。IFN γ は表皮角化細胞での Mig/CXCL9 や IP10/CXCL10 の産生を誘導することから、これらは CXCR3 を介して Th1 細胞を遊走すると考えられる。そのため、表皮角化細胞は IFN γ の存在下で Th1 とともに Th2 を遊走するケモカインを産生することとなり、それによってアトピー性皮膚炎の複雑な病態が形成されると示唆される。

E. 結論

AD の皮膚では TARC/CCL17 と MDC/CCL22 がともに表皮角化細胞から産生され、CCR4 を介して Th2 細胞を呼び集めることにより、AD の病態形成に密接に関わっていると考えられる。そのため、CCR4 を標的とする治療法は AD の治療に有効である可能性が高い。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujisawa, T., Fujisawa, R., Kato, Y., Nakayama, T., Morita, A., Katsumata, H., Nishimori, H., Iguchi, K., Kamiya, H., Gray, P. W., Chantry, D., Suzuki, R., Yoshie, O. Presence of high contents of thymus and activation-

regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:139-146, 2002.

Horikawa, T., Nakayama, T., Hikita, I., Yamada, H., Fujisawa, R., Bito, T., Harada, S., Fukunaga, A., Chantry, D., Gray, P. W., Morita, A., Suzuki, R., Tezuka, T., Ichihashi, M., Yoshie, O. IFN- γ -induced expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 14:767-773, 2002.

2. 学会発表

義江 修：「Th1/Th2 バランスの制御」 第52
回日本アレルギー学会総会、横浜（2002.11.28-
30）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願平9-513294

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表皮細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生調節及び Th2 細胞遊走能に関する研究

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 師井洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学講師
占部和敬 九州大学大学院医学研究院皮膚科学講師
古賀哲也 九州大学大学院医学研究院皮膚科学助教授

研究要旨

本研究は、表皮細胞の TARC 及び GM-CSF 産生調節機構ならびに TARC の Th2 細胞遊走能の制御機構を明らかにし、新規治療法の開発に寄与することを目的としている。表皮細胞の培養上清は PMA で刺激した JARCAT 細胞 (TARC の受容体である CCR4 を 30%程度発現している)の遊走を希釈倍率依存性に誘導した。この遊走は抗 TARC 抗体の添加によって部分的ではあるが有意に抑制されたことから、培養上清中の TARC には生物学的活性があると考えた。

表皮細胞の TARC 産生は、TNF- α と IFN- γ によって濃度依存性に有意に増強された。一方、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 によって濃度依存性に有意に抑制された。一方、線維芽細胞では自発的な TARC 産生を認めなかったが、TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の存在下で TARC 産生が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の作用をさらに増強させた。

表皮細胞の GM-CSF 産生調節に関しては、今年度は予備実験として、種々のタイプのシグナル抑制物質を作用させたところ、CX-659S や U0126 などの ERK1/2 磷酸化抑制物質が比較的特異的に GM-CSF の産生を抑制することが明らかになった。今後、その作用機序や他のサイトカイン産生に対する抑制効果を検討する予定である。

A. 研究目的

表皮細胞はさまざまなサイトカインやケモカインを産生し皮膚疾患の病態形成に関与している。この表皮細胞のサイトカイン・ケモカインの産生は、浸潤してくるリンパ球から産生される Th1/Th2 サイトカインによって極めて多様に調節されていると考えられている。なかでも Th2 細胞に対する遊走活性を有するケモカインである TARC は、アトピー性皮膚炎の病態形成において重要な役割を演じているのではないかと注目されている。

表皮細胞は TARC を産生し、血中の TARC 濃度はアトピー性皮膚炎の病勢を反映することが証明されている。一方、アトピー性皮膚炎の表皮細胞は健常者表皮細胞よりも granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)を産生しやすいこと、そのため表皮内抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の活性化が誘導されている可能性が指摘されるようになった。そこで我々は表皮細胞の TARC 産生調節及び TARC による Th2 細胞の遊走能に対す

る種々のサイトカインや薬剤の影響を検討するとともに、表皮細胞の GM-CSF 産生に対する薬剤の影響と皮膚炎形成における意義を検討しようと計画した。

B. 方法

1) 表皮細胞から産生される TARC の生物学的活性

JARCAT 細胞は PMA で刺激すると、TARC の受容体である CCR4 を約 30% に発現することが予備実験で明らかとなった。そこで表皮細胞を培養しその上清を用いて、実際に PMA-JARCAT 細胞が遊走するかどうかをポイデンチャンバ法を用いて確かめる。

2) 種々の濃度の TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-4, IL-13 の存在下、非存在下あるいはこれらサイトカインの両存在下で、ヒト表皮細胞 (HaCaT 細胞) および線維芽細胞 (NG1RGB 細胞) の TARC 産生能を比較し、その調節機序を明らかにする。

3) 表皮細胞の GM-CSF 産生に対する薬剤の影響

表皮細胞を種々の濃度の薬剤の存在下・非存在下で培養し、上清中の GM-CSF の濃度を比較する。

C. 結果および考察

1) 表皮細胞の培養上清は PMA で刺激した JARCAT 細胞 (TARC の受容体である CCR4 を 30%程度発現している)の遊走を希釈倍率依存性に誘導した。この遊走は抗 TARC 抗体の添加によって部分的ではあるが有意に抑制されたことから、培養上清中の TARC には生物学的活性があると考えた。

2) 表皮細胞の TARC 産生は、TNF- α と IFN- γ によって濃度依存性に有意に増

強された。一方、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 によって濃度依存性に有意に抑制された。線維芽細胞では自発的な TARC 産生を認めなかったが、TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の存在下で TARC 産生が誘導され、IFN- γ は TNF- α +IL-4 あるいは TNF- α +IL-13 の作用をさらに増強させた。

3) 表皮細胞の GM-CSF 産生に対する薬剤の影響

今年度は予備実験として、種々のタイプのシグナル抑制物質を作用させたところ、CX-659S や U0126 などの ERK1/2 燐酸化抑制物質が比較的特異的に GM-CSF の産生を抑制することが明らかになった。今後、その作用機序や他のサイトカイン産生に対する抑制効果を検討する予定である。

1) の実験より、表皮細胞の培養上清中にはヒト T 細胞を遊走させる活性が存在し、TARC もその一つである可能性が示唆された。今後は、CCR4 を transfect した細胞を用いて、TARC の遊走能に影響を与えるような諸因子を検討することによって、遊走を抑制するような薬剤の開発を行う方向で実験を組み立てたい。

2) の実験によって、TARC 産生は表皮細胞と線維芽細胞で異なった調節制御が行われていることが明らかになったが、残念ながら今のところその意義は明確ではない。

3) の実験によって、MEK1/2 及び ERK1/2 のシグナル経路が GM-CSF の産生に重要であることが明らかになった。次年度は、皮膚炎の病態形成に重要と考えられている IL-1, TNF- α , TARC, IL-6, IL-8 などのサイト・ケモカインの産生調節がどのようなシグナル伝達系で調節

されているのかを明らかにすることによって、新薬の開発の可能性を模索したい。

D. 結論

表皮細胞から産生される TARC は生物学的活性 (CCR4+リンパ球遊走作用) を有しているが、その産生は Th1 サイトカインで増強され、Th2 サイトカインで抑制された。また線維芽細胞では Th1 サイトカインと Th2 サイトカインは協調して TARC 産生を増強させた。皮膚炎の病態形成に関与すると考えられている種々のサイトカイン・ケモカインの産生を調節する薬剤は、今後新しいコンセプトに立った治療薬の開発に大きく寄与すると考えられる。次年度以降はそのような方向性で研究を進めたい。

E. 発表論文

1. 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
2. Goto Y, Watanabe N, Kogawa N, Tsuchiya M, Takahashi O, Uchi H, Furue M, Hayashi H. CX-659S: a novel diaminouracil derivative that has antioxidative and acute anti-inflammatory activities. *Eur J Pharmacol* 438:189-196, 2002
3. Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H, Terao H, Moroi Y, Urabe K, Furue M. Propionibacterium acnes-induced IL-8 production may be mediated by NF- κ B activation in human monocytes. *J Dermatol Sci* 29:97-103, 2002
4. Uchi H, Arrighi J, Aubry J, Furue M, Hauser C. The sesquiterpene lactone parthenolide inhibits LPS-but not TNF- α -induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Allergy Clin Immunol* 110:269-276, 2002
5. Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M. Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J Dermatol Sci*. 30(1):29, 2002

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 アレルギー性皮膚炎の形成機序にはリンパ球走化を誘導するケモカインが関与している。これまで皮膚アレルギー疾患における Th2 ケモカインである TARC (Thymus and activation -regulated chemokine)の関与を明らかにしている。本年度はさらにアトピー性皮膚炎 (AD)における CCR4 陽性細胞浸潤機序について検討した。AD 病変部での CCR4 mRNA、TARC mRNA 発現については、急性部病変で表皮に TARC mRNA 発現、及び真皮での CCR4 mRNA 発現を認め、CCR4 陽性細胞の浸潤が明らかにされた。また血管新生に関与する VEGF のアレルギーへの関与を明らかにするため、VEGF を過剰産生するマウスを作成した。皮膚炎における役割について次年度解析を行う予定である。またヒト皮膚表皮角化細胞(KC)の TARC 産生に及ぼすサイトカイン (TGF- β 1) の作用について検討し、TGF- β 1 の濃度依存性の KC からの TARC 産生抑制作用を認めた。サイトカインによる TARC 産生調節を明らかにした。

A. 研究目的

皮膚は外界からさまざまな刺激を受ける臓器であり種々の外来刺激によって免疫応答を生じる。皮膚炎の形成にはリンパ球走化を誘導するケモカインの関与が重要である。これまで皮膚アレルギー疾患において Th2 ケモカインである TARC (Thymus and activation regulated chemokine)の関与を報告している。皮膚炎症における TARC 産生調節、炎症における血管新生に VEGF の関与が明らかにされており、VEGF を過剰産生するマウスの作成について検討した。

B. 研究方法

(1) アトピー性皮膚炎(AD)は慢性、再発性皮膚炎であり、その病態に皮膚特異的なリンパ球の浸潤が関与する。AD 患者皮膚を用いて Th2 ケモカインレセプターである CCR4 mRNA 発現および TARC mRNA の発現を in situ

hybridization 法を用いて検討した。

(2) VEGF を K14-promoter cDNA にサブクローンし VEGF コンストラクトを作成し、これを用いて VEGF 遺伝子導入マウスを作成する。

(3) TGF- β 1 は皮膚の線維化を誘導するサイトカインである。表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて TGF- β 1 の HaCaT 細胞の TARC 産生に対する影響について northern blot, immunoblot, ELISA 法で検討した。

(4) 表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて長波長紫外線(Ultraviolet A: UVA)(1,4,7 J/cm²)を照射した。照射後(48 時間まで)の TARC 産生を northern blot 法, ELISA 法で検討した。HaCaT 細胞は無刺激下および IFN- γ , TNF- α を加えた系とし、各々で TARC 産生量を検討し、この産生に対する UVA の影響を検討した。

C. 研究結果

(1) AD 患者病変部皮膚を用いて TARC mRNA、

CCR4 mRNA 発現細胞について検討した。表皮、真皮における一視野における陽性細胞数を計測した。急性期病変では表皮ケラチノサイトに TARC mRNA 発現を認め、真皮浸潤細胞にも TARC mRNA 発現細胞を認めた。真皮浸潤細胞に CCR4 mRNA 陽性細胞を認めた。慢性病変では表皮の TARC mRNA 産生細胞数、強度は急性期に比し減少した。CCR4 mRNA 発現細胞についても急性期と比較して慢性期にはその数、強度ともに減少して認められた。

(2) VEGF cDNA を作成し、VEGF cDNA コンストラクトをマウス受精卵に移入し、VEGF 遺伝子導入マウスファウンダー作成を試みた。受精卵を移植したマウスから VEGF マウスが誕生しており、次年度において皮膚炎の惹起に関して解析を行う予定である。

(3) northern blot、immunoblot 法、ELISA 法において、IFN- γ 、TNF- α で刺激したヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞の TARC 産生は、TGF- β 1 によって抑制されることが認められた。この抑制効果は TGF- β 1 10ng/ml で最大であった。

(4) 無刺激下において confluent の HaCaT 細胞は TARC 蛋白を産生した。UVA(1-7J/cm²)は用量依存性にこの産生を抑制した。UVA 7J/cm² 照射時に最大の TARC mRNA、蛋白産生の抑制が認められた。IFN- γ 、TNF- α 刺激下で TARC 産生は増強し、UVA はこの TARC 産生に対して抑制作用を有した。経時的には、IFN- γ 、TNF- α 刺激下 HaCaT 細胞に対する UVA (7 J/cm²)の TARC 産生抑制作用は、照射 16-24 時間後で最大であり、48 時間後には回復を示した。

D. 考察

AD をはじめとするアレルギー疾患は皮膚病

変部に Th2 リンパ球、好酸球が浸潤する慢性皮膚炎である。AD 病変部において TARC mRNA 発現は表皮ケラチノサイトに認められ、また CCR4 mRNA 陽性細胞は浸潤細胞に認められた。この結果は、AD の病態形成に TARC、CCR4 などの Th2 ケモカインが重要であることを示す所見と考えられる。UVA は、無刺激また IFN- γ 、TNF- α 刺激下の表皮角化細胞株 HaCaT 細胞の TARC 産生を用量依存性に抑制した。TGF- β 1 による TARC 産生抑制は、AD 慢性期病変で TARC 産生が抑制されることを示した。また VEGF トランスジェニックマウスが作成できたので、次年度 VEGF の皮膚炎形成への関与に関する検討を行う。

E. 結論

アレルギー性皮膚炎の形成に Th2 サイトカインである TARC、またその受容体である CCR4 の働きが重要であること、さらに皮膚炎症局所における TARC 産生調節に炎症性サイトカインの関与が明らかとなった。これらを制御することが将来的な治療につながると推測される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Zheng X, Nakamura K, Furukawa H, Nishibu A, Takahashi M, Tojo M, Kaneko F, Kakinuma T, Tamaki K. Demonstration of TARC and CCR4 mRNA expression and distribution using in situ RT-PCR in the lesional skin of atopic dermatitis. *J Dermatol.* 2003; 30(1): 26-32.

2) Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Oyama N, Nishibu A, Satoh M, Kakinuma T, Wakugawa M,