

図1. IgE トランスジェニックマウスにおける3相性耳介皮膚腫脹反応

抗原の皮内投与により、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皮膚腫脹が誘導された。

Basophils constitute only a minor population among cells infiltrated in the skin lesion of IgE-DTH

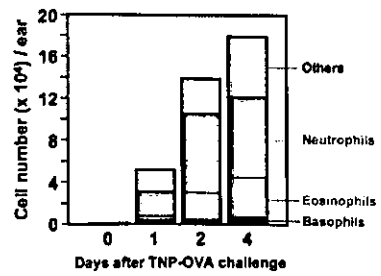


図4. 第3相性耳介皮膚腫脹反応における浸潤細胞の動態変化

抗原チャレンジ後、2日目に皮膚における好塩基球数の増加が観察されたが、皮膚浸潤細胞における割合は2%程度であり、好酸球・好中球が大部分を占めていた。

T cells and mast cells are dispensable for the development of IgE-DTH

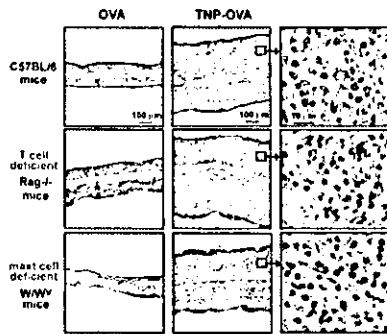


図2. 第3相耳介皮膚腫脹にはT細胞もマスト細胞も必須ではない。

T細胞欠損マウスでもマスト細胞欠損マウスでも好酸球浸潤をとまなう第3相耳介皮膚腫脹が誘発された。

好塩基球が主役となる新たな慢性アレルギー炎症誘発機構

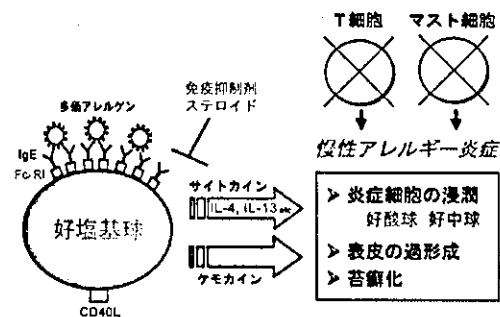


図5. 好塩基球が主役となる慢性アレルギー炎症誘発機構

DX5<sup>+</sup> but not DX5<sup>-</sup> bone marrow cells from normal mice reconstituted IgE-DTH in FcεR1<sup>-/-</sup> mice

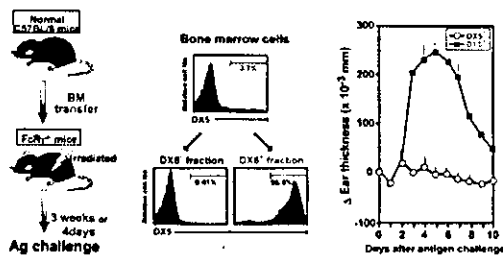


図3. 正常マウスのDX5陽性骨髄細胞をFcεRI欠損マウスに移入することにより第3相耳介皮膚腫脹が誘発された。

DX5陽性骨髄細胞の約20%がFcεRI陽性の好塩基球であった。

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

## FcεR1 を標的とした新しいアレルギー性疾患治療戦略の検討

分担研究者 片山一朗 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

研究協力者 室田浩之 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座

中村敏明 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座

研究要旨 アトピー性皮膚炎（AD）においては皮膚バリアー機能の障害や IgE 抗体の過剰産生などの免疫異常がその発症、伸展に大きな関与をしている。アレルギー性炎症反応に強く関与する IgE 抗体の上昇に際し、IgE 抗体による肥満細胞、好塩基球あるいは樹状細胞上に存在する高親和性 IgE レセプター（FcεR1）のクロスリンクが即時型・遅発型のアレルギー反応を引き起こすと考えられている。FcεR1 を標的とするヒト型抗体の臨床応用が進められているが副作用や医療コストが大きな問題として残されており、作用点が明解かつ安全で確実にしかも選択的にアレルギー性炎症を抑制できる治療戦略の確立が望まれている。われわれは FcεR1 が細胞膜の一画である lipid raft に局在しないと下流のシグナル伝達を開始できないという挙動に着目し、lipid raft を不活化あるいは FcεR1 の dominant negative form を lipid raft に発現させる事で IgE を介したアレルギー性疾患の増悪を防げるのではないかと考えた。今回アレルギー性炎症増幅機序における lipid raft の関与を検討するとともに、lipid raft を標的とした治療薬の開発のため、ヒト末梢血より樹立した樹状細胞における FcεR1 の局在と下流の遺伝子発現が lipid raft を失活させる試薬でどのような影響を受けるか検討したので報告させていただく。

### A. 研究目的

FcεR1 を介するシグナルを lipid raft の機能を失活させる事で阻害できるようなアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患に対する安全でコストパフォーマンスの高い治療戦略を開発する事を目的とする。

これまでに、Methyl-β-cyclodextrin 処理で末梢血由来樹状細胞の IgE 刺激依存的な TARC 産生を抑えられることから AD に対する lipid raft を標的とした治療が現実味を帯びてきた。さらに外来性コレステロール負荷も lipid raft の不安定化を導く

事が知られており、実際過去に魚鱗癬に使用されていたコレステロール軟膏を塗布することで AD の皮疹が改善できることがわかった。今回、このコレステロールが何故奏功するのかを中心に検討した。

### B. 研究方法

同意の得られた健常人およびアトピー性皮膚炎罹患者（ダニ特異的 IgE が class IV 以上を選出）の末梢血単核球（PBMC）を IL-4 および GM-CSF 存在下で 4 日間培養する事で樹状細胞を樹立。さ

らに同患者の血清から IgE をアフィニティーカラムを用いて抽出。コレステロール (200ug/ml) 負荷 6 時間の前処理ある群とない群それぞれに IgE(10ng/ml)とリコンビナントダニ抗原 Der fl (200ng/ml)を刺激し 2 4 時間後の培養上澄を回収し TARC、IL-10 を ELISA 法で測定するとともに、FcεR1 と lipid raft の局在をコンフォーカル顕微鏡で観察することで確認した。

### C. 研究結果

健常人およびアトピー性皮膚炎患者 PBMC に対する IgE、および IgE と抗原同時添加群で TARC の発現を比較した所、Fig. 1 に示す通りアトピー性皮膚炎群において健常群より強い IgE 誘導性 TARC 産生誘導が認められた。IL-10 においても同様の結果を認め末梢血から樹立した樹状細胞においてもアトピー性皮膚炎特有の表現型が存在する可能性が示唆された。樹状細胞にはヒスタミン受容体も発現していることからヒスタミン  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  を IgE と共刺激したがこれらの分子の発現に相乗効果は認められなかった。Fig. 2 に示す通りコレステロール負荷はこのような IgE 誘導性 TARC 産生誘導を有意に抑制した。Fig. 3 に示す通り IgE 誘導性 IL-10 産生もコレステロールで抑制できた。しかしコレステロールへの反応性はアトピー性皮膚炎患者で健常人より若干低下していた。

次にコレステロール負荷に伴う FcεR1 と lipid raft の局在をみた所、Fig. 4 に示す通りコレステロール負荷をしていない樹状細胞では FcεR1 は細胞膜全体に均一に分布しており、IgE 添加によって capping するとともに lipid raft と一致する部位に lipid raft が集まってくる。しかしコレステロ

ール負荷をした樹状細胞では FcεR1 が IgE 刺激前からある一領域に集まるように局在し IgE 刺激でも動くことはなかった。Cholera-toxin B で染色した lipid raft もコレステロール負荷なしと比較すると染色性が低下していた。

### D. 考察

これまでになかったコレステロールと AD の関係の検討は AD の病態の理解と治療の開発という 2 つの側面における重要なヒントを提供しているものと考えられた。

まず、病態の理解においては 1) 樹状細胞にも AD 特有の表現型がある、2) FcεR1 の局在はコレステロール負荷に影響される、3) AD ではコレステロールに対する応答性が悪い、という点が今回判明した。1) は前回検討した FcεR1 の発現が AD 末梢血由来樹状細胞で増強していた現象の裏を見ている可能性がある。さらに今回ヒスタミン刺激を加えた所、ヒスタミンに対する応答性も AD 群では増強していた。まだヒスタミン受容体の発現量の検討は行っていないがこれら一連の変化が樹状細胞樹立に用いている IL-4、GM-CSF に対する影響で生じている可能性もあり今後検討していきたいと考えている。2) は全く予期せぬ現象であった。まずコレステロールで細胞死が引き超されているのではないかと考えたが、トリパンブルー染色や Hoechst33342 による染色で生細胞であることを確認した。この局在の異常がコレステロール負荷に伴う影響を引き出している可能性は推察できる。症例数は 3 とまだ少ないといわざるを得ず、症例の蓄積をしていきたい。3) では AD で脂質ホメオスタシスの異常、ABC カセット・LDL 受容体の発現の異常な

どが生じている可能性が伺える。今後、AD患者における血液中脂質含有量の検討を行っていきたいと思う。

治療的側面においても現時点では2)によると思われるコレステロールのAD皮疹の治療効果の裏が確認できた。今後、モデル動物などに対してコレステロール負荷を行い、改善できるかを確認したいと考えている。

#### E. 結論

樹状細胞におけるlipid raftを標的とした治療戦略はAD治療の全く新しい視野を提供するとともに、症状改善および増悪の抑止に十分な潜在能力を持つものと考えられた。中でもコレステロールはADの病態的側面の理解深めるとともに新規治療戦略としての潜在能力を持つものと考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 片山一朗: 難治性アトピー性皮膚炎の治療法。アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp239-241, 2003
- 2) 室田浩之、Bae SangJae、堀内保宏、片山一朗: 線維芽細胞におけるTLR2,4の発現とその意義。臨床免疫, 40(3): 272-275, 2003
- 3) Murota H, Hamasaki Y, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Matsuyama T: Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. Arthritis Rheumatism 48(4): 1117-1125, 2003

4) 片山一朗: アトピー性皮膚炎の悪化因子と患者指導。アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp236-238, 2003

5) Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Katayama I, Nishimoto K: The role of keratinocyte on defense system in dermatophyton infection. Proceedings of the 12th Korean-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2002 (Nov 8-9, 2001 Tokyo, Japan)

6) Eishi K, Lee JB, Bae SJ, Takenaka M, Katayama I: Impaired sweating function in adult atopic dermatitis: results of the quantitative sudomotor axon reflex test. Br J Dermatol, 147: 683-688, 2002

7) 片山一朗: 【臨床皮膚科 最近のトピックス Clinical Dermatology 2002】 皮膚疾患の病態 アトピー性皮膚炎とりモデリング。臨床皮膚科, 56(5増): 39-42, 2002

8) Katayama I, Takenaka M, Yamamoto K: Advisory guidelines for the avoidance of exacerbating factors of atopic dermatitis in daily-life. JMAJ (Jpn Med Assoc J), 45(11): 466-471, 2002

H. 知的所有権の所得状況  
なし

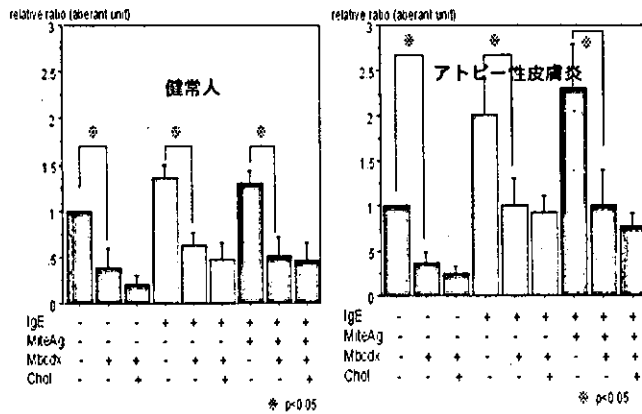


図1. 末梢血単核球由来樹状細胞(MoDC)のmethyl- $\beta$ -cyclodextrin(Mbcdx)処理によるlipid raftの失活でTARCの産生は有意に抑制される。またアトピー性皮膚炎患者由来のMoDCではIgE処理によって健康人よりも強いTARCの産生を認めた。

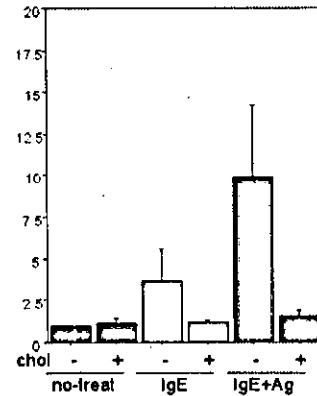


図3. MoDCからのIL-10の産生もコレステロール処理によって抑制される。

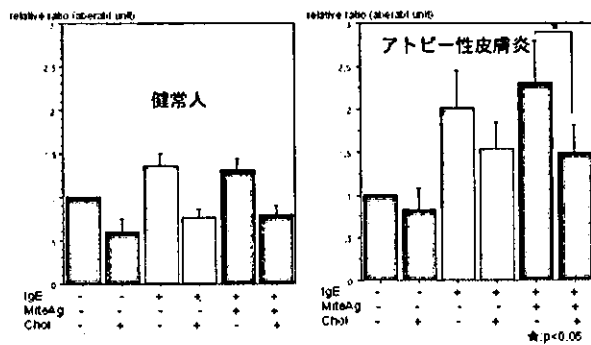


図2. MoDCのコレステロール処理によってTARCの産生は抑制される。この抑制効果はアトピー性皮膚炎患者由来MoDCでは健康人に比し幾分か弱い傾向が認められた。

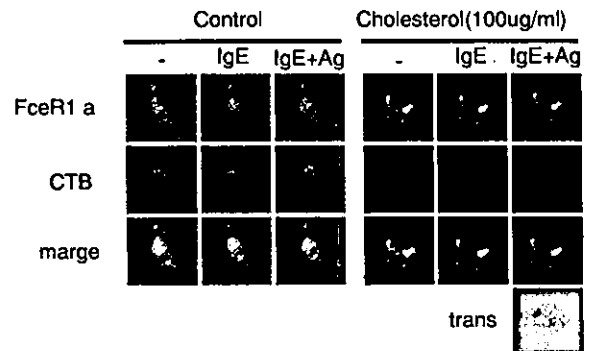


図4. コレステロール負荷時のFceR1の局在。緑がFceR1,赤がラフト,青がヘキストを示す。コレステロール処理をしていない方はIgE処理によってラフト上に移動する傾向が認められたが,コレステロール負荷するとFceR1の局在に異常が生じ, IgE刺激でも反応しない。

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

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班

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

(H15-免役-006)

発行 平成 17 年 3 月 31 日

発行者 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班  
主任研究者 西岡 清

事務局 〒113-8519  
東京都文京区湯島 1-5-45  
東京医科歯科大学大学院  
皮膚科学分野  
TEL 03-5803-5286 FAX 03-5803-5289