

20030656

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

重症アトピー性皮膚炎の難治化機序を踏えた

治療法の確立に関する研究

(H15-免役-006)

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 16 (2004 年) 3 月

目 次

I 平成 15 年度総括研究報告書

重症アトピー性皮膚炎の難治化機序を踏えた治療法の確立に関する
研究

(東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学) 西岡 清

----- 1

II 平成 15 年度分担研究報告

1. STAT6 Decoy ODN を用いた接触過敏反応および抗原特異的 IgE 誘
導性第 3 相耳介腫脹反応の発症機序の解析と抑制

(東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学) 西岡 清

----- 5

2. 難治化病態の解明と治療法の開発

「IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機構」

(東京医科歯科大学大学院感染分子制御学) 烏山 一

----- 9

3. Lipid raft を標的とした新しいアレルギー性疾患治療戦略の検討

(長崎大学医学部皮膚科学) 片山 一朗

----- 12

III 研究成果の刊行一覧

----- 16

Ⅰ 平成 15 年度総括研究報告書

アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と遺伝子療法の開発に関する研究

主任研究者 西岡 清 東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と遺伝子治療の開発を目指して、平成 15 年度では以下の成果が得た。

1. アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介するアレルギー炎症が重要な役割を果たすことから、IgE のトランスジェニックマウスあるいは IgE の受動感作を行ったマウスに抗原を投与することによって、即時型、遅発型反応に続く第 3 相目の強い炎症反応が出現することを見つけたし、これがアトピー性皮膚炎の難治化に関与する可能性を考え、その発症機序を検討した。第 3 相反応は、T 細胞、B 細胞、肥満細胞とも異なる FcεRI 陽性骨髄由来造血細胞によって起こることを明らかにした。
2. IgE による遅発型反応ならびにハプテン繰り返し塗布により引き起こされる皮膚反応は、共にアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症のモデルとされている。IL4 受容体のシグナル伝達を司る STAT6 の作用を抑制する STAT6 デコイを用いて炎症反応に対する抑制効果を検討した。STAT6 デコイの投与によって、IgE による遅発型反応とハプテン繰り返し塗布によるアレルギー炎症反応を共に抑制できることが明らかとなり、STAT デコイによるアレルギー炎症の遺伝子療法の可能性を示した。
3. 細胞膜上の lipid raft の分解あるいはこの領域に dominant negative FcεRI を発現させることによるアトピー性皮膚炎の治療法の開発を行うため、健常人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a(+) FcεRI(+)細胞を効率よく回収する方法を確立し、この細胞に IgE あるいは IgE+抗原の添加し、FcεRI 下流で活性化される Syk のリン酸化を指標とする lipid raft 機能を解析する実験系を開発した。

分担研究者

鳥山 一 東京医科歯科大学大学院感染分子
制御学分野 教授
片山 一朗 長崎大学大学院皮膚病態学分野
教授

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の多くは、乳幼児期に発症し、消退をくり返して自然治癒するが、一部は、成人期に再燃あるいははじめて発症して、難治性の成人型アトピー性皮膚炎へと移行する。難治化した本性患者における難治化

機序はまだ十分に明らかにされていない。難治化機序の一つとして Th2 細胞を介する炎症反応の増強と持続が指摘されている。Th2 細胞を介した IgE 抗体産生異常に基づく病態形成に対しては、環境アレルゲンの検出と除去以外に方法がなく、病因論に基づく治療法の確立が急務となっている。本研究では、アトピー性皮膚炎の Th2 細胞を中心とする免疫学的炎症反応の解析と新しい治療法の開発を目的とする。アレルゲン特異的 IgE トランスジェニックマウスの解析から、アレルゲン特異的 IgE が即時型、遅発型反応に続いて出現する、炎症反応が長期にわたって持続する第 3 相反応が存在することを世界に先駆けて明らかにしている。この第 3 相反応を解析することによって、アトピー性皮膚炎の難治化機序を明らかにする。また、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 受容体を介するシグナル伝達の重要な転写調節因子である STAT6 機能を制御することによって、また、細胞膜上の lipid raft に変異型 FcεRI 分子を導入発現することによって、アトピー性皮膚炎治療法の開発を行う

B. 研究方法と結果

1. IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症の解析

IgE 遺伝子導入マウスの皮膚反応を検討する課程で、即時型反応、遅発型反応に続いて出現する、長期に持続する第 3 相目の強い皮膚炎症反応が発見された。新たに発見された第 3 相反応は、抗原投与 3—4 日後にピークを示す長期にわたって持続する炎症反応であり、

IgE 受動感作によっても引き起こされることから、アトピー性皮膚炎における炎症の遷延化に関連することが考えられる。第 3 相反応発現機序の実体は明らかにされていないが、第 3 相反応は、IgE 受動感作によって、T 細胞欠損マウス、B 細胞欠損マウス、肥満細胞欠損マウスにおいても検出され、FcεRI 欠損マウスでは検出されないことから、肥満細胞以外の FcεRI 陽性細胞が責任細胞であると考えられる。分担研究者の鳥山は、第 3 相反応の病理組織学的解析、flow cytometry 解析、抗体による細胞除去、細胞移入実験などを行った。細胞移入実験結果から、責任細胞は、リンパ球、肥満細胞、好塩基球、血小板以外の FcεRI 陽性の骨髄由来血球系細胞であり、IgE—肥満細胞を介する反応とは異なる新しい慢性アレルギー炎症誘発機構が存在することを明らかになった。さらに、この慢性アレルギー反応の抑制に IL-4R/STAT6 を介するシグナルが関与していることが明らかとなり、第 3 相反応の抑制を標的とした創薬開発の可能性が示された。

2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制

主任研究者の西岡は、IL-4 受容体のシグナル伝達因子の STAT6 欠損マウスにおいて IgE 受動感作による遅発型反応が抑制されることを見出し、STAT6 のおとり核酸 (STAT6 decoy) を用いてアトピー性皮膚炎の炎症反応の抑制を試みている。IgE 受動感作による遅発反応は、STAT6 decoy の投与によって著明に抑制されることをすでに明らかにしている。今回、STAT6 decoy がアレルゲンの反復投与のよ

て引き起こされるアレルギー炎症反応、ならびに IgE を介する第 3 相反応に対する抑制効果を検討した。アレルゲン反復投与モデルにおける炎症反応に対して、STAT6 decoy は、最終惹起反応前日に投与することによって炎症反応を抑制し、また、第 3 相反応に対しては、惹起反応前に STAT6 decoy で前処理することにより、第 3 相反応の 50~60%を抑制した。抑制された皮膚内の炎症細胞を検討すると、両反応共に、炎症部位内に浸潤する好中球、リンパ球、好酸球、脱顆粒した肥満細胞が著明に減少していた。アレルゲン反復投与による炎症反応と新しく発見された慢性アレルギー炎症である第 3 相反応も共に STAT6 decoy によって抑制できることが明らかとなり、STAT6 のおとり核酸が IgE を介するアレルギー炎症反応の治療薬となる可能性が示された。今後、ヒトアレルギー炎症への応用に向かったの検討を開始する必要がある。

3. Syk リン酸化を指標とした Lipid raft 機能の解析と治療への応用

細胞膜上の受容体や抗原を含む細胞膜関連蛋白質は、界面活性剤によっても分解されない細胞膜構成領域 (lipid raft) に局在することが明らかになっている。IgE を結合する FcεRI も同様で、細胞膜上を自由に移動しているが、IgE と抗原のクロスリンクによって lipid raft 内に移動する。分担研究者の片山は、lipid raft の分解あるいはこの領域での dominant negative FcεRI の発現によるアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を試みている。健康人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a(+) FcεRI(+) 細胞を効率よく回

収する方法を確立し、この細胞に IgE あるいは IgE+抗原の添加し、FcεRI 下流で活性化される Syk のリン酸化を指標とすることにより、lipid raft 機能を解析することが出来ることを示し、治療法開発のためのツールとなる実験系を開発した。今後、この実験系を利用して、種々の薬物の投与、遺伝子導入などを行い、治療薬の開発を行っていく予定である。

C. 研究結果

今年度の研究成果として、①慢性アレルギー反応の新しい反応、すなわち、IgE を介する第 3 相反応の責任細胞についての詳細な情報が得られたこと、②アレルゲン反復投与によるアレルギー炎症ならびに第 3 相反応が STAT6 のおとり核酸によって抑制されること、さらに、③lipid raft 調節による創薬開発のための研究システムとして Syk リン酸化を指標とする実験系を確立したことは、アトピー性皮膚炎の新しい治療法を開発する上で非常に重要な成果が得られたものと考えられる。第 3 相反応の責任細胞についての情報は得られたが、未だ責任細胞を同定分離するに至っていないこと、STAT6 おとり核酸はヒトアトピー性皮膚炎にどのように適応できるかの検討が必要であること、また、lipid raft 機能の測定法が開発によって、lipid raft 機能を調節する薬物の検索、あるいは dominant negative 遺伝子の導入による抗炎症効果の検定が必要であることなど、今後さらに継続して検討を加える予定である。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介する第3相反応の役割が考えられ、その責任細胞が T 細胞、B 細胞、肥満細胞、ランゲルハンス細胞とも異なる骨髄細胞であることから、さらに責任細胞の同定分離を行い、責任細胞の機能を検討することにより、アトピー性皮膚炎の難治化機序を明らかにできる可能性を示唆した。STAT6 デコイがアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症モデルであるハプテン繰り返し塗布による炎症反応のみでなく、第3相反応も抑制できる可能性が示し、STAT6 デコイを用いた遺伝子治療のヒトへの応用の可能性が出てきた。Lipid raft を利用した遺伝子治療の開発は、まだ端緒についた所であるが、dominant negative Fc ϵ RI 導入による遺伝子治療の基礎が固まりつつあり、今後の進展が期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

分担研究者報告を参照。

G. 知的所有権の所得状況

分担研究者報告を参照。

II 平成 15 年度分担研究報告書

STAT6 Decoy ODN を用いた接触過敏反応および抗原特異的 IgE 誘導性第 3 相耳介腫脹反応の発症機序の解析と抑制

分担研究者	西岡 清	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・教授
研究協力者	横関博雄	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・助教授
	鷺見浩史	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生
	呉 明花	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生
	金井康真	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生

研究要旨 重症アトピー性皮膚炎の皮膚病変の形成に抗原特異的 IgE 抗体が重要な役割を果たすと考えられている。また、アトピー性皮膚炎の増悪因子として種々の外用剤などによる接触皮膚炎が問題となっている。すでに、抗原特異的 IgE 誘導性遅発型反応で STAT6 が重要な役割を果たすこと、また接触過敏症の誘導においても STAT6 が重要な役割を果たすことについて明らかにしている。前回の班会議では、STAT6 欠損マウスと Wild Type (WT: C57BL/6) マウスの腹部に 5%TNCB を塗布後、1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応）を誘導し比較検討した結果、両者とも経時的な耳介腫脹反応は同様の経過をたどったが、欠損マウスでは WT マウスに比べ耳介の腫脹が明らかに減弱していたことを報告した。今回、STAT6 Decoy ODN を用いて、耳介の惹起後の腫脹反応について有用性を検討した。その結果、STAT6 Decoy ODN 投与群では明らかに Scrambled decoy ODN 投与群、PBS 投与群に比べ耳介腫脹反応が抑制されていた。組織学的には好酸球、リンパ球、脱顆粒した肥満細胞の浸潤数が減少していた。惹起部皮膚のサイトカイン量を ELISA で測定した。その結果、IL-4, IL-6, Eotaxin が STAT6 decoy ODN 投与群で抑制されていた。

さらに、TNP 特異的 IgE 遺伝子導入マウスの耳介皮内に TNP-OVA を皮下投与し惹起後 2 4 時間後の遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応のみならず、さらに 3～4 日目に出現する第 3 相の耳介腫脹反応も STAT6 Decoy ODN 皮下投与により耳介腫脹反応が抑制された。

A. 研究目的

前回の班会議では、STAT6 欠損マウスと Wild Type (WT: C57BL/6) マウスの腹部に

5%TNCB を塗布後、1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応）を誘導し比較検討した結果、両者とも経時的

な耳介腫脹反応は同様の経過をたどったが、欠損マウスでは WT マウスに比べ耳介の腫脹が明らかに減弱していたことを報告した。今回、STAT6 Decoy ODN を用いて、急性、慢性接触皮膚炎の耳介惹起後の腫脹反応について経時的に比較検討し STAT6 の役割を解析する。

また最近、TNP 抗原特異的 IgE 遺伝子導入マウスにて、耳介皮内に TNP-OVA を投与すると抗原特異的即時型反応（第 1 相）ならびに遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応のみならず、さらに 3～4 日目より第 1 相、第 2 相を凌ぐ第 3 相の耳介腫脹反応を示すことが明らかにされている。このモデルマウスを用いて STAT6 Decoy ODN の有用性を検討。STAT6 decoy ODN 投与群では Scrambled decoy ODN, PBS 皮下投与群に比較して第 3 相耳介腫脹反応は有意に抑制された。

B. 研究方法

BALB/c マウスの腹部に 5%TNCB を塗布した 4 日後に、耳介に 1%TNCB を塗布して 1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応:Acute CHS）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応:Chronic CHS）を誘導し惹起前日に、0.2mM, 2mM, 20mMSTAT6 Decoy ODN（おとり型核酸医薬）、Scrambled Decoy を耳介の皮下に投与して、耳介の惹起後の腫脹反応について経時的に比較検討し STAT6 の役割を解析した。他のハプテン（DNFB, Oxazolone）により誘導された CHS においても STAT6Decoy ODN の効果を判定した。

一方、TNP 抗原特異的 IgE 誘導性 3 相反応は TNP 特異的 IgE 導入マウス(鳥山教授より供与)の耳介に STAT6 Decoy ODN, scrambled

decoy ODN, PBS を皮内注射した。24 時間後に 10 μ g/ear の TNP-OVA を耳介に皮内注射にて惹起反応を誘導。

C. 研究結果

健康人およびアトピー性皮膚炎患者 PBMC から IL-4, GM-CSF およびダニ抗原刺激を加える事で CD1a(+) Fc ϵ R1(+)細胞を効率良く得る事ができた。これに対し IgE、および IgE と抗原同時添加群で Fc ϵ R1 の下流で活性化される Syk のリン酸化をみたところ Tyr323 がクロスリンクに伴いリン酸化しており、これら樹状細胞には機能的 Fc ϵ R1 の発現が確認できた。さらに抗原・抗体刺激に伴い、Triton-X100 に不溶性の分画に Fc ϵ R1 が検出されることから、Fc ϵ R1 は刺激によって lipid raft に局在していると考えられた。さらにこれら樹状細胞に抗原・抗体刺激を加えると TARC の mRNA 発現増強が認められるが、このことは MBCD の濃度依存的に抑制された。さらにコレステロール軟膏を実際アトピー性皮膚炎罹患者に外用していただくとして外用部は対照群と比し著しい改善が認められた。これらの結果は lipid raft を標的とした治療がアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患を改善させうる十分な潜在能力をもつ事を示唆していた。

C.研究結果

20mMSTAT6 Decoy ODN を投与した群では Scrambled Decoy 投与群に比べ、明らかに acute CHS, Chronic CHS における惹起後の耳介腫脹反応が減弱していた。また、他のハプテンにより誘導された acute CHS, chronic CHS ともに STAT6 decoy ODN は有効であった。

惹起した耳介を病理組織学的に検討したところ、急性、慢性接触過敏反応ともに STAT6 Decoy 投与群は Scrambled Decoy 投与群と比較して浮腫性反応のみならず、好酸球、肥満細胞、脱顆粒肥満細胞数が有意に減少していた。さらに、耳介組織中のサイトカイン量を ELISA で解析した結果 STAT6 Decoy 投与群の惹起皮膚では IL-4、IL-6、eotaxin の蛋白量が減少していたが、IFN- γ の蛋白量については有意差がなかった。

また、TNP-IgE 遺伝子導入マウスに誘導した第3相反応では、STAT6 DecoyODN 投与群は陽性対照群、Scrambled Decoy 投与群と比較して耳介腫脹反応が 50~60%抑制され、病理組織学的に、浸潤する好酸球、好中球、肥満細胞、脱顆粒した肥満細胞、リンパ球の数が減少した。

D. 考察

これらのことより、STAT6 Decoy を投与することにより惹起部の皮膚局所のサイトカイン、ケモカインの誘導を制御することにより急性、慢性接触過敏反応及び抗原特異的 IgE 誘導性第3相反応を抑制することが明らかになった。

E. 結語

慢性湿疹、アトピー性皮膚炎に STAT6 Decoy による遺伝子治療法の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wu M.-H., Yokozeki H., Takagawa, S., Yamamoto T., Satoh T., Kaneda F. and

Nishioka K., Hepatocyte Growth Factor both Prevents and Ameliorates the Symptoms of Dermal Sclerosis in a Mouse Model of Scleroderma, *Gene Therapy*, 11, 170-180, 2004

2) Yokozeki H., Wu M.-H., Miyazaki Y., Sumi K., Katayama I., Takeda K., Akira S., Nishioka K., Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice., *Clin. Exp. Immunol.*, 132, 385-392, 2003

3) Satoh T., Kaneko M., Wu M.-H., Yokozeki H., Nishioka K.: Contribution of selectin ligands to eosinophil recruitment into the skin of patients with atopic dermatitis., *Eur. J. Immunol.*, 32, 1274-1281, 2002

4) Awad S., Yokozeki H., Miyazaki Y., Igawa K., Minatohara K., Satoh T., Nishioka K.: Glucocorticoids induced the production and gene expression of IL-1 α through AP-1 and partially NF- κ B activation in murine epidermal cells, *J. Med. Dent. Sci.*, 49, 27-35, 2002

5) Yokozeki H, Watanabe K, Igawa K, Miyazaki Y, Katayama I, Nishioka K: $\gamma\delta$ T cells assist $\alpha\beta$ T cells in the adoptive transfer of contact hypersensitivity to para-phenylenediamine. *Clin Exp Immunol*, 125:351-359, 2001

6) Katayama I., Bae S-J, Hamasaki Y, Igawa K, Miyazaki Y, Yokozeki H, Nishioka K: Stress Respinse, Tachykinin, and Cutaneous Inflammation. (Symposium Proceeding6), *J. Invest. Dermatol.*, 81-86, 2001

7) 横関博雄、呉 明花：STAT6 欠損マウス

を用いた IgE 関与遅発型反応の発症機序の
解析、臨床免疫,36(4):547-551, 2001

8) 横関博雄：遅延型アレルギーにおける
STAT6 の関与臨床免疫,36 (2) : 260-
265,2001

9) 横関博雄：アレルギー性接触皮膚炎の
effector 細胞、アレルギー科、13:219-232、
2002

10) 横関博雄:アトピー性皮膚炎：病態に即し
た診断へのアプローチ、Modern
Physician,4,417-420, 2002

11)横関博雄: 免疫疾患 アトピー性皮膚炎、
医学のあゆみ、512-515. Ver. 2, 2002

G.知的所有権の所得状況

なし

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

難治化病態の解明と治療法の開発

「IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機構」

分担研究者 烏山 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 高 IgE 血症を呈する抗原特異的 IgE トランスジェニックマウスに多価の抗原（TNP-OVA）を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（第1相と第2相）に引き続いて、強い細胞浸潤をともなう遅延型の皮膚腫脹が誘導された。この第3相皮膚腫脹は IgE/FcεRI を介する反応で、しかもマスト細胞非依存的かつ T細胞非依存的な遅延型アレルギー炎症反応である。FcεRI 欠損マウスへの正常細胞移入実験結果から、皮膚を構成するケラチノサイトや線維芽細胞などではなく、骨髄由来血球系細胞（マスト細胞、好塩基球、リンパ球、血小板を除く）がその発症に深く関与していることが判明し、これまでに知られていない全く新しい慢性アレルギー炎症誘発機構が存在することが強く示唆された。さらに、この慢性アレルギー炎症反応の制御には IL-4R/STAT6 を介するシグナル伝達に関与していることが明らかとなった。第3相皮膚腫脹の責任細胞ならびに液性因子の同定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。

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。第3相耳介腫脹を呈さない FcεRI 欠損マウスに放射線照射したのちに、正常マウス骨髓細胞を移入し、第3相耳介腫脹出現の有無を解析した。

(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

FcεRI を発現できない Fcγ鎖ノックアウトマウスでは第3相耳介腫脹は出現しないので、このマウスをレシピエントとして第3相耳介腫脹の責任細胞の同定を進めた。放射線照射した FcεRI 欠損マウスに正常マウスの骨髓細胞を移入して血球細胞を再構築したところ、第3相耳介腫脹が誘導された。一方、FcεRI 欠損マウス由来の骨髓細胞の移入では第3相耳介腫脹は誘導されなかった。さらに、責任細胞を絞り込むために、正常マウス骨髓細胞から *in vitro* でマスト細胞ならびに好塩基球を分化させ FcεRI 欠損マウスに移入した。いずれの場合も第3相耳介腫脹は誘導されなかった。また、正常マウスの血中から血小板を単離して FcεRI 欠損マウスに移入したが、第3相耳介腫脹は誘導されなかった。

次に、細胞浸潤に寄与する液性因子を明らかにするために、IL-1 欠損、IL-6 欠損、IL-18 欠損、TNFα 欠損、IL-5R 欠損、CCR5 欠損、INFγ 欠損マウスなどの変異マウスを解析し

たところ、いずれのマウスにおいても正常マウスと同程度の第3相耳介腫脹が誘導された。興味あることに、STAT6 欠損マウスならびに IL-4Rα 欠損マウスでは正常マウスに比べより強い耳介腫脹が認められた。

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/FcεRI を介する反応で、しかもマスト細胞非依存的かつT細胞非依存的な遅延型免疫応答である。FcεRI 欠損マウスへの正常細胞移入実験結果から、皮膚を構成するケラチノサイトや線維芽細胞などではなく、骨髓由来血球系細胞がその発症に深く関与していることが判明した。個々の細胞系譜の移入実験ならびに各種ノックアウトマウスの解析から、マスト細胞、好塩基球、血小板ならびにリンパ球の関与は否定的である。以上の結果は、既成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。

代表的な炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、TNFα 欠損マウスにおいても正常マウスと同程度の第3相耳介腫脹が誘導されたが、STAT6 欠損マウスならびに IL-4Rα 欠損マウスでは正常マウスに比べより強い耳介腫脹が認められたことから、この慢性アレルギー炎症反応の制御には IL-4R/STAT6 を介するシグナル伝達に関与していると考えられる。

E. 結論

IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症反応が存在することが明らかとなった。この反応にはマスト細胞、好塩基球、リンパ球は必須ではなく、これまで知られていないユニークな慢性アレルギー炎症誘発機構の存在が強く示唆され、新たな創薬のターゲットの同定が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

Maezawa, Y., Nakajima, H., Kumano, K., Kubo, S., Karasuyama, H., Iwamoto, I.: Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 131 Suppl 1: 2-6, 2003.

2. 学会発表

鳥山一：IgE トランスジェニックマウスにおける遅延型皮膚アレルギー炎症第 15 回日本アレルギー学会春期臨床大会 2003, 5.12. 横浜

向井香織、鳥山 一他：アレルギー疾患モ

デルマウスを用いた慢性アレルギー炎症誘発機構の解析 第33回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12.8-10 福岡

久保田俊之、鳥山 一他：高親和性 IgE 受容体 FcεRI の発現調節におけるα鎖膜直上領域の役割 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12.8-10 福岡

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

「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10-3233

厚生労働科学研究費助成金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

Lipid raft を標的とした新しいアレルギー性疾患治療戦略の検討

分担研究者 片山 一郎 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

研究協力者 室田浩之 長崎大皮膚科

Bae SangJae 長崎大皮膚科

堀内 保宏 長崎大皮膚科

研究要旨 アトピー性皮膚炎においては皮膚バリア機能の障害や IgE 抗体の過剰産生などの免疫異常がその発症、伸展に大きな関与をしている。アレルギー性炎症反応に強く関与する IgE 抗体の上昇に際し、IgE 抗体による肥満細胞、好塩基球あるいは樹状細胞上に存在する高親和性 IgE レセプター (FcεR1) のクロスリンクが即時型・遅発型のアレルギー反応を引き起こすと考えられている。FcεR1 を標的とするヒト型抗体の臨床応用が進められているが副作用や医療コストが大きな問題として残されており、作用点が明解かつ安全で確実にしかも選択的にアレルギー性炎症を抑制できる治療戦略の確立が望まれている。われわれは FcεR1 が細胞膜の一区画である lipid raft に局在しないと下流のシグナル伝達を開始できないという挙動に着目し、lipid raft を不活化あるいは FcεR1 の dominant negative form を lipid raft に発現させる事で IgE を介したアレルギー性疾患の増悪を防げるのではないかと考えた。今回アレルギー炎症増幅機序における lipid raft の関与を検討するとともに、lipid raft を標的とした治療薬の開発のため、ヒト末梢血より樹立した樹状細胞における FcεR1 の局在と下流の遺伝子発現が lipid raft を失活させる試薬でどのような影響を受けるか検討したので報告させていただく。

A. 研究目的

FcεR1 を介するシグナルを lipid raft の機能を失活させる事で阻害できるようなアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患に対する安全でコストパフォーマンスの高い治療戦略を開発する事を目的とする。樹状細胞を用いて検討を行い、外用剤としての適応を念頭においている。

B. 研究方法

同意の得られた健常人およびアトピー性皮膚炎罹患患者（ダニ特異的 IgE が class IV 以上を選出）の末梢血単核球（PBMC）を IL-4 および GM-CSF 存在下で 4 日間培養する事で樹状細胞を樹立。樹状細胞分画はフローサイトメトリーを用いて FcεR1(+)CD1a(+)細胞

を検出する事で確認した。抗原・抗体刺激には患者血清とリコンビナントダニ抗原を用いた。Fc ϵ R1 の活性を下流の Syk のリン酸化で、局在を Triton-X100 insolubility assay にて検討した。lipid raft を失活させる cholesterol 脱失試薬として methyl-beta-cyclodextrin (MBCD) を用い、抗原抗体刺激に伴う TARC の mRNA の発現を RT-PCR で検討し、この試薬に対する影響をみた。さらに lipid raft を不安定にするとして知られるコレステロール負荷による影響を見るために、すでに魚鱗癬に適応が検討されていたコレステロール軟膏 (10% w/w) をアトピー性皮膚炎罹患者に同意を得た上で外用していただいた。二重盲検比較試験の対照として溶媒であるワセリンを用いた。

C. 研究結果

健康人およびアトピー性皮膚炎患者 PBMC から IL-4、GM-CSF およびダニ抗原刺激を加える事で CD1a(+) Fc ϵ R1(+)細胞を効率良く得る事ができた。これに対し IgE、および IgE と抗原同時添加群で Fc ϵ R1 の下流で活性化される Syk のリン酸化をみたところ Tyr323 がクロスリンクに伴いリン酸化しており、これら樹状細胞には機能的 Fc ϵ R1 の発現が確認できた。さらに抗原・抗体刺激に伴い、Triton-X100 に不溶性の分画に Fc ϵ R1 が検出されることから、Fc ϵ R1 は刺激によって lipid raft に局在していると考えられた。さらにこれら樹状細胞に抗原・抗体刺激を加えると TARC の mRNA 発現増強が認められるが、このことは MBCD の濃度依存的に抑制された。さらにコレステロール軟膏を実際ア

トピー性皮膚炎罹患者に外用していただくと外用部は対照群と比し著しい改善が認められた。これらの結果は lipid raft を標的とした治療がアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患を改善させうる十分な潜在能力をもつ事を示唆していた。

D. 考察

これまで Fc ϵ R1 の生理的機能はラットの好塩基細胞株を用いて解析されてきた。Fc ϵ R1 と lipid raft の関与もこの細胞を用いた系で立証されてきた。ヒトの細胞、中でも樹状細胞における Fc ϵ R1 と lipid raft の関与については知られていなかった。われわれの今回の検討でヒトの樹状細胞においてもその関与を示唆する所見を得ることができた。

近年、アトピー性皮膚炎症状増悪のメカニズムの中に樹状細胞を始めとする抗原提示細胞が重要な役割を担う事が知られてきており、抗原と抗原特異的な IgE の作用によって様々なサイトカイン・ケモカインを産生し、皮膚構成細胞のリモデリングはもとより炎症細胞の炎症の場へのリクルートにも関与するとされている。実際、今回の検討においても樹立した樹状細胞に対する抗原・抗体刺激によって単球の遊走を促すケモカインである TARC の mRNA の発現誘導が認められた。しかも、この誘導は lipid raft を MBCD によって失活させることで抑制できる。この事は lipid raft を失活させる事で樹状細胞が抗原・抗体特異的活性を受け、さらなる炎症を引き起こそうとするカスケードを抑制できる可能性を示唆していた。

一方でコレステロールの負荷は lipid raft の安定性を損なわせる方法の一つとして用いられる。一方で表皮細胞は分化とともにセラミドなどのスフィンゴリピッドと同様にコレステロールの含有量が増加するといわれている。しかしアトピー性皮膚炎皮疹部では角質層におけるコレステロール含有量が低下しているとする報告もある。このことは従来魚鱗癬などに応用されていたコレステロール軟膏がアトピー性皮膚炎の症状を改善できる可能性を想像させる。実際、われわれはコレステロール軟膏をアトピー性皮膚炎罹患者に外用していただき、対照に比し皮疹の著しい改善を認めた。

Lipid raft を標的とした治療はアトピー性皮膚炎の全く新しい治療戦略を提供していると考えられる。今後はいかに $Fc\epsilon R1$ 特異的な反応を抑止できるかが重要な問題であり、最終的には lipid raft に常に局在するような $Fc\epsilon R1$ dominant negative form の構築を行っていきたいと考えている。

E. 結語

樹状細胞における Lipid raft を標的とした治療戦略はアトピー性皮膚炎治療の全く新しい視野を提供するとともに、症状改善および増悪の抑止に十分な潜在能力を持つものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 片山一朗: 難治性アトピー性皮膚炎の治療法. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨

床. 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp239-241, 2003

- 2) 室田浩之、Bae SangJae、堀内保宏、片山一朗: 線維芽細胞における TLR2,4 の発現とその意義. 臨床免疫, 40(3): 272-275, 2003
- 3) Murota H, Hamasaki Y, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Matsuyama T: Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. Arthritis Rheumatism 48(4): 1117-1125, 2003
- 4) 片山一朗: アトピー性皮膚炎の悪化因子と患者指導. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床. 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp236-238, 2003
- 5) Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Katayama I, Nishimoto K: The role of keratinocyte on defense system in dermatophyton infection. Proceedings of the 12th Korean-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2002 (Nov 8-9, 2001 Tokyo, Japan)
- 6) Eishi K, Lee JB, Bae SJ, Takenaka M, Katayama I: Impaired sweating function in adult atopic dermatitis: results of the quantitative sudomotor axon reflex test. Br J Dermatol, 147: 683-688, 2002
- 7) 片山一朗: 【臨床皮膚科 最近のトピックス Clinical Dermatology 2002】 皮膚疾患の病態 アトピー性皮膚炎とりモデリング. 臨床皮膚科, 56(5 増): 39-42, 2002
- 8) Katayama I, Takenaka M, Yamamoto K: Advisory guidelines for the avoidance of exacerbating factors of atopic dermatitis in

daily-life. JMAJ (Jpn Med Assoc J), 45(11):
466-471, 2002

G.知的所有権の所得状況

なし

Ⅲ 研究成果の刊行一覧