

厚生労働科学研究研究費補助金  
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

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

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 小川 秀興

平成16（2004）年3月

I. 総括研究報告	
皮膚・気道・鼻粘膜局所におけるresidential cell による生体防御機構のアレルギー疾患における役割の解析に関する研究	-----3
小川秀興	
II. 分担研究報告	
1. ダニ抗原タンパク：Derf1のプロテアーゼ活性による表皮バリア機能の破壊作用について	-----8
小川秀興	
2. 皮膚及び粘膜におけるバリア機構とダニ抗原等の透過性についての解析に関する研究	-----10
奥田峰広	
3. 皮膚血管内皮細胞機能とアレルギーに関する研究に関する研究	-----13
坪井良治	
4. ヒト皮膚角化細胞ならびに気道上皮細胞における TWEAK/Fn14 分子の役割に関する研究	-----15
中尾篤人	
5. 鼻粘膜上皮におけるアレルギー性サイトカイン及びその他の修飾因子による反応性の解析に関する研究	-----17
花澤豊行	
6. 黄色ブドウ球菌による皮膚局所におけるマスト細胞の活性化におけるMD-2分子の役割に関する研究	-----19
牛尾博子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----22

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

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

主任研究者 小川秀興

順天堂大学・学長・医学部皮膚科学講座・教授

研究要旨：

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

本研究によってアレルギー疾患における臓器／組織特異的な病態に対する理解が深まりアレルギー疾患に対する新規治療法の開発につながることを期待される。

本年度の研究によって以下のような、いくつかの重要な成果が得られた。

- 1) ダニ抗原のプロテアーゼ活性が皮膚バリア機能（皮膚角化細胞の水分保持機能）を障害することを見いだした。
- 2) リポフラビンを用いた経皮浸透量を指標とする非常に簡便な皮膚バリア機能測定法を新規に開発し、ヒト臨床検体だけでなく、動物モデルにおいても皮膚バリア機能障害の測定に有用であることを確認した。
- 3) 黄色ブドウ球菌由来のペプチドグリカンによる皮膚局所肥満細胞のToll様受容体による活性化には、グラム陰性菌による活性化と異なりMD2分子は必要でないことがわかった。
- 4) 半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射は皮膚血管神経系を介してアトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応を抑制することを見いだした。
- 5) TNFファミリーのメンバーであるTWEAK分子が皮膚角化細胞や気道上皮細胞に作用し、炎症性サイトカインの産生を促し、アレルギー疾患に関与する可能性を見いだした。
- 6) 気道における酸化ストレスが肺上皮細胞におけるサイトカイン産生能を変化させることを明らかにした。

これらの結果は、皮膚・気道・鼻粘膜局所における上記のような生体防御機構／生理的機構がアレルギー疾患の病態形成において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものでありアレルギー疾患の病態の理解や新規治療法の開発にとって新たな洞察を加えるものである。

分担研究者 奥田峰広  
花王株式会社  
安全性評価研究センター  
主任研究者  
坪井良治  
東京医科大学皮膚科学講座教授  
中尾篤人  
山梨大学医学部免疫学講座教授  
花澤豊行  
千葉大学大学院医学研究院  
頭頸部腫瘍学講師  
牛尾博子  
順天堂大学医学部アトピー疾患  
研究センター講師

#### A. 研究目的

外界に接する最前線である皮膚、気道、鼻粘膜局所においては、白血球等の免疫系細胞による全身的な生体防御機構の他に、それぞれの組織に固有な residential cell による生体防御システムが備わっている。アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症で認められる皮膚気道鼻粘膜における臓器組織特異的な病態の形成には全身的な免疫系のみならず、そのようなそれぞれの組織に固有な residential cell による局所的な生体防御系の機能不全が、密接に関与していると考えられる。

以上の考えにもとづいて、我々は、本研究で、皮膚、気道、鼻粘膜局所の residential cell による生体防御機構（あるいはその生理的機能）が、アレルギー疾患の病態において果たす役割について明らかにする。本研究の概要は 1) 皮膚角化細胞の担う表皮バリア機能がアトピー性皮膚炎の病態に果たす役割の解析（小川、奥田） 2) 気道上

皮細胞、鼻粘膜上皮細胞、皮膚角化細胞などの上皮系細胞がアレルギー疾患の病態に果たす役割の解析（小川、中尾、花沢） 3) 局所自律神経系（神経伝達分子）がアレルギー疾患の病態に果たす役割の解析（坪井） 4) 皮膚/気道/鼻粘膜に存在する肥満細胞がアレルギー疾患に果たす役割の解析（小川、牛尾）に大別される。

#### B. 方法 C. 結果 D. 考察 E. 結論

1) 主任研究者小川は、分担研究者奥田らと共同で、アトピー性皮膚炎の成因/悪化原因の1つである皮膚における表皮バリア機能の障害とアレルギー反応の主要な原因抗原の1つであるダニ抗原との関係について、ダニ抗原タンパク Derf1 の持つプロテアーゼ活性に着目し検討した。彼等は、ヌードマウスの背部皮膚に Derf1 を密封塗布した後、経皮水分喪失量 (TEWL) 及び角質層のリボフラビンの吸収を測定した。その結果、Derf1 塗布後に TEWL 及び角質層のリボフラビンの吸収は、亢進しており、かつプロテアーゼ活性阻害剤を同時に塗布すると変化が認められなくなることから、Derf1 の持つプロテアーゼ活性が表皮バリア機能を障害することが示唆された。よってダニ抗原が多量に存在する環境においては角質層に付着したダニ抗原により表皮バリア機能が破壊され、特にアトピー性皮膚炎の患者においては症状の悪化に関与する可能性が示唆された。

2) 分担研究者奥田は、侵襲のより少ない手法として、すでにビタミンB<sub>2</sub>であるリボフラビンの経皮吸収量を元に皮膚バリア機能を測定する手法を、昨年度の本研究にて開発し報告した。この手法は、リボフラビンを用い

ることで放射性標識化合物に匹敵する検出感度が得られ、かつ測定対象への影響が少ない利点がある。本年度は小川らと共同で、この手法の応用検討をヒトにおいて重ねることにより測定法の正確性をさらに詳細に検討した。またダニ抗原等を経皮的に投与した動物モデルにおける角層バリア機能の障害を、この手法を用いて測定するとともに、経皮曝露によるI型およびIV型アレルギー反応の誘導についても検討を行った。誘発乾燥性皮膚炎および乾燥性皮膚疹、アトピー性皮膚炎患者の無疹部にリポフラビン水溶液を貼付し、テープストリッピング法を用いて回収した角層中のリポフラビン量を定量したところ、従来の皮膚バリア機能測定法の1つである経表皮水分蒸散量(TEWL)と比較して、両者に相関を認めた。またブタおよびマウス等の皮膚にダニ抗原溶液を単回もしくは累積塗布し、塗布後のバリア機能の経時変化を測定し、さらには経皮曝露によるI型およびIV型アレルギー反応の誘導を行ったところ、ダニ抗原溶液を塗布することにより、ダニ抗原が角層内に浸透する事が確認され、また経時的に皮膚バリア機能が低下することが確認できた。また、経皮曝露によりアレルギー反応が誘導されることが確認できた。以上より、リポフラビンによる表皮バリア機能測定法は、比較的簡便で、TEWL測定ほど測定環境の影響を受けないため臨床応用に有用な手法であることが確認できた。またダニ抗原の自己浸透性により健常皮膚においても、皮膚バリア機能の障害を誘導することができることが確認でき、アトピー性皮膚炎発症および増悪の一因である可能性が示唆された。

3) 分担研究者中尾は、主任研究者小川、分

担研究者坪井らと共同で、TNFファミリーに属する分子として新規に同定されたTWEAK(TNF-like weak inducer of apoptosis)分子のアトピー性皮膚炎や気管支喘息等のアレルギー性疾患における役割について検討した。FACSscanやELISA法を用いて、培養ヒト皮膚角化細胞やヒト気管支上皮細胞がTWEAK受容体の1つであるFn14を発現し、かつTWEAK刺激によってそれぞれRANTESならびにIL-8/GM-CSFが産生することを見いだした。さらにこれらの産生にはI $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化が重要であることをI $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化阻害剤を用いて証明した。以上から、アレルギー性疾患の病態形成においてはIL-4/IL-5/IL-13などのいわゆるTh2型T細胞の産生するTh2型サイトカインの他に、TNFファミリーの1つであるTWEAKがRANTESやGM-CSFの産生を介して関与している可能性が示唆された。

4) 分担研究者坪井は、昨年度の本研究で、アトピー性皮膚炎患者の皮膚部では健常人に比較してノルアドレナリン(NA)濃度が高いこと、*in vitro*の実験系でNAが皮膚微小血管内皮細胞に作用して起炎性サイトカインの産生を増加させることを報告した。本年度は*in vivo*の実験として、アトピー性皮膚炎患者に対して、半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射を実施し、アセチルコリン、メサコリン、vasoactive intestinal polypeptide(VIP)の皮膚反応に対する影響を検討した。アトピー性皮膚炎患者22例においてGa-Al-As半導体レーザー(メディレーザーソフト1000<sup>®</sup>)を連続波で20分間、右星状神経節近傍に照射した後、皮膚反応をアセチルコリンないしメサコリンを右前腕に皮内注射して15

分後の遅延蒼白反応を測定し、VIPについては注射15分後の紅斑・膨疹面積を測定した。その結果、入院患者5回/週照射群(8名)は、計10回照射後のアセチルコリンによる遅延蒼白反応が8例中6例で、メサコリンによる皮膚反応も8例中3例で蒼白斑の面積が減少傾向を示した。以上から、半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射は、皮膚血管神経系を介してアトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応を抑制する可能性が示唆された。

5) 分担研究者牛尾らは、小川らと共同で、MD-2分子が、マスト細胞の黄色ブドウ球菌に対する皮膚局所における活性化において果たす役割について検討した。昨年度の本研究で、マスト細胞がToll-like receptor2(TLR2)分子がブドウ球菌由来のペプチドグリカン(PGN)の認識に重要であり、マスト細胞の黄色ブドウ球菌に対する皮膚局所における活性化に重要であることを彼等は報告した。今年度はさらにその研究を進め、TLR4の細胞外部分に結合して、TLR4リガンドの認識やTLR4分子の細胞外への発現に重要な役割をはたす分子であるMD-2分子が、マスト細胞活性化に果たす役割について解析した。MD-2欠損マウス、TLR4欠損マウスおよび野生型マウスの骨髄より培養マスト細胞を確立し、マスト細胞欠損WBB6F<sub>1</sub>-W/W<sup>v</sup>マウスに細胞移入し、急性腹膜炎、PGNによる急性皮膚反応モデルを導入し、それぞれのマウスにおける反応を比較した。その結果、マスト細胞のMD-2の欠損はTLR2リガンドであるPGNに対する反応には影響を及ぼさなかったが、急性腹膜炎に対するマスト細胞による防御応答を消失させることが明らかになった。以上のことか

ら、マスト細胞のブドウ球菌によるTLR2の活性化には、MD-2は全く関係しないが、腹膜炎の防御にとっては重要な分子であることが明らかになった。

6) 分担研究者花沢は、気道におけるNOを中心としたoxidative stressのアレルギー性炎症への関与に着目した。鼻腔および気管においてはアレルギー炎症により上皮細胞から一酸化窒素(NO)が産生され、また遊走細胞からはスーパーオキシド(O<sup>2-</sup>)を含むreactive oxygen species(ROS)が放出されている。昨年度の研究から鼻粘膜上皮においてはアレルギー炎症によりNOとスーパーオキシドが反応し生ずるperoxynitriteにより鼻粘膜上皮内および上皮下にチロシン残基のニトロ化が生じてnitrotyrosineが生ずることを確認した。そこで本年度は、このニトロ化により気道上皮がどのような機能変化が生ずるかをサイトカイン産生能に着目し肺上皮細胞(A549)を用いて解析した。培養肺上皮細胞A549をIL-1βで刺激し、IL-8の産生能をperoxynitriteの供与薬であるSIN-1の同時投与の有無により比較検討し、培養細胞中のhistone deacetylase(HDAC)の酵素活性とチロシン残基のニトロ化の割合について検討した結果、培養上清中に産生されるIL-8濃度は、IL-1βにより増大するが、SIN-1のみではその産生能には変化がなかった。しかし、IL-1βとSIN-1の双方の存在下ではその産生能は増強された。また、HDACの活性は、IL-1βの存在下に増強されるが、SIN-1の追加による酵素活性の変化はみとめられなかったが、HDAC内に占めるチロシン残基のニトロ化の割合は増大していた。以上から、oxidative stressは、気道(肺)上皮細胞のサイトカイン産生

能を変化させることが示唆された。その機序については詳細は不明であるが、HDAC活性が変化せずにHDAC中に占めるニトロ化されたチロシン残基の割合は増加していることから、HDAC中のチロシン残基のニトロ化によりサイトカイン産生が何らかの理由で増強されたことが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Jin L, Nakao A, Nakayama M, Yamaguchi N, Kojima Y, Nakano N, Tsuboi R, Okumura K, Yagita H, Ogawa H: Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* (in press)
- 2) Xu H, Okamoto A, Ichikawa J, Ando T, Tasaka K, Masuyama K, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakao A: TWEAK/Fn14 interaction stimulates human bronchial epithelial cells to produce IL-8 and GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* (in press)
- 3) Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 27;315(1):240-5, 2004
- 4) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors

2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109:1351-1359, 2002

##### 2. 学会発表

- 1) ダニ抗原タンパク: Derf1による表皮バリア機能の破壊作用について: 光石幸市、高井敏朗、中村年伸、小川秀興; 第33回日本免疫学会
- 2) 伊藤友章、加藤雪彦、茂田江理、辻香、斎藤万寿吉、住田治子、磯部環貴、玉城毅、古賀道之、坪井良治: アトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応に対する低出力レーザー星状神経節近傍照射の影響. *日本レーザー医学会誌* 24: 25-29, 2003.
- 3) 伊藤友章、加藤雪彦、茂田江理、辻香、斎藤万寿吉、坪井良治、古賀道之: 低出力レーザー星状神経節近傍照射がアトピー性皮膚炎患者の神経伝達物質皮膚反応に及ぼす影響について. *日皮会誌* 114: 35-41, 2004.
- 4) 牛尾博子: Toll-like receptor とアレルギー、第53回日本アレルギー学会、教育講演、2003年10月(岐阜)
- 5) Ushio, H., Nakao, A., Miyake, K., Okumura, K., Ogawa, H. MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN、第33回日本免疫学会、2003年12月(福岡)

#### H. 知的財産権の出願/登録状況

特になし

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

ダニ抗原タンパク：Derf1のプロテアーゼ活性による  
表皮バリア機能の破壊作用について

主任研究者 小川秀興

順天堂大学学長／医学部皮膚科学講座教授  
／アトピー疾患研究センターセンター長

研究協力者 光石幸市（順天堂大学医学部皮膚科学講座）  
高井敏朗（順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター）  
Hongri Xu、岡本篤司（山梨大学医学部耳鼻科学講座）

研究要旨：

本研究で我々は、ダニ抗原タンパクの1つである Derf1 の持つプロテアーゼ作用が皮膚の表皮の角質層のもつバリア機能に与える影響をインビボにおいて検討した。システイン溶液中に溶解しプロテアーゼ活性を示す Derf1 ならびにシステイン溶液中に溶解させずプロテアーゼ活性を示さない Derf1 をヌードマウスの背部皮膚に密封塗布し経皮水分喪失量（TEWL）及び角質層のリボフラビンの吸収を測定した結果、TEWL 及び角質層のリボフラビンの吸収は、プロテアーゼ活性を示す Derf1 を塗布したときのみ亢進した。この結果は Derf1 の持つプロテアーゼ活性が表皮バリア機能を障害することを初めて示唆し、アトピー性皮膚炎患者の皮膚病態に関与する可能性を示した。今後、プロテアーゼ活性による皮膚バリア機能障害の詳細なメカニズムを解析するとともに、鼻粘膜や気道上皮においても同様の知見が得られるか否かについて検討する予定である。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の成因および悪化原因の1つに皮膚における表皮バリア機能の障害が示唆されている。一方アレルギー反応の原因抗原としてダニ抗原は生活環境上の最も重要な因子とされる。ダニ抗原は表皮から侵入し、皮膚局所においてアレルギー反応を誘導するが今回我々はダニ抗原タンパクの1つである Derf1 の持つシステインプロテアーゼ活性が

皮膚の表皮の角質層のもつバリア機能に与える影響を調べた。

B. 研究方法

システイン溶液中に溶解しプロテアーゼ活性を示す Derf1 ならびにシステイン溶液中に溶解させずプロテアーゼ活性を示さない Derf1 をヌードマウスの背部皮膚に密封塗布し経皮水分喪失量（TEWL）及び角質層のリボ



フラビンの吸収を測定した。

#### C. 結果

TEWL 及び角質層のリボフラビンの吸収は、亢進しており Derf1 の持つプロテアーゼ活性が表皮バリア機能を破壊することが認められた。

#### D. 考察

ダニ抗原が多量に存在する環境においては角質層に付着したダニ抗原によりバリア機能が破壊され、特にアトピー性皮膚炎の患者においては症状の悪化に関与する可能性が示唆された。また、鼻粘膜上皮細胞及び気道上皮細胞においても Derf1 の持つプロテアーゼ活性が上皮細胞の機能に影響を与えるか否か現在検討中である。

#### E. 結論

ダニ抗原タンパクの1つである Derf1 の持つプロテアーゼ作用は、皮膚の表皮の角質層のもつバリア機能を障害させる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1) ダニ抗原タンパク : D e r f 1 による表皮バリア機能の破壊作用について : 光石幸市、高井敏朗、中村年伸、小川秀興 :  
第 3 3 回日本免疫学会

#### H. 知的財産券の出願/登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

皮膚及び粘膜におけるバリア機構とダニ抗原等の透過性についての解析

分担研究者 奥田峰広

花王株式会社 安全性評価研究センター 主任研究員

研究要旨 生体の防御機能である、皮膚粘膜部位のバリア機能をより正確に測定することが、アレルギー反応の個体差、部位差の解明に有用であると考えた。バリア機能の測定法として開発したリポフラビンの角層内浸透を指標としたバリア機能測定法の応用検討を行った。ダニ抗原によるバリア破壊について検討した。

- 1) 誘発乾燥性皮膚炎など様々なバリア機能が低下した皮膚にリポフラビン水溶液を貼付し、テープストリッピング法を用いて回収した角層中のリポフラビン量を定量することで角層バリア破壊の程度を測定した。
- 2) ブタおよびマウス等の皮膚にダニ抗原溶液を単回もしくは累積塗布し、塗布後のバリア機能の経時的变化をリポフラビン法により測定し、ダニ抗原自身が角層のバリア機能を破壊することを確認した。

A. 研究目的

アレルギー反応は皮膚粘膜バリア機構、免疫反応、自律神経反応などの広義の生体防御機構が破綻し、ヒトにとって本来無害であるはずの抗原に対して過剰反応してしまう状態であると考えられる。本研究の目的は、非免疫学的生体防御機構の一部である皮膚、気道、鼻粘膜局所における皮膚粘膜バリア機能が、アレルギー反応において果たす役割を解析することである。同一抗原に暴露されていても、皮膚、気道、鼻粘膜局所それぞれに同様なアレルギー反応が認められるわけではない。この違いの一つとして非免疫学的生体防御機構の一部である皮膚、気道、鼻粘膜局所における皮膚粘膜バリア機能に差があるのではないかと考える。皮膚粘膜バリア機能を正確に測定するための手法としては、放射性標識化合

物を用いた経皮吸収率測定や、非侵襲的手法としての経皮水分蒸散量測定等があるが、適応部位など臨床応用の面で困難な点もある。そこでまず、非侵襲的手法を用いた皮膚粘膜バリア機能の測定法の開発を行い、アレルギー反応の部位差解析を行うこととした。さらにはダニ抗原等の経皮吸収挙動を明らかにすることで非免疫学的生体防御機構の解析を行うこととした。侵襲のより少ない手法として、すでにビタミンB<sub>2</sub>であるリポフラビンの経皮吸収量を元に皮膚バリア機能を測定する手法を開発している。この手法は、リポフラビンを用いることで放射性標識化合物に匹敵する検出感度を利用し、かつ測定対象への影響の少ない測定法である。本年度はその応用検討を重ねることにより測定法の正確性を確保すると共に皮膚以外の気道、鼻粘膜への応用

の可能性を検討し、より有用な皮膚粘膜バリア機能の測定法の開発を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

- ①バリア機能測定； リボフラビン（和光純薬製、特級）は $30\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように蒸留水で希釈したものをを用いた。脱脂綿にリボフラビン溶液を含浸させたものを皮膚に接触させ、角層中に浸透したリボフラビンをセロハンテープ（ニチバン製）により角層ごと採取した。このテープから1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム、和光純薬製）によりリボフラビンを再抽出し、励起波長 $483\text{nm}$ 、測定波長 $526\text{nm}$ で測定した。
- ②バリア破壊モデル； 5% SDS溶液を用いて、一定時間皮膚を処理することでバリア破壊モデルとした。
- ③皮膚シート； ブタ皮膚は小型ヘアレス種であるユカタンマイクロブタの凍結保存された皮膚を購入して用いた。皮膚表面に付着している汚れなどを除くためにヘキサソ（和光純薬製、特級）を含ませた脱脂綿で軽くふき取りを行った。また、脂肪組織等はメスにより除去した。調整した皮膚シートを拡散セルに装着し、ダニ抗原溶液を塗布した。
- ④ダニ抗原； ダニ抗原によるバリア破壊能を測定する目的で、市販ダニ抗原溶液を種々濃度に希釈し皮膚シートに塗布し、経時的にリボフラビン溶液を接触させその後テープストリッピング法により角層を回収し、浸透したリボフラビン量を測定した。
- ⑤ヒトでの測定；市販洗顔料を用いて、前腕部を通常の使用法に従って洗浄し、30分

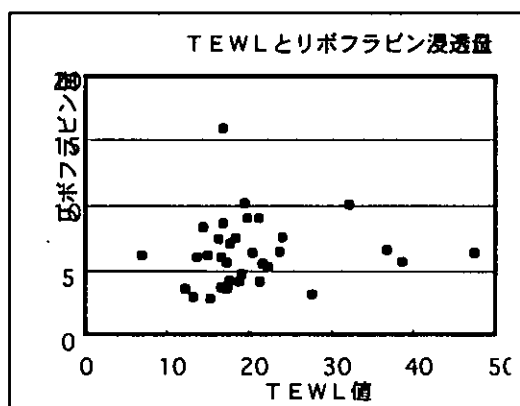
間 $23\text{℃}$ 40%の恒温恒湿室で順化した後に、測定部位にリボフラビン溶液を含浸させた脱脂綿を接触させ、一定時間後表面に残存する水滴を軽く押さえて除去した上でテープストリッピング法により角層を回収し、リボフラビン量を測定した。

### （倫理面への配慮）

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

## C. 研究結果

- ①洗浄処理により誘導した皮膚バリア機能破壊モデルおよび乾燥等により従来法である経皮水分蒸散量（TEWL）の測定結果からバリア機能の低下が確認できた部位におけるリボフラビンを指標としたバリア機能測定法による測定結果から本評価法の有用性を検討したところ相関性が高い評価法で



あることが確認された。また、本方法を用いることで従来のTEWL測定装置の適用が不可能であった屈曲部位や指背等の微小部位等の測定が可能となった。

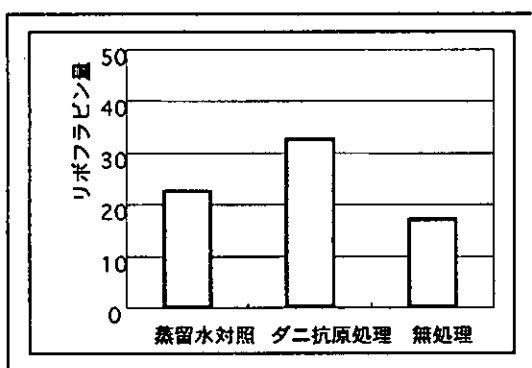
- ②ユカタンマイクロブタ皮膚を拡散セルに装着し、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ から段階希釈した

ダニ抗原溶液を塗布し、経時的にバリア破壊状況をリボフラビン法により測定した。その結果、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ では塗布後1時間で有意なリボフラビン浸透量の増加が認められ、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ でも24時間処理により有意なリボフラビン浸透量の増加が認められた。

同様な処理を協力研究者の光石幸市（順天堂大学）らはマウスにダニ抗原タンパクであるDerf1を累積処理し、さらにそのプロテアーゼ活性を活性化させることによりバリア破壊が生じることを確認した。

#### D. 考察

リボフラビンを用いた経皮浸透量を指標とするバリア機能測定法の有用性が確認できた。ヒトへの実際の応用についてもその有用性が確認できた。また、ダニ抗原が皮表に付着することにより自らのプロテアーゼ活性により



角層のバリア機能に障害を与えることを明らかにすることができた。

#### E. 結論

非免疫的生体防御機能の解析を行うための手法として経皮浸透量測定に基づく評価法が確立できた。またダニ抗原タンパク自体のプロテアーゼ活性によりバリア機能に障害が生じることが確認され、アトピー性皮膚炎患者における症状悪化に關与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

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

ダニ抗原タンパク：Derf1による表皮バリア機能の破壊作用について：光石幸市、高井敏朗、中村年伸、小川秀興；第33回日本免疫学会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

皮膚血管内皮細胞機能とアレルギーに関する研究

分担研究者 坪井良治

東京医科大学皮膚科教授

研究要旨：

アトピー性皮膚炎発症に及ぼす神経系と血管系の関与を明らかにする目的で、アトピー性皮膚炎患者に対し半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射を実施し、アセチルコリン、メサコリン、vasoactive intestinal polypeptide (VIP) の皮膚反応に対する影響を検討した。その結果、入院患者 5 回/週照射群（8 名）は、計 10 回照射後のアセチルコリンによる遅延蒼白反応が 8 例中 6 例で、メサコリンによる皮膚反応も 8 例中 3 例で蒼白斑の面積が減少傾向を示した。このことから半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射は、皮膚血管神経系を介してアトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応を抑制することが判明した。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の病因としては、免疫学的異常だけでなく、心理的ストレス、発汗異常、バリアー機能異常などの非免疫学的要因も指摘されている。自律神経系がストレスに対する重要な血管運動性の神経調節機構として働いていることから、我々は遅延蒼白反応に代表されるアトピー性皮膚炎の血管収縮反応に着目した。これまでの研究から、アトピー性皮膚炎患者の皮疹部では健常人に比較してノルアドレナリン (NA) 濃度が高いこと、*in vitro* の実験系で NA が皮膚微小血管内皮細胞に作用して起炎性サイトカインの産生を増加させることをすでに報告した。本年度は *in vivo* の実験として、アトピー性皮膚炎患者に対し半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射を実施し、アセチルコリン、メサコリン、vasoactive intestinal

polypeptide (VIP) の皮膚反応に対する影響を検討した。

B. 方法

診断基準に適合するアトピー性皮膚炎患者 22 例を対象とした。Ga-Al-As 半導体レーザー（メディレーザーソフト 1000®）を連続波で 20 分間、右星状神経節近傍に照射した。皮膚反応はアセチルコリンないしメサコリンを右前腕に皮内注射して 15 分後の遅延蒼白反応を測定し、VIP については注射 15 分後の紅斑・膨疹面積を測定した。

C. 結果

入院患者 5 回/週照射群（8 名）は、計 10 回照射後のアセチルコリンによる遅延蒼白反応が 8 例中 6 例で、メサコリンによる皮膚反応も 8 例中 3 例で蒼白斑の面積が減少傾向を示した。VIP 皮内反応は 8 例中 5 例で紅斑の面積が増大傾向を示した。外来患者 1~2 回/週

照射群（10名）でもアセチルコリン、メサコリンによる蒼白斑面積の減少傾向、VIPによる紅斑の増大傾向が認められたが有意差はなかった。

#### D. 考察

今回の検討では、Achとメサコリンの皮内反応に対する遅延蒼白反応に差が認められた。メサコリンはAchの類似物質で、非特異的コリンエステラーゼで分解されないため作用時間が長く、またアセチルコリンエステラーゼによる分解がAchに比べて著しく遅いため差が生じたと考えられる。VIPは真皮細小血管壁と汗腺周囲の神経線維に分布し、Achと共存していると言われている。アトピー性皮膚炎患者、健常人両者ともに紅斑と膨疹を認めたが、皮内注射15分後の面積は、AD患者では健常人に比べて減少していた。

#### E. 結論

半導体低出力レーザーによる星状神経節近傍照射は、皮膚血管神経系を介してアトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応を抑制することが判明した。

#### F. 健康危険情報

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

#### G. 研究発表

1) 伊藤友章、加藤雪彦、茂田江理、辻 香、齋藤万寿吉、住田治子、磯部環貴、玉城毅、古賀道之、坪井良治：アトピー性皮膚炎患者に認められる遅延蒼白反応に対する低出力レーザー星状神経節近傍照射の影響。日本レーザー医学会誌 24：25-29, 2003.

2) 伊藤友章、加藤雪彦、茂田江理、辻 香、齋藤万寿吉、坪井良治、古賀道之：低出力レーザー星状神経節近傍照射がアトピー性皮膚

炎患者の神経伝達物質皮膚反応に及ぼす影響について。日皮会誌 114：35-41, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究に関して新たな実用新案・特許の申請は現在のところない。

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

ヒト皮膚角化細胞ならびに気道上皮細胞における TWEAK/Fn14 分子の役割

分担研究者 中尾篤人

山梨大学大学院医学工学総合研究部免疫学講座教授

研究協力者 Long Jin（順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター）

Hongri Xu、岡本篤司（山梨大学医学部耳鼻科学講座）

相良博典（独協医科大学呼吸器アレルギー科）

研究要旨：

本研究で我々は TNF ファミリーに属する分子として新規に同定された TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) 分子のヒト皮膚角化細胞や気管支上皮細胞に対する作用について検討した。ヒト皮膚角化細胞ならびに気管支上皮細胞は TWEAK の受容体の 1 つである Fn14 分子を発現しており TWEAK 刺激により RANTES/IL-8/GM-CSF を産生した。この TWEAK 作用は主として NF- $\kappa$ B 経路を介しており、さらに TGF- $\beta$  との共刺激により増強された。以上の結果は TWEAK が皮膚や気道の residential cell に作用し炎症の惹起/維持に関与する可能性を示唆した。従来言われてきた Th2 タイプサイトカイン以外に TWEAK も炎症性サイトカインやケモカインの産生作用を介してアトピー性皮膚炎や喘息の病態に関与しているかもしれない。

A. 研究目的

本研究で我々は TNF ファミリーに属する分子として新規に同定された TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) 分子のアトピー性皮膚炎や気管支喘息等のアレルギー性疾患における役割について検討するため、まずヒト皮膚角化細胞や気管支上皮細胞に対する TWEAK の作用について検討した。

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) は TNF ファミリーに属する膜タンパクであるが、ある種の条件下において分泌される。その機能は一部の腫瘍細胞株に細胞死を誘導することが報告されているものの、

この作用は限局的でかつ弱いため、本来の生理作用は、別にある可能性が考えられた。最近になって、TWEAK の受容体の 1 つが増殖因子 FGF-1 で誘導される分子として既に同定されていた Fn14 であることが判明し、TWEAK は FGF などの増殖因子と同様の作用をもつことが示唆された。

B. 研究方法

ヒト培養皮膚角化細胞ならびに培養気管支上皮細胞における Fn14 発現を FACSscan によって検討するとともに、TWEAK 刺激によってアレルギー疾患に関与するサイトカイン/ケ

モカインがこれらの細胞において産生されるか否かについて ELISA 法によって検討した。TWEAK 刺激によって活性化される細胞内シグナル経路についてもウエスタンブロット法/I $\kappa$ B- $\alpha$ リン酸化の阻害剤を用いて検討した。また TWEAK と TGF- $\beta$ との相互作用についても検討した。

#### C. 結果

ヒト培養皮膚角化細胞ならびに培養気管支上皮細胞は Fn14 を発現し、かつ TWEAK 刺激によってそれぞれ RANTES ならびに IL-8/GM-CSF を産生した。さらにこれらの産生には I $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化が重要であった。また TWEAK と TGF- $\beta$ との共刺激は、ヒト培養皮膚角化細胞における RANTES 産生を増強した。

#### D. 考察

アレルギー性疾患の病態形成においては IL-4/IL-5/IL-13 などのいわゆる Th2 型 T 細胞の産生する Th2 型サイトカインが重要であると考えられているがこれとは異なり TWEAK が RANTES や GM-CSF の産生を介して関与している可能性もあるかもしれない。

今後、この可能性について検討するため臨床検体を用いてアレルギー疾患局所における TWEAK/Fn14 の発現ならびにそれらの発現と臨床的パラメーターとの関連について検討していきたい。

#### E. 結論

新規 TNF ファミリー分子 TWEAK はヒト皮膚角化細胞や気管支上皮細胞に作用し、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生を I $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化依存的に誘導する。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. Jin L, **Nakao A**, Nakayama M, Yamaguchi N, Kojima Y, Nakano N, Tsuboi R, Okumura K, Yagita H, Ogawa H: Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes. J Invest Dermatol (in press)
2. Xu H, Okamoto A, Ichikawa J, Ando T, Tasaka K, Masuyama K, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, **Nakao A**: TWEAK/Fn14 interaction stimulates human bronchial epithelial cells to produce IL-8 and GM-CSF. Biochem Biophys Res Commu (in press)

#### H. 知的財産権の出願/登録状況

特になし。



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

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

分担研究者 花澤豊行  
千葉大学大学院医学研究院・頭頸部腫瘍学講師

研究要旨：

アレルギー性鼻炎における一酸化窒素の産生が鼻粘膜にどのような影響を与えているかを、酸化ストレスの面から検討した。これまでの研究から鼻粘膜上皮においてはアレルギー炎症によりNOとスーパーオキシドが反応し生ずるperoxynitriteにより鼻粘膜上皮内および上皮下にチロシン残基のニトロ化が生じてnitrotyrosineが生ずることを確認した。そこでこのニトロ化により気道上皮がどのような機能変化が生ずるかをサイトカイン産生能に着目し肺上皮細胞（A549）を用いて検討した。培養肺上皮細胞A549をIL-1で刺激し、IL-8の産生能をperoxynitriteの供与薬であるSIN-1の同時投与の有無により比較検討した。また、培養細胞中のhistone deacetylase（HDAC）の酵素活性とチロシン残基のニトロ化の割合について検討した。その結果、培養上清中に産生されるIL-8濃度は、IL-1により増大するが、SIN-1のみではその産生能には変化がなかった。しかし、IL-1とSIN-1の双方の存在下ではその産生能は増強された。また、HDACの活性は、IL-1の存在下に増強されるが、SIN-1の追加による酵素活性の変化はみとめられなかった。しかし、HDAC内に占めるチロシン残基のニトロ化の割合は増大していた。IL-1の刺激により肺上皮細胞からのサイトカイン産生が増大した。チロシン残基のニトロ化によりHDAC活性を変化させずにサイトカイン産生を増強させることを示唆している。oxidative stressは、気道炎症において、上皮細胞のサイトカイン産生能を増強することで増悪させる可能性がある。

A. 研究目的

気道におけるNOを中心としたoxidative stressのアレルギー性炎症への関与に着目した。鼻腔および気管においてはアレルギー炎症により上皮細胞から一酸化窒素（NO）が産生され、また遊走細胞からはスーパーオキシド（ $O_2^-$ ）を含むreactive oxygen species（ROS）が放出されている。これまでの研究から鼻粘膜上皮においてはアレルギー炎症によりNOとスーパーオキシドが反応し生ずるperoxynitriteにより鼻粘膜上皮内および上皮下にチロシン残基のニトロ化が生じてnitrotyrosineが生ずることを確認した。そこでこのニトロ化により気道上皮がどのような機能変化が生ずるかをサイトカイン産生能に着目し肺上皮細胞（A549）を用いて検討した。

B. 方法

培養肺上皮細胞A549をIL-1で刺激し、IL-8の産生能をperoxynitriteの供与薬である

SIN-1の同時投与の有無により比較検討した。また、培養細胞中のhistone deacetylase（HDAC）の酵素活性とチロシン残基のニトロ化の割合について検討した。

C. 結果

培養上清中に産生されるIL-8濃度は、IL-1により増大するが、SIN-1のみではその産生能には変化がなかった。しかし、IL-1とSIN-1の双方の存在下ではIL-8産生能は増強された。また、HDACの活性は、IL-1の存在下に増強されるが、SIN-1の追加により酵素活性の低下が生じていた。さらに、HDAC内に占めるチロシン残基のニトロ化の割合は増大していた。

D. 考察

HDACはサイトカイン産生時には、DNAの2重らせん構造を解きほぐすことによりmRNAの転写を促進する。今回、IL-1の刺激により肺上皮細胞からのサイトカイン産生が増大した。

しかしSIN-1のみではこの変化は確認できなかった。IL-1刺激によりHDAC活性が上昇し、サイトカインの産生能が上昇したと考えられる。しかし、IL-1とSIN-1双方の存在下ではHDACの酵素活性には変化がないが、HDAC中に占めるニトロ化されたチロシン残基の割合は増加していた。このことから、oxidative stressによるチロシン残基のニトロ化は、HDAC活性を高めずに、IL-1刺激によるサイトカイン産生能を増強させる可能性があることを示唆している。oxidative stressは、気道炎症に対して、サイトカイン産生能を増強すること可能性がある。

#### E. 結論

oxidative stressは、気道（肺）上皮細胞のサイトカイン産生能を変化させうる。

#### F. 健康危険情報

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

#### G. 研究発表

1) Ito K, Hanazawa T, Tomita K, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 27:315(1):240-5, 2004.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究に関して新たな実用新案・特許の申請は現在のところない。

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

黄色ブドウ球菌よる皮膚局所におけるマスト細胞の活性化における  
MD-2 分子の役割に関する研究

分担研究者氏名 牛尾 博子  
順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター・講師

研究要旨 アトピー性皮膚炎では、局所のブドウ球菌の感染が増加しており、これが病態に結びついている可能性がある。マスト細胞は、IgE 抗体を介した活性化により放出するさまざまなメディエーターを通じてアレルギー反応の中心的役割を果たすことが知られているが、その他のメカニズムによる活性化のしくみは十分解明されていない。本研究では、マスト細胞がブドウ球菌由来のペプチドグリカンにより、Toll-like receptor (TLR) 依存的に活性化されるメカニズムを、MD-2 分子を欠損するマウス由来のマスト細胞を用いて検討した。その結果、MD-2 分子は、TLR4 を介したマスト細胞の活性化には必要であるが、ペプチドグリカンによる TLR2 の活性化には関与しないことが *in vitro* および *in vivo* で明らかとなった。

- A. 研究目的：マスト細胞の黄色ブドウ球菌に対する皮膚局所における活性化のしくみを解明することを目的とする。我々はすでに、マウスのマスト細胞がブドウ球菌由来のペプチドグリカン (PGN) や大腸菌由来のリポポリサッカライド (LPS) により、Toll-like receptor (TLR) 依存的に活性化されることを報告してきた。そこでさらに詳細な活性化のしくみを解明するために、MD-2 分子を欠損したマウス由来の骨髓培養マスト細胞を用いた検討を行った。MD-2 分子は、TLR4 の細胞外部分に結合して、TLR4 リガンドの認識や TLR4 分子の細胞外への発現に重要な役割をはたす分子であることが報告されている。しかしながら、マスト細胞における TLR4 やその他の TLR を介した活性化におけるこの分子の関与については詳細に検討されていない。
- B. 方法：MD-2 欠損マウス、TLR4 欠損および野生型マウスの骨髓より培養マスト細胞確立した。それぞれのマスト細胞から、全 RNA を抽出し、RT-PCR 法により MD-2 の遺伝子産物を確認した。また、細胞表面における発現は、MD-2 と TLR4 の複合体を認識するモノクローナル抗体 (MTS510) を用いて FACS 解析を行った。また  $2 \times 10^6$  /ml の濃度で培養したマスト細胞をさまざまな濃度の LPS や PGN で刺激後 3、6 時間目に採取した培養上清中のサイトカインを市販の ELISA kit を用いて測定した。マスト細胞欠損 WBB6F<sub>1</sub>-W/W<sup>o</sup> マウスのマスト細胞の修復は、 $1 \times 10^6$  のマスト細胞を腹腔内あるいは、耳の皮内に注射することによりおこなった。急性腹膜炎は、マウスをペントバルビタール麻酔後、開腹し、回盲腸部を結紮して 21G の針で穴をあけることにより誘導した。皮膚の血管透過性の亢進は、PGN を皮内注射後すぐに、0.5%エバンスブルーを静脈内注射し、30 分後に組織に浸出した色素量を定量することによりおこなった。
- C. 結果：野生型マウス由来の骨髓培養マスト細胞は、MD-2 および TLR4 を発現していることを RT-PCR 法と FACS 解析により確認した。さらに、TLR4 や TLR2 リガンド刺激によるサイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13) の産生を調べたところ、MD-2 欠損マスト細胞は TLR4 リガンドである LPS にはまったく反応しなかった。一方、MD-2 の欠損は TLR2 リガンドである PGN に対する反応には影響を及ぼさなかった。また、

in vivo の急性腹膜炎モデルにおいて、腹腔マスト細胞が宿主をバクテリアから保護するのに重要であることがわかっているが、腹腔のマスト細胞上の MD-2 の欠損は、腹膜炎後の宿主の生存率を有意に低下させた。この割合は、TLR4 を欠損したマスト細胞を腹腔内に修復したマウスとほぼ同程度であった。上記生存率と平行して、腹膜炎誘導後、腹腔内に浸潤してくる好中球および産生されるサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) は、野生型のマスト細胞をもつマウスに比べ、マスト細胞を欠損したマウス、および MD-2 や TLR4 を欠損したマスト細胞をもつマウスで有意に低下していた。一方、in vivo、PGN の皮内注射によりおこるマスト細胞依存性の血管透過性の亢進は、MD-2 分子の有無に影響されなかった。

D. E. 考察および結論：以上のことから、マスト細胞のブドウ球菌による TLR2 の活性化には、MD-2 が全く関係しないことが明らかになった。これらの結果は、マスト細胞が TLR4 や TLR2 リガンドの認識機構において、他の大部分の細胞に従う可能性が高いことを示唆するものであり、今後、TLR によるマスト細胞の活性化機序を解明する上で重要な知見である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) MD-2 is required for the full responsiveness of mast cell to LPS but not to PGN. Ushio, H., Nakao, A., Supajatura, V., Wongpiyabovorn, J., Miyake, K., Okumura, K., Ogawa, H. (投稿中)
- 2) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109:1351-1359, 2002

##### 2. 総説

- 1) 牛尾博子：マスト細胞における TLR の役割、*臨床免疫* 40(3) 259-265, 2003

- 2) 牛尾博子：Toll-like receptor とアレルギー、アレルギー、印刷中、2004

#### 3. 学会発表

- 1) 牛尾博子：Toll-like receptor とアレルギー、第 53 回日本アレルギー学会、教育講演、2003 年 10 月 (岐阜)
- 2) Ushio, H., Nakao, A., Miyake, K., Okumura, K., Ogawa, H. MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN、第 33 回日本免疫学会、2003 年 12 月 (福岡)