

20020798

厚生労働科学研究費補助金

アレルギー性疾患予防・治療研究事業

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた
新規治療法の開発に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 玉井 克人

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- 重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた新規治療法の
開発に関する研究 1
玉井 克人

II. 分担研究報告

1. NFκB decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた
重症アトピー性皮膚炎の治療 6
玉井 克人
2. 表皮角化細胞における NFκB の機能解析 9
橋本 公二
3. 合成核酸の高効率導入のための新規非ウイルスベクターの開発... 13
金田 安史
4. 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NFκB デコイ DNA 軟膏
治療効果の検討 15
森下 竜一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 23

厚生労働科学研究費補助金（アレルギー性疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた
新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 玉井 克人 弘前大学医学部 助教授

研究要旨

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた新規治療法の開発をテーマに研究班を組織した。本研究班は、1) NFkB decoy deoxyoligonucleotide (NDON) の抗炎症薬理効果の検討、2) 高分子核酸医薬の皮膚への導入方法の開発、3) NDON 軟膏の重要アトピー性皮膚炎に対する臨床研究、を主な研究内容とする。平成14年度は、1) 皮膚炎自然発症マウス (NC/Nga マウス) に対する 1.6%NDON 軟膏の皮膚炎治療効果とその薬理作用を検討し、NDON が肥満細胞にアポトーシスを誘導することにより治療効果を発揮すること、2) 超音波とケミカルピーリングを組み合わせることにより生体皮膚に対する高分子 DNA 導入法を開発したこと、3) 重症アトピー性皮膚炎患者の顔面病変に対して NDON 軟膏が有効であること、などの研究結果を得た。

分担研究者

橋本公二・愛媛大学医学部・教授
金田安史・大阪大学大学院医学系研究科・教授
森下竜一・大阪大学大学院医学系研究科・助教授

A. 研究目的

近年著しく増加傾向を示す難治性アレルギー性疾患のひとつにアトピー性皮膚炎がある。その皮膚症状の激しさは日常生活における QOL を著しく損ね、しかもス

テロイドを中心とした現在の治療法に抵抗性を示す難治例が少なくない為、より有効かつ安全な治療法開発が切望されている。われわれは、これまでにない新しい概念の治療薬である核酸医薬、特に NFkB decoy oligodeoxynucleotides (NDON) を用いた外用薬を開発し、アトピー性皮膚炎に対する新規治療法としての有用性を検討するとともに、その臨床研究を進めている。NFkB は種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子、アポトーシス関連分子といった、炎症関連遺伝子群の発

現を誘導する転写因子である。NDON は NFκB と特異的に結合する配列 (CCCTAAAGGG) を含む 20 塩基対のオリゴ DNA で、NFκB と結合してその作用を特異的に阻害する。上述したように NFκB が多くの炎症関連遺伝子の発現を誘導することから、NDON はそれら遺伝子の発現を抑制することにより多面的抗炎症作用を発揮すること、さらにその作用特異性故にステロイドに比較して副作用が少ないことが期待される。本研究班は NDON およびその他の核酸医薬の開発とアトピー性皮膚炎に対する臨床応用を研究目的とし、以下の4項目を主な研究内容とする。

1) 発症皮膚炎モデルマウスを用いた NDON およびその他の核酸医薬の治療効果および副作用の検討：コンベンショナルな条件で飼育すると皮膚炎を自然発症する NC/Nga マウスを用い、NDON、その他の核酸医薬の治療効果および副作用を検討する。今年度は主に NDON 外用剤の治療効果を検討する。

2) 表皮角化細胞およびランゲルハンス細胞における NDON 薬理作用の検討：ランゲルハンス細胞や表皮角化細胞は、抗原提示、サイトカイン、ケモカイン産生など、アトピー性皮膚炎発症に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの細胞において NDON の標的分子である NFκB が皮膚炎発症にどのように関与するかを検討し、NDON の薬理作用を明らかにする。今年度は主に表皮角化細胞における NFκB 関連分子の発現動態を検討する。

3) 生体皮膚への低侵襲・非観血的高分子 DNA 導入法の開発：皮膚は角層のバリアー機能が極めて良く発達しており、分子量 1,000 を超える分子の通過は困難である。そのため、分子量 12,000 の NDON は搔爬によるびらん局面や顔面などバリアー機能の低い部位以外では十分な治療効果が得られない可能性が高い。皮膚炎に対してより有効な核酸医薬を開発するためには、皮膚に高分子 DNA を導入する新たな方法論の開発が必要である。本研究班では、細胞融合能を持つセンダイウイルス (Hemagglutinating Virus of Japan、HVJ) の外被蛋白を利用した新たな遺伝子導入ベクター (HVJ-envelope、HVJ-E)、および皮膚の化学処理と超音波を組み合わせた新たな遺伝子導入法 (gene bath) の開発とアトピー性皮膚炎への臨床応用を目指す。今年度は HVJ-E の開発と臨床応用に向けた基礎研究を行う。

4) 核酸医薬の臨床研究展開：NDON およびその他の核酸医薬について、EBM に基づく臨床研究を行い、その効果と安全性について正確に評価することが本研究班の最終目的である。平成 13 年 11 月より弘前大学附属病院皮膚科において、重症アトピー性皮膚炎に対する NDON 軟膏治療の第 1 回臨床試験 (オープン試験) を開始し、重症顔面病変に対する有効性を明らかにした。今年度は第 1 回試験結果を詳細に解析し、このデータを基に、本研究班員の所属する複数施設における第 2 回臨床試験 (二重盲検試験) のプロトコール作成を行う。

B. 方法

- 1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NDON 治療効果の検討：自然発症皮膚炎モデルマウスである NC/Nga マウスを用いて NDON 治療効果を検討した。NC/Nga マウス (♂、4 週令) をコンベンショナル条件下で飼育し、皮膚炎の発生を確認した後、ワセリンを基剤とした 1.6%NDON 軟膏塗布群、1.6%スクランブルデコイ (ランダムな配列からなる 20 塩基対 DNA) 軟膏塗布群、基剤 (ワセリン) 塗布群、無投与群の 4 群に分けて 2 週に 1 回、計 4 回 (8 週間) 塗布し、肉眼的および組織学的皮膚炎状態の改善程度を比較検討した。また、炎症細胞の NDON 治療前後における浸潤動態変化、アポトーシスの有無、ICAM1 の発現パターンの変化についても比較検討した。
- 2) 表皮角化細胞における NFkB 関連分子発現動態の検討：NDON の標的である NFkB の表皮角化細胞における発現を検討した。角化細胞を無血清培養法にて培養した後、炎症性サイトカインの代表で、NFkB を活性化する TNF- α 、IL-1 を添加し、NFkB-IkB 関連分子の発現および細胞内局在について、蛍光抗体法および western blot 法にて検討した。
- 3) 生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発：紫外線で賦活化した HVJ と DNA 溶液を混合した後に TritonX100 で処理し、10,000g で遠心して DNA を HVJ-E 内に封入した。これを種々の培養細胞や生体組織に投与し、遺伝子導入効果を検討した。
- 4) NDON の臨床研究展開：弘前大学倫

理委員会に承認を得た上で、10 名の重症成人型アトピー性皮膚炎患者に同意を得て NDON 軟膏の世界初の臨床研究を行った。NDON 投与前後で臨床症状の改善度および副作用の有無について検討した。

C. 結果

- 1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NDON 治療効果の検討：コントロール群 (基剤のみ、およびランダム DON 含有軟膏塗布群) と比較して、NDON 軟膏塗布群では、臨床的・組織学的に炎症症状の著明改善を認め、さらに真皮内の浸潤肥満細胞におけるアポトーシスと、それに伴う浸潤肥満細胞数の著しい減少が観察された。
- 2) 表皮角化細胞における NFkB 関連分子発現動態の検討：表皮角化細胞において、RelA、p50、p52、RelB、IkB- α の発現が認められた。TNF- α 、IL-1 刺激により IkB- α のリン酸化が生じるとともに、RelA と p50 が NFkB 配列に結合することが確認された。また、TNF- α 刺激により RelA、p50 とともに細胞質内から核内へ移行した。
- 3) 生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発：HVJ-E ベクターは多くの培養細胞への遺伝子導入に優れ、特に従来法では効率の低かった浮遊細胞や初代培養細胞への遺伝子導入に効果的であることが確認された。蛍光ラベルした二重鎖のデコイ核酸を培養表皮角化培養細胞に導入するとほぼ 100%に近い効率で核内導入された。さらに、皮膚への HVJ-E ベクター局注によ

り遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

4) NDON の臨床研究展開：ステロイド外用剤や FK506 軟膏の適応外である重症顔面病変に対し、NDON は極めて有効かつ安全という結果を得た。しかし 20bp のオリゴ DNA からなる NDON は分子量約 12,000 で顔面以外の皮膚では吸収が悪いため、その他部位への治療は必ずしも著効せず、より良い効果を得る為には皮膚に対する高効率核酸導入法の開発が必要である事が明らかとなった。また、顔面は左右比較試験などに不向きなため、治療効果を確認するために二重盲検試験は必須である。第 2 回臨床試験は重症顔面病変に対する NDON の多施設二重盲検試験とし、そのプロトコールを作成した。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の病態形成には、角層のバリアー機能低下、Th2 リンパ球による IgE 抗体産生誘導、好酸球、肥満細胞、表皮ランゲルハンス細胞表面の Fcε レセプターと IgE の結合、侵入抗原の IgE 結合に伴う即時型反応誘導とランゲルハンス細胞を介した遅延型反応誘導、といった多くの反応が複雑に関与している。侵入抗原刺激により肥満細胞から産生される TNF-α は血管内皮細胞における ICAM-1 や VCAM-1 などの接着分子の発現と、これに伴うリンパ球、好酸球、単球の皮膚浸潤を誘導する。これら浸潤細胞から産生される種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子群は遅延型反応を誘導し、さらにアトピー

性皮膚炎症状を増悪させる。NFκB は、IL-1、IL-8、IL-12、IFN-γ、TNF-α 等の炎症性サイトカイン、RANTES、Eotaxin 等のケモカイン、GM-CSF、M-CSF 等の成長因子、ICAM-1、VCAM-1、ELAM-1 等の接着分子、Bcl-2 等のアポトーシス抑制遺伝子など、炎症病変形成に関わる多くの遺伝子発現を誘導する転写因子であり、NFκB をおとり DNA である NDON に結合させてこれら遺伝子群の発現を抑制することにより、アトピー性皮膚炎症状を改善しうることが期待される。皮膚炎自然発症モデル動物である NC/Nga マウス皮膚への 1.5%NDON 軟膏塗布により著しい皮膚炎症状の改善が得られ、その作用機序として肥満細胞のアポトーシスが関与することが強く示唆された。上述したように NFκB は Bcl2 の発現を誘導するため、NDON による Bcl2 発現抑制がアポトーシス感受性を高めたものと考えられる。また病変皮膚での ICAM-1 発現低下も確認されており、ランゲルハンス細胞や浸潤リンパ球を介した遅延型反応も抑制されると予想される。

NDON の薬理効果は、上述したように浸潤炎症細胞や表皮ランゲルハンス細胞を標的として発揮されていると考えられる。しかし近年、表皮角化細胞から産生されるサイトカイン、ケモカイン、成長因子群が皮膚の免疫反応において重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなりつつある。

今回の研究で、表皮角化細胞が TNFα に反応して NFκB 関連蛋白の発現および

核移行を示すことが明らかとなり、表皮性サイトカイン産生に NFκB が関与していることが強く示唆される。皮膚に吸収された NDON は、浸潤炎症細胞のみならず表皮角化細胞由来サイトカインの産生抑制にも寄与していると予想される。

今回施行した重症アトピー性皮膚炎に対する第1回 NDON 臨床研究では、特に顔面の重症病変に対して NDON が極めて有効であることが明らかとなった。皮膚はその発達した角層バリアー機能故に通常分子量 1,000 以上の分子は容易に通過し得ないことが知られており、分子量 12,000 の NDON がバリアー機能の低下しているアトピー性皮膚炎患者皮膚でどの程度吸収されるかが、その有効性の鍵を握っていた。顔面は、他部位に比較して角層の生理的バリアー機能が低いこと、毛包脂腺系が良く発達していること、さらに強い掻痒に伴う掻爬性びらんにより角層バリアーが破綻していたこと、などが NDON 吸収性を高め、その有効性につながったと思われる。NDON 塗布が特に著効を示した症例では、塗布開始後約 2 週間で略治状態となり、NDON 塗布終了後も極めて良い状態が維持された。少なくとも NDON 終了後約 3 ヶ月間は保湿剤を中心としたよる維持療法が可能で、strong クラス以上のステロイド外用を必要としなかった。ステロイドを中心としたこれまでの治療薬がサイトカイン産生抑制など即効的炎症反応抑制をその主作用としていたため、投与中止後のリバウンドによる皮膚炎増悪は常に問題

となっていた。一方 NDON は肥満細胞のアポトーシス誘導、すなわち浸潤炎症細胞そのものを病変部から除去するという極めて新しい作用点を有する治療薬で、この特異的作用により、やや緩やかな治療効果発現と極めて長い治療効果維持が得られたと考えられる。治療期間中およびその後の観察期間において、全身、局所共に副作用は認められなかった。この症例が、NDON 治療開始前には数年間ステロイドを離脱し得なかったことを考えると、NDON は極めて有用かつ安全なアトピー性皮膚炎治療の新たな選択肢といえる。

今回の臨床研究では体幹、四肢など顔面以外の部位では期待した改善効果は観察されなかった。これは、顔面以外の部位での NDON 吸収率が低いためと予想され、皮膚に NDON を効率よく吸収させる新たな方法論の開発が必要である。現在開発中の HVJ-E ベクターは、皮膚を含む多くの組織に遺伝子導入が可能である。このベクター利用することにより、顔面以外の皮膚にも NDON を導入し得る新たな方法論の開発が可能となるかもしれない。

E. 結論

NFκB を標的とした NDON がアトピー性皮膚炎に有効な新薬となりうる可能性が示された。平成 15 年度は、第 2 回臨床試験（二重盲検試験）により、より正確な有効性と安全性を確認すると共に、アトピー性皮膚炎に対するより効果的な核酸医薬の開発を進めていく予定である。

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

NFkB decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた
重症アトピー性皮膚炎の治療

主任研究者 玉井 克人 弘前大学医学部 助教授

研究要旨

NFkB に対する抑制作用を持つ 2%NDON 軟膏を用い、弘前大学附属病院皮膚科を受診した重症アトピー性皮膚炎患者 10 名に対して同意を得た上で臨床試験を行った。その結果、NDON は、顔面の重症病変に対して特に有効であることが明らかとなった。

A. 研究目的

NFkB は TNF- α などの種々の炎症性刺激により活性化されて核内に移行する転写因子で、遺伝子上の特異的塩基配列を認識して結合することによりサイトカインや接着分子など、種々の炎症性遺伝子発現を誘導する。また、種々の炎症性疾患治療に用いられるステロイドやシクロスポリン、FK506 が NFkB の活性化を抑制することが知られており、NFkB は炎症発症機序の中心的役割を持つ転写因子と考えられる。皮膚炎自然発症モデルマウス (NC/Nga マウス) を用いた研究により、NFkB 結合配列を含む 20 塩基の oligodeoxynucleotides (ODN) 含有軟膏 (1.5%) が皮膚炎改善および発症予防に有効であること、その作用が NFkB decoy ODN (NDON) に NFkB を結合し (おとり効果)、標的遺伝子への結合を阻害するこ

とによる炎症細胞の局所浸潤抑制、アポトーシス誘導によることが明らかとなった。本研究は、これらの基礎的研究を背景とした、重症アトピー性皮膚炎に対する世界初の NDON 臨床応用研究であり、NDON のアトピー性皮膚炎に対する有効性および副作用の有無を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

弘前大学倫理委員会の承認を得て、10 例の重症アトピー性皮膚炎患者に 2%NDON 軟膏を外用し、その臨床効果を検討した。弘前大学皮膚科を受診した 20 歳以上 65 才未満の重症アトピー性皮膚炎患者を対象として、NDON 外用治療開始前 2 週間を白色ワセリンのみで加療し、症状が不変ないし悪化した症例に対して NDON を 1 日 1 回 1 週間塗布し、1 週間休薬 (白色ワセリンのみ)、次に朝夕 2 回

1週間塗布し、さらに1週間休薬し、開始前および1週ごとに臨床効果、局所および全身的異常の有無、掻痒の変化、total IgEの変動を観察した。

C. 研究結果

NDON 軟膏はアトピー性皮膚炎の顔面病変、特に重度の紅斑、浮腫、湿潤局面に対して極めて有効であることが明らかとなった。顔面病変のある7例中6例で著効を示し、皮膚炎症状が重篤であるほど強い改善傾向が観察された。効果のあった6例では、いずれも掻痒の改善が自覚された。最重症例では、NDON 塗布2週間で顔面病変は略治状態となり、治療終了後3カ月の観察期間においても良好な状態が維持された。一方、体幹、四肢など顔面以外の病変部では、顔面で観察されたような著しい改善効果は得られなかった。局所の刺激症状はなく、また重篤な全身性の副作用は認められなかった。NDON 治療前後でtotal IgGの変化は観察されなかった。

D. 考察

今回施行した重症アトピー性皮膚炎に対する世界で初めてのNDON 臨床研究では、特に顔面の重症病変に対してNDON が極めて有効であることが明らかとなった。角層バリアー機能が著明に発達した皮膚で、分子量12,000のNDONがどの程度吸収されるかが問題であった。顔面皮膚は毛包脂腺系が良く発達して物質の吸収が良く、さらに皮膚炎による角層バリアー破綻がNDON 吸収性を高め、有効性につながっ

たと思われる。また、NDON は肥満細胞のアポトーシス誘導という新しい作用を持った治療薬で、この特異的作用により長い治療効果が得られたと考えられる。

E. 結論

NDON が重症アトピー性皮膚炎の顔面病変に有効であることが明らかとなった。平成15年度は第2回臨床研究を多施設で行う予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成14年度)

1. 論文発表

- 1) Nakamura H, Aoki M, Tamai K, Oishi M, Ogihara T, Kaneda Y and Morishita R: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model. *Gene Therapy*, 9: 1221-1229, 2002
- 2) Meng X, Sawamura D, Ina S, Tamai K, Hanada K, Hashimoto I: Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin. *Exp Dermatol*, 11: 456-461, 2002
- 3) Matsuzaki Y, Tamai K, Kon A, Sawamura D, Uitto J and Hashimoto I: Keratinocyte responsive element 3 (KRE3): Analysis of a

keratinocyte-specific regulatory
sequence in the 230-kD bullous
pemphigoid antigen (BPAG1) gene
promoter. *J Invest Dermatol*, 120:
308-12, 2003

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を
含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表皮角化細胞における NFκB の機能解析

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

表皮角化細胞における NFκB, およびその関連蛋白の発現、リン酸化、核移行についての詳細な検討を行った。角化細胞では RelA, p50, p52, RelB, IκB-alpha が発現しており、TNF-alpha 刺激により核内へ移行し、NFκB 配列に bind することが明かとなった。さらに、IκB mutant でその機能が消失することは角化細胞において NFκB が重要な役割をはたしていることが示唆された。

A. 研究目的

NFκB decoy oligonucleotide (NDON) の表皮角化細胞に与える効果を検討するためには、まず表皮角化細胞における NFκB の機能・役割について明らかにしておくことが必須である。NFκB-IκB 関連の分子、その機能発現に必須であるとされるリン酸化などを詳細に検討することが NDON の薬理作用を解析する上で必要不可欠である。そこで、この研究では表皮角化細胞における NFκB-IκB 関連の分子の発現と、炎症性サイトカインによる発現調節を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

表皮角化細胞は正常ヒト皮膚より無血清培養法にて培養した。継代を繰り返し、

4-5 代継代したものを使用した。角化細胞を無血清培養法にて培養し、サイトカイン刺激前には添加物を含まない培地に交換した。その後、炎症性サイトカインの代表で、NFκB を活性化することが知られている分子である TNF-alpha, IL-1 を添加し、NFκB-IκB 関連の分子の局在については蛍光抗体法、蛋白の細胞質、核内発現については western blot 法にて検討した。NFκB に bind する蛋白の同定については gel shift assay で検討した。各種抗体は Santa Cruz 社、TNF-alpha, IL-1 は R&D 社、Gel Shift Assay は Promega 社製を使用した。

C. 研究結果

Western blot では RelA, p50, p52, RelB,

I κ B- α の発現が細胞質分画、各分画ともに認められた。発現量は細胞質内のほうがすべての分子で高かった。TNF- α (10 ng/ml), IL-1(10 ng/ml)刺激によりこの発現パターンが変動するかについて検討したところ、刺激 30 分後には I κ B- α のリン酸化がみられた。核分画では RelA, p50, p52, RelB, I κ B- α の発現が増強する一方、細胞質分画ではすべての分子の発現量が低下した。

Western blot で刺激後 RelA, p50 の核分画での発現量の増加がみられたため、実際に機能しているかについて Gel shift assay で確認した。TNF- α (10 ng/ml), IL-1(10 ng/ml)刺激により NF κ B 配列へ bind する蛋白が確認された。各種抗体を使用した supershift assay を施行したところ、bind する蛋白は RelA と p50 であることが確認できた。binding 活性は刺激後 30 分で最も増強されることが確認できた。そこで、TNF- α の濃度による binding 活性を検討したところ、1 ng/ml より dose dependent に NF κ B 配列への binding 活性の増強が認められた。さらに、I κ B の機能を阻害する I κ B mutant をアデノウイルスベクターを用いて角化細胞に導入し、TNF- α 刺激による binding を検討したところ、この binding 活性は消失した。すなわち、TNF- α 刺激で角化細胞内では NF κ B シグナルが伝達され、機能していることが明かとなった。

Western blot, gel shift assay の結果、

NF- κ B が核分画に移行することが明かとなったが、さらに蛍光抗体法で確認した。培養表皮角化細胞では無刺激状態では RelA, p50 は細胞質内に存在していたが、TNF- α (10 ng/ml)刺激により RelA, p50 とともに細胞質内から核内へ移行した。

D. 考察

表皮角化細胞における NF κ B, およびその関連蛋白の発現、リン酸化、核移行については詳細な検討はなされていなかった。今回の検討で、角化細胞では RelA, p50, p52, RelB, I κ B- α が発現しており、TNF- α 刺激により核内へ移行し、NF κ B 配列に bind することが明かとなった。さらに、I κ B mutant でその機能が消失することは角化細胞において NF κ B が重要な役割をはたしていることが示された。

E. 結論

表皮角化細胞においては NF κ B が発現・機能しており、各種炎症性疾患において重要な役割をはたしていることが示唆され、この機能を抑えることにより炎症の抑制効果が得られることが期待される。すなわち、NDON が表皮角化細胞にも効果を発現する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 14 年度)

1. 論文発表

- 1) Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, Hashimoto K, Raab G, Klagsbrun M, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Mekada E: HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function. Proc Natl Acad Sci in press
- 2) Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitsumi M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M.: Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells. J Immunol 170: 2205-13, 2003
- 3) Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, Hashimoto K: Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex. J Dermatol 30: 135-140, 2003
- 4) Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, Hashimoto K: A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation. Br J Dermatol in press
- 5) Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Ijuin T, Takenawa T, Hashimoto K.: Phosphatidylinositol 3 kinase is a key regulator of early phase differentiation in keratinocytes. J Biol Chem. 277: 40390-40396, 2002
- 6) Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Differentiatl effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. J Invest Dermatol 119: 1231-1236, 2002
- 7) Tsuda T, Thoyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K: Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro. J Dermatol Sci 31:37-42, 2003
- 8) Kobayashi M, Amagai M, Kuroda-Kinoshita K, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Nishikawa T: BP180 ELISA using bacterial recombinant NC16a protein as a diagnostic and monitoring tool for bullous pemphigoid. J Dermatol Sci 30: 224-232, 2002
- 9) 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.* 119:403-410, 2002

2. 学会発表

- 1) Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
- 2) Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Efficient transgene expression in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological

Research September 19, 2002, Geneva, Switzerland

- 3) Hashimoto K, Shirakata Y, Yamasaki K: Cre-loxP adenovirus mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes. Symposia "GENE THERAPY" 20th World Congress of Dermatology June 5, 2002, Paris, France
 - 4) Hashimoto K, M Tohyama: HHV-6 associated drug eruption (HADE). Symposia "CUTANEOUS DRUG ERUPTIONS & DRUG HYPERSENSITIVITY" 20th World Congress of Dermatology June 1, 2002, Paris, France
- G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

合成核酸の高効率導入のための新規非ウイルスベクターの開発

分担研究者 金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

細胞融合活性を持つセンダイウイルスのウイルス外被を利用し、これに核酸など高分子を封入して高効率に生体組織へ導入可能な新たなベクターを開発した。このベクターを用いることにより、種々の生体組織や癌組織に遺伝子導入が可能となることが明らかとなった。

A. 研究目的

生体組織への遺伝子導入効率を高めるためリボソームに封入した遺伝子を細胞融合ウイルスである HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan; Sendai virus) を利用し、細胞融合を利用して直接細胞質内に導入できる HVJ-リボソームを開発してきた。我々は最近この方法がアンチセンス核酸のような合成核酸を崩壊することなく機能的な分子を効率良く導入できることを FRET (fluorescence resonance energy transfer) を用いた手法で証明した。しかしこのベクターはウイルスとリボソームという2つの異なるベジクルを準備する必要があり手法が複雑であること、リボソームと融合することによってウイルス粒子より平均直径が1.3倍大きくなった粒子は融合活性がウイルスの10%以下に落ちてしまうこ

となどの欠点も合わせ持つことがわかった。本研究では、これらの HVJ リボソームベクターの欠点を克服し、より有効な遺伝子導入ベクターを開発することを目的とした。

B. 研究方法

紫外線照射により HVJ を不活化した後、mild detergent 処理と遠心力によって不活化 HVJ 粒子内に導入したい遺伝子を封入することにより、強い膜融合活性を保ち、培養細胞へも生体組織へも遺伝子導入が可能な非ウイルス性 HVJ envelope vector (HVJ-E) の開発を行った。さらにこの HVJ-E を用いて種々の培養細胞や生体組織への遺伝子導入を試みた。

C. 研究結果

紫外線照射により HVJ を不活化した後、

mild detergent 処理と遠心力によって不活化 HVJ 粒子内に導入したい遺伝子を封入することにより、強い膜融合活性を保ち、培養細胞へも生体組織へも遺伝子導入が可能な非ウイルス性 HVJ envelope vector (HVJ-E) の開発を行った。さらにこの HVJ-E を用いて種々の培養細胞や生体組織への遺伝子導入を試みた。

D. 考察

HVJ-E ベクターは多くの培養細胞への遺伝子導入に優れ、特に従来法では効率の低かった浮遊細胞や初代培養細胞への遺伝子導入に効果的であることがわかった。また、種々の生体組織に高効率の遺伝子導入を可能とする極めて優れた非ウイルスベクターである。抗原性も低く連続投与可能であることが示されており、従来のベクター系をしのぐ性能が証明されつつある。今後、アトピー性皮膚炎を含む種々の難治性疾患に対する遺伝子・核酸医療現場での臨床応用が期待される。

E. 結論

生体組織に対して高効率に遺伝子導入可能な新たな遺伝子導入ベクターHVJ-Eが開発された。今後、このベクターを利用して生体皮膚への高効率遺伝子導入法を確立し、NFκB デコイ DNA を用いたアトピー性皮膚炎治療に応用する予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 14 年度)

1. 論文発表

- 1) **Kaneda Y**, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, Nakamura H, Morishita R, Kotani T: Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 6(2): 219-226, 2002
- 2) Endoh M, Koibuchi N, Sato M, Morishita R, Kanzaki T, Murata Y, **Kaneda Y**: Fetal gene transfer by interuterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. *Molecular Therapy* 5(5): 501-508, 2002
- 3) Nakamura H, Morishita R, **Kaneda Y**: Molecular therapy via transcriptional regulation with double-stranded oligodeoxynucleotides as decoys. *In Vivo*, 16:45-48, 2002

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NFκB デコイ DNA 軟膏治療効果の検討

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

自然皮膚炎発症モデルマウスである NC/Nga マウスを用いて、転写因子 NFκB の活性を抑制する 1.6% NFκB デコイ軟膏の皮膚炎発症予防および治療効果を検討した。その結果、NFκB デコイ軟膏は著明な皮膚炎抑制効果を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

転写因子を生体内で直接制御できる二重鎖核酸化合物であるデコイ DNA を用い、炎症性サイトカインなどの発現調節に必要な NFκB の抑制によるアトピー性皮膚炎の治療効果を検討した。

B. 研究方法

NC/Nga マウスは、名古屋大学近藤らにより茶色毛色・早熟性に重点をおかれ愛玩用マウスから系統育成され樹立された。東京農工大学松田らにより NC マウスの皮膚炎はヒトのアトピーと酷似することが確認され、アトピー自然発症モデルとして報告された。SPF では発症しないが、コンベンショナル飼育で 8 週令を境に頭頸部に発症し、次第に耳や背部など全身に拡大していき、17 週令でプラトーに達する。NC/Nga 雄マウスを 4 週令にて SLC より

購入し、コンベンショナル飼育した。はじめに、ワセリン基剤軟膏を用いて皮膚へのオリゴ DNA 投与が可能であるかに否かについて、FITC 標識オリゴ DNA 含有軟膏をマウス背部皮膚に外用して検討した。次に、NFκB デコイ投与(1.6% NFκB デコイ含有軟膏)群、スクランブルデコイ投与(1.6%)群、基剤投与群、無投与群の 4 群に分類し、12 週令から 20 週令まで 2 週に 1 回塗布し、肉眼的皮膚炎症状および組織学的変化つき比較検討した(皮膚炎発症予防効果の検討)。次に NFκB デコイ投与(1.6%)群、スクランブルデコイ投与(1.6%)群の 2 群につき、29 週令から 30 週令の間に 1 回のみ塗布し、臨床症状スコアおよび組織学的変化につき比較検討した(皮膚炎治療効果の検討)。

C. 研究結果

皮膚炎発症予防検討および治療効果検討のいずれの試験においても、コントロール群に比較して、NFκB デコイ投与群では著明な皮膚症状の改善が得られた。組織学的には、過角化や表皮肥厚が改善し、また真皮内に浸潤する肥満細胞数が著明に減少していた。アポトーシス染色法であるTUNEL染色を施行したところ、NFκB デコイ投与群のみ TUNEL 陽性細胞を多数認め、肥満細胞に特異的な c-kit 染色との2重染色によって肥満細胞がアポトーシスを起こしていることが確認された。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の病態には、Th2 リンパ球の真皮内浸潤増加と、IgE を介した肥満細胞脱顆粒が関与すると考えられている。NFκB デコイ投与群に観察された著明な治療効果には、浸潤する肥満細胞のアポトーシスが寄与していると考えられた。デコイは核内では2週間以上存続し、血中に入ると数時間以内に分解されるため、局所投与に極めて適した治療方法である。ステロイド治療に見られるような全身性副作用は有しないことが予想されるため、安全性の高いアトピー性皮膚炎治療薬になるものと期待される。

E. 結論

NFκB デコイ DNA 含有軟膏が、皮膚炎自然発症モデルマウスの皮膚炎予防およ

び治療に有効であることが明らかとなり、アトピー性皮膚炎治療のための核酸医薬開発の道が開かれた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (平成 14 年度)

1. 論文発表

- 1) Tomita N, Morishita R, Tomita T, Ogihara T: Potential therapeutic applications of decoy oligonucleotides. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 4: 166-170, 2002
- 2) Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee SJ, Kwon KY, Choi SY, Lee KU, Park JY, Moon IJ, Park JG, Yoshizumi M, Ouchi Y, Lee IK: Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo. *Circ Res*. 90: 1325-1332, 2002
- 3) Jo N, Ogata N, Aoki M, Otsuji T, Morishita R, Kaneda Y, Matsumura M: Effective transfection of a cis element "decoy" of the nuclear factor-κB binding site into the experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res*. 24: 465-473, 2002
- 4) Azuma H, Tomita N, Kaneda Y, Koike H, Ogihara T, Katsuoka Y, Morishita

R: Transfection of NFκB decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts. *Gene Therapy*. 10: 415-425, 2003

5) Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, Aoki M, Hashiya N, Sakonjo H, Makino H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R: Inhibition of NFκB activation using cis-element "decoy" of NFκB binding site reduces neointimal formation in

porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Therapy*. 10: 356-364, 2003

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura H, Aoki M, <u>Tamai K.</u> Oishi M, Ogihara T, Kaneda Y Morishita R	Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model.	Gene Therapy	9	1221-1229	2002
Meng X, Sawamura D, Ina S, <u>Tamai K.</u> Hanada K, Hashimoto I	Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin.	Exp Dermatol	11	456-461	2002
Matsuzaki Y, <u>Tamai K.</u> Kon A, Sawamura D, Uitto J Hashimoto I	Keratinocyte responsive element 3 (KRE3): Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter.	J Invest Dermatol	120	308-312	2003
Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, <u>Hashimoto K.</u> Raab G, Klagsbrun M, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Mekada E	HB-EGF and ErbB signaling is essential for heart function.	Proc Natl Acad Sci	in press		
Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, <u>Hashimoto K.</u> Yasukawa M	Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes: analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells.	J Immunol	170	2205-2215	2003