

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・治療等研究事業

研 究 報 告 書

第1分冊

厚 生 労 働 省

目次

平成14年度終了研究課題(分冊1)

アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明と新治療法開発に関する研究	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 環境皮膚免疫学 教授	西岡 清 (1)
樹状細胞を用いたアトピー性皮膚炎治療に関する研究	東京大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授	玉置 邦彦 (4)
遺伝子改変モデル動物を用いたアレルギー病態の解析と治療への応用に関する研究	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 感染分子制御学 教授	烏山 一 (7)
小児アトピー性皮膚炎の発症に関わる因子および発症予測・予防に関する実験的・文献的解析	福井医科大学医学部小児科 教授	真弓 光文 (10)
小児アトピー性皮膚炎における酸化ストレスおよびレドックス制御機構の関与に関する研究	福井医科大学医学部小児科 教授	真弓 光文 (13)
アトピー性皮膚炎と末梢血樹状細胞に関する研究	浜松医科大学皮膚科 教授	瀧川 雅浩 (16)
ストレスによるアトピー性皮膚炎の増悪機序の検討(サブスタンスPアナログによる線維芽細胞からのエオタキシンの誘導と産生抑制)	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座 教授	片山 一朗 (19)
アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚病変部のT細胞レセプターの検討(第2報)	増マリアナ医科大学皮膚科学教室 助教授	相馬 良直 (22)
アトピー性皮膚炎治療薬としての抗酸化剤(CX-659S):表皮角化細胞への作用について	九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 助教授	古賀 哲也 (25)
T細胞のホーミング・レセプター発現の制御機構の解明	杏林大学医学部皮膚科 教授	塩原 哲夫 (28)
STAT6 Decoyによるアトピー性皮膚炎モデルマウス(ハプテン反復外用マウス)の耳介腫脹反応の制御	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 環境皮膚免疫学 教授	西岡 清 (31)

アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明と
新治療法開発に関する研究

アトピー性皮膚炎の病因・病態の解明および新治療法開発に関する研究班

主任研究者 西岡 清

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科環境皮膚免疫学 教授

研究要旨 難治性アトピー性皮膚炎の病因・病態の解析と新しい治療法の開発において、平成14年度に以下の価値ある研究成果が得られた。

1. Th1、Th2 細胞の皮膚へのホーミングに局所のサイトカイン環境が重要な役割を果たしていること
2. 皮膚に浸潤する抗原特異的オリゴクローナルな T 細胞を抗原ペプチド療法により制御するモデル系を作成したこと
3. IgE による炎症反応に、遅発反応より遅れて出現し長期のわたって持続する第3相反応を発見し、この反応の詳細を検討したこと
4. 精神神経ストレス分子による皮膚線維芽細胞のエオタキシン産生に関与するシグナル伝達分子を標的とする治療薬開発の可能性を示したこと、
5. アトピー性皮膚炎で酸化ストレスが作用し、抗酸化薬の開発が必要であること、また、本症の発症危険因子としてアトピー家族歴が重要であること
6. 本症患者の血中樹状細胞が Th2 反応を促進する DC2 優位となっていること
7. GMCSF と TGF- β によりランゲルハンス細胞が LC1、LC2 に偏移して T 細胞を刺激することからサイトカインによる免疫反応調節の可能性を示したこと
8. アトピー性皮膚炎の治療薬、抗酸化薬の CX-659S の開発を行ない、CX-369S が MEK1/2-Erk1/2 経路を介して表皮細胞による GMCSF 産生を阻害して炎症反応を抑制すること
9. STST6 のおとり核酸製剤が、IgE 受動転嫁によるアレルギー炎症とハプテン繰り返し塗布による炎症反応の両方を抑制し、治療薬としての可能性を示したこと

以上の研究成果は、重症アトピー性皮膚炎の病因・病態を明らかにするとともに、新しい治療法の開発を可能にするものであり、価値ある成果と考えられる。さらに継続して治療薬の開発を行なう必要がある。

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
烏山 一	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科感染分子制御学教授
塩原哲夫	杏林大学医学部皮膚科学教授
滝川雅浩	浜松医科大学皮膚科学教授
真弓光文	福井医科大学小児科学教授
片山一朗	長崎大学医学部皮膚科学教授
古賀哲也	九州大学大学院医学研究院医学部皮膚科助教授
相馬良直	聖マリアンナ医科大学皮膚科助教授

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の病態として、皮膚バリア機能異常による皮膚の易刺激性にもとづく非特異的炎症と、IgE の過剰産生にもとづくアレルギー炎症の2側面が指摘されている。皮膚バリア機能異常に対して、種々のスキンケア製剤が臨床の場に導入され、アトピー性皮膚炎発症の予防、治療に供されている。一方、IgE によるアレルギー炎症は、本症患者の難治化に重要な役割を果たしていることから、IgE が関与する炎症反応に対する新しい治療法の開発が急務となっている。本研究班では、患者数の増加を示し、難治化傾向を示すアトピー性皮膚炎の新しい治療法を開発するため活動し、すでに、アトピー性皮膚炎の病因・病態の解析において多くの知見を得ており、また、それら知見をもとにした新しい治療法開発の標的を明らかにしてき

た。本年度は、それら知見のさらなる集積と治療法開発を行なった。

B. 研究方法ならびに結果

1) アトピー性皮膚炎の炎症機構の解析

アトピー性皮膚炎の炎症局所では、急性期は Th2 細胞が、また、慢性期には Th1 細胞が浸潤するが、そのメカニズムは明らかとなっていない。T 細胞が皮膚に浸潤するためには、CLA 分子を発現し、内皮細胞表面の E セレクチンと反応し、ケモカインの作用によって選択的に皮膚に遊走し、皮膚に症状を生じると考えられている。そのうち E セレクチンが CLA 陽性 T 細胞と結合する分子について、塩原班員は、CLA は E セレクチンリガンド (ESL) とは異なる分子であるが、ともに Fucosyl transferase VII (FucTVII) によって付加される糖鎖構造を持つ分子であることを明らかにし、その糖鎖構造の検出法を開発している。ヒト末梢血からのナイーブ T 細胞は IL2 と CD3 抗体で刺激し、さらに、IL2 あるいは IL4 を添加して培養することによって、Th1、Th2 細胞が誘導される。そこで、誘導された T 細胞に発現される ESL、ケモカイン受容体 CCR4 の動態を観察し、アトピー性皮膚炎での浸潤細胞の動きと比較検討した。その結果、浸潤する T 細胞は局所のサイトカイン環境により発現される T 細胞上の ESL と CCR4 の組み合わせによって最も必要とされる時期に皮膚に浸潤することを明らかになった。アトピー性皮膚炎では、末梢血中に ESL+CCR4+ の Th2 細胞が増加しているが、これは皮膚に Th2 細胞が十分に浸潤しているためであり、これら末梢血 Th2 細胞は皮膚に Th1 細胞が浸潤しているときにはじめて浸潤できるというバランスが存在することを明らかにした。この成果は、アトピー性皮膚炎の炎症局所での浸潤細胞のスイッチングの説明を可能とするものであり、アトピー性皮膚炎での細胞浸潤の制御機構を検討することによって新しい治療法開発の可能性を示唆するものである。

相馬班員は、アトピー性皮膚炎の炎症局所にオリゴクローナルな T 細胞が浸潤することを明らかにしており、この現象をさらに明らかにするため、アトピー性皮膚炎モデル動物である NC/Nga マウスをダニ抗原で経皮感作し、皮膚ならびに脾臓での T 細胞クローンの解析を行っている。その結果、皮膚と脾臓とに同一の T 細胞受容体をもつクローンが検出されることを示し、アトピー性皮膚炎での抗原ペプチド療法のモデルとなる可能性を明らかにし、抗原ペプチド療法の動物実験の準備を整えている。

烏山班員は、IgE 抗体遺伝子導入マウスを作成して IgE 抗体が関与する炎症反応の検討を行い、すでに、IgE 抗体を介する炎症反応に IgE の高親和性受容体の α 鎖が重要な役割を果たしていることを示し、 α 鎖発現調節が治療薬開発の標的になることを示唆している。さらに、遺伝子導入マウスに抗原投与によって惹起される皮膚反応が、これまでに見つかった皮膚反応に加えて、長期にわたって炎症反応が持続す

る第 3 相反応が出現することを発見した。この反応は、正常マウスに IgE 抗体を投与し、抗原で惹起しても出現する皮膚反応であり、肥満細胞欠損マウス、T・B 細胞欠損マウスでも出現することから、肥満細胞以外の IgE の結合能をもつ細胞が重要な役割を果たしていることを明らかにした。この反応は、抗ヒスタミン薬では抑制されないが、ステロイドとシクロスポリンによって抑制された。今後、第 3 相反応の責任細胞を明らかにすることによって新しい治療法を開発する可能性を示唆する知見であり、アトピー性皮膚炎の難治化との関係に興味あるものである。

片山班員は、神経ペプチドのアトピー性皮膚炎の炎症反応への関与を解析し、新しい治療法を開発することを目的として研究を行っている。アトピー性皮膚炎の痒みの主役を担うヒスタミン、サブスタンス P と好酸球浸潤との関連を検討した結果、好酸球浸潤に重要な役割を果たすエオタキシンが皮膚線維芽細胞により産生されていることを明らかにした。アトピー性皮膚炎の皮膚線維芽細胞は、IL4 とヒスタミンあるいはサブスタンス P の刺激によって、培養条件下で強いエオタキシン産生を示し、長期の継代後もその形質を持続することを明らかにした。そこで、エオタキシン産生刺激となる IL4 のシグナル伝達系を検討したところ、STAT6 のリン酸化は見られたものの、ヒスタミン、サブスタンス P 添加によって STAT6、NF κ B の活性化の増強が見られなかったことから、これらのシグナル伝達分子とは別のシグナル伝達系が関与していることを明らかにしている。今後、シグナル伝達分子の解析を行い、そのシグナル伝達分子を標的とした治療薬開発が期待される。

真弓班員は、アトピー性皮膚炎への酸化ストレスの関与を検討し、アトピー性皮膚炎の急性増悪において酸化ストレスが関与していることを明らかにしている。本年度は、急性増悪因子として伝染性膿痂疹を選び、膿痂疹合併時の酸化ストレスの関与を検討した。小児アトピー性皮膚炎患者では膿痂疹合併後に尿中 8-HdG と acrolein が増加し、症状の改善とともに減少し、抗酸化酵素である heme oxydase 活性が上昇することを示した。また、培養人皮膚微小循環血管内皮細胞の接着分子発現は TNF- α により増強するが、NO 放出薬剤 (spermine NONO)、抗酸化剤 (PDTC) によって抑制されることを明らかにした。この知見はレドックス制御薬剤によるアトピー性皮膚炎治療の可能性を示唆するものである。また、真弓班員は既発表論文から本症の発症危険因子についてメタ解説を行い、本症発症の危険因子としてアトピー性疾患の家族歴が重要であることを明らかにしている。

2) アトピー性皮膚炎の免疫反応調節による治療法の開発

アトピー性皮膚炎が Th2 細胞による炎症反応であることから、Th2 から Th1 への偏移が治療法開発の標的となる。この偏移に樹状細胞の役

割が注目されている。滝川班員は、本症患者末梢血の樹状細胞 (DC) の DC1/DC2 比と患者の病状を比較し、本症患者では DC1/DC2 比の低下を認め、この値は患者の血清総 IgE 値、SCORAD 値と負の相関を示し、血中 Th1/Th2 比と正の相関を示すことを明らかにしている。

玉置班員は、皮膚樹状細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) の機能調節により、アトピー性皮膚炎の免疫反応を Th2 から Th1 に偏移して治療を行うことを目的として検討している。GMCSF は、Th1 反応に偏移させるサイトカインである IL12 の LC からの産生を低下させ、TGF- β がそれを増強することをすでに見出しており、サイトカインによるアトピー性皮膚炎の免疫反応の操作が可能であることを示唆している。この機序をさらに検討するため、TGF- β で処理した LC に抗原ペプチドをパルスして T 細胞と培養し、この培養環境に種々のサイトカインを添加したところ、TGF- β 処理した LC によって Th1 細胞が誘導できることが可能となった。そこで、マウスの足底に LC を投与して *in vivo* での Th1 細胞の誘導を試みたが、十分な誘導は見られなかった。LC の注射部位からリンパ組織への遊走が不十分であった可能性が示唆されており、今後、LC の遊走促進方法の開発が必要であるが、サイトカインを用いて LC 機能を調節する治療法の開発が期待される。

3) アトピー性皮膚炎治療薬の開発

当研究班ではこれまで難治性アトピー性皮膚炎の治療薬の開発を行なっている。古賀班員は、当研究班で開発を進めている抗酸化薬 CX-659S がアレルギー性接触皮膚炎を抑制することから、CX-569S のハ乗作用を検討している。CX-659S は表皮細胞からの GMCSF 産生を抑制して炎症反応を抑制していることを明らかにし、CX-659S が表皮細胞の MEK1/2-Erk1/2 経路を阻害して GMCSF の産生を抑制していることを示した。この薬剤は臨床応用可能なものとなりつつある。

西岡班員は、アトピー性皮膚炎難治化に IgE を介するアレルギー炎症が大きく関与していることに着目し、本症での Th2 型反応の主役を担う IL4-IL4R シグナル伝達系を標的として治療薬の開発を行っている。IL4 のシグナル伝達因子である STAT6 のおとり核酸製剤を調整し、アトピー性皮膚炎モデルである IgE 受動転嫁による遅発型反応を抑制することを明らかにし、さらに、ハプテン繰り返し塗布による Th2 型皮膚反応に対しておとり核酸製剤の効果を検討したところ、STAT6 おとり核酸製剤が Th2 皮膚反応も抑制することが明らかとなった。この核酸製剤は、皮膚反応発症において、肥満細胞の脱顆粒現象の抑制と局所の IL4 陽性細胞の減少に作用していることが明らかになり、今後も引き続いて、新しい治療薬としての開発を行なう必要がある。

D. 考察と結論

本研究班では、難治化するアトピー性皮膚炎

の病因・病態の解析とその解析結果に基く新しい治療薬の開発を目的として検討を行い、本症の皮膚反応において、①皮膚にホーミングするための分子が、Fucosyl transferase VII によって発現されて糖鎖構造を付加された新たな分子であること、②炎症皮膚に抗原特異的オリゴクローナルな T 細胞が浸潤することから抗原ペプチド療法の可能性があること、③アトピー性皮膚炎の難治化に関与すると考えられる IgE を介する新しい皮膚反応、第 3 相反応を発見し、この反応を担う細胞の同定により治療薬開発の標的となること、④神経ペプチドによるエオタキシン産生の責任シグナル伝達分子を標的とする治療薬開発の可能性を明らかにしたこと、⑤アトピー性皮膚炎で酸化ストレスが作用し、抗酸化薬の開発が必要であることを明らかにした。これらの成果は本症での病態を理解する上で重要であるだけでなく、将来の治療薬開発の標的を明らかにしたものとして価値ある知見である。

本症の Th2 型反応を Th1 型反応に偏移させるため、樹状細胞の機能調節を行い治療法の開発を試みた。⑥本症患者で、血中樹状細胞が Th2 反応を促進する DC2 優位となっていること、⑦ランゲルハンス細胞が GMCSF により LC2 に、TGF- β により LC1 に機能偏移して T 細胞を刺激することが明らかにされ、サイトカインによる免疫反応調節による治療法の可能性が示したことは価値ある成果と考えられる。さらに、本研究班では 2 つの新しい治療薬の開発をおこなっている。⑧抗酸化薬の CX-659S と、⑨STAT6 のおとり核酸製剤である。前者はアレルギー性接触皮膚炎とハプテン繰り返し塗布によるアトピー性皮膚炎モデル炎症を抑制すること、後者は、IgE 受動転嫁によるアレルギー炎症とハプテン繰り返し塗布による炎症反応を抑制することが示され、その薬理作用が明らかにされてきている。どちらの製剤も近未来の治療薬としての可能性を示しており、当研究班の価値ある成果であり、引き続き開発を進める必要がある。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー研究事業）
分担研究報告書

樹状細胞を用いたアトピー性皮膚炎治療に関する研究

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

研究要旨

アトピー性皮膚炎（AD）は、その多くは高IgE血症を伴い、慢性に経過する湿疹性病変である。ADは急性湿疹部位はTh2であるが、慢性湿疹部位ではTh1であるとする考え方が提示されている。しかし、我々がTh2ケモカインであるTARC, MDCおよびその受容体であるCCR4の発現について検討した限りでは、Th2に偏位した疾患であることが示唆されている。一方、表皮に存在する樹状細胞（DC）であるランゲルハンス細胞（LC）のIL-12産生について検討してみると、GM-CSFによってLCからのIL-12産生が強く抑制されるのに対し、TGF- β によってIL-12産生は増強されることが明らかとなった。そこで、LCをTGF- β 存在下で培養することによってTh1を誘導できるか否かについて検討してきた。その結果、OVAトランスジェニックマウスを用いた研究によってin vitroではTh1の誘導が可能である結果が得られた。そこで、同様条件でin vivoにおいて、Th1が誘導できるか否かについて検討したが、充分誘導できる結果は得られなかった。その理由のひとつとして、LCがリンパ節へ遊走できない可能性が考えられた。DCの分化に影響を与えるとされているLPSなどによって刺激した場合のIL-12産生やToll-like Receptorの発現を検討し、そのリガンドを用いた場合のIL-12産生、CD80, CD86発現への影響について検討を加えている。

A. 研究目的

皮膚の表皮に存在するランゲルハンス細胞（LC）は表皮細胞（EC）の1~3%を占める細胞である。LCは、樹状細胞（DC）に属するとされており、強い抗原提示能を有する抗原提示細胞（APC）である。酵素処理によって単離した直後のLC（fLC）は、immature DCであり、培養2-3日後のLC（cLC）はmature DCであるとされている。我々は、マウス表皮からLCを95%以上の純度で採取し、研究を進めている。

（J Invest Dermatol, 113 : 1021, 1999
J. Leukocyte Bio, 66:28, 1999). 本研究は、このようにして採取したLCを、アトピー性皮膚炎（AD）の治療に用いる可能性を検討しようというものである。ADのモデルマウスとされているNC/Ngaマウスにおいては皮膚炎局所で、Th2ケモカインであるTARC, MDCやその受容体CCR4が強発現していることは既に報告した（J Clin Invest 104:1097, 1999）。このことは、ADがTh2にシフトした病態であることを示唆している。そこで、マウスLCによってTh1を誘導する条件をつくり、それをin vitroに応用しようというものである。

B.C.研究方法と結果

①BALB/cマウスLCを採取し、in vitroで抗CD40+INF+ γ 刺激を加え、培養上清中のIL-12p40を測定する。このIL-12p40はbioactiveであることは2D6 cell assayで証明してある。②ここにGM-CSFを加えると、LCからのIL-12産生はほぼ完全に抑制される（J Immunol 164:5113, 2000）。③それに対し、LCの分化に重要とされるTGF- β を加えると逆にLCからのIL-12産生は増強されLCからのIL-12産生はGM-CSFとTGF- β のバランスによって決定される。（Eur J Immunol 31:294, 2001）④このように異なる刺激によって、LCからのIL-12産生が修飾されることが明らかとなったので更にLPS刺激によるIL-12産生とIL-6産生への影響を脾臓CD11c+DCと腹腔m Φ について行なった。その結果、低濃度LPS刺激では（1ng/ml）m Φ のIL産生もIL-6産生も強く誘導され、DCでは産生が誘導されたが、それほど強くはなかった。しかし、LCではいづれも誘導はされなかった。興味あることに、TGF- β もLPSもLCか

らのIL-6,IL-12産生に影響しなかったが、mΦではLPSによるIL-6やIL-12産生をTGF-βは抑制した。

⑤更に、LCをin vitroでTGF-β刺激した後、naive T細胞と共に培養し、培養上清中のサイトカインを測定しTh1/Th2への誘導について検討した。このために、(a)LCはOVAペプチド(323-339)存在下でαCD40又はαCD40+TGF-βで培養後(b)OVA(323-339)特異的TCRを発現させたトランスジェニックマウス由来のCD4+CD62L high T細胞と共培養し、IL-2,IL-4,IFN-γを測定した。その結果、TGF-β処理群ではIFN-γ産生を多くIL-4を少なく産生した。一方、IL-2の産生には差がみられなかった。(c)次にin vivoでのTh1の誘導について検討した。LCに同様にαCD40またはαCD40+TGF-β処理しOVAペプチドと共に培養した後トランスジェニックマウスの足蹠に注射した。その後リンパ節からリンパ球を採取し、IL-2,IL-4,IFN-γ産生について検討した。αCD40,αCD40+TGF-β処理群からのIFN-γ,IL-4産生が少ないもののIFN-γ/IL-4ではTh1にシフトしている結果が得られた。

⑥TGF-βやLPS以外による方法のひとつとしてTLRを介しての刺激を考え、LCにおけるTLRの発現について検討し、TLR2,3,4,9の発現のあることを明らかにした。更にそれらのリガンドによるLCからのIL-12産生などについて検討し、TLR9のリガンドであるCpGによってTh1にシフトする可能性があるものと考え検討を進めている。

⑦この過程で、脾臓DCとLCにおけるIFN-γ産生について比較検討した。脾臓DCと異なり、LCからのIFN-γ産生はmRNA,蛋白レベルのいずれにおいても認められなかった。

(倫理面への配慮)

以上の研究遂行中は、動物愛護の精神に則って実験を行なった。

D.E. 考察と結論

このように、LCからのIL-12産生は、LCへの刺激(あるいはLCの置かれた微少環境)によって異なることが示唆された。そして⑤からはTGF-β処理したLCを用いてin vitroにおいてnaive T細胞からTh1細胞を誘導できる可能性が示されたと考えている。しかし、in vivoにおいては充分誘導がかけられなかった為、LCに発現しているTLRを介したりリガンドによる刺激を用いる可能性について検討を進めることとし、現在研究を行なっている。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Tada Y, Asahina A, Tamaki K. Murine epidermal Langerhans cells do not produce IFN-γ. *J Invest Dermatol.* in press
2. Nagaoka Y, Nakamura K, Yasaka N, Watanabe T, Asahina A, Tamaki K. Identification and characterization of the low affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRII / CD23) on murine Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 119:130-36, 2002
3. Tamaki K, Nakamura K. The role of lymphocytes in healthy and eczematous skin *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:455-460,2001
4. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K. TGF-β upregulates IL-12 production by mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 31: 294-300,2001
5. Tamaki K, Sugaya S, Tada Y, Yasaka N, Uehara M, Nishimoto M, Nakamura K. Epidermal and dermal gamma-delta T cells. *Chem Immunol.* 79:43-51,2001
6. Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Nakagawa H, Tamaki K. Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1 beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-3 and is inhibited by dexamethasone and tecrolimus. *Dermatology* 202:239-45, 2001
7. Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M, Kim SS, Yamada Y, Kawasaki H, Tamaki K, Furue M. Expression of CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes in vitro-upregulation by RANTES. *J Dermatol Sci.* 25:229-35,2001
8. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells. *J Immunology* 164: 5113-9,2000
9. 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

10. Tamaki K. Antipruritic effect of macrolide antibiotics. J Dermatol 27:66-7,2000
11. Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NF kappa B and C/EBP beta. J Biol Chem. 275: 32077-88,2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝子改変モデル動物を用いたアレルギー病態の解析と 治療への応用に関する研究

分担研究者 鳥山 一

東京医科歯科大学大学院感染分子制御学 教授

研究要旨 抗原特異的 IgE を高レベルで産生するトランスジェニックマウスの耳介皮内に抗原（TNP-OVA）を単回投与したところ、投与後 30 分をピークとする即時型（第 1 相）の皮膚腫脹ならびに数時間後をピークとする第 2 相目の皮膚腫脹に引き続き、2 日目より強い細胞浸潤をともなう皮膚腫脹が出現し、投与抗原量に応じて 1-4 週間持続した。各種変異マウスを用いた解析から、この第 3 相目の皮膚炎症反応は①抗原特異的、②IgE/FcεRI 依存的、③マスト細胞非依存的、④T細胞非依存的であり、サイクロスポリンが有効であることが判明した。これらの結果から、IgE/FcεRI を介するマスト細胞非依存的・T細胞非依存的な遅延型アレルギー炎症反応が存在することが明らかとなった。この発見は「IgE が即時型のアレルギー反応をひきおこす」「T細胞が遅延型免疫応答をひきおこす」という既成概念を塗り替えるものであり、IgE がアトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー炎症反応において増悪・遷延因子として作用している可能性を強く示唆するものである。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の重症度と患者血中 IgE 値に正の相関が認められる。しかし、IgE が花粉症のような即時型アレルギー反応を引き起こすことは教科書的事実として広く認知されているのに対して、アトピー性皮膚炎のような慢性アレルギー疾患の病態形成・遷延化に IgE が関与しているのかどうかについては明快な答えが出されていない。従来のアレルギー疾

患モデル動物では、抗原を繰り返しチャレンジするため、T細胞を含めた様々な細胞が感作・活性化されてしまい、IgE 単独の病態への関与を解析することは不可能であった。そこで、我々は抗原特異的な IgE を高レベルで産生するトランスジェニックマウスを樹立し、事前の抗原免疫をせず単回の抗原投与のみでアレルギー反応を誘発させて、慢性アレルギー疾患の病態形成・遷延化における IgE の

役割を解析した。

B. 研究方法

ハプテン TNP 特異的 IgE トランスジェニック (Tg) マウスあるいは TNP 特異的 IgE であらかじめ受動感作した種々の変異マウスの耳介に抗原 TNP-OVA あるいは OVA を皮内注射し、経時的に耳介皮膚厚の計測、病理組織学的解析をおこなった。さらに、各種薬物をマウスに経口投与し、皮膚炎症反応に対する効果を調べた。

(倫理面への配慮) 動物実験はすべて東京医科歯科大学動物実験指針に則り、実験動物委員会の承認を得ておこなった。

C. 研究結果

TNP 特異的 Tg マウスの耳介皮内に TNP12-OVA (1-100 μ g) を投与したところ、投与後 30-60 分をピークとする即時型 (第 1 相) の皮膚腫脹ならびに数時間後をピークとする第 2 相目の皮膚腫脹が認められた。興味あることに、その後、2 日目より再び強い皮膚腫脹が出現し、投与抗原量に応じて 1-4 週間持続した (ピークは 3-12 日目)。この第 3 相目の皮膚腫脹は抗原特異的、IgE 依存である。しかも TNP4-OVA のような low valency の抗原を用いた時には出現しないことから、多価抗原である必要があることがわかった。TNP 特異的 Tg マウスのみならず、TNP 特異的 IgE であらかじめ受動感作したマウスでも、同様の第

3 相目の皮膚腫脹が認められた。ここで、各種の変異マウスを用いて解析したところ、驚くことにマスト細胞欠損マウス (WBB6F1-W/Wv) ならびに T 細胞欠損マウス (ヌードマウス、RAG ko マウス、TCR δ ko マウス) でも、正常マウスと同等の第 3 相目皮膚腫脹が観察された。一方、FcR γ 鎖 ko マウスでは第 3 相目皮膚腫脹が全く出現しなかったことから、低親和性 IgE レセプター CD23 ではなく高親和性 IgE レセプター Fc ϵ RI が 3 相目皮膚腫脹には必須であることが判明した。3 相目皮膚腫脹は、抗ヒスタミン/セロトニンでは影響が見られなかったが、ステロイドあるいはサイクロスポリン投与によって劇的に抑制された。

D. 考察

TNP 特異的 Tg マウスならびに TNP 特異的 IgE 受動感作マウスに多価の抗原を皮内投与して誘導される第 3 相目皮膚腫脹は、IgE/Fc ϵ RI を介する反応で、しかもマスト細胞非依存かつ T 細胞非依存な遅延型免疫応答であることが判明した。この新発見は「IgE が即時型のアレルギー反応をひきおこす」「T 細胞が遅延型免疫応答をひきおこす」という既存概念では説明できない、全く新しい慢性アレルギー炎症誘導機構が存在することを強く示唆している。慢性アレルギー疾患での抗 IgE 抗体療法の有効例の報告と考え合わせると、IgE が即時型アレルギー反応のみならず、アトピー性皮膚

炎などの慢性アレルギー炎症反応の誘導・維持にも関与していることが強く示唆される。第3相目皮膚腫脹の機序解明はあらたな創薬のターゲットの発見につながるものと期待される。

E. 結論

IgE トランスジェニックマウスならびに IgE で感作した種々の変異マウスの解析から、IgE/FcεRI を介するマスト細胞非依存的・T細胞非依存的な遅延型アレルギー炎症反応が存在することが明らかとなった。この発見は IgE がアトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー炎症反応において増悪・遷延因子として作用している可能性を強く示唆するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., Karasuyama, H.: Long-term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J. Immunol.* 170: 775-780, 2003.
- ② Sato, E., Hirahara, K., Wada, Y., Yoshitomi, T., Azuma, T., Matsuoka, K., Kubo, Taya, C., Yonekawa, H., Karasuyama, H. and Shiraishi, A.: Chronic inflammation in skin can be induced in IgE transgenic mice by a single challenge of multivalent antigen. *J. Allergy Clin.*

Immunol. 111: 143-148, 2003.

2. 学会発表

- ① 久保田俊之、久保秀一、松岡邦枝、米川博通、反町典子、烏山一：FcεRI の発現調節における FcεRI α 鎖細胞内領域の役割. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 2002, 12.4-6. 東京

H. 知的財産権の出願・登録の状況

1. 米国特許：Patent No. 6,118,044
"Transgenic animal allergy models and methods for their use"
2. 欧州出願 98309340.2-2105
"Transgenic animal allergy models and methods for their use"
3. 平成9年11月14日特許願
特願平9-313989号
発明の名称「トランスジェニック動物」
4. 平成10年11月13日国内優先出願
特願平10-32334

小児アトピー性皮膚炎の発症に関わる因子および発症予測・予防に関する 実験的・文献的解析

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学医学部小児科教授
研究協力者 大嶋勇成 福井医科大学医学部小児科助手
塚原宏一 福井医科大学医学部小児科講師

研究要旨 小児アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）発症の危険因子を同定し、その発症予測方法を確立することで、AD のみならず小児期アトピー性疾患発症の効率的予防法を開発することを目的とし、Medline による文献検索から AD 発症危険因の同定を行った。AD 発症に関する文献を 100 件抽出し、メタアナリシスを行い、AD 家族歴が最も重要な危険因子として同定された。家族歴以外にも喫煙、ペット飼育、室内環境汚染など幾つかの危険因子が同定されたが、多くの報告が欧米での疫学調査に基づくものであるため、環境が異なるわが国にもあてはまるかどうかの検討を含め、わが国での危険因子を同定する必要があると考えられた。

A. 研究目的

小児アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下 AD と略す）はアレルギーマーチの初発症状であり、気管支喘息発症の危険因子でもある。従って、AD 発症の危険因子を同定し、その発症の予測方法を確立することは、AD を含めた小児期アレルギー性疾患の予防対策を講じる上で重要と考えられる。本研究は、乳幼児における AD 発症危険因子・予測因子を、現在までに報告された文献を網羅的に検索することにより、同定する事を目的とする。

B. 研究方法

(方法 1) “atopic dermatitis” と “atopy” をキーワードとして Medline を検索し、それぞれ 7763 件と 3468 件の文献を選択した。次に “prediction” または “risk factor” を絞キーワードとして絞り込み、論文内容から発症危険因子に関する文献を 66 件選択した。

(方法 2) ISI 社の雑誌インパクト・ファクタ

情報により、一般医学、アレルギー学、小児科学、皮膚科学の各分野で上位を占める 23 雑誌を選択し、“atopic dermatitis” をキーワードに検索して 2283 件を選択して、論文内容から発症危険因子に関する 90 件を抽出した。方法 1、2 で抽出された論文より重複したものを除き、最終的に 100 件を解析対象とした。各論文から危険因子のオッズ比とその 95%信頼区間を、オッズ比の記載のない場合は実測数や相対危険度からオッズ比を算出し、得られたオッズ比と 95%信頼区間から General variance-based method によりメタアナリシスを行い、オッズ比のまとめ値とその 95%信頼区間を算出した。各研究間の重み付けは行っていない。

C. 結果

1. アレルギー性疾患家族歴

AD 家族歴はオッズ比 2.98 (95%信頼区間: 2.39-3.71) で AD 発症の危険因子となった。

気管支喘息家族歴は(オッズ比:1.5(1.07~2.1)) 危険因子となったが、アレルギー性鼻炎家族歴は有意とならなかった。

2. 出生時点までの要因

喘息で報告されているように兄弟数が多いほど発症リスクが減少し、第1子の方が発症リスクが高い傾向は認められず、兄弟からの感染機会の増加が発症予防に作用するといった **hygiene hypothesis** は AD では確認できなかった。妊娠初期の熱性感染症や妊娠前までの経口避妊薬の使用がそれぞれオッズ比 1.63 (1.00~2.69)と 1.30 (1.05~1.63)で危険因子となるとの報告があるが、普遍性があるものかは不明である。過期産はオッズ比 1.32 (1.10~1.59)で危険因子となった。未熟児では気管支喘息の発症リスクが高いことが報告されているが、AD の発症の危険因子とならなかった。

3. 出生後の生育環境

家庭の社会経済レベルに関しては、喘息では低い階層での危険性が高いのに対し、AD では高い階層の方が発症の危険性が高い(オッズ比 1.28 (1.08~1.51))。ペットの飼育と家庭内喫煙はそれぞれオッズ比 1.16 (1.02~1.32)、1.22 (1.07~1.39)で危険因子となった。デイケア保育や農村生活は AD 発症を抑制する結果は得られなかった。寄生虫感染も AD 発症とは関連がないと報告されている。室内排気型の暖房や、室外排気用のフードを備えていないガス器具の使用は AD 発症の危険因子となり、室内大気の汚染が AD 発症と関連するとの報告もある。

4. 食事に関する因子

母乳栄養に関しては Gdalevich らによるメタアナリシスの結果、オッズ比 0.68 (0.52~0.88)で生後3ヶ月までの完全母乳栄養は AD 発症に予防効果があると報告されている。離乳食に関しては、生後4ヶ月までに離乳用食品を開始した場合、湿疹の頻度が増加するとの報告があるが、離乳食の開始時期やその内容がわが国の実情と異なるため、わが国に実情を反映した解析データが必要といえる。食物制限は、AD 家族歴を有するハイ

リスク児では、年少時期の食物制限は発症予防効果が期待されるが、年齢が進むにつれてその効果が減弱すると考えられた。

5. 検査成績からみた発症要因

AD では、臍帯血 IgE 値と発症とは有意の関係は認められず、その他の検査結果で有意なものも、臨床応用には程遠いのが現状である。

6. 遺伝子多型とアトピー性皮膚炎

TAP1、FcεRI、IL-13、RANTES、TGFβ 1 の遺伝子多型が報告されているが、TGFβ 1 多型はオッズ比 4.8 (2.4~9.7)で、AD 家族歴より高いオッズ比を示すが、IL-13 の多型ではオッズ比 1.77 (1.06~2.9)で家族歴よりも低い。

D. 考察

AD の発症の危険因子としては AD 家族歴が最も重要であった。家族歴以外にも喫煙、ペット飼育、室内環境汚染など幾つかの因子が同定されたが、オッズ比を比較してもその発症への寄与は弱いものと考えられる。この結果は、AD が非常に多様な疾患群であるため、AD 全体としてみた場合には個々の危険因子の寄与程度が薄まってしまいその重要性が低く評価されてしまう可能性が考えられる。

アレルギー性疾患の増加の説明使われる **Hygiene hypothesis** に関しては、喘息で報告されているような、兄弟数、デイケア、農村生活などは AD では危険因子とならず、**Hygiene hypothesis** により AD の発症を説明することは困難と考えられた。

アトピー性皮膚炎の発症予測の点からは、アトピー性皮膚炎の発症が出生後早期から始まるため、発症前予測として利用できる因子が限られてしまう。そのため、遺伝子多型を応用することが考えられるが、アトピー性皮膚炎家族歴を超える予測精度が期待されるだけの候補遺伝子多型は同定されていない。今後、遺伝子多型の組み合わせなどで予測精度を上げる方法の確立が望まれる。

E. 結論

AD 発症の危険因子としては AD 家族歴が最も重要であった。今回検討した因子の大半

は欧米での疫学調査に基づくものであり、居住環境や食生活など、わが国の現状とは異なる背景に基づくため、わが国のADの発症予測には、今回の検討で同定された発症候補因子がわが国にもあてはまるかどうかの検討を含め、わが国での危険因子を同定する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohshima Y, Yamada A, Hiraoka M, Katamura K, Ito S, Hirao T, Akutagawa H, Kondo K, Morikawa A, Mayumi M: Early sensitization to house dust mite is a major risk factor for subsequent development of bronchial asthma in Japanese infants with atopic dermatitis: Results of a 4-year follow-up study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89:265-270(2002)
- 2) Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M: Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* 51:195-200(2002)
- 3) Iio J, Katamura K, Ohmura K, Yasumi T, Meguro T, Ohshima Y, Nakahata T: Lipid A analogue, ONO-4007, inhibits IgE response and antigen-induced eosinophilic recruitment into airways in BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol* 127:217-225(2002)
- 4) Yamada A, Ohshima Y, Tukahara H, Hiraoka M, Kimura I, Kawamitsu T, Kimura K, Mayumi M: Two cases of anaphylactic reaction to gelatin induced by chloral hydrate suppository. *Pediatr Int* 44:87-89 (2002)
- 5) Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki I, Mayumi M, Ohshima Y: Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived

dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* 169:4861-4866(2002)

- 6) 大嶋勇成, 眞弓光文: アレルギーの機構—Overview. 別冊・医学のあゆみ state of arts ver.2 235-239(2002)
- 7) 小俣合敏子, 安富素子, 大嶋勇成. 樹状細胞からの IL-12 産生のケモカインによる制御. *臨床免疫* 38:468-473(2002).
- 8) 大嶋勇成. アトピー性皮膚炎の増加と喘息の関係 *日本小児科学会誌* 106:1616-1621(2002).
- 9) 大嶋勇成: アトピー性疾患発症の危険因子と予防的治療法の問題点 *福井県小児科医学会会報* 31:48-51(2002)

2. 学会発表

- 1) Ohshima Y, Omata N, Yasutomi Y, Yamada A, Mayumi M: Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *Keystone symposia Dendritic cells Keystone CO March 3-April 8, 2003*
- 2) 大嶋勇成: 分野別シンポジウム; 乳児アレルギー性疾患の変遷: アトピー性皮膚炎の増加と喘息の関係 第105回日本小児科学会 2002/4/19 名古屋
- 3) 大嶋勇成: シンポジウム: 小児アレルギー性疾患における症状の変遷、アレルギーマーチの新しい意義: 皮膚症状とアレルギー性疾患の経過 第39回日本小児アレルギー学会 2002/11/1-2 盛岡
- 4) 大嶋勇成: シンポジウム: 小児アレルギー性疾患発症要因—最近の研究成果から: 素因2 抗原提示細胞かT細胞か 第52回日本アレルギー学会 2002/11/28 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

小児アトピー性皮膚炎における酸化ストレスおよびレドックス制御機構の関与に
関する研究

分担研究者 眞弓光文 福井医科大学医学部小児科 教授
研究協力者 塚原宏一 福井医科大学医学部小児科 講師
大嶋勇成 福井医科大学医学部小児科 助手

研究要旨 本研究の目的は、小児アトピー性皮膚炎（AD）の発症・病態形成における酸化ストレスの関与とそれに対するレドックス制御機構を明らかにし、ADの病因・病態を解明し、レドックス制御による新たなAD治療法を開発するための基礎データを集積することである。本年度は、急性増悪期にあるAD患者におけるレドックス環境の変化を特異的尿マーカーを用いて経時的に評価するとともに、レドックス制御薬剤の炎症制御機構を細胞生物学のレベルで検討した。黄色ブドウ球菌による膿痂疹を合併し皮膚病変が急性増悪したAD患者においては、病初期には酸化ストレスが著しく亢進していたが、その程度は臨床検査所見の改善とともに低下した。一方、代表的な抗酸化酵素である heme oxygenase 活性は高いレベルを推移した。NO産生は経過中ほぼ正常レベルを推移した。一方、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞での接着分子（E-selectin、ICAM-1）発現は炎症性サイトイン TNF- α 処理により著明に増加するが、それはNO放出薬剤（spermineNONOate）、抗酸化剤（PDTC）により抑制された。以上の結果より、レドックス制御機構の活用によるADの新たな治療法の開発が可能となることが示された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis、以下ADと略す）は小児においてよく見られるアレルギー炎症性疾患であるが、皮膚病変には多様性があり病変形成機序には不明な点も多い。他のアレルギー炎症性疾患である気管支喘息、アレルギー性鼻炎の治療が多くの患者で奏効しているのに対して、ADはしばしば難治で新規の効果的な治療法の導入が臨床の現場から望まれている。

本研究の目的は、ADの発症・病態形成における酸化ストレスの関与とそれに対するレドックス制御機構を明らかにし、ADの病因・病態を解明し、レドックス制御による新たなAD治療法を開発するための基礎データを集積することである。

B. 研究方法

(1) 臨床医学的研究

黄色ブドウ球菌による膿痂疹を合併し皮膚病変が増悪したために入院加療を要したAD

患者（13名、男9/女4；年齢1.5～10.0歳）を対象とした。急性期（入院当日および翌日）、回復期（入院7～9日目）に尿を採取した。尿中8-OHdG（酸化核酸傷害の指標）、acrolein（酸化脂質傷害の指標）、NO_x（内因性NO産生の指標）、bilirubin oxidative metabolites (BOM)（酸化ストレス下でのheme oxygenaseの活性の指標）濃度（対Cr比）を測定し、年齢を一致させたアレルギー性疾患を有しない健常児（28名、男10/女18；年齢1.5～10.0歳）から得られた正常データと比較検討した。

(2) 実験医学的研究

培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞の細胞膜上での接着分子（E-selectin、ICAM-1、VCAM-1）発現に及ぼす炎症性サイトイン TNF- α （10 ng/mL）の作用とそれに対する NO 放出薬剤（spermineNONOate、1mM）、抗酸化剤（PDTC、0.1mM）の効果を、蛋白（flow cytometry、4時間後）、mRNA（Light Cycler RT-PCR、2時間後）発現の両レベルで検討した。

C. 結果

(1) 臨床医学的研究

皮膚病変が急性に増悪した小児 AD 患者では、入院当日および翌日での尿中8-OHdG、acrolein 排泄は正常対照に比して有意に増加していた。それらは抗生物質投与などの治療による臨床検査所見の改善と一致して低下した。acrolein 排泄については入院7～9日目の時点でも正常対照に比して有意に高かった。一方、BOM 排泄は正常対照に比して有意に高いレベルをほぼ変化なく推移した。NO_x排泄は経過中ほぼ正常レベルを推移した。

(2) 実験医学的研究

培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞での E-selectin、ICAM-1 発現は TNF- α 処理により蛋白、mRNA レベルで著明に増加した（VCAM-1は誘導しなかった）。SpermineNONOate、PDTC はこれらの反応を蛋白、mRNA レベルで抑制した。

D. 考察

ADの病因・病態に関与する機構の解明は、新たな治療法の確立と発症予防の両面から極めて重要である。今回の研究で、AD患者の急性増悪期には全身性に酸化ストレスが増強されるが、これに反応して代表的な抗酸化酵素である heme oxygenase 活性も上昇することが示された。一方、レドックス制御に関与する NO の産生には亢進が認められず、AD患者における NO 産生不全がその病態形成に関連することが示唆された。また、NO 放出薬剤や抗酸化剤などのレドックス制御薬剤が AD 局所への炎症細胞の浸潤を抑制することにより、AD の治療に有用であることが示唆された。AD の発症・病態形成と酸化ストレスとその制御機構との関連性がさらに明らかにされることにより、機能性食品を含めたレドックス制御機構の活用による新たな AD 治療法が開発されることが展望される。

E. 結論

レドックス制御機構の活用による AD の新たな治療法が開発が可能となることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tsukahara H. Pathophysiological roles of nitric oxide in inflammatory diseases. *Current Advances in Pediatric Asthma and Other Allergic Diseases* (Morikawa A, ed; Jomo Newspaper) 145-152, 2002.

(2) Hattori K, Tsuchida S, Tsukahara H, Mayumi M, Tanaka T, Zhang L, Taniguchi T, Muramatsu I. Augmentation of NO-mediated vasodilation in metabolic acidosis. *Life Sci* 71 (12): 1439-1447, 2002.

(3) Ohshima Y, M. Yasutomi, N. Omata, A. Yamada, K. Fujisawa, K. Kasuga, M. Hiraoka, M. Mayumi. Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4⁺ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res.* 51(2): 195-200, 2002.

(4) Omata, N., M. Yasutomi, A. Yamada, H. Iwasaki, M. Mayumi, Y. Ohshima. Monocyte chemoattractant Protein-1 selectively Inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th-1 Immune response. *J. Immunol.* 169: 4861-4866, 2002.

(5) Tsukahara H, Ishida T, Mayumi M. Gas-phase oxidation and disproportionation of nitric oxide. *Methods Enzymol* (Cadenas E, Packer L, eds; Academic Press) 359: 168-179, 2002.

(6) 眞弓光文. アトピー性皮膚炎. 小児疾患診療のための病態生理 1 小児内科 Vol.34 増刊号 p1244-1250, 2002. 「小児内科」「小児外科」編集委員会共編. 東京医学社

(7) 眞弓光文. 原因・悪化因子をいかに検索・除去するか. 特集 アトピー性皮膚炎ガイドラインをガイドする. *Medical Digest* 51(3):9-16, 2002.

(8) Tsukahara H, Ishida T, Todoroki Y, Hiraoka M, Mayumi M. Gas-phase disproportionation of nitric oxide in elevated pressures. *Free Radic Res* 37 (2): 171-177, 2003.

(9) Tsukahara H, Shibata R, Ohshima Y, Todoroki Y, Sato S, Ohta N, Hiraoka M, Yoshida A, Nishima S, Mayumi M. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 9308: 1-8, 2003 (electronical).

2. 学会発表

(1) 大嶋勇成. 分野別シンポジウム：乳児アレルギー性疾患の変遷：アトピー性皮膚炎の増加と喘息の関係 第105回日本小児科学会 2002/4/19 名古屋

(2) Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Omata N, Yasutomi M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. REDOX KYOTO 2002: International Symposium for Redox Signaling and Stress Diseases, Kyoto, 2002年(11月).

(3) 大嶋勇成. シンポジウム：小児アレルギー性疾患における症状の変遷、アレルギー性疾患の経過 第39回日本小児アレルギー学会 2002/11/1-2 盛岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アトピー性皮膚炎と末梢血樹状細胞に関する研究

分担研究者 瀧川雅浩 浜松医科大学皮膚科 教授

研究要旨 樹状細胞は機能的に DC1 と DC2 の 2 つに分類され、それぞれ Th1 および Th2 の分化誘導に関与すると考えられている。Th2 病の代表であるアトピー性皮膚炎において、これらの樹状細胞の病因への関与を調べるため、健常人 10 名、アトピー性皮膚炎患者 47 名、尋常性乾癬患者 10 名において、末梢血樹状細胞の数と割合を調べた。その結果、アトピー性皮膚炎患者では、末梢血樹状細胞が DC2 優位に増加しており、さらに、DC1/DC2 比は、血中総 IgE 値、特異的 IgE 値、およびアトピー性皮膚炎重症度である SCORAD index と逆相関し、また、末梢血中 Th1/Th2 比と順相関することが判明した。また、アトピー性皮膚炎の皮膚病変真皮内には、真皮に健常人では認められない DC2 が認められた。これらの結果から、アトピー性皮膚炎の Th2 シフトに DC2 の関与することが示唆された。

A. 研究目的

Th1/Th2 バランスの決定には、遺伝、病原体、樹状細胞、T 細胞やその他の細胞が産生するサイトカインおよびそれらが提供する微小環境が関連する。ヒトにおいて DC1 と呼ばれる骨髄由来の樹状細胞と、リンパ系由来の DC2 が存在し、これらが各々、Th1 および Th2 のバランスシフトに関与することが明らかとなった。Th2 シフトを伴う慢性炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎(AD)において、これらの樹状細胞との関連を明らかにするため、我々は、AD の末梢血樹状細胞のそれぞれのタイプとの関連を検討する目的で以下の研究をおこなった。

B. 研究方法

浜松医科大学皮膚科を受診した AD の外来および入院患者 46 名(男性 29 名 女性 17 名、平均年齢 25.0 歳、重症度は軽症から重症)、尋常性乾癬患者 10 名(男性 7 名 女性 3 名、平均年齢 43.0 歳)および健常人 17 名(男性 11 名 女性 6 名、平均年齢 29.2 歳)を対象とした。AD 患者においては、初診時あるいは入院時において、SCORAD、LDH、総 IgE 値およびダニ特異的 IgE 値、末梢血好酸球数を調べた。

末梢血樹状細胞は、被験者の静脈血を FITC 標識-抗 CD3、抗 CD14、抗 CD16、抗 CD19、抗 CD20 および 抗 CD56 抗体、PE 標識-抗 CD11c および抗 CD123 抗体、PerCP 標識 抗 HLA-DR 抗体にて染色し、染色し、少なく

とも50,000個以上の細胞をFACS解析した。DC数は1mlあたりの絶対数および全単核球中のパーセントであらわした。DC1/DC2比はDC1数(1 μ lあたり)/DC2数(1 μ lあたり) \times 100であらわした。CD4陽性細胞のサイトカイン産生を調べるため、細胞内産生サイトカインをFACS解析した。末梢血単核細胞をFicollによって調整し、PMAおよびCa-ionophore添加24時間後に回収して、常法に従い、FITC標識抗IFN- γ 抗体およびPE標識抗IL-4抗体で染色してFACS解析した。統計学的解析は、Man-WhitneyテストおよびDC1/DC2比とアレルギーパラメーターの相関はmultiple linear regressionにて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2名のAD患者皮膚病変内のDC2の存在を調べるため、病変部皮膚生検組織をPE標識抗CD45RAまたは抗CD123抗体およびFITC標識抗HLA-DR抗体にて2重染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

C. 研究結果

はじめにAD患者群における末梢血樹状細胞数を健常人および尋常性乾癬患者と比較した。ADでは絶対数 $34.0 \pm 22/\mu$ l、全白血球中 $0.53 \pm 0.29\%$ が樹状細胞であった。一方、正常および乾癬患者の末梢血樹状細胞は、18/ μ l前後で、全体の0.4%程度であり、AD患者では有意に高値であった($p < 0.008$)。また、ADのDC1は $25.9 \pm 17.3/\mu$ l、全体の $0.49 \pm 0.49\%$ で健常人(0.29%)および乾癬患者(0.19%)に比べやや増加していた。DC2はAD($0.15 \pm 0.20\%$)の方が2倍以上健常人(0.065%)および乾癬

(0.04%)より多かった($p < 0.001$)。DC1/DC2比はADでは(3.7 ± 2.0)、健常人(7.5 ± 7.4)および乾癬(7.7 ± 7.0)より低値であった($p < 0.003$)。

Th2反応の反映としてIgE高値と末梢好酸球増多がある。そこで、AD患者において、DC1/DC2比とIgE値および好酸球数との関連を調べた。総IgE値およびダニ特異的IgE値とDC1/DC2比とは負の相関があった($p < 0.02$)が、好酸球数とは相関を認めなかった。また、末梢循環CD4陽性細胞のIFN- γ 産生細胞数/IL-4産生細胞数比とDC1/DC2比との関連を調べたところ、両者は正の相関があった($p < 0.04$)。さらに、重症度の指標であるSCORAD値とも負の相関があった($p < 0.02$)。

アレルギー性鼻炎において、DC2が直接病変部に浸潤し、病変の形成に関与しているという報告があるため、ADの皮膚病変にDC2が存在しているかどうかを2名の患者皮膚病変生検組織で検討したところ、少数ではあるが、健常人ではみられないDC2を真皮血管周囲に認めた。

D. 考察

我々の検討から、DC1/DC2比の不均衡が血中IgE値、Th1細胞数/Th2細胞数比、皮疹の重症度のTh2シフトの度合いと関連するパラメータと密に関連していることが判明した。これ迄の報告から、Th1/Th2のバランスの不均衡は、抗原の種類、サイトカインおよびそれに関連する微小環境、樹状細胞などが直接または間接的に影響するといわれる。特に樹状細胞がTh1/Th2を規定する重要な因子として、DC1およびDC2が各々機能的に異