

20030164

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に対する核酸医薬を用いた
新規治療法の開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 玉井 克人

平成16(2004)年4月

重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬を用いた 新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 王井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

核酸医薬である NF κ B decoy oligonucleotides (NDON)を用いた重症アトピー性皮膚炎治療薬の開発と臨床応用を目的とし、具体的には1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NDON およびその他の核酸医薬の治療効果および副作用の検討、2) 表皮角化細胞およびランゲルハンス細胞における NDON 薬理作用の検討、3) 生体皮膚への低侵襲・非観血的高分子 DNA 導入法の開発、4) 核酸医薬の臨床研究展開、を主なテーマとして研究を進めている。平成15年度は、1) NDON は NC/Nga マウスに対してタクロリムスと同等の治療効果を発揮する一方、肥満細胞のアポトーシスは NDON に特異的であること、2) NDON が表皮細胞における MIP-3 α 、および関連サイトカインの産生を抑制しうること、3) STAT6 デコイがアトピー性皮膚炎治療に有効であること、等を明らかにすると共に分担研究者の所属する施設に置いて、第2回臨床研究を行うためのプロトコール作成、倫理委員会への申請を行った。

分担研究者	橋本 公二	愛媛大学 医学部皮膚科	教授
	金田 安史	大阪大学 大学院医学系研究科	教授
	森下 竜一	大阪大学 大学院医学系研究科	教授

A. 研究目的

既存の治療法に抵抗性を示す難治例の少なくない重症アトピー性皮膚炎に対し、これまでにない新しい概念の治療薬である核酸医薬、特に NF κ B decoy oligodeoxynucleotides (NDON) を用いた外用薬を開発し、アトピー性皮膚炎に対する新規治療法としての有用性を検

討するとともに、その臨床研究を進めることを本研究班の研究目的とする。NF κ B は種々のサイトカイン、ケモカイン、成長因子、接着分子、アポトーシス関連分子といった、炎症関連遺伝子群の発現を誘導する転写因子である。NDON は NF κ B と特異的に結合する配列 (CCCTAAAGGG) を含む 20 塩基対

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

- 1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いた NDON およびその他の核酸医薬の治療効果および副作用の検討 コンベンショナルな条件で飼育すると皮膚炎を自然発症する NC/Nga マウスを用い、NDON、その他の核酸医薬の治療効果および副作用を検討する。今年度は NDON 外用剤とタクロリムス外用剤の治療効果を検討する。
- 2) 表皮角化細胞およびランゲルハンス細胞における NDON 薬理作用の検討 ランゲルハンス細胞や表皮角化細胞は、抗原提示、サイトカイン、ケモカイン産生など、アトピー性皮膚炎発症に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの細胞において NDON の標的分子である NF κ B が皮膚炎発症にどのように関与するかを検討し、NDON の

薬理作用を明らかにする。今年度は、前年度に引き続き、表皮角化細胞における NF κ B 関連分子の発現動態を検討する。

- 3) 生体皮膚への低侵襲・非観血的高分子 DNA 導入法の開発 皮膚は角層のバリア機能が極めて良く発達しており、分子量 1 000 を超える分子の通過は困難である。そのため、分子量 12 000 の NDON は搔爬によるひらん局面や顔面などバリア機能の低い部位以外では十分な治療効果が得られない可能性が高い。皮膚炎に対してより有効な核酸医薬を開発するためには、皮膚に高分子 DNA を導入する新たな方法論の開発が必要である。本研究班では、細胞融合能を持つセンダイウイルス (Hemagglutinating Virus of Japan, HVJ) の外被蛋白を利用した新たな遺伝子導入ヘクター、および皮膚の化学処理と超音波を組み合わせた新たな遺伝子導入法 (gene bath) の開発とアトピー性皮膚炎への臨床応用を目指す。今年度は HVJ-liposome ヘクターを用いた STAT 6 テコイ DNA によるアトピー性皮膚炎治療研究を行う。
- 4) 核酸医薬の臨床研究展開 NDON およびその他の核酸医薬について、EBM に基づく臨床研究を行い、その効果と安全性について正

確に評価することか本研究班の最終目的である。平成13年11月より弘前大学附属病院皮膚科において、重症アトピー性皮膚炎に対するNDON軟膏治療の第1回臨床試験（オープン試験）を開始し、重症顔面病変に対する有効性を明らかにした。今年度は第1回試験結果を詳細に解析し、このデータを基に、本研究班員の所属する複数施設における第2回臨床試験（二重盲検試験）のプロトコール作成を行うとともに、各施設の倫理委員会に申請する。

B. 研究方法

- 1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いたNDON治療効果の検討
自然発症皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを用いてNDONおよびタクロリムス軟膏の治療効果を検討した。NC/Ngaマウス(♂、4週令)をコンベンショナル条件下で飼育し、皮膚炎の発生を確認した後、ワセリンを基剤とした1.6%NDON軟膏塗布群、0.1%タクロリムス軟膏塗布群に分けて週2回、1週間塗布し、肉眼的および組織学的皮膚炎状態の改善程度を比較検討した。また、治療前後における炎症細胞浸潤動態変化、アポトーシスの有無、ICAM1の発現パターンの変化についても比較検討した。

- 2) 表皮角化細胞におけるNF κ B関連分子発現動態の検討
NDONの標的であるNF κ Bの表皮角化細胞における発現を検討した。角化細胞を無血清培養法にて培養した後、炎症性サイトカインの代表で、NF κ Bを活性化するTNF- α 、IL-1を添加し、NF κ B-I κ B関連分子の発現および細胞内局在について、蛍光抗体法およびwestern blot法にて検討した。さらに、NF κ Bにより誘導されるサイトカインの一つMIP3 α の発現動態について、培養表皮細胞の分化度の影響を検討した。

- 3) 生体皮膚への高分子DNA導入法の開発
紫外線で賦活化したHVJとliposomeを融合した遺伝子導入ベクターHVJ-liposomeを用い、STAT6テコイDNAをアトピー性皮膚炎モデルマウスに導入して治療効果を検討した。

- 4) NDONの臨床研究展開
弘前大学附属病院でおこなわれた10名の重症成人型アトピー性皮膚炎患者に対する第1回NDON軟膏臨床研究の詳細を検討し、第2回臨床研究（他施設2重盲検試験）をデザインした。

C. 研究結果

- 1) 自然発症皮膚炎モデルマウスを用いたNDON治療効果の検討

タクロリムス投与群に比較して、NF κ B デコイ投与群でより強い皮膚炎抑制効果が得られた。組織学的には、肥満細胞、CD4 ヘルパーT 細胞数、ICAM-1 陽性細胞数および真皮内神経線維数が NF κ B デコイ投与群で有意な減少を示した。また、いずれの群においても投与中止後のリバウンド現象は観察されなかった。

- 2) 表皮角化細胞における NF κ B 関連分子発現動態の検討 表皮角化細胞において、RelA、p50、p52、RelB、I κ B- α の発現が認められた。TNF- α 、IL-1 刺激により I κ B- α のリン酸化が生じるとともに、RelA と p50 が NF κ B 配列に結合することが確認された。また、TNF- α 刺激により RelA、p50 とともに細胞質内から核内へ移行した。また、分化した角化細胞は未分化細胞に比較して、TNF- α 刺激による MIP3 α 産生が有意に増加していた。
- 3) 生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発 HVJ-liposome に STAT6 デコイ DNA を封入し、抗 DNP-IgE 抗体を静脈注入したアトピーモデルマウスに皮下注入すると、症状の 1 つである 24 時間後の耳朶腫脹を有意に抑制した。皮膚組織学的検査において、浮腫、好中球や好酸球の浸潤を STAT6 decoy が著明に抑制し

たが、scramble decoy では効果がなかった。培養肥満細胞は、STAT6 デコイによりヒスタミンの分泌は影響を受けなかったが、TNF- α や IL-6 の分泌が著明に抑制された。

- 4) NDON の臨床研究展開 重症顔面病変に対し、NDON は極めて有効かつ安全という結果を得た。しかし顔面は左右比較試験などに不向きなため、治療効果を確認するための多施設 2 重盲検試験をデザインした。既にそれぞれの施設における倫理委員会にプロトコールを提出し、審査終了ないし継続中である。

D. 考察

本研究班では、平成 14 年度に得られた研究結果を基に、引き続きアトピー性皮膚炎に対する NF κ B デコイの基礎的、臨床的研究を進めると共に、新たな核酸医薬として STAT6 デコイのアトピー性皮膚炎治療への応用の可能性について検討した。

NF κ B デコイ DNA については、本研究班で顔面重症アトピー性皮膚炎治療に有効であることを明らかにした。顔面に対するその他の外用療法として、ステロイド軟膏、タクロリムス軟膏がある。ステロイド軟膏は、作用が速効性であり、臨床現場で第一選択薬として用いられている。しかし、特に顔面では、その局所吸収性が極めて高い為、

酒さ様皮膚炎やステロイド座瘡といった副作用が高頻度に出現し、長期連用は困難である。またタクロリムス軟膏は、NF κ B デコイ軟膏と同様に顔面に特に効果を発揮するが、局所刺激性、免疫抑制作用による感染症の併発が問題となる。NF κ B デコイ DNA は、その分子量が 12800 と大きいため、重症顔面病変でよく吸収され、症状の改善に伴う角層バリアー機能の改善に伴って、吸収量が減少する。即ち、症状軽快後は殆ど吸収されないと予想され、その結果長期連用投与しても副作用出現の心配は殆どないと予想される点で、従来の治療薬に比較して極めて有利であると思われる。NF κ B デコイ DNA 軟膏は、重症時には治療薬、軽症・寛解時には保湿薬として機能することか可能であり、従来の他の治療薬と組み合わせることで使用することにより、それぞれの薬剤の特性を生かしてより有効かつ安全な治療法の開発が期待できる。

平成 14 年度の研究により、NF κ B デコイ DNA は肥満細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにしたが、今年度はさらに、NF κ B デコイ DNA が皮膚炎における CD4 ヘルパー T 細胞数、ICAM1 陽性細胞数、真皮内末梢神経数の減少を誘導することを明らかにした。即ち、NF κ B デコイ DNA は、皮膚炎を構成する多くの炎症細胞や免疫担当細胞に作用していると考えられ

る。

アトピー性皮膚炎を誘導するもう一つの機序として、表皮角化細胞由来サイトカイン産生が考えられる。表皮角化細胞における NF κ B の機能を明らかにする目的で、TNF α 刺激下における表皮角化細胞内 NF κ B 蛋白の動態、および NF κ B の制御を受けるサイトカイン産生制御を検討した結果、表皮細胞の分化度と NF κ B による MIP3 α 産生誘導程度の間には正の相関があることが明らかとなった。表皮角層内に存在するセラミドが表皮細胞の分化を調節する可能性が示唆されており、アトピー性皮膚炎患者角層ではセラミドが有意に低下していることと併せ考えると、NF κ B デコイ DNA による表皮細胞内 NF κ B 制御がアトピー性皮膚炎治療にどのような役割を果たすかについて、さらに検討することは極めて重要であると考えられる。

NF κ B デコイ DNA 以外の核酸医薬として STAT6 デコイ DNA がアトピー性皮膚炎モデルマウスに対する治療効果を有することが明らかとなった。本研究では新たなドラッグデリバリーシステムである HVJ-liposome 法を用いており、これによりデコイ DNA を効率よく生体に導入可能となる。今後この方法の安全性、有効性を確立し、臨床応用の可能性を引き続き検討していく予定である。

NF κ B デコイ DNA 軟膏の第 2 回臨床研究は、4 施設において、二重盲検により開始される予定である。既に倫理委員会に申請済みであり、すべての施設で承認されれば直ちに開始される。この臨床研究が進展すれば、NF κ B デコイ DNA 軟膏の有効性、安全性に関してより詳細な情報が得られるのみならず、本邦で開発された新たなアレルギー新薬として、臨床治験に進む道が得られることが期待される。

E. 結論

NF κ B を標的とした NDON がアトピー性皮膚炎に有効な新薬となりうる可能性が示された。平成 16 年度は、第 2 回臨床試験（二重盲検試験）により、より正確な有効性と安全性を確認すると共に、アトピー性皮膚炎に対するより効果的な核酸医薬の開発を進めていく予定である。

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

分担研究者 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

重症アトピー性皮膚炎患者に対する NDON 軟膏第 1 回臨床試験の結果を詳細に検討し、顔面のひらん局面を有する重症病変に特に有効であることが明らかとなった。これらの結果を基に、顔面病変を第 2 回臨床試験のプロトコールを作成した。第 2 回臨床研究は、3 種類の異なる NDON 濃度を用いた多施設二重盲検試験とすることとした。

A. 研究目的

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

decoy ODN (NDON) に NF κ B を結合し (おとり効果)、標的遺伝子への結合を阻害することによる炎症細胞の局所浸潤抑制、アポトーシス誘導によることが明らかとなった。本研究は、これらの基礎的研究を背景とした、重症アトピー性皮膚炎に対する世界初の NDON 臨床応用研究であり、NDON のアトピー性皮膚炎に対する有効性および副作用の有無を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

弘前大学附属病院で行った 10 例の重症アトピー性皮膚炎患者に対する 2%NDON 軟膏治療研究結果を詳細に検討した。これらの結果を基にして NF κ B デコイ軟膏の有用性、安全性を検

討すると共に、ステロイド軟膏、タクロリムス軟膏との違いを考察した。NF κ B デコイ軟膏の有効性、安全性をより詳細に検討する目的で、他施設 2 重盲検試験をデザインし、各施設の倫理委員会に申請した。

C. 研究結果

第 1 回 NDON 軟膏臨床試験では、NDON 軟膏はアトピー性皮膚炎の顔面病変、特に重度の紅斑、浮腫、湿潤局面に対して極めて有効であることが明らかとなった。その一方で、顔面以外の病変では明らかな有効性は確認し得ず、NDON の部位特異的有効性が存在することが明らかとなった。副作用についての検討では、1 週間の休薬期間を間に挟んだ連日 2 週間投与では、局所、全身ともに明らかな副作用は観察されなかった。これら NDON の有効性、安全性について、より詳細な検討をする目的で、他施設 2 重盲検試験をデザインした。即ち、弘前大学、大阪大学、愛媛大学および岐阜大学の 4 施設において、それぞれ顔面重症病変を有するアトピー性皮膚炎患者 10 名の臨床研究参加希望者を募集し、十分なインフォームドコンセントを得た後に臨床研究を開始する。具体的には、2 週間の washout 期間後に、0.1%、0.5%、1%それぞれの濃度に調整した NDON 軟膏を、医師、患者共に濃度が明示されないよ

う選択し、1 日 2 回、3 週間連日投与し、その有効性、安全性を検討する。既にそれぞれの施設における倫理委員会にプロトコールを提出し、審査終了しないし継続中である。

D. 考察

NDON 臨床研究では、特に顔面の重症病変に対して NDON が極めて有効であることが明らかとなった。既に臨床現場でアトピー性皮膚炎治療に用いられているステロイド軟膏、プロトピック軟膏も顔面病変に対して強い治療効果を示す。しかし、ステロイド軟膏の長期連日投与では、酒渣様皮膚炎、ステロイド座瘡、毛細血管拡張などの強い局所副作用が出現し、タクロリムス軟膏の長期連日投与では免疫抑制作用による感染症の合併が問題となる。今回計画した第 2 回 NDON 臨床試験により、その有効性、安全性についてより多くの情報が得られることが期待される。

E. 結論

第 1 回 NDON 臨床研究結果の詳細を基に、第 2 回臨床研究（二重盲検試験）の詳細が決定された。

F. 研究発表（平成 14 年度）

1 論文発表

分化状態の表皮角化細胞における NF κ B の機能解析

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

分化・未分化での表皮角化細胞における NF κ B, およびその関連蛋白の発現、リン酸化、核移行について詳細な検討を行った。角化細胞では RelA, p50, p52, RelB, I κ B- α が発現しており、TNF- α 刺激により核内へ移行し NF κ B 配列に bind することが明らかとなった。その発現量は分化・未分化により若干の差が認められた。NF- κ B 活性化により産生が誘導される MIP3- α が分化した細胞において産生量が 10 倍高いことは、NDON が外用剤として機能する場合においてより効果的に分化した角化細胞が産生するサイトカインを抑制することが予想された。

A. 研究目的

NF κ B decoy oligonucleotide(NDON)の表皮に与える効果を検討するために、まず表皮角化細胞における NF κ B の機能・役割について明らかにしておくことが必須である。前年度は単層培養系における NF κ B-I κ B 関連の分子、その機能発現に必須であるとされるリン酸化など検討した。NDON は外用剤としての臨床応用の可能性が示唆されており、表皮に吸収された場合その初期の標的細胞は分化した角化細胞である。したがって、分化誘導した角化細胞における NDON の薬理作用解析が望まれる。そこで、本年度は分化した表皮角化細胞における NF κ B-I κ B 関連の分子の発現と、炎症性サイトカインによる発現調節、ならびに NF- κ B 活性化により誘導されるサイトカイン

のうち、MIP3- α を代表としてその産生について検討した。

B. 研究方法

表皮角化細胞は正常ヒト皮膚より無血清培養法にて培養した。継代を繰り返し、4-5 代継代したものを使用した。角化細胞を無血清培養法にて培養し、100%コンフルエントになった時点で培養液を 10%FCSDMEM に変更し 3 日間培養することにより分化を誘導した。この時点で、分化マーカーであるケラチン 1, 10 が誘導され、分化した状態であることを確認した。その後、炎症性サイトカインの代表で、NF κ B を活性化することが知られている分子である TNF- α , IL-1 を添加し、NF κ B-I κ B 関連の分子の発現について western blot 法ならびに gel shift

英語論文

- 1 Oshima K, Shimamura M, Mizuno S, Tamai K, Doi K, Morishita R, Toshikazu Nakamura T, Kubo T, and Kaneda Y
Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats FASEB J in press
- 2 N Umegaki, R. Moritsugu, S Katoh, K Harada, H Nakano, K Tamai, K Hnanada, M Tanaka Photodynamic therapy may be useful to debulk cutaneous lymphoma prior to radiotherapy British J Dermatol in press
- 3 Tamai K, Hashimoto I, Hanada K, Ikeda S, Imamura S, Ogawa H
Japanese guidelines for diagnosis and treatment of junctional and dystrophic epidermolysis bullosa Arch Dermatol Res 2003 2003, 295 24-28
- 4 Kaneda Y and Tamai K Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases Arch Dermatol Res 2003, 295 63-66
- 5 Matsuzaki Y, Tamai K, Kon A, Sawamura D, Utito J and Hashimoto M
Keratinocyte responsive element 3 (KRE3) Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence

in the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG1) gene promoter J Invest Dermatol, 120 308-312, 2003

日本語論文

- 1 玉井克人 先天性表皮水疱症 今日の小児疾患治療指針 第13版 2003, p 576
- 2 玉井克人 先天性表皮水疱症を治す、難治性皮膚疾患を治すスキル、皮膚診療プラクティス 15、2003, p238
- 3 玉井克人他、新規アトピー性皮膚炎治療薬の開発、転写因子 NF κ B を標的とした ODN 臨床応用、アレルギーの臨床 23、2003、p196
- 4 玉井克人他、アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬導入による新しい治療法、アレルギー・免疫、10、2003、p89-96、

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

assay で検討した。さらに、NF- κ B 活性化により産生が誘導される MIP3- α について mRNA、蛋白レベルでの発現を分化、未分化状態で比較した。

C. 研究結果

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

Gel shift assay では、TNF- α , IL-1 刺激により NF κ B 配列へ bind する蛋白が確認された。supershift assay を施行したところ、bind する蛋白は分化、未分化ともに RelA と p50 であることが確認できた。binding 活性は未分化では刺激後 30 分で最も増強されるのに対し、分化した状態では 1 時間後に NF κ B 配列への結合が認められたか、未分化の状態と比較すると程度は弱いものであった。

MIP-3 α の TNF- α 刺激による産生を mRNA、蛋白レベルで比較すると、未分化では、mRNA は 1 時間後をピークとして増加するが、3 時間以降は base level に復帰した。一

方、分化した細胞では 3 時間をピークとして 12 時間後まで mRNA が増加していた。分泌された蛋白量を ELISA 法にて定量したところ、蛋白産生量は分化細胞では、未分化細胞と比較して約 10 倍程度産生が増加していた。

D. 考察

分化・未分化での表皮角化細胞における NF κ B, およびその関連蛋白の発現、リン酸化、核移行については詳細な検討はなされていなかった。今回の検討で、角化細胞では RelA, p50, p52, RelB, I κ B- κ が発現しており、TNF- α 刺激により核内へ移行し、NF κ B 配列に bind することが明かとなった。その発現量は分化・未分化により若干差があることが明らかになった。NF- κ B 活性化により産生が誘導される MIP3- α が分化した細胞において産生量が 10 倍高いことは、NDON が外用剤として機能する場合においてより効果的に分化した角化細胞が産生するサイトカインを抑制することが予想された。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表 (平成 15 年度)

1 論文発表

英語論文

Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M
Human herpesvirus 6 and drug allergy **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 2003, 3 255-60

Nanba D, Mammoto A, **Hashimoto K**, Higashiyama S
Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF **J Cell Biol** 2003, 163 489-502

Iwamoto R, Yamazaki S, Asakura M, Takashima S, Hasuwa H, Miyado K, Adachi S, Kitakaze M, **Hashimoto K**, Raab G, Nanba D, Higashiyama S, Hori M, Klagsbrun M, Mekada E
Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function **Proc Natl Acad Sci USA** 2003, 100 3221-6

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, **Hashimoto K**
Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation **J Biol Chem** 2003, 278 40026-31

Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa SI, **Hashimoto K**, Yoshida N, Takenawa T
Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment **EMBO J** 2003, 22 2981-2991

Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y, Okuda S, Maeda N, Kanda F, Yasukawa M, **Hashimoto K**, Horikawa T, Ueda M
Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome **Acta Derm Venereol** 2003, 83 128-31

Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, **Hashimoto K**, Sugai M
Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial

peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes **Infect Immun** 2003, 71 3730-9

Shibata R, Kai H, Seki Y, Kato S, Wada Y, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Yoshimura A, Imaizumi T
Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells **Hum Gene Ther** 2003, 14 601-10

Yamasaki K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Shirakata Y, Sayama K, Hanada T, Yoshimura A, **Hashimoto K**
SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes **J Invest Dermatol** 2003, 120 571-80

Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, **Hashimoto K**
Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor β autoinduction A negative feedback mechanism for keratinocyte growth **J Invest Dermatol** 2003, 120 1030-1037

Hamada K, Kohno S, Iwamoto M, Yokota H, Okada M, Tagawa M, Hirose S, Yamasaki K, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Ito M
Identification of the Human IAI 3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy **Cancer Res** 2003, 63 2506-12

Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitzu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K**, Yasukawa M
Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells **J Immunol** 2003, 170 2205-13

Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, **Hashimoto K**
Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex **J Dermatol**

2003, 30 135-40

Wada T, Shirakata Y, Takahashi H, Murakami S, Iizuka H, Suzuki H, **Hashimoto K** A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol** 2003, 149 185-8

Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K** So-called biological dressing effects of cultured epidermal sheets are mediated by the production of EGF family, TGF- β and VEGF **J Dermatol Sci** 2003, 32 209-15

日本語論文

- 1 藤山幹子、**橋本公二** 薬剤誘発性過敏症症候群 *medicina* 40 997-9, 2003
- 2 藤山幹子、**橋本公二** drug-induced hypersensitivity syndrome と HHV-6 臨床免疫 40 219-21, 2003
- 3 **橋本公二** D I H S の経緯と診断基準 *医学のあゆみ* 205 951-4, 2003
- 4 **橋本公二** D I H S とはなにか *アレルギー・免疫* 10 811-5, 2003
- 5 山崎研志、白方裕司、佐山浩二、**橋本公二** 角化細胞の幹細胞 *再生医学* 40 218-225, 2003
- 6 藤山幹子、**橋本公二** 薬剤誘発性過敏症症候群 *アレルギー科* 15 381-6, 2003

2 学会発表

Yamasaki K, Dai X, Nanba D, Shiraiishi K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K** PLZF regulates and suppresses melanoma proliferation and tumor growth *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Amagai M In vitro keratinocyte dissociation assay to evaluate blister-inducing activity of pemphigus IgG autoantibodies *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, **Hashimoto K** Novel role of angiotensin II in fibroblasts induction of fibroblast migration by angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF receptor transactivation *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Higashiyama S, **Hashimoto K** Keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice show marked retardation of skin wound healing *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Nanba D, Shirakata Y, Nakanishi Y, Hieda Y, Ishiguro H, Higashiyama S, **Hashimoto K** Epidermal hyperplasia and impaired morphogenesis of hair follicles in mice overexpressing a soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Dai X, Yamasaki K, Yahata Y, Tokumaru S, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, **Hashimoto K** All trans-retinoic acid induces production of IL-8 in human keratinocytes via increased phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K, Sayama K, Tsuda T, Tan E, **Hashimoto K** production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-like receptor 3 in human keratinocytes *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003, USA

Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Sugai M, Ichijo H, **Hashimoto K** Epidermal differentiation regulates the production of innate antimicrobial peptides in the skin International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003, USA

Tokumaru S, Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K** EGF receptor transactivation by UV-irradiation is mediated via HB-EGF shedding in human keratinocytes International Investigative Dermatology 2003 Miami Beach May 2003, USA

Hashimoto K Drug induced hypersensitivity syndrome (DIHS) 13th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology, Daejeon Oct 2003, Korea

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

生体皮膚への遺伝子導入法の開発、難治性皮膚疾患遺伝子治療法の開発

分担研究者 金田 安史 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー皮膚炎に対する治療法開発のため STAT6 decoy を HVJ-liposome を用いて皮下注入したところ、アトピーマウスにおける症状、組織学的変化を有意に抑制した。これは肥満細胞における TNF- α や IL-6 などのサイトカインの分泌抑制によることがわかった。

A. 研究目的

アトピー皮膚炎に対する治療法を開発し、その機構を明らかにするとともに臨床応用の可能性を探る。

B. 研究方法

今回は STAT6 を抑制する二重鎖オリゴ核酸 (デコイ) の効果について検討した。東京医科歯科大学の横関らは STAT6 のノックアウトマウスにおいて、抗 IgE 抗体によるアトピー性皮膚炎が抑制されることを報告している。そこで今回我々は、STAT6 を成育マウスの皮膚組織で抑制するために NF κ B decoy の前例にならって、STAT6 の DNA 結合配列をもつデコイを合成し HVJ-liposome を用いてマウス皮膚組織に導入を行った。デコイとしては、5'-GAT CAA GAC CTT TTC CCA AGA AAT CTA T-3' と 3'-CTA GTT CTG GAA AAG GGT TCT TTA GAT A-5' をアニールした 28 mer の二重鎖と

し、コントロールとして scramble decoy ODN, (5'-CGA AAA TTC GTT AAA TCA CTA GCT TAC C -3' と 3'-GCT TTT AAG CAA TTT AGT GAT CGA ATG G-5' をアニールした二重鎖) を用いた。HVJ-liposome は負電荷型のリポソームに不活性化した HVJ を融合することにより作成した。

C. 研究結果

HVJ-liposome にデコイを封入し皮下に注入した。蛍光ラベルのオリゴ核酸を導入したところ、表皮の下層部に瀰漫性に導入が見られた。抗 DNP-IgE 抗体を静脈注射した皮膚組織の核抽出液中では STAT6 への結合活性が上昇していたか、STAT6 decoy を導入することによってその結合活性が阻害されることがケルシフトアッセイで認められた。抗 DNP-IgE 抗体を静脈注入したアトピーモデルマウスに STAT6 decoy を皮下注入すると症状の 1 つである 24 時間後の耳朶腫脹

を有意に抑制した。1時間後の耳朶腫脹は抑制しなかった。また骨格筋投与においても同様な抑制効果が得られた。皮膚組織学的検査において、STAT6 decoy によって浮腫、好中球や好酸球の浸潤を STAT6 decoy が著明に抑制したが、scramble decoy では効果がなかった。その機構の解明のために肥満細胞を培養して IgE 受容体の刺激後に STAT6 decoy を導入した。これによってヒスタミンの分泌は影響を受けなかったか、TNF- α や IL-6 の分泌が著明に抑制されたが、interferon- γ の分泌は抑制されなかった。

D. 考察

STAT6 decoy は in vivo においても Th2 サイトカインの分泌抑制によってアトピー症状の改善を誘起している事が示唆された。今後は1回の投与での症状の抑制期間を検討する必要がある。

E. 結論

STAT6 decoy を封入した HVJ-liposome はアトピーの効果的な治療剤として有用である。

F. 健康危険情報

特に有害な薬剤や作業は含まれなかった。

G. 研究発表 (平成 15 年度)

1 論文発表

1) Kaneda, Y and Tamai, K Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of

intractable skin diseases Arch Dermatol Res 295, S63-66, 2003

2) Ogushi I, Imuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, Tsutsui H, Nakanishi K, Morishita R, Kaneda Y, Fujimoto J Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model Hepatology 38, 335-344, 2003

3) Wu, M-H, Yokozeki, H, Takagawa, S, Yamamoto, T, Satoh, T, Kaneda, Y, 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

4) Yamazaki, S, Iwamoto, R, Saeki, K, Asakura, M, Takashima, S, Yamazaki, A, Kimura, R, Mizushima, H, Moribe, H, Higashiyama, S, Endoh, M, Kaneda, Y, Takagi, S, Itami, S, Takeda, N, Yamada, G, and Mekada, E. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities J Cell Biol 163, 469-475, 2003

2 学会発表

第102回日本皮膚科学会総会 教育講演 “遺伝子治療の現状と将来展望”
金田安史 (平成15年5月23日 浦安)

NDON 外用療法のプロトコール作成 新規核酸医薬の開発に関する研究

分担研究者 森下 竜一 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療の基礎的・臨床的研究を行う。炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NF κ B に注目し、NF κ B の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬 (NDON) の治療法としての可能性をさらに詳細に検討した。これまでに我々はアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた基礎的検討において NDON 塗布の効果を示してきたが、今年度はその詳細なメカニズムを検討し、さらに既にアトピー性皮膚炎治療薬として既に市販されている免疫抑制剤タクロリムス軟膏との比較検討を行い、その非劣性及び一部優位性を示した。今後臨床研究を行うとともに、新しい治療法の開発を目指す。

A. 研究目的

炎症関連遺伝子を制御する転写因子 NF κ B に注目し、NF κ B の転写因子活性を阻害するおとり型二重鎖核酸医薬 (NDON) を用いたアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、NDON の作用機序について詳細に検討する。また免疫抑制剤タクロリムス軟膏との効果比較を行う。

C 研究結果

アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて、16%NF- κ B テコイ軟膏群、タクロリムス軟膏、スクランフルデコイ

(コントロール群) において比較検討した。臨床症状スコアでは塗布開始後 05 週において 16%NF- κ B テコイ軟膏は 01%タクロリムス軟膏に比べ有意にスコアが低下していた。塗布開始後 1 週ではともに有意差なくスコアが減少しており、非劣性が示された。さらに HE 染色において 16%NF- κ B テコイ軟膏は他の 2 つに比較して表皮肥厚が改善しており、トルイシン青染色において 16%NF- κ B テコイ軟膏は他の 2 つに比べ肥満細胞数が有意に減少していた。また TUNEL 染色では 16%NF- κ B テコイ軟膏は他の 2 つに比べアポトーシス細胞数が有意に増加。さらに免疫染色による検討で 16%NF- κ B テコイ軟膏はスクランフ

H 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

「所望の機能的性質を有する核酸
の単離方法およびそのためのキッ
ト」

2003年11月20日出願 PCT/JP03/14

ルに比へ ICAM-1 発現が有意に減少していたが、CD4 染色において T cell に関しては 3 者いずれも有意差がみられなかった。

D 考察

このように NODN は表皮肥厚を改善させ、種々のケモカインを放出する肥満細胞を減少させることができる。これは NODN の肥満細胞に対するアポトーシス誘導によっても示されている。また炎症性細胞浸潤を促進する ICAM-1 の発現も減少させており、NODN の効果を裏付ける基礎的データを得ることかできた。

E. 結論

NODN はケモカインを放出する肥満細胞死の誘導、炎症性細胞浸潤を促す ICAM-1 の発現抑制などにより、モデル動物において有効性を示しており、またその効果はタクロリムス軟膏と同等以上であった。NODN はアトピー性皮膚炎の新しい有効な治療薬になりうると考えられた。

F 健康危険情報

臨床研究において、NODN に起因すると考えられる重篤な有害事象は現在確認されていない。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 K Yamasaki, T Asai, M Shimizu, M Aoki, N Hashiya, H Sakonjo, H Makino, Y Kaneda, T Ogihara, R Morishita Inhibition of NF κ B activation using cis-element 'decoy' of NF κ B binding site reduces neointimal formation in porcine balloon injured coronary artery model Gene Therapy 2003, 10 356-364
- 2 Ryuchi Morishita, Yasufumi Kaneda, Toshio Ogihara Therapeutic Potential of Oligonucleotide-Based Therapy in Cardiovascular Disease Current Opinion 2003, 17 383-389
- 3 森下竜一 皮膚関連疾患に対する遺伝子治療 日本皮膚科学会雑誌 2003 年 113 巻第 13 号 1940-1942
4. H Azuma, N Tomita, Y Kaneda, H Koike, T Ogihara, Y Katsuoka, and R Morishita Transfection of NF κ B-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts Gene Therapy 2003, vol 10-no 5 415-425