

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成17(2005年)3月

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

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 17 (2005 年) 3 月

## 目 次

### I 平成 16 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皮膚科学分野) 西岡 清

----- 1

### II 平成 16 年度分担研究報告書

1. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制  
(東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野) 横関博雄 西岡清

----- 5

2. 難治化病態の解明と治療法の開発  
「IgE/FcεRI を介する第 3 相反応の解析」  
(東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野) 鳥山 一

----- 13

3. FcεRI を標的としたアレルギー疾患治療薬の開発  
(大阪大学大学院皮膚病態学講座) 片山 一朗

----- 19

# I 平成 16 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

主任研究者 西岡 清 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 名誉教授

研究要旨 難治性アトピー性皮膚炎の難治化病態解析と、その解析結果に基づく新しい治療法の開発を目的として活動し、以下の研究成果を得た。

1 IgE 遺伝子導入動物において発見されたアレルギーの新しい炎症反応、すなわち、IgE の第3相反応は、アレルギー投与後3～4日目にピークとなる非常に強い炎症反応で、アトピー性皮膚炎症状の難治化を考える上で興味深い反応である。この反応の責任細胞の同定を行い、骨髄由来の DX5<sup>+</sup> asialoGM1<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup> 細胞で、好塩基球に相当する細胞であることが明らかになった。

2 IL-4 受容体からのシグナルを伝達する分子である STAT6 に対するおとり核酸 (Decoy) が、IgE によるアレルギー炎症の即時型反応 (第1相反応) と遅発型反応 (第2相反応) を抑制することをすでに明らかにしたので、今年度は、第3相反応に対する STAT6 decoy の抑制効果を検討した。STAT6 decoy の前投与によって、第3相反応の約40%が抑制された。

3 FcεRI が局在する細胞膜上の lipid raft を修飾する Methyl-β-cyclodextrin あるいは外来コレステロールがアレルギー炎症を抑制する可能性が示された。

以上、アトピー性皮膚炎の治療の標的ならびに新しい治療薬開発の可能性を示す価値ある成果が得られた。

### 分担研究者

鳥山 一 東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー分野 教授

横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授

片山一朗 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座 教授

抗体産生亢進により引き起こされる炎症反応が混在している。前者の皮膚バリア機能異常による炎症反応は生活指導と軟膏療法で比較的容易に治療が可能であるが、Th2 細胞を介する IgE 産生亢進によって引き起こされるアレルギー炎症反応に対する有効な治療法は確立していない。本研究では、すでに樹立したアトピー性皮膚炎のモデルマウスを解析することにより難治化する病態の解析を行うとともに、このモデルマウスを用いてシグナル伝達分子を標的として核酸医薬であるおとり (decoy) 型核酸を用いた遺伝子治療、FcεRI が局在する Lipid raft の機能修飾による治療法・治療薬を開発する。

### A. 研究目的

近年増加傾向にあるアトピー性皮膚炎に対して、種々の治療薬の導入が行われているが、成人型アトピー性皮膚炎をはじめとする難治症例の減少傾向は見られていない。難治性アトピー性皮膚炎は、患者の生活の質を大きく障害する事から重要な社会問題にまで発展している。本症の病態には、皮膚バリア機能異常に基づく炎症反応と、Th2 細胞を介した IgE

### B. 研究方法

昨年度の活動に引き続いて、以下の成果が得られ

た。

### 1. IgE/FcεRI を介する第3相反応の解析

IgE 遺伝子導入マウスの皮膚反応を検討する過程で、即時型反応、遅発型反応に続いて、抗原投与後3～4日にピークを示し、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。この第3相反応は、抗原特異的IgEの受動転嫁によっても引き起こされ、強い炎症反応が長期にわたって持続することから、アトピー性皮膚炎における炎症の遷延化に関連すると考えられる。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、T細胞、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、昨年引き続き、各種抗体で処理した骨髄由来細胞を移入したマウスを用いて、第3相反応の責任細胞を明らかにする研究を行った。FcεRI欠損マウスに正常骨髄細胞を移入することにより第3相反応は誘導されたが、脾臓細胞あるいは骨髄細胞由来培養肥満細胞の移入では、反応は誘導されなかった。さらに検討を加えた結果、責任細胞は、骨髄由来の放射線感受性を持ち、NK細胞マーカー(DX5)、asialoGMIを表面に発現するFcεRI陽性細胞であり、好塩基球あるいは好塩基球様細胞であることが明らかになった。今後この細胞を標的とした治療法の開発が考えられる。

### 2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制

主任研究者の西岡と分担研究者の横関は、IL-4受容体のシグナル伝達分子であるSTAT6を欠損したマウスにおいて、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アレルギー炎症の抑制を検討している。IgE受動感作による遅発型反応ならびにアレルギー反応の抑制によ

て引き起こされるアレルギー炎症反応は、ともに、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。今年度は、IgEを介する第3相反応に対するSTAT6 decoyの炎症反応抑制効果を検討した。STAT6 decoyを惹起反応前に前処理することにより、第3相反応の約40%が抑制された。反応局所の炎症細胞は、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。この抑制を明らかにするため、肥満細胞欠損マウスであるW/WマウスとSL/SLマウスについて検討したところ、W/Wマウスでは、骨髄由来培養肥満細胞を移入することにより第3相反応を誘導できたが、細胞内シグナル伝達が障害されているSL/SLマウスでは反応の回復が見られなかった。この差は、それぞれのマウスで、肥満細胞の欠損を誘導するメカニズムが異なっているためと考えられる。第3相反応は、STAT6 decoyによって100%抑制されなかったことは、第3相反応は、鳥山らが明らかにした責任細胞に加え、肥満細胞が関与していることを示唆するものと考えられる。この点についてはさらに検討する必要がある。しかし、STAT6 decoyが即時型反応、遅発型反応に加えて、第3相反応の一部を抑制することから、アレルギー炎症に対する新しい治療薬となりうることを示唆される。

### 3. FcεRI を標的としたアレルギー疾患治療薬の開発

細胞膜上の受容体や抗原を含む細胞膜関連蛋白は、Triton Xなどの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。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内に移動することが想定されている。分担研究者の片山は、昨年度に確立した樹状細胞のIgE依存性TARC発現を指標として、lipid raft機能を測定した。健常者あるいはアトピー性皮膚炎患者の樹状細胞にIgEならびに抗原を投与することによってTARC産

生が亢進する。これに Lipid raft を修飾する操作を加え、FcεRI のシグナル伝達を阻止すると、TARC 産生が抑制される。コレステロール枯渇による Lipid raft の不活化をきたす Methyl-β-cyclodextrin は、樹状細胞の IgE 依存性 TARC 産生を著明に抑制した。また、Lipid raft を不安定化させる外来性コレステロールの添加によっても、TARC 産生が抑制された。しかし、アトピー性皮膚炎患者由来の樹状細胞による TARC 産生に対する抑制効果は、健常者由来樹状細胞に比して、比較的弱いものであった。これは、患者樹状細胞で FcεRI からのシグナルがより多くだされているためと考えられる。そこで、試験的に、アトピー性皮膚炎患者に 10%コレステロール軟膏を外用させたところ、皮膚症状の改善がみられた。以上から、Methyl-β-cyclodextrin、コレステロールをはじめとする Lipid raft を修飾する薬物の検討により、新しい治療薬が開発できる可能性を示した。

### C. 研究結果

今年度の研究成果として、①IgE を介する慢性アレルギー反応のモデルとなる IgE を介する第3相反応の責任細胞が、DX5<sup>+</sup>asialoGM1<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup>の骨髄細胞で、抗塩基球あるいは抗塩基球様細胞あることが明らかとなり、今後、慢性アレルギー反応の治療薬開発の標的細胞が絞られてきたこと、②IgE を介する即時型反応、遅発型反応に続いて、第3相反応の約40%強の反応が STAT6 decoy の前投与によって抑制されること、さらに、③lipid raft を不活化あるいは不安定化をきたす Methyl-β-cyclodextrin や外来性コレステロールがアレルギー炎症を抑制すること、が明らかになった。特に、第3相反応は、STAT6 decoy の投与で反応の一部が抑制されることから、第3相反応の責任細胞である DX5<sup>+</sup> asialoGM1<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup>好塩基球と肥満細胞との関わりがどのようになっているかの検討が必要となってきた。好塩基球が抗原刺激

を受けた後、どのような形で、また、どのような細胞の助けを得て、超遅延型（3～4日後にピークとなる）反応を発現してくるのか、また、肥満細胞がどのように関与するかについての検討が必要となる。さらに、好塩基球機能を調節する薬物の検討が必要となろう。STAT6 decoy はアレルギー炎症に対する一つの治療薬としての位置を得るところまできているが、第3相反応の責任細胞が明らかになったことにより、さらに新しい治療薬開発の可能性がでてきている。

一方、Lipid raft 機能調節によってアレルギー炎症の抑制の可能性が示されたことは、今後の治療薬開発に新しい方向性を示すものと期待される。

### D. 考察

平成16年度の研究によって、IgE を介する第3相反応の責任細胞を明らかにすることができた。この第3相反応に対して STAT6 decoy がその炎症反応の一部を抑制したことから、STAT6 decoy がアレルギー炎症の治療薬となりうる事が明らかになった。さらに、細胞膜上の lipid raft を修飾する外来性コレステロールが皮膚炎の治療薬となる可能性が示されたことは、アトピー性皮膚炎の治療法開発にとって価値ある成果が得られたと考える。

### 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 16 年度分担研究報告書



## STAT6 decoy ODN による TNP 特異的 IgE 誘導性第 3 相耳介腫脹反応の抑制機序の解析

分担研究者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授  
分担研究者 西岡 清 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 名誉教授  
研究協力者 金井康真 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 大学院生  
鷺見浩史 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 大学院生

**研究要旨** 今までに、我々は STAT6 decoy ODN が抗原特異的 IgE 誘導性遅発型反応、急性、慢性接触過敏症の耳介腫脹反応を抑制することを明らかにした。近年、TNP 特異的な IgE 遺伝子を導入した transgenic マウスが確立された。このマウスは耳介皮下に TNP-OVA を単回投与すると即時型反応（第 1 相）ならびに遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応が現れ、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。また、この反応は抗 TNP-IgE 抗体を受動感作させることによっても誘導できる。今回、このモデルを用いて STAT6 decoy ODN の有用性を検討した。マウスの尾静脈に 300 $\mu$ g の抗 TNP-IgE 抗体を投与し受動感作させ、耳介に約 0.3nmol/ear の STAT6 decoy ODN を皮下投与した。1 日後に 10 $\mu$ g/ear の TNP-OVA を耳介に皮下注射し、第 3 相耳介腫脹反応について病理組織、および ELISA 法による組織中のサイトカイン・ケモカイン量を検討した。陰性対照群には 10 $\mu$ g/ear の OVA を皮下注射した。STAT6 decoy ODN 投与群は陽性対照群、Scrambled decoy ODN 投与群に比較して耳介腫脹反応が抑制され、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。さらに、組織中の IL-4、IL-6、IL-13、TARC、CTACK、eotaxin、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1、TCA-3 の蛋白量も減少した。STAT6 decoy ODN が IgE 誘導性の第 3 相耳介腫脹反応を抑制したことから、IgE 依存性炎症反応に対する遺伝子治療の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の皮膚病変形成には、IL-4・IL-13 などの Th2 サイトカインが重要であると考えられている<sup>1)2)</sup>。そして IL-4・IL-13 受容体のシグナル伝達に関わる転写調節因子は Signal Transducers and Activators of the Transcription 6 (STAT6) として知られている<sup>3)</sup>。従って、STAT6 の制御はアトピー性皮膚炎に代表される IgE 依存性の慢性アレルギー性炎症反応治療において有効な手段になると推測される。

近年、慢性アレルギー性炎症のモデルマウスとし

て 2,4,6-trinitrophenol (TNP) 特異的な IgE を恒常的に発現しているマウス (TNP-IgE transgenic マウス) が樹立された<sup>4)</sup>。このマウスでは TNP-OVA の皮下投与により即時型皮膚反応 (第 1 相反応)、遅発型皮膚反応 (第 2 相反応) さらに、慢性アレルギー性皮膚炎症反応 (第 3 相反応) が誘導される<sup>5)</sup>。そして第 3 相反応では、好酸球などの細胞浸潤数の増加や表皮の肥厚が観察され、アトピー性皮膚炎病変部の組織反応に類似する<sup>1,5)</sup>。また、これらの反応は、抗 TNP-IgE 抗体による受動感作によっても誘導できる。

今回我々は、この IgE 依存性皮膚炎反応モデルを用いて、STAT6 decoy ODN 投与による炎症抑制効果とアトピー性皮膚炎に代表される慢性アレルギー性炎症反応に対する治療薬としての可能性につき検討した。Decoy ODN とは、特定の転写調節因子が対応する部位へ結合するのを競合的に阻害し、プロモーター活性を低下させることにより遺伝子群の発現抑制を行うものである<sup>6)</sup>。今回、遺伝子の標的細胞への導入に際し、STAT6 decoy ODN を細胞膜融合能がある HVJ-envelope に封入した<sup>7)</sup>。

今回の研究で、IgE 依存性第3相反応に対して STAT6 decoy ODN が抑制効果を示すことが明らかとなり、さらにその作用機序についても検討を加えた。

## B. 研究方法

BALB/c マウス、C57BL/6J マウス、C3H/HeN マウス、CD-1 (ICR) *-nu/nu* マウスはオリエンタル酵母社より購入した。TNP-IgE transgenic マウス<sup>4)</sup>は東京医科歯科大学免疫アレルギー分野の鳥山一教授より供与頂いた。

### 1) Decoy ODN の合成と投与方法

用いた decoy ODN の配列には次のものを用いた<sup>8)</sup>。STAT6 decoy ODN ; 5'-GAT CAA GAC CTT TTC CCA AGA AAT CTA T-3'、3'-CTA GTT CTG GAA AAG GGT TCT TTA GAT A-5'。Scrambled decoy ODN ; 5'-CGA AAA TTC GTT AAA TCA CTA GCT TAC C-3'、3'-GCT TTT AAG CAA TTT AGT GAT CGA ATG G-5'。二重鎖 ODN は TE buffer (Wako 社) に溶解し、95°C から 20°C に3時間かけアニーリングし合成した<sup>8)</sup>。

### 2) TNP-IgE transgenic マウスを用いた耳介腫脹反応

の誘導

TNP-IgE transgenic マウスの耳介に 10 $\mu$ g の TNP-OVA を皮下投与し、耳介腫脹反応を用いて経時的に測定した。

### 3) 受動転嫁による TNP 特異的 IgE 依存性耳介腫脹反応の誘導

マウスの尾静脈に 300 $\mu$ g の抗 TNP-IgE 抗体を投与。翌日 10 $\mu$ g の TNP-OVA を皮下注射し、耳介腫脹反応を経時的に測定した。また、一部の実験では耳介に 1% TNCB (in acetone : olive oil = 1 : 4) を 20 $\mu$ L 塗布することで耳介腫脹反応を惹起した。

### 4) 2,4-Dinitrophenol (DNP) に対する IgE 依存性耳介腫脹反応の誘導

5 $\mu$ g の抗 DNP-IgE 抗体 (ICN バイオメディカル社) を尾静脈より投与し、翌日 30 $\mu$ g の DNP<sub>4</sub>-OVA (LSL 社) を耳介に皮下投与し耳介腫脹反応を経時的に測定した。

### 5) Decoy ODN 及び抗体の蛍光標識

一部の STAT6 decoy ODN には RodaminB を標識した。MAR-1 抗体 (e-Bioscience 社) と CD-4 抗体 (BioLegend 社) には FITC を標識した。

## C. 研究結果

### 1) STAT6 decoy ODN による第3相耳介腫脹反応の抑制

TNP-IgE transgenic マウスにおいて IgE 依存性の第3相反応を誘導させ、STAT6 decoy ODN による抑制効果を検討した。Fig. 1 a に示す通り、STAT6 decoy ODN は第3相耳介腫脹反応を有意に抑制した。

第3相反応のピーク時 (惹起から4日後) における病理組織学的検討をしたところ、STAT6 decoy ODN

による細胞浸潤数の顕著な減少が観察された (Fig. 1 b)。

IgE 依存性の第 3 相反応は、抗 TNP-IgE 抗体静脈注射による受動感作によっても誘導することができる。そこで BALB/c マウスを用いて STAT6 decoy ODN の効果を検討したところ、TNP-IgE transgenic マウスと同様に第 3 相耳介腫脹反応の抑制がみられた (Fig. 2 a)。

第 3 相反応の耳介組織では好酸球、好中球、リンパ球、肥満細胞数の減少が確認された (Fig. 2 b, c, d)。さらに総肥満細胞に対する脱顆粒肥満細胞数の割合も陽性対照群・Scrambled decoy ODN 投与群ではそれぞれ 83%、86%であったのに対し、STAT6 decoy ODN 投与群では 37%と低下していた (Fig. 2 d)。

次に、他の strain においても同様の抑制効果が得られるかを検討した。Fig. 3 a, b のように C57BL/6J マウスや C3H/HeN マウスにおいても抑制が確認された。また、TNCB 塗布で惹起時 (Fig. 3 c)、抗 DNP-IgE 抗体で感作後、DNP-OVA で惹起時 (Fig. 3 d) においても STAT6 decoy ODN による抑制効果がみられた。

## 2) サイトカイン・ケモカインの定量

BALB/c マウスにおいて第 3 相反応のピーク時 (惹起から 5 日後) に採取した耳介組織を用いて STAT6 decoy ODN による局所でのサイトカイン・ケモカイン産生量の変動を ELISA 法で測定した。Fig. 4 に示す通り STAT6 decoy ODN は、IL-4、IL-6、IL-13、TARC、CTACK、eotaxin、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1、TCA-3 の産生量を抑制した。IL-5、MDC、RANTES の産生量においては差が認められなかった。また、IFN- $\gamma$ 、IP-10 の産生量は、STAT6 decoy ODN 投与群、Scrambled decoy ODN 投与群ともに上昇し

ており両者間に差はみられなかった。

## 3) STAT6 decoy ODN の導入細胞の解析

抗 TNP-IgE 抗体で受動感作した BALB/c マウスに RhodaminB 標識した STAT6 decoy ODN を皮下投与し、

翌日に TNP-OVA にて惹起。Fig. 5 に示す通り Fc $\epsilon$ RI 陽性細胞と CD4 陽性細胞への STAT6 decoy ODN の導入が確認された。

また、表皮細胞や真皮の紡錘形の線維芽細胞と思われる細胞にも STAT6 decoy ODN の陽性所見がみられた。

## D. 考察

遺伝子治療法における手段の一つとして、antisense oligonucleotides (antisense ODN) や decoy oligodeoxynucleotides (decoy ODN) といった核酸医薬剤が注目されている。Antisense ODN は、遺伝子の相補性を利用し、特定の遺伝子の発現を抑制する。従って、antisense ODN の作用機序は転写段階での阻害、RNA の分解促進、RNA の膜透過阻害、翻訳の阻害と考えられる。一方、decoy ODN の作用機序はプロモーター活性の低下である<sup>6)</sup>。今回、decoy ODN が antisense ODN より安定性の高いこと、作用機序が明確であることを考慮して decoy ODN による遺伝子治療の可能性を検討することとした。また、decoy ODN の標的細胞へ導入には HVJ-envelope を用いた<sup>7)</sup>。HVJ-envelope 上のノイラミニダーゼタンパク質は、細胞膜上に存在するシアル酸受容体と特異的に結合し、HVJ-envelope 上の F<sub>1</sub> タンパク質を活性化することにより膜融合を起こし、decoy ODN を細胞質内に導入する<sup>7)</sup>。この膜融合による導入のメリットは、

カチオン性脂質を主成分とした一連の非ウイルス性トランスフェクションツールでみられるリソソームによる導入分子の分解を受けない点である<sup>7)</sup>。さらに、*in vitro* だけでなく *in vivo* でも適用が可能であり、従来の HVJ-liposome よりも ODN の細胞導入効率が高いと報告されている<sup>7)</sup>。

さて、このようにして調整・作製した STAT6 decoy ODN 皮下投与は抗 TNP-IgE 抗体誘導性第3相耳介腫脹反応を著明に抑制した。また、組織学的検討の結果、STAT6 decoy ODN によりリンパ球浸潤のみならず好酸球、好中球、肥満細胞浸潤も減少していた。

現在、STAT6 のシグナル経路は肥満細胞<sup>9)</sup>、好塩基球、CD4 陽性 Th2 細胞、線維芽細胞、内皮細胞において知られている。これらの細胞に STAT6 decoy ODN が導入されているかを検討するために RhodaminB 標識した STAT6 decoy ODN を用いて解析した。結果、FcεRI 陽性細胞と CD4 陽性細胞への導入が確認された。しかし、今回の実験では FcεRI 陽性細胞が肥満細胞か好塩基球かは明らかではない。内皮細胞への導入ははっきりと確認できず、今後検討していく予定である。

STAT6 decoy ODN 投与は組織中の IL-4、IL-13、IL-6 といったサイトカインや TARC、TCA-3、CTACK、eotaxin などのケモカイン産生減少を引き起こした (Fig.4)。IL-4、IL-13 は血管内皮細胞における P-selectin、VCAM-1 の発現を誘導することが知られており、リンパ球や好酸球の浸潤減少にはこれらの接着分子の発現抑制が関与した可能性が考えられる。さらに、減少のみられた TARC、TCA-3、eotaxin はリンパ球、特に Th2 細胞の浸潤において重要な chemoattractant とされている。一方、eotaxin は好酸球に特異的な chemoattractant であり皮膚にお

ける主要な産生細胞は線維芽細胞である。そして IL-4、IL-13 は eotaxin 産生を誘導するサイトカインである。よって eotaxin 産生の低下は IL-4、IL-13 の減少もしくは線維芽細胞に対する STAT6 decoy ODN の直接作用によるものと推測され、これらが好酸球浸潤の低下のさらなる要因と考えられる。また、CD4 陽性 Th2 細胞からの TCA-3 産生は STAT6 を介することがわかっており、これが TCA-3 の減少の一因と考えた。IL-6 は、ヒト胎児肝由来の肥満細胞においてアポトーシスを減衰させることが報告されている。STAT6 decoy ODN により IL-6 が減少したことが、肥満細胞のアポトーシスの減衰を抑えたため、肥満細胞の浸潤数が減少していたのではないかと考えられる。肥満細胞における IL-6 の産生は FcεRI を介した STAT6 経路により産生される<sup>9)</sup>。従って組織中の IL-6 の減少の理由の一つに、STAT6 制御による肥満細胞からの IL-6 産生の低下が考えられる。近年、CTACK は皮膚角化細胞で特異的に産生されることが報告されている。STAT6 decoy ODN は表皮細胞に導入されていたが、CTACK の減少が STAT6 抑制による直接作用によるものかどうか不明であり、今後検討を要する。今回の検討では、組織中の IFN-γ、IP-10 が STAT6 decoy ODN 投与により陽性対照群に比べて顕著に上昇していた。しかも同様の現象は Scrambled decoy ODN 投与においても認められた。この現象は、HVJ-envelope 自体による IFN-γ 誘導作用によるものと思われる。

STAT6 decoy ODN の抑制効果は、他系統のマウスを用いた場合、惹起方法を塗布に変えた場合、さらにハプテンを DNP にした場合においても認められた (Fig. 3)。従って、その作用は

TNP-IgE/TNP-OVA のみにみられる現象ではないことが明らかになった。

#### E. 結論

STAT6 decoy ODN を用いた STAT6 の制御がアトピー性皮膚炎のような IgE 依存性の慢性アレルギー性炎症反応の新たな遺伝子治療法のアプローチになることが期待されるが、今後、外用での投与方法には更なる改善が必要であると思われる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wu M.-H., Yokozeki H., Takagawa, S., Yamamoto T., Satoh T., Kaneda F. 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, Sumi K., Awad S, Satoh T, Katayama I, Takeda K, Akira S, Kaneda Y, Nishioka K.: In Vivo Transfection of a Cis Element "Decoy" against Signal Transducers and Activators of Transcription 6 (STAT6) Binding Site Ameliorates the IgE Mediated Late Phase Reaction in an Atopic Dermatitis Mouse Model. *Gene Therapy*, 11:1753-1762,2004
- 3) Sumi K., Yokozeki H., Wu M-H, Satoh T, Kaneda Y, Katayama I, Takeda K, Akira S, Kaneda Y, Nishioka K.: In Vivo Transfection of a Cis Element "Decoy" against Signal Transducers and Activators of the Transcription 6 (STAT6) Binding Site Ameliorates the response of Contact Hypersensitivity. *Gene Therapy*, 11;1763-1771,2004
- 4) Namiki T, Yamagawa S, Izumo T, Ishikawa M, Tachibana M, Kawakami Y, Yokozeki H., Nishioka K., Kaneko Y. Genomic alteration in primary cutaneous melanoma detected by comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome, *Cancer genetics and cytogenetics*, in press
- 5) 横関博雄: 手湿疹と異汗性湿疹、*Seminaria Dermatologie*,167:32-34,2004
- 6) 横関博雄., 西岡 清: アトピー性皮膚炎の診断のすすめ方 81(3):393-397,2004
- 7) 横関博雄: 皮膚からみた扁桃摘出術の適応、*Johns* 20(5):725-728,2004
- 8) 横関博雄: 花粉症にみられる皮膚症状とその治療、*臨床医* 30(2):185-187, 2004
- 9) 横関博雄: スギ花粉皮膚炎、*総合臨床*, 53(4): 1559-1560, 2004
- 10) 横関博雄: STAT6 デコイによるアレルギー疾患の治療戦略、アレルギー、免疫、11(8),1032-1038, 2004
- 11) Yokozeki H., Nishioka K.: Autoimmune Diseases in Dermatology, *JMAJ*47(6): 1-5, 2004

##### 2. 学会発表

- 1) Sumi K., Yokozeki H. et al: In vivo transfection of cis element "decoy" against stat6 binding site ameliorates contact hypersensitivity, The 29 th annual meeting of the JSID, April 14-16, 2004, Kyoto
- 2) Kanai M., Yokozeki H. et al: In vivo transfection of cis element "decoy" against stat6 binding site

ameliorates chronic skin inflammation induced in  
IgE transgenic mice, The 29 th annual meeting of  
the JSID, April 14-16, 2004, Kyoto

H. 知的財産権の出願、登録状態

なし

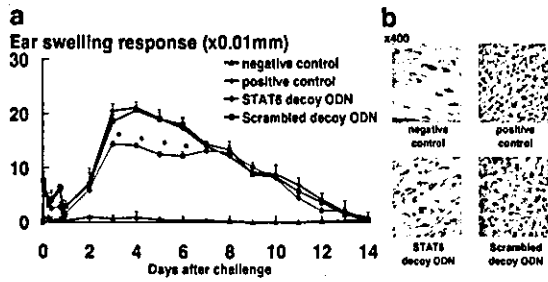


図1. TNP-IgE transgenic マウスにおける第3相反応

- (a) STAT6 decoy ODN により第3相耳介腫脹反応が抑制（4日後：34%）された。  
 (b) 病理組織学的所見：STAT6 decoy ODN により第3相反応ピーク時の細胞浸潤数が減少している。\*:P<0.05

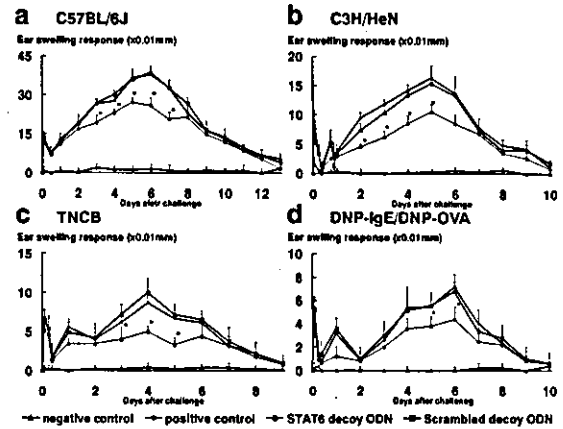


図3. さまざまな方法での第3相耳介腫脹反応の検討。

(a,b) STAT6 decoy ODN による制御は C57BL/6J マウス（6日後：34%）でも C3H/HeN マウス（5日後：32%）でも認められる。

(c,d) BALB/c マウスにおいて、惹起に際し TNCB 塗布を行った場合（4日後：54%）でも抗 DNP-IgE 抗体で受動感作後に DNP-OVA にて惹起した場合（6日後：35%）でも STAT6 decoy ODN による制御が認められた。\*:P<0.05

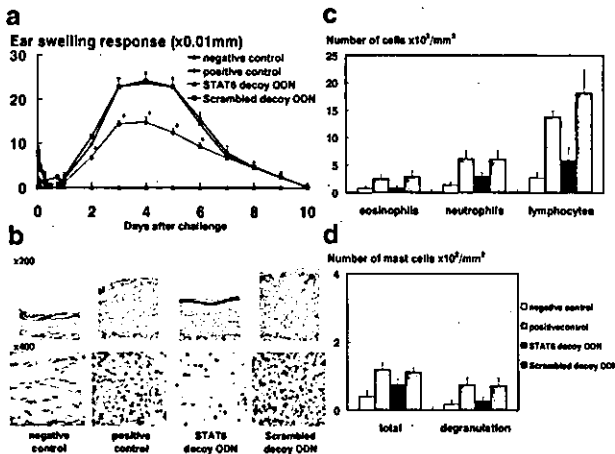


図2. BALB/c マウスにおける IgE 受動感作による第3相反応

- (a) STAT6 decoy ODN により第3相耳介腫脹反応が制御（5日後：39%）された。\*:P<0.05  
 (b) 病理組織学的所見：STAT6 decoy ODN により第3相反応ピーク時の細胞浸潤数が減少している  
 (c) STAT6 decoy ODN により好酸球、好中球、リンパ球が減少した。  
 (d) 総肥満細胞と総肥満細胞中の脱顆粒肥満細胞の割合も観察された。

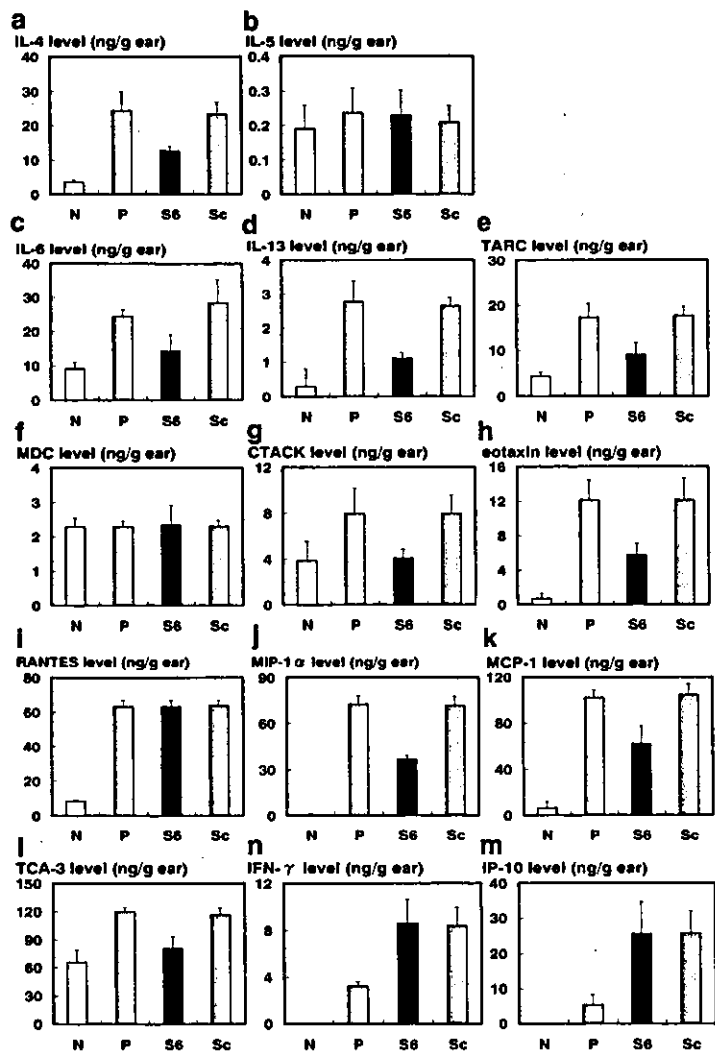


図4. 第3相反応ピーク時における耳介組織抽出液中のサイトカニン・ケモカインの定量。

\*:P<0.05 n: negative control p: positive control  
S6: STAT6 decoy ODN Sc: Scrambled decoy ODN

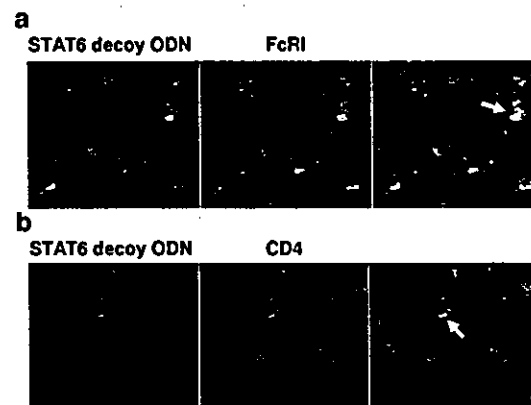


図5. STAT6 decoy ODNの導入細胞。STAT6 decoy ODN (Rhodamin B 標識) は FcεRI 陽性細胞 (a, 矢印)、CD4 陽性細胞 (b, 矢印) に導入されている。



## 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免疫アレルギー学分野 教授

研究要旨 抗原特異的 IgE トランスジェニックマウスあるいは IgE で感作した正常マウスに多価の抗原を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（即時相と遅発相）に引き続き、強い好酸球浸潤を伴う遅延型の皮膚腫脹が誘導された。この遅延型皮膚腫脹は IgE/FcεRI を介する反応であるが、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ことがわかり、IgE-DTH と命名した。IgE-DTH を惹起しない FcεRI 欠損マウスに正常マウス骨髄を移入すると IgE-DTH を誘発することができた。そこで骨髄細胞の各細胞分画を移入したところ、c-kit<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup>細胞が IgE-DTH 誘発に必須であることがわかった。表面マーカー、核形態、ギムザ染色などの解析から、この細胞が好塩基球であることが判明した。これまでエフェクター細胞のひとつとしてしか考えられていなかった好塩基球が中心的役割を果たす新たな T 細胞非依存的慢性アレルギー炎症反応誘発機構が存在することが明らかとなった。

#### 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、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 が本当に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。そこで、我々は抗原特異的 IgE トランスジェニックマウスを樹立し、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。抗原を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（即時相と遅発相）に引き続き、強い好酸球浸潤を伴う遅延型の皮膚腫脹が誘導された（図 1）。これまでの研究で、この遅延型皮膚腫脹は IgE/FcεRI を介する反応であるが、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ことがわかり（図 2）、IgE-DTH と命名した。本年度は、このユニークな IgE-DTH を引き起こす責任細胞の同定を行った。

#### 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。IgE-DTH を呈さない FcεRI 欠損マウス (FcεRI<sup>-/-</sup>) に放射線照射したのちに、正常マウス骨髄細胞を移入し、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

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、IgE-DTH が誘導されたが、FcεRI 欠損マウス由来の骨髓細胞の移入では IgE-DTH は誘導されなかった。骨髓細胞移入後 4 日目の抗原チャレンジでも IgE-DTH が誘発されたことから、比較的分化の進んだ骨髓由来細胞が責任細胞であると考えられた。そこで、正常マウス由来の骨髓細胞を細胞表面マーカーにより分画し、各分画を FcεRI 欠損マウスに移入したところ、NK 細胞マーカーである DX5 陽性分画が IgE-DTH を引き起こすことが明らかとなった (図 3)。さらなる解析から、c-kit<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup>細胞が IgE-DTH 誘発に必須であり、表面マーカー、核形態、ギムザ染色などの特徴から、この細胞が好塩基球であることが判明した。

### D. 考察

FcεRI 欠損マウスへの正常骨髓細胞移入実験の結果から、好塩基球が IgE-DTH を引き起こす責任細胞であることが明らかとなった。IgE-DTH 耳介腫脹の局所に浸潤している細胞の多くは、好酸球や好塩基球であり、好塩基球はわずか 1-2% を占めるに過ぎない (図 4)。したがって、IgE-DTH においては、好塩基球は単にアレルギー炎症のエフェクター細胞として機能しているのではなく、好酸球浸潤を特徴とする慢性アレルギー炎症を誘発するイニシエーターとして働いていることが強く

示唆される (図 5)。本研究成果は、好塩基球が主役となる新たな T 細胞非依存的慢性アレルギー炎症誘発機構の存在を明確に示すものであり、そのプロセスの詳細を解析することにより、新たな創薬のターゲットの同定が期待される。

### E. 結論

これまでエフェクター細胞のひとつとしてしか考えられていなかった好塩基球が中心的役割を果たす新たな T 細胞非依存的慢性アレルギー炎症反応誘発機構が存在することが明らかとなった。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Maezawa, Y., Nakajima, H., Seto, Y., Suto, A., Kumano, K., Kubo, S., Karasuyama, H., Saito, Y., Iwamoto, I.: IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Clin Exp Immunol.* 135: 12-18, 2004.
- 2) Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. and Karasuyama, H.: Ly49Q, a member of Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 1016-1021, 2004.
- 3) Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, Nagai Y, Yasuda T, Suzuki H, Horai R, Iwakura Y, Yamamoto T, Karasuyama H, Miyake K, Yamanashi Y: Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide -induced signaling. *J Exp Med.* 201: 333-9, 2005.
- 4) 鳥山 一; 「IgE 受容体研究の最近の進歩」

Animus.34:22-25,2004

5) 鳥山 一;「遺伝子改変モデル動物で誘導される新たな慢性アレルギー炎症反応に対するシクロスポリンの作用」医薬ジャーナル, 40: 183-187,2004

6) 向井香織、松岡邦枝、鳥山 一;「IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機構」臨床免疫. 41(2):195-199,2004

## 2. 学会発表

- 1) H Karasuyama, K Mukai, K Matsuoka, H Yonekawa, T Kubota, N Toyama-Sorimachi, Y Minegishi; Novel mechanism of antigen-specific, IgE/FcεRI-mediated induction of chronic allergic inflammation, American Association of Immunologists 2004 meeting 2004.4.17-21 Washington DC, USA
- 2) 久保田俊之、久保秀一、向井香織、米川博通、峯岸克行、鳥山 一; IgE 結合による FcεRI の発現亢進機構の解析, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 3) 向井香織、松岡邦枝、久保田俊之、佐藤英一郎、平原一樹、米川博通、峯岸克行、鳥山 一; 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序の解析, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 4) 小俣合歓子、大嶋勇成、安富素子、山田彰子、鳥山 一、眞弓光文; T細胞の経口免疫寛容成立に及ぼす抗原特異的 IgE の影響, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 5) H Karasuyama, K Mukai, K Matsuoka, H Yonekawa, T Kubota, N Toyama-Sorimachi, Y Minegishi; Chronic allergic inflammation induced by a novel mechanism in an antigen-specific, IgE/FcεRI-dependent and T cell/mast cell-independent manner., 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS 2004.7.18-23. Montreal, Canada
- 6) 鳥山 一; IgE トランスジェニックマウスを用いた新たな慢性アレルギー発症機構の解明, 第16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜
- 7) 向井香織、久保田俊之、峯岸克行、鳥山一; 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16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜、
- 8) 久保田俊之、向井香織、峯岸克行、鳥山一; IgE 結合による FcεRI 発現調節機構の解析, 第16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜
- 9) 向井香織、久保田俊之、峯岸克行、鳥山一; IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機序の解析, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌
- 10) 久保田俊之、向井香織、峯岸克行、鳥山一; IgE 結合による FcεRI 発現調節機構の解析, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌
- 11) 金井康真、横関博雄、呉 明花、鷺見浩史、佐藤貴浩、片山一郎、鳥山 一、西岡 清; STAT6 decoy ODN を用いた TNP 特異的 IgE 誘導性第3相耳介腫脹反応の抑制, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌

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 10-32334 号