

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

皮膚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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 玉置 邦彦

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目次

### I 総括研究報告

皮膚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----- 1  
に関する研究

主任研究者 玉置邦彦

分担研究者 義江 修、師井洋一、中村晃一郎

### II 分担研究報告

1 アレルギー性皮膚疾患発症におけるケモカインの役割りとその治療への応用----- 6

分担研究者 玉置邦彦

研究協力者 佐伯秀久、柿沼 誉、小宮根真弓

2 皮膚特異的ケモカイン産生制御に関する研究----- 10

分担研究者 義江 修

研究協力者 中山隆志、稗島州雄、長久保大輔

3 表皮細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生調節に関する研究----- 15

分担研究者 師井洋一

4 表皮特異的サイトカイン過剰発現マウスについての研究----- 18

分担研究者 中村晃一郎

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----- 24

皮膚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 王置 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

師井 洋一 九州大学大学院医学系研究院皮膚科学講師

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。これまでの研究によって、ケラチノサイト (KC) から TNF- $\alpha$ や IFN- $\gamma$ などによる刺激で産生誘導ないし増強される TARC/CCL17, MDC/CCL22, CTACK/CCL27 に加えて、Eotaxin/CCL11, Eotaxin-3/CCL26 などかアレルギー性皮膚疾患に重要な働きをしていることが示された。そして *in vitro* によるこれらケモカイン産生制御の研究から *in vivo* における炎症への関わり合いも示唆されたと考えている。動物モデルのひとつとして VEGF トランスジェニックマウスを作成し、VEGF はアレルギー炎症で血管増生、炎症細胞の浸潤を誘導することを明らかにした。また、マウスの CCR4, CCR6, CCR8 に対する単クローン抗体作製に成功した。さらに、肝臓などで構成的に産生される LEC/CCL16 が第4のヒスタミンレセプターH4のリガンドとして作用しうることを明らかにし、また CCR10 の発現細胞として形質細胞を新たに同定した。CCR4 を介したシグナル伝達系には MEK1/2 および ERK を介した経路が細胞遊走に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの病態解析に関する検討からアレルギー性皮膚疾患の理解が進み、それに基づいた治療戦略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へて研究が進んでおり、最近では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あつめている。本研究班では、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、皮膚特異的ケモカインとされる CTACK/CCL27 とその受容体 CCR10、好酸球浸潤に関与する Eotaxin/CCL11, Eotaxin-2/CCL24, Eotaxin-3/CCL26 とその受容体 CCR3 を中心に研究をすすめることにしている。2年目である本年は主として CCL17, CCL26, CCL27, CCR4, CCR10 について研究した。

## B 研究方法

(1) 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 AD、水疱性類天疱瘡 (BP)、菌状息肉症 (MF) に関する研究で、玉置らはこれまで患者血清中の CCL17 が高値を示しかつ病勢と相関し、CCL17 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。今年度は AD 患者における CCL24, CCL26, CCL27 の血清中の値を ELISA で検討した。(2) KC からの CCL17, CCL22 産生制御については主に HaCaT 細胞を用いて検討した。玉置らは TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 などによる産生制御をランゲルハンス細胞 (LC) での反応とも比較して検討した。(3) 玉置らは「かゆみ」による搔破のモデルとして *in vitro* での KC の stretching を開発し、その刺激による KC の増殖能の変化やシグナル伝達経路を解析し、さらに KC からのサイトカイン・ケモカイン産生を検討した。(4) 動物モデルとしては KC に特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg) を玉置らは CCL17, CCL27 について、中村らは VEGF (vascular endothelial cell growth factor) について作成し解析した。(5) 義江らはマウスの CCR4, CCR6 および CCR8 を認識する単クローン抗体をアルメニアンハムスターで作成し、皮膚およびその他の組織・細胞での発現を検討した。(6) 義江らは最近報告された第 4 のヒスタミンレセプター-H4 が発現する細胞を検討し、H4 の新しいリガンドとしてのケモカインを解析した。(7) 義江らは皮膚指向性メモリー/エフェクター細胞で選択的に発現している CCR10 の発現を B 細胞で検討した。(8) 師井らはマウスリンパ腫細胞 EL4 にヒト CCR4cDNA を組み込んだ pcDNA3 ベクターをトランスフェクションし、恒常的 CCR4 発現細胞を得た (=EL4/CCR4)。これらの細胞を用いて細胞遊走試験を行い、各種のシグナル伝達阻害剤を用いた実験により CCR4

シグナル伝達経路を解析した。(9) 中村らは AD 患者末梢血より単球を採取し GM-CSF, IL-4 添加により樹状細胞を誘導し、この樹状細胞が産生する CCL17 について検討を加え、健康人、乾癬患者のそれと比較した。

## C 研究結果

(1) 玉置らは AD および Th1 優位の皮膚疾患である尋常性乾癬 (PsV) 患者の血清中で CCL27 が高値を示すことを明らかにした。特に AD 患者では血清中の CCL27 値は病勢と相関することを見出した。さらに Th1 ケモカインである IP-10/CXCL-10 の血清中の値は、PsV 患者では AD 患者や健康人より高いことを報告した (文献 1)。また AD 患者血清中の CCL24 値は上昇していないが、CCL26 値は上昇しており病勢と相関することを見出した (文献 2)。(2) 玉置らは HaCaT 細胞からの CCL22 産生が CCL17 と同様に、TNF- $\alpha$ と IFN- $\gamma$ によって濃度依存性に有意に増強され、IL-4 と IL-13 存在によって有意に抑制されることを示した (文献 3)。また LC からの CCL17, CCL22 産生は KC とは異なり、IL-4 により増強し IFN- $\gamma$ により減弱することを示した。(3) 玉置らは「かゆみ」による搔破の *in vitro* モデルである KC の stretching により、KC 細胞表面の EGF receptor がリン酸化されて、細胞内の ERK1/2 のリン酸化が誘導されることを示した。さらに AP1 の activation が起り keratin 6 (K6) の誘導と細胞増殖が起きることを見出した。また、stretching により KC から産生されるサイトカイン・ケモカインについても現在検討中である。(4)動物モデルとして玉置らは KC 特異的に発現する CCL17 Tg を作成した。このマウスでは血清中の CCL17 値が 5,000 pg/ml と正常のマウスに比べて約 100 倍高かった。また KC の培養上清を用いた細胞遊走試験により、CCL17 Tg の KC は機能的な CCL17 を過剰産生していること

が確認された。現在、接触皮膚炎の実験などを施行中である。KC 特異的 CCL27 Tg も 4 系統ファウンダーが作成され、現在解析中である。中村らは KC 特異的に発現する VEGF Tg を作成した。VEGF Tg マウスファウンダーは加齢に伴い口囲、顔面、耳介に皮膚炎を生じた。組織学的に表皮 KC の増殖、真皮乳頭層の血管増生、血管周囲性に細胞浸潤を認めた。また Tg マウスでは耳介の血管拡張を認め、組織学的に CD31 陽性血管内皮細胞の増殖を認めた。以上より VEGF は皮膚アレルギー炎症を制御することが示唆された。(5) 義江らはマウスの CCR4、CCR6 および CCR8 を認識する単クローン抗体をアルメニアンハムスターで作製することに成功した。これらの抗体を用いた発現細胞の分布と機能解析は現在進行中である。(6) 義江らは第 4 のヒスタミンレセプター H4 が好酸球で選択的に発現し、ヒスタミンは H4 を介して好酸球の遊走を誘導することを明らかにした。さらに H4 の新しいリガンドとしてケモカイン LEC/CCL16 を見出した。(7) 義江らは皮膚指向性メモリー/エフェクター細胞で選択的に発現している CCR10 が B 細胞では形質細胞の段階で選択的に発現することを見出し、MFC/CCL28 は CCR10 を介して形質細胞の骨髄や粘膜組織への帰巢を促進することを明らかにした(文献 6)。(8) 師井らは恒常的 CCR4 発現細胞(EL4/CCR4)を用いて細胞遊走試験を行い、各種のシグナル伝達阻害剤の影響を検討した結果、MEK1/2 阻害剤である U-0126 では遊走能が 50%以下にまで抑制された。(9) 中村らは AD 患者末梢血単球由来の樹状細胞が産生する CCL17 は、健康人、乾癬患者のそれと比較して有意に高いことを示した。

#### D 考察

これまでの研究によって、(1) KC から TNF- $\alpha$ や IFN- $\gamma$ などによる刺激で産生誘導

ないし増強される CCL17, CCL22, CCL27 に加えて、CCL11, CCL26 などがアレルギー性皮膚疾患に重要な働きをしていることが示された。特に前 3 者では CCR4 発現 Th2 細胞の、後 2 者では CCR3 発現好酸球の皮膚への遊走に関与していると考えられる。そして(2) *in vitro* によるこれらケモカイン産生制御の研究から *in vivo* における炎症への関わり合いも示唆されたと考えている。ステロイド、FK506 のこれらの産生抑制に加えて 14 員環マクロライドが産生抑制に働くことも明らかにできており、現在はこの抑制機構の転写レベルでの検討を行っている。(3) 掻破の *in vitro* モデルを作成し stretch による KC の細胞増殖機構が明らかにされたが、今後は stretch により KC から産生されるサイトカイン・ケモカインについて詳細に検討していく。また、これまでは一回 stretch での影響をみてきたが、頻回 stretch による検討も進めており、よりよいモデルが作成でき掻破による影響をより詳細に明らかにできるものと考えている。(4) 動物モデルに関して王置らは 2 種類のモデルマウス(CCL17, CCL27)を作成した。これらは肉眼的には皮膚病変はみられないが、接触皮膚炎などを含めた種々の刺激に対する解析を現在行っている。これらの病態解析に関する検討からアレルギー性皮膚疾患の理解が進み、それに基づいた治療戦略の開発が期待される。また中村らは VEGF Tg を作成し、VEGF はアレルギー炎症で血管増生、炎症細胞の浸潤を誘導することを明らかにした。今後接触皮膚炎における VEGF の役割、さらに治療薬を用いたその抑制機序について検討する予定である。(5) マウスの CCR4、CCR6、CCR8 に対する単クローン抗体作製に成功した。これらの抗体作成の報告はいまだなく、マウスにおけるレセプター発現細胞の特定とそれらの機能解析に貴重な手段を提供する。(6) ヒスタミンはマスト細胞から産生される重要な炎症性

メディエーターであり、皮膚のアレルギー性疾患でも重要な働きをしている。H4 は最近報告された新しいヒスタミンレセプターである。H4 の発現細胞が好酸球であり、かつヒスタミンは H4 を介して好酸球の遊走を誘導する、という発見はヒスタミンの新しい生理機能を明らかにした。さらに肝臓などで構成的に産生される CCL16 が H4 のリガンドとして作用するという発見は H4 の生理機能に関し重要な知見をもたらした。(7) CCR10 の発現細胞として形質細胞を同定したことは CCR10 に作用するケモカイン CCL27 と CCL28 の生理機能に関して新たな地平を開いた。皮膚におけるこれらのケモカインの産生と形質細胞の遊走との関係が注目される。(8) ケモカインレセプターは 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり、百日咳毒素で完全に阻害されることより、その主なシグナル伝達分子は cAMP であると考えられているが、詳細は不明である。今回の検討により、CCR4 を介したシグナル伝達系には MEK1/2 および ERK を介した経路が細胞遊走に重要な役割を果たしていることが示唆された。CCR4 を発現する T 細胞の皮膚への浸潤 遊走が大きな一因となっている AD や MF に対して、シグナル伝達阻害剤の臨床応用・効果が期待される。(9) AD 患者末梢血由来の樹状細胞から産生される CCL17 が健康人や乾癬患者に比べて極めて多いことか示され、Th2 優位な病態に重要であることか示唆された。

## E 結論

アレルギー性皮膚疾患の病態に対して、CCL17, CCL22 に加えて CCL27 や CCL26 などが重要な働きをしていることが示された。また in vitro によるこれらケモカイン産生制御の研究から in vivo における炎症への関わり合いも示唆された。動物モデルのひとつとして VEGF Tg を作成し、VEGF はアレルギー

一炎症で血管増生、炎症細胞の浸潤を誘導することを明らかにした。マウスの CCR4、CCR6、CCR8 に対する単クローン抗体作製に成功した。また、CCL16 が H4 のリガンドとして作用しうること、CCR10 の発現細胞として形質細胞を新たに同定した。CCR4 を介したシグナル伝達系には MEK1/2 および ERK を介した経路が細胞遊走に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## F 健康危険情報 なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Watanabe T, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris J Allergy Clin Immunol 2003, 111 592-7
- 2) Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis Clin Exp Immunol 2003, 134 309-13
- 3) Xiao F, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, Yano S, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells J Dermatol Sci 2003, 31 111-7

- 4) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT Biochem Biophys Res Commun 2003, 301 841-7
- 5) Hieshima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Kawasaki Y, Shiba F, Shiota M, Katou F, Saito T, Yoshie O CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity J Immunol 2003, 170 1452-61
- 6) Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O Cutting edge profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues J Immunol 2003, 170 1136-40
- 7) Uchi H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M CX-659S, a diaminouracil derivative, indirectly inhibits the function of Langerhans cells by blocking the MEK1/2-Erk1/2 Pathway in keratinocytes J Invest Dermatol 2003, 120 983-9
- 8) Terao H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M Plasma IL-13 levels in patients with atopic dermatitis J Dermatol 2003, 30 76-7
- 9) Sugaya M, Nakamura K, Mitsui H, Takekoshi T, Saeki H, Tamaki K Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1 J Dermatol Sci 2003, 31 179-87
- 10) Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Akiba H, Oyama N, Nishibu A, Kaneko F, Tsunemi Y, Kakinuma T, Saeki H, Tamaki K Ultraviolet A irradiation inhibits thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by a human keratinocyte HaCaT cell line Eur J Dermatol 2003, 13 348-53
- 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

## アレルギー性皮膚疾患発症におけるケモカインの役割とその治療への応用

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

研究協力者 佐伯 秀久 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学講師  
柿沼 誉 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学助手  
小宮根真弓 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。これまでの研究によって、ケラチノサイト (KC) から TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などによる刺激で産生誘導ないし増強される TARC/CCL17, MDC/CCL22, CTACK/CCL27 に加えて、Eotaxin/CCL11, Eotaxin-3/CCL26 などがアレルギー性皮膚疾患に重要な働きをしていることが示された。特に CCL17, 22 では CCR4 発現 Th2 細胞の、CCL11, 26 では CCR3 発現好酸球の皮膚への遊走に関与していると考えられる。そして in vitro によるこれらケモカイン産生制御の研究から in vivo における炎症への関わり合いも示唆されたと考えている。動物モデルでは 2 種類 (CCL17, 27) のトランスジェニックマウスを作成した。これらは肉眼的には皮膚病変はみられないが、種々の刺激に対する解析を行っている。これらの病態解析に関する検討と遺伝子解析とを合わせてアレルギー性皮膚疾患の理解が進み、それに基づいた治療戦略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。本研究ではこれらの病態へのケモカインの関与を解析すると共に、それに基づいた治療戦略を検討する。(1)臨床的にアトピー性皮膚炎 (AD)、水疱性類天疱瘡 (BP)、菌状息肉症 (MF) における TARC/CCL17, MDC/CCL22, CTACK/CCL27 などについて検討する。更に(2)ケラチノサイト (KC) が産生するこれらケモカインの産生制御について in vitro で検討し、薬剤による影響を検討する。(3)病態との関わり合いで、KC の増殖とサイトカイン、ケ

モカインについても検討する。また(4)「かゆみ」による搔破の病態への関与を in vitro モデルを作成して検討する。(5)動物モデルを作成すると共に、(6)遺伝子多型に関する研究も展開する。

### B 研究方法

(1)これまで AD, BP, MF における CCL17, CCL22 と CCR4 発現 Th2 細胞の重要性について明らかにし報告してきた (J Allergy Clin Immunol 2001, J Invest Dermatol 2001, Clin Exp Immunol 2002, Br J Dermatol 2003, J Am Acad Dermatol 2003)。今年度はさらに AD 患者における CCL27,



Eotaxin-2/CCL24, Eotaxin-3/CCL26 の血清中の値を ELISA で検討した。(2)KC からの CCL17, CCL22 産生制御については主に HaCaT 細胞を用いて検討した。TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 などによる産生制御をランゲルハンス細胞 (LC) での反応とも比較して検討した。さらに、KC からの fractalkine/CX3CL1 産生制御について主に NHEK (normal human epidermal keratinozyte) を用いて解析し、尋常性乾癬 (PsV) 患者や扁平苔癬 (LP) 患者の皮膚での発現も併せて検討した。(3)KC の増殖に対する IL-15 の関与を検討した。(4)「かゆみ」による搔破のモデルとして *in vitro* の KC の stretching を開発し、その刺激による KC の増殖能の変化やシグナル伝達経路を解析した。(5)動物モデルとしては KC に特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg) を CCL17, CCL27 について作成し解析した。また(6)AD に関しては様々な遺伝子に関する多型解析を行ってきたが、今年度は CCR3 に関する解析を行なった。

### C 研究結果

(1)AD および Th1 優位の皮膚疾患である PsV 患者の血清中で CCL27 が高値を示すことを明らかにした。特に AD 患者では血清中の CCL27 値は病勢と相関することを見出した。さらに Th1 ケモカインである IP-10/CXCL-10 の血清中の値は、PsV 患者では AD 患者や健常人より高いことを報告した (文献 1)。また AD 患者血清中の CCL24 値は上昇していないが、CCL26 値は上昇しており病勢と相関することを見出した (文献 2)。(2) HaCaT 細胞からの CCL22 産生が CCL17 と同様に、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  によって

濃度依存性に有意に増強され、IL-4 と IL-13 存在によって有意に抑制されることを示した (文献 3)。また LC からの CCL17 産生は KC とは異なり、IL-4 により増強し IFN- $\gamma$  により減弱することを示した (文献 4)。さらに、NHEK からの CX3CL1 産生は TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  によって増強することを示し、PsV や LP 患者の表皮 KC で CX3CL1 が強発現していることを明らかにした (文献 5)。(3)KC の増殖に IL-15 が関与することを示した (文献 6)。(4)「かゆみ」による搔破の *in vitro* モデルである KC の stretching により、KC 細胞表面の EGF receptor がリン酸化されて、細胞内の ERK1/2 のリン酸化が誘導されることを示した。さらに AP1 の activation が起り keratin 6 (K6) の誘導と細胞増殖が起きることを見出した (文献 7)。(5)動物モデルとしては KC 特異的に発現する CCL17 Tg を作成した。このマウスでは血清中の CCL17 値が 5,000 pg/ml と正常のマウスに比べて約 100 倍高かった。また KC の培養上清を用いた細胞遊走試験により、CCL17 Tg の KC は機能的な CCL17 を過剰産生していることが確認された。現在、接触皮膚炎の実験などを施行中である。KC 特異的 CCL27 Tg も 4 系統ファウンダーが作成され、現在解析中である。(6)AD に関して CCR3 の多型解析を行なったか、健常人と比べて有意差は認められなかった (文献 8)。

### D 考察

これまでの研究によって、KC から TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  などによる刺激で産生誘導ないし増強される CCL17, CCL22, CCL27 に加えて Eotaxin/CCL11, CCL26 などがアレルギー性皮膚疾患に重要な働きをしていることが

示された。特に前 3 者では CCR4 発現 Th2 細胞の、後 2 者では CCR3 発現好酸球の皮膚への遊走に関与していると考えられる。そして in vitro によるこれらケモカイン産生制御の研究から in vivo における炎症への関わり合いも示唆されたと考えている。ステロイド、KF506 のこれらの産生抑制に加えて 14 員環マクロライドが産生抑制に働くことも明らかにできており、現在はこの抑制機構の転写レベルでの検討を行っている。搔破の in vitro モデルを作成し stretch による KC の細胞増殖機構が明らかにされたが、今後は stretch により KC から産生されるサイトカイン・ケモカインについて詳細に検討していく。また これまでには一回 stretch での影響をみてきたが、頻回 stretch による検討も進めており、よりよいモデルが作成でき搔破による影響をより詳細に明らかにできるものと考えている。動物モデルは我々のグループでは 2 種類のモデルマウスを作成した。これらは肉眼的には皮膚病変はみられないが、種々の刺激に対する解析を行っている。

## E 結論

AD、BP、MF などアレルギー性皮膚疾患の病態に対して、CCL17、CCL22 に加えて CCL27 や CCL26 などが重要な働きをしていることが示された。また in vitro によるこれらケモカイン産生制御の研究から in vivo における炎症への関わり合いも示唆されたと考えている。動物モデルでは 2 種類 (CCL17, 27) の Tg を作成した。これらは肉眼的には皮膚病変はみられていないが、現在種々の刺激に対する解析を行っている。これらの病態解析に関する検討と遺伝子解析とを合わせてアレルギー性皮膚疾患の理解が進み、それに

基づいた治療戦略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, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Asano N, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Watanabe T, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris J Allergy Clin Immunol 2003, 111 592-7
- 2) Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis Clin Exp Immunol 2003, 134 309-13
- 3) Xiao T, Kagami S, Saeki H, Sugaya M, Kakinuma T, Fujita H, Yano S, Mitsui H, Torii H, Komine M, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K Both IL-4 and IL-13 inhibit the TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  enhanced MDC production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells J Dermatol Sci 2003, 31 111-7
- 4) Xiao T, Fujita H, Saeki H, Mitsui H, Sugaya M, Tada Y, Kakinuma T, Torii H, Nakamura K, Asahina A, Tamaki K Thymus and activation-regulated chemokine

- (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF- $\alpha$  and IL-4 and downregulated by IFN- $\gamma$  Cytokine 2003, 23 126-32
- 5) Sugaya M, Nakamura K, Mitsu H, Takekoshi T, Saeki H, Tamaki K Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1 J Dermatol Sci 2003, 31 179-87
- 6) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT Biochem Biophys Res Commun 2003, 301 841-7
- 7) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes J Invest Dermatol, in press
- 8) Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, Kakinuma T, Fujita H, Asano N, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population J Dermatol Sci 2003, 33 130-3

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

研究協力者 中山 隆志 近畿大学医学部細菌学助手

稗島 州雄 近畿大学医学部細菌学講師

長久保大輔 近畿大学医学部細菌学助手

**研究要旨** CCR10 は CLA (cutaneous lymphocyte antigen) 陽性皮膚指向性メモリー/エフェクターT 細胞で特異的に発現することが報告されている。我々は CCR10 が B 細胞では形質細胞の段階で特異的に発現することを明らかにした。さらにヒト骨髄中の形質細胞は CXCR4、CXCR6、CCR10 および弱く CCR3 を発現し、一方、骨髄ストローマ細胞はこれらのリガンドである SDF-1/CXCL12、CXCL16 および MEC/CCL28 は産生することを明らかにした。ヒスタミンはマスト細胞から産生される重要な炎症性メディエーターであり、皮膚のアレルギー性疾患でも重要な働きをしている。最近、好酸球に特異的に発現する新しい型のヒスタミンレセプターH4 が報告された。我々は肝実質細胞で構成的に発現・産生されるケモカイン LEC/CCL16 が H4 を介して好酸球を遊走させることを見出した。またマウスの CCR4、CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体をアルメニアンハムスターで作製することに成功し、正常マウスのリンパ球でのこれらのケモカインレセプターの発現解析を行った。

### A 研究目的

(1) 皮膚指向性メモリーT 細胞は CCR4 とともに CCR10 を発現することが報告されている。そのため、これらのレセプターの発現制御と機能解析は皮膚アレルギー疾患の予防・治療に有用な知見をもたらす。我々は以前 EBV 感染 B 細胞では CCR10 の発現が新たに誘導されることを報告した (Nakayama, et al, Journal of Virology 76 3072-3077, 2002)。しかしながら EBV そのものは CCR10 の発現を直接誘導する作用を示さなかったところから、CCR10 の発現誘導は EBV 感染 B 細胞の示す形質細胞様の分化段階に由来するのではないかと考えた。そこで CCR10 の発現制御を明らかにする目的で、ヒトの骨髄中

の形質細胞および多発性骨髄腫についてケモカインレセプターの発現プロファイルを解析した。

(2) ヒスタミン H4 レセプターは最も新しく同定されたヒスタミンレセプターで、好酸球に特異的に発現し、ヒスタミンによる好酸球の遊走を媒介することか報告されている。ところでヒスタミンレセプターやケモカインレセプターの属する GPCR (G protein-coupled receptor) 系ではしばしばひとつのレセプターか多様なリガンドに対して反応するいわゆるレセプターの交雑性が見出されている。そこでケモカイン系のヒスタミンレセプターへの作用を明らかにする目的で、造血系細胞に発現することか示されているヒスタ

ミンレセプターH1、H2 および H4 について、ケモカインとの交差反応性を網羅的に調べた。

(3) CCR4 と CCR8 は Th2 細胞に選択的に発現し、一方 CCR6 は未熟樹状細胞、B 細胞および一部のメモリーT 細胞に発現していることが知られている。そしてこれらのレセプターは皮膚アレルギー性疾患で重要な役割を果たしていることが我々も含めた多くの研究から明らかにされている。マウスのこれらのレセプターに特異的に反応する単クローン抗体を作製できれば、マウスの皮膚アレルギー性疾患モデルでの病態解析や治療実験に大いに役立つと期待される。そこで我々はマウスの CCR4、CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体をアルメニアンハムスターを用いて作製した。

## B 研究方法

### (1) CCR10 の形質細胞での発現

ヒト骨髓腫細胞株でのケモカインレセプターの発現は RT-PCR で網羅的に解析した。正常人の末梢血、骨髓、および多発性骨髓腫患者の末梢血からの単核球分離は Ficoll-Paque 法で行った。形質細胞は CD38 強陽性細胞として検出される。そこで抗 CD38 と各種ケモカインレセプターに対する市販単クローン抗体あるいは抗血清との 2 重染色を行い、CD38 強陽性の形質細胞でのケモカインレセプターの発現を flow cytometry にて解析した。また形質細胞の発現するケモカインレセプターに対応するリガンドによる形質細胞の遊走反応は Transwell を用いて解析した。出発細胞集団および遊走細胞集団に含まれる形質細胞は抗 CD38 染色によって検出した。ヒト骨髓由来ストローマ細胞でのケモカイン発現は RT-PCR および ELISA により検出し

た。

### (2) LEC/CCL16 のヒスタミン H4 レセプターに対する作用

ヒスタミンレセプターH1、H2 および H4 の cDNA は報告されている塩基配列をもとにクローニングした。これらの cDNA をマウスレトロウイルスベクターを用いてマウス L12 細胞に発現させた。32 種のケモカインについて細胞内カルシウム上昇反応および細胞遊走反応を検討した。LEC/CCL16 の H4 レセプターへの結合はヨード 125 でラベルした LEC/CCL16 を用いて行った。ヒト末梢血中の好酸球は Percoll 法で分離し、Transwell を用いて LEC/CCL16 に対する遊走反応を調べた。また BALB/c マウスに LEC/CCL16 を静注し、骨髓から末梢血中への好酸球の動員を検討した。

### (3) マウス CCR4、CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体の作製

マウスの CCR4、CCR6 および CCR8 の N 末端細胞外ドメインのアミノ酸配列を GST 融合蛋白として大腸菌で発現させ、Glutathione-Sepharose 4B カラムで精製した。精製した GST 融合蛋白は CFA とともにアルメニアンハムスターに免疫した。最終免疫の 3 日後、脾細胞を分離してマウス SP2 ミエローマとポリエチレングリコール 1500 を用いて細胞融合した。ハイブリドーマは GST および GST 融合蛋白を用いた ELISA でスクリーニングし、陽性クローンはそれぞれのレセプタートランスフェクタントとの反応性で確認した。

### (倫理面への配慮)

正常人からの骨髓あるいは末梢血の提供および多発性骨髓腫患者からの末梢血提供に当

たっては書面によるインフォームドコンセントを得た。また動物実験については近畿大学医学部実験動物委員会の承認のもとに行った。

## C 研究結果

### (1) 形質細胞でのケモカインレセプター発現解析

ヒト骨髄腫細胞株4種についてケモカインレセプターの発現を RT-PCR を用いて網羅的に調べた。その結果、これらの細胞株ではいずれも CXCR4、CXCR6、CCR10 および弱く CCR3 を発現することが見出された。そこで正常人骨髄中の形質細胞および多発性骨髄腫患者の末梢血中の骨髄腫細胞について、これらのレセプターを中心にケモカインレセプターの発現を flow cytometry で解析した。その結果、正常形質細胞および骨髄腫細胞はともに細胞株と同様に CXCR4、CXCR6、CCR10 および弱く CCR3 を発現していた。さらに正常形質細胞はこれらのレセプターのリガンドである SDF-1/CXCL12、CXCL16 および MEC/CCL28 に対して遊走反応を示した。さらにヒト骨髄のストローマ細胞は SDF-1/CXCL12、CXCL16 および MEC/CCL28 を構成的に発現していることを明らかにした。

### (2) LEC/CCL16 のヒスタミン H4 レセプターを介した好酸球遊走

ヒスタミンレセプター H1、H2 および H3 を安定して発現するマウス L12 細胞を用いて、32 種のヒトケモカインに対する反応性を細胞内カルシウム上昇を指標に検討した。その結果、我々が以前に肝実質細胞で構成的に発現していることを報告した LEC/CCL16 が H4 レセプターを介して細胞内カルシウム上昇を誘導することを見出した。さらに

LEC/CCL16 は H4 レセプターを介して L12 細胞の細胞遊走も誘導した。また LEC/CCL16 は H4 と特異的に高親和性で結合することも確かめられた ( $K_d=17\text{nM}$ )。H4 はヒト末梢血では好酸球に特異的に発現していることが報告されている。そこで LEC/CCL16 による好酸球の遊走を検討した。その結果、LEC/CCL16 はヒト末梢血中の好酸球の遊走を誘導し、その作用は H3/H4 の阻害剤である thiooperamide によってブロックされた。さらに LEC/CCL16 をマウスに静注すると、末梢血中の好酸球数が特異的に有意な上昇を示した。

### (3) 新規単クローン抗体を用いたマウス CCR4、CCR6、CCR8 の発現解析

マウスの CCR4、CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体を作製した。特異性はマウスの全ケモカインレセプター (CCR1 から CCR10、CXCR2 から CXCR6、XCR1、CX3CR1 の 17 種) を網羅したマウス L12 細胞株の発現パネルを用いて検討した。その結果、これらの単クローン抗体はそれぞれのケモカインレセプターに特異的であることが確認された。そこで次にこれらの抗体によるそれぞれのケモカインレセプターの作用阻止を細胞遊走および細胞内カルシウム濃度上昇反応で検討した。その結果、これらの抗体はいずれもレセプターの機能を中和する活性はなかった。そこで次に正常マウスのリンパ球での染色を検討した。その結果抗 CCR4 (2G12) は胸腺細胞の一部を染色した。さらに CD4 および CD8 とのダブル染色を行うと CCR4 はダブル陽性の一部と CD4 シングル陽性の一部が染色された。さらに CCR4 陽性細胞は CD69 陽性細胞 (皮質から髄質への移行期の胸腺細胞に相当) であった。そこで

次に脾臓の CD4 陽性細胞を精製し、IL-2+IL12+IFN- $\gamma$  存在下および IL-2+IL4 存在下でそれぞれ Th1 と Th2 に分極させた。その結果、どちらの培養でも同程度で CCR4 を発現していた。ただし、IFN- $\gamma$  および IL-4 の細胞内染色では Th1 と Th2 へのはっきりした分極は確認できなかった。抗 CCR8 (1018) による胸腺細胞の染色ではダブル陰性の一部と CD4 シングル陽性の一部が染色された。抗 CCR6 (29-2L17) は脾臓、リンパ節、パイエル板の細胞の一部を染色した。さらにこれらの組織での CCR6 陽性細胞は大部分が CD19 陽性の B 細胞であった。

#### D 考察

(1) CLA 陽性皮膚指向性メモリー/エフェクター T 細胞での特異的な発現が報告されている CCR10 が B 細胞では形質細胞の分化段階で特異的に発現することを明らかにした。このことは CCR10 を標的とする薬剤の開発にとって重要な情報である。また形質細胞の産生するイムノグロブリンのクラス、特に IgE 産生、とケモカインレセプター発現の関係は今後の重要な研究課題である。

(2) ヒスタミンはマスト細胞から産生される重要な炎症性メディエーターであり、皮膚のアレルギー性疾患でも重要な働きをしている。最近、好酸球に発現する新しい型のヒスタミンレセプター H4 が報告された。我々はケモカイン LEC/CCL16 が H4 を介して好酸球を遊走することを見出した。我々はすでに LEC/CCL16 は肝実質細胞で構成的に発現され、正常人血清中にもかなりの濃度で存在し、レセプターとしては CCR1、CCR2 および CCR5 に作用することを報告している (International Immunology 13 1021-1029, 2001)。今回の発

見から LEC/CCL16 は骨髄からの好酸球の動員に関わっている可能性が示唆された。また薬剤などによる肝障害での好酸球の肝浸潤にも関わっている可能性が示唆された。

(3) CCR4 と CCR8 は Th2 細胞に選択的に発現し、一方 CCR6 は未熟樹状細胞、B 細胞および一部のメモリー T 細胞に発現していることが知られている。そしてこれらのレセプターは皮膚のアレルギー性疾患で重要な役割を果たしていることが我々のも含めた多くの研究から明らかにされている。マウスの CCR4 CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体はこれらのレセプターのアレルギー性疾患での役割をマウスの疾患モデルで解析するための有力な手段を提供する。

#### E 結論

ヒト形質細胞および多発性骨髄腫は CXCR4、CXCR6、CCR10 および弱く CCR3 を発現することを明らかにした。肝実質細胞で構成的に発現している LEC/CCL16 はヒスタミンレセプター H4 を介して好酸球を遊走することを明らかにした。マウスの CCR4、CCR6、CCR8 に対する単クローン抗体をアルメニアンハムスターで作製することに成功した。

#### F 健康危険情報 なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, and Yoshie, O Cutting edge profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues Journal

- of Immunology 170 1136-1140, 2003
- 2) Hieshima K, Ohtani H, Shibano M, Izawa D, Nakayama T, Kawasaki Y, Shiba F, Shiota M, Katou F, Saito T, and Yoshie O CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity Journal of Immunology 170 1452-1461, 2003
  - 3) Nakayama T, Kato Y, Hieshima K, Nagakubo D, Fujisawa T, and Yoshie O Liver-expressed chemokine/CCL16 attracts eosinophils by crossreacting to histamine H4 receptor Journal of Immunology, on revision
  - 4) Hieshima K, Kawasaki Y, Hanamoto H, Nakayama T, Nagakubo D, Kanamaru A, and Yoshie O Blocking CCL25 and CCL28 prevents intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells Journal of Immunology, on revision
- 2 学会発表
  - 1) 義江 修 「Chemokines, Chemokine Receptors and Beyond」第53回日本アレルギー学会総会、岐阜 (2003 10 23)
  - 2) 稗島州雄、中山隆志、長久保大輔、義江修 「腸管免疫におけるケモカイン CCL28/CCR10 系の役割」第33回日本免疫学会総会 学術集会、福岡 (2003 12 9)
- 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に関する研究

分担研究者 師井洋一 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 講師

**研究要旨** TARC による CCR4 のシグナル伝達機構を解析する目的で CCR4 発現細胞を作製し、各種 MAP キナーゼ阻害剤の影響を解析した。MEK1/2 および ERK が重要な役割をしていることが示唆された。

### A 研究目的

近年の免疫ケモカインの解析により T リンパ球や樹状細胞の動態が明らかにされてくるのに伴い、皮膚炎症性疾患の病態生理・概念もドラマティックに変貌してきた。一例として、アトピー性皮膚炎においては、ケモカインの一種である CCL17(TARC)や CCL22(MDC)を表皮細胞が産生することによって、CCR4 を持つ Th2 型 T 細胞が炎症の場である皮膚に到達することが明らかとなった。我々はこれらの所見をふまえて、ケモカインレセプター CCR4 のシグナル伝達系の解析をするために、マウスリンパ腫細胞である EL4 細胞にヒト CCR4 分子を遺伝子導入した細胞を樹立し、様々なシグナル伝達分子の特異的阻害剤を添加することで、その反応性の変化を検討した。

### B 研究方法

マウスリンパ腫細胞 EL4 にヒト CCR4cDNA を組み込んだ pcDNA3 ベクターをトランスフェクションし、恒常的 CCR4 発現細胞を得た (=EL4/CCR4)。これらを 5 $\mu$ m サイズの小孔を持つフィルターで分割された上チャンパーにいれ、その下チャンパーにはケモカインである TARC を 10 $\mu$ g/ml の濃度で添加した。デキサメサゾン、FK506、以前の実験で MEK1/2 阻害剤と同様の反応を示した CX-659S を 10<sup>-10</sup> M から 10<sup>-3</sup> M の濃度で上チャンパーに加えた。また MEK1/2 阻害剤 U-0126、ERK 阻害剤 PD098059、p38 MAPK 阻害剤 SB203580、SD282 を 5-40 $\mu$ M の濃度で上チャンパーに添加し、EL4/CCR4 細胞の 24

時間の遊走反応を検討した。

(倫理面への配慮)

マウス胸腺細胞株を用いた in vitro の実験であり、倫理面で問題はないと考える。

### C 研究結果

恒常的 CCR4 発現 EL4/CCR4 細胞は TARC によって遊走が誘導された。デキサメサゾンではほとんど抑制されなかったが、高濃度の FK506 ではわずかに抑制が認められた。各種細胞内キナーゼの阻害剤では CX-659S を除いて濃度依存的に抑制効果が認められた。ERK の阻害剤 PD098059 が 70-80% 程度の抑制にとどまったか、MEK1/2 阻害剤である U-0126 は低濃度でも 50% の、最高 74% の抑制効果が認められた。また p38 阻害剤である SB203580 や SD282 では高濃度で 50-60% の抑制効果が認められた。

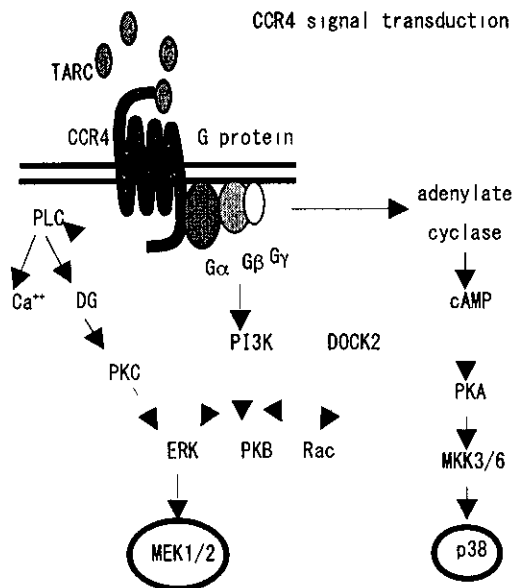
### D 考察

ケモカインレセプターは 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり、百日咳毒素で完全に阻害されることより、その主なシグナル伝達分子 (セカンドメッセンジャー) は cAMP であると考えられているか、詳細は不明である。今回の検討により、CCR4 を介したシグナル伝達系には MEK1/2 および ERK 並びに p38 を介した経路が細胞遊走に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、ERK から MEK1/2 に連なるシグナ

ルでは、MEK1/2 阻害剤でより強い抑制効果があったことから、何らかの介在シグナルが存在することか予想された。

下図参照



## E 結論

以上の結果より、CCR4 を発現する T 細胞の皮膚への浸潤・遊走が大きな一因となっているアトピー性皮膚炎や菌状息肉症に対して、これら阻害剤またはこれらの知見から開発されるであろう薬剤の臨床応用・効果が期待される。

## F 健康危険情報

特に問題はない

## G 研究発表

### 1 論文発表

1 Fujii K, Kohno Y, Sugita K, Nakamura M, Moroi Y, Urabe K, Furue M, Yamada M, Miyashita T  
Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients  
Hum Mutat 2003 21(4) 451-452

2 Uchi H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M

CX-659S, a Diaminouracil Derivative, Indirectly Inhibits the Function of Langerhans Cells by Blocking the MEK1/2-Erk1/2 Pathway in Keratinocytes

J Invest Dermatol 2003 Jun, 120(6) 983-989

3 Hawkins WG, Trcka J, Segal N, Blachere NE, Gold JS, Moroi Y, Bowne WB, Lewis JJ, Wolchok JD, Houghton AN

The role of lipopolysaccharide in T-cell responses following DNA vaccination  
Vaccine 2003 21(13-14) 1548-53

4 Terao H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M

Plasma IL-13 Levels in Patients with Atopic Dermatitis

J Dermatol 2003 30(1) 76-7

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 2002 Oct, 30(1) 29-36

6 Morita K, Koga T, Moroi Y, Urabe K, Furue M

Rapid effects of olopatadine hydrochloride on histamine-induced skin response

J Dermatol 2002 29(11) 709-712

7 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-kappaB activation in human monocytes  
J Dermatol Sci 2002 Aug, 29(2) 97-103

8 Trcka J, Moroi Y, Clynes RA, Goldberg SM, Bergtold A, Perales MA, Ma M, Ferrone CR, Carroll MC, Ravetch JV,

Houghton AN  
Redundant and Alternative Roles for  
Activating Fc Receptors and  
Complement in an Antibody-Dependent  
Model of Autoimmune Vitiligo  
Immunity 2002 June, 16 (6) 861-868

9 Koga T, Duan H, Moroi Y, Urabe K,  
Furue M

Activated and mature CD83-positive  
dendritic cells and interferon-gamma-  
positive cells in skin eruptions of  
secondary syphilis

Acta Derm Venereol 83(3) 214-7 2003

10 Nakahara T, Urabe K, Moroi Y,  
Morita K, Furue M

Bepotastine besilate rapidly inhibits  
mite-antigen induced immediate  
reactions in atopic dermatitis

J Dermatol Sci 32 237-8 2003

11 Urabe K, Nakahara T, Moroi Y,  
Morita K, Furue M

Mite-antigen induced immediate  
reaction in atopic dermatitis re inhibited  
by daily administratio of Fexofenadine

J Dermatol 30, 845-846, 2003

## 2 学会発表

1 Chen Q, Koga T, Uchi H, Hara H,  
Terao H, Moroi Y, Urabe K, Furue M

Propionibacterium acnes induces IL-8  
production in human monocytes via NF-  
 $\kappa$ B activation

63rd annual meeting SID 2002, May 15-  
18 Los Angeles

2 Bin Y, 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 keratinocytes and  
fibroblasts

63rd annual meeting SID 2002, May 15-  
18 Los Angeles

3 Moroi Y, Furue M, Houghton AN

The depigmentation induced by  
autoantibody through FcR or  
complement

20th world congress of dermatology,  
2002, July 1-5

4 Obata C, Moroi Y, Urabe K, Koga T,  
Himeno K, Furue M

Immunization with formaldehyde-  
treated tumor cells induced antitumor  
immune responses

International Investigative Dermatology  
2003, April 30-May 4, Miami

5 Koga T, Duan H, Moroi Y, Urabe K,  
Furue M

Histological evidence of nuclear factor  
kappa B p65 activation in skin infectious  
disease

International Investigative Dermatology  
2003, April 30-May 4, Miami

## 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

## 表皮細胞特異的サイトカイン過剰発現マウスについての研究

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** VEGF (vascular endothelial growth factor)は血管増殖、リンパ管増殖作用を有し、さらにマクロファージの遊走、活性化など炎症細胞に作用し炎症反応を調節する。VEGFの皮膚炎における役割を明らかにするため、ケラチン 14 プロモーターを用いてヒト VEGF (165)を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成した。VEGF Tg マウスファウンダーは加齢とともに耳部、顔面、口囲に著明な皮膚炎を生じ、組織学的に表皮増殖、真皮乳頭層の血管増生、血管周囲性細胞浸潤を認めた。6種類の VEGF Tg ラインが確立され、血管増生の顕著な VEGF6Tg マウスを実験に使用した。VEGF Tg マウスは肉眼的にも耳介に血管拡張を有し、組織学的に表皮にヒト VEGF の過剰発現を認め、真皮に CD31 陽性血管内皮細胞の増殖を認めた。以上の結果から VEGF は皮膚における血管増生、リンパ球、組織球の細胞浸潤を誘導することか可能で、皮膚炎症反応の制御に重要であることか明らかにされた。またアトピー性皮膚炎(AD)(n=5)患者末梢血単球より誘導した樹状細胞は3日間培養下において健常人に比べて有意に高値の TARC/CCL17 を産生した。以上から AD の病態において樹状細胞が Th2 のサイトカインの誘導に重要であることか明らかとなり治療の標的となりうる可能性か示された。

### A 研究目的

Vascular endothelial cell growth factor (VEGF)は血管増殖、リンパ管増殖を有し、同時にマクロファージの遊走活性作用を有し、細胞浸潤を誘導するサイトカインである。皮膚における VEGF の産生細胞として表皮ケラチノサイト(KC)、マクロファージなどがあり、またアレルギー性皮膚疾患において血清 VEGF 値の増加か報告されている。VEGF を皮膚特異的に発現するマウスを作成し、アレルギー炎症における VEGF の役割を明らかにし、VEGF による炎症反応の制御を解析することは皮膚炎の形成機序を明らかにする上で重要である。またアトピー性皮膚炎患者(AD)(n=5)の末梢血から単球由来樹状細胞を誘導し、Th2 サイトカインの誘導に関与するケモカインで

ある TARC/CCL17、CCL22 の産生を測定し、健常人と比較した。

### B 研究方法

表皮 KC 特異的に発現させるためケラチン 14 プロモーター領域下にヒト VEGF165 遺伝子を導入し、VEGF Tg マウスを作成し、組織学的変化について解析する。VEGF の炎症反応における制御を検討する。また AD ヒト患者末梢血樹状細胞(DC)を誘導し、TARC/CCL17 産生能について検討した。

### C 研究結果

表皮 KC 特異的に発現する VEGF 165 Tg マウスを作成した。VEGF TG マウスファウンダーは加齢に伴い口囲、顔面、耳介に皮膚炎を