

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 秀興

平成17（2005）年3月

目 次

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	-----1
小川秀興	
II. 分担研究報告	
1. TGF- β シグナルの皮膚リモデリング/創傷治癒における役割 (アトピー性皮膚炎苔せん化病変の理解に向けて)	-----6
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	-----8
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	-----11
坪井良治	
4. ヒト末梢血好酸球における TGF- β シグナル伝達経路についての解析に関する研究	-----13
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	-----15
花澤豊行	
6. 内因性リガンドによる Toll 様受容体を介したマスト細胞の活性化がアレルギー疾患に及ぼす影響に関する研究	-----17
牛尾博子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----23

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) 本研究班で開発／検証中であるリボフラビンを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、さらに改良し、これまで測定困難な部位においても検証が容易となった。また湿潤部位などへの応用が可能となった。さらに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を確認した。

2) TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系であるSmad分子のうちSmad3分子は皮膚創傷治癒過程において促進的に、一方Smad7分子は抑制的に作用することが示唆された。

3) 純粋な皮膚血管内皮細胞を用いてIFN- γ やTNF- α などによって皮膚血管内皮細胞のケモカインの発現が亢進することを見いだした。

4) マスト細胞は内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントによりTLR4を介して活性化され、関節炎の病態形成に関与する可能性を示した。

5) ヒト末梢血由来好酸球におけるTGF- β シグナル伝達経路の詳細について明らかにした。

6) nitrotyrosine (NT) 産生量の測定は気管支喘息の診断あるいは重症度を評価する上での指標となり得ることが示された。

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診断、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

花沢豊行 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 B. 方法 C. 結果 D. 考察

E. 結論

1) 主任研究者小川は、分担研究者中尾らと共同で、アトピー性皮膚炎慢性期の苔せん化病変の形成機序について解析するための基礎的な検討として、創傷治癒過程における TGF- β シグナル経路の役割について検討した。ラビット創傷治癒モデルにおいて TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 分子をアデノウイルスベクターを用いて人為的に発現させ、その効果について検討したところ、Smad3 分子を創傷時に過剰発現させた場合、肉眼的、病理学的に創傷治癒は促進したが、Smad7 分子を過剰発現した場合は創傷治癒が遅延した。この結果をふまえ、アトピー性皮膚炎の苔せん化病変におけるそれぞれの分子の発現ならびに活性、ダニ抗原などのアレルゲンがこれらの分子の発現に与える影響等についてについて現在、検討中である。

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 B₂ 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、本研究班にて開発し報告した。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しつつ採取試料の微量化と湿潤部位への応用につ

いて検討すると共に、ダニ抗原等を経皮的に投与し角層バリア機能への影響をリボフラビンの浸透等を指標に測定することについて検討を行った。これまで用いてきたボフラビン処理後にセロハンテープ等による角層の回収し測定する法をさらに改良し、シアノアクリレート系接着剤を用いることで、採取面積を低減すると共に、採取した角層をリボフラビン処理することにより湿潤面での測定および定量性の確認を行った。その結果、リボフラビンによるバリア機能測定法の改良により、部位差についての検証が容易となり、また湿潤部位などへの応用が可能となった。さらに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この方法で確認でき、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) 分担研究者坪井は、活性化した血管内皮細胞のケモカイン産生について DNA マイクロアレイを用いた解析を行った。血管内皮細胞は、ケラチノサイトやマクロファージと同様にケモカインの重要な産生細胞であり、皮膚への炎症細胞の遊走に直接関与している。皮膚微小循環系は血管とリンパ管で構成されているが、これまでの研究報

告は二つの細胞を明確に分離して検討していない。そこで、ヒト皮膚血管内皮細胞だけを純粋培養し、炎症性サイトカイン刺激下でのケモカイン遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析し、大血管系のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の遺伝子発現と比較した。BEC では VEGF-C などが優位に発現し、リンパ管内皮細胞に発現する Prox-1 や podoplanin などは発現していなかった。BEC と HUVEC の両者において、CCL20, IL-8 は TNF- α 刺激下でのみ、MIG は IFN- γ 刺激下でのみ発現が亢進した。RANTES と MCP-2 は IFN- γ および TNF- α の同時刺激により発現が著明に亢進し、相乗作用を示した。GCP-2 は TNF- α 刺激下の HUVEC において発現がより亢進し、MCP-2 は IFN- γ 刺激下の BEC において発現がより亢進していた。以上の結果から、IFN- γ や TNF- α などによって皮膚血管内皮細胞のケモカインの発現が亢進しアトピー性皮膚炎における白血球の皮膚への遊走に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

4) 分担研究者牛尾らは、小川らと共同で、内因性リガンドによる Toll-like receptor (TLR) を介したマスト細胞の活性化がアレルギー疾患に及ぼす影響を検討した。これまで本研究においてマウスの骨髄由来培養マスト細胞は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、TLR 依存的に活性化されることを報告してきたが TLR4 のリガンドには、これらの病原微生物由来の物質に加えて、生体が傷害された際に生

じるファイブロネクチンやヒアルロン酸などのフラグメントが報告されている。そこで TLR2 欠損、TLR4 欠損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、それぞれのマスト細胞をさまざまな濃度のファイブロネクチンのフラグメントである extra domain A (EDA)、タイプ III₁₁ およびタイプ III₁₂ で刺激し、培養上精中のサイトカインを測定した。さらにファイブロネクチンのフラグメントを膝関節内に注入し、関節の腫脹、局所の炎症およびサイトカイン産生を調べた。その結果、野生型マウス由来の骨髄培養マスト細胞はファイブロネクチンのフラグメントである EDA により濃度依存的に活性化され、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6) を産生したが、III₁₁ および III₁₂ にその作用はなかった。EDA によるマスト細胞活性化効果は TLR4 を欠損したマスト細胞では消失していたが、TLR2 欠損マスト細胞では野生型のものと同程度であった。EDA を膝関節内に注入することにより、野生型マウスでは関節が腫脹するが TLR4 欠損マウスではみられなかった。以上より、マスト細胞は内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントにより TLR4 を介して活性化され、リウマチなどのアレルギー-膠原病疾患の病態に関与している可能性が示唆された。

5) 分担研究者中尾は、主任研究者小川らと共同で、ヒト末梢血由来好酸球における Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナル伝達について解析した。好酸球は、喘息の気道リモデリング病態の形成に重要

な役割を果たしていることが近年明らかにされ注目を集めており、とりわけ好酸球が産生するサイトカインの1つである

Transforming growth factor- β (TGF- β)がこの好酸球による気道リモデリング形成作用に重要であると考えられている。ヒト末梢血由来好酸球を分離精製し、TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 経路の活性化の有無ならびにその機能的役割についてウエスタンブロット法、ELISA 法によって検討したところ、正常ヒト末梢血由来好酸球において TGF- β 刺激による Smad2 のリン酸化が観察された。

Smad3/Smad4 の発現はウエスタンブロットでは認められなかった。Smad3/Smad4 発現の欠如は、TGF- β /Smad 経路に依存する Smad7 遺伝子、c-jun 遺伝子の発現には影響を与えなかった。以上の結果は他の細胞と異なり、正常ヒト末梢血由来好酸球においては、Smad2 経路だけで TGF- β シグナルが細胞内で伝達されているユニークなシグナル伝達が行われている可能性を示唆した。

6) 分担研究者花沢は、これまでの本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 (NT) が生ずることを確認した。そこで実際にどの程度の NT がアレルギー性鼻炎および喘息患者において産生されているかを評価し、疾患の重症度との関連について本年度は検討した。アレルギー性鼻炎患者および喘息患者においては、

鼻腔および呼気中の NO 濃度を測定した。その結果、アレルギー性鼻炎患者および喘息患者においては、健常者に比べ有意に鼻腔および呼気中の NO 濃度の上昇を確認した。鼻腔洗浄液中の NT は希釈されるためか、EIA の測定閾値以下であった。一方、呼気蒸気中の NT 濃度はステロイドを使用していない軽症の喘息症例において有意に上昇しており、ステロイド吸入もしくは内服している中等症から重症例では、その産生濃度は有意に抑制されていた。以上の結果から、気道上皮内の oxidative stress は、アレルギー炎症において増強することから、nitrotyrosine (NT) 産生量の測定はアレルギー炎症を評価する上での指標となり得ることが推測された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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.
2. 牛尾博子: Toll-like receptor とアレルギー、アレルギー 53:469-475, 2004.
3. Ushio H, Nakao A, Supajatura V, Miyake K, Okumura K, Ogawa H: MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. Biochem Biophys Res Commun 323:491-498, 2004.
4. 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.

5. Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H: Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model. *J Invest Dermatol*

123:229-236, 2004

6. 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* 318:422-427, 2004

H. 知的所有権の出願取得状況
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・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
—TGF- β シグナルの皮膚リモデリング／創傷治癒における役割
(アトピー性皮膚炎苔せん化病変の理解に向けて) —

主任研究者 小川秀興

順天堂大学医学部皮膚科学講座／アトピー疾患研究センター

研究協力者：住吉孝二（順天堂大学医学部皮膚科学講座）

神崎美令（山梨大学医学部皮膚科学講座）

研究要旨：アトピー性皮膚炎の慢性期においては苔せん化と呼ばれる角化細胞の肥厚、細胞外マトリックスの過剰蓄積、線維芽細胞の増殖、といった構造変化（リモデリング）が観察される。この時期において炎症性細胞はあまり認められず、Transforming growth factor- β (TGF- β) などのサイトカイン／増殖因子がその病態形成に重要な働きをしていることが示唆されている。そのため、この時期の病態は、一種の創傷治癒不全の状態であるとも考えられている。我々は本研究において、アトピー性皮膚炎慢性期の病態において、どのような TGF- β シグナル経路が関与しているかについて明らかにするため、ラビット創傷治癒モデルにおいて TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 分子を人為的に発現させ、その効果について検討した。その結果、Smad3 分子を創傷時に過剰発現させた場合、肉眼的、病理学的に創傷治癒は促進したが、Smad7 分子を過剰発現した場合は創傷治癒が遅延した。この結果をふまえ、アトピー性皮膚炎の苔せん化病変におけるそれぞれの分子の発現ならびに活性について今後検討し、アトピー性皮膚炎慢性期の病態の分子機構を明らかにしていきたい。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の慢性期においては苔せん化と呼ばれる角化細胞の肥厚、細胞外マトリックスの過剰蓄積、線維芽細胞の増殖、といった構造変化（リモデリング）が観察される。この時期において炎症性細胞はあまり認められず、Transforming

growth factor- β (TGF- β) などのサイトカイン／増殖因子がその病態形成に重要な働きをしていることが示唆されている。そのため、この時期の病態は、一種の創傷治癒不全の状態であるとも考えられている。

我々は本研究において、このようなアトピー性皮膚炎慢性期の病態において、どの

ような TGF- β シグナル経路が関与しているかについて明らかにするため、ラビット創傷治癒モデルにおいて TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 分子を人為的に発現させ、その効果について検討した。

B. 研究方法

ラビット耳背部をパンチバイオプシーによって損傷させ（潰瘍形成）、その治癒を観察する系において、アデノウイルスベクターを用いて Smad3 分子あるいは Smad7 分子を発現させそれらの創傷治癒過程への効果について病理学的に解析した。

C. 研究結果

Smad3 分子を創傷時に過剰発現させた場合、肉眼的、病理学的に創傷治癒は促進したが、Smad7 分子を過剰発現した場合は創傷治癒が遅延した。この結果に一致していくつかの成長因子の皮膚での発現も Smad3 分子の過剰発現時に増加し、Smad7 分子の過剰発現時には低下していた。

D. E. 考察および結論

Smad3 分子は皮膚創傷治癒過程において

促進的に、一方 Smad7 分子は抑制的に作用することが示唆された。この結果をふまえて、アトピー性皮膚炎の苔せん化病変におけるそれぞれの分子の発現ならびに活性について検討中である。また、ダニ抗原などのアレルゲンがこれらの分子の発現に与える影響、これらの分子の過剰発現が皮膚バリア機能に与える影響についても検討する。さらに強皮症モデル（マウス）においてアデノウイルスベクターを用いて Smad3 分子あるいは Smad7 分子を発現させ強皮症の皮膚硬化病変を変動させうるか否かについても現在検討中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H: Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model. *J Invest Dermatol* 123:229-236, 2004

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

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りボ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) バリア機能測定精度の向上と適用部位拡大を目的としてサンプル採取法の改良を行いφ 5 mm程度の部位や屈曲部位においても測定可能となった。
- 2) バリア機能測定精度の向上を目的として発汗等の影響を回避する方法を検討し、改良試験法を用いることで対応可能であることを確認した
- 3) ダニ抗原プロテアーゼによる角層バリア機能破壊について確認を行った。

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B₂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開発している。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 483nm 、測定波長 526nm 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ン（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、SDS処理によるバリア破壊処理もしくは、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、

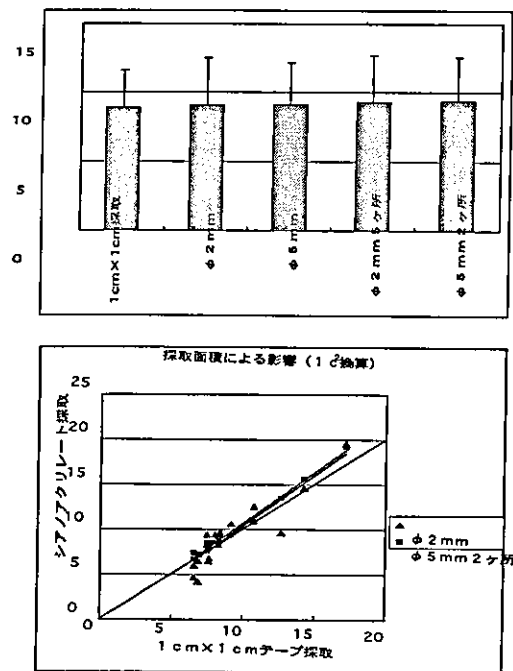
経時的にリボフラビン溶液を接触させその後テープストリッピング法により角層を回収し、浸透したリボフラビン量を測定した。

（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。

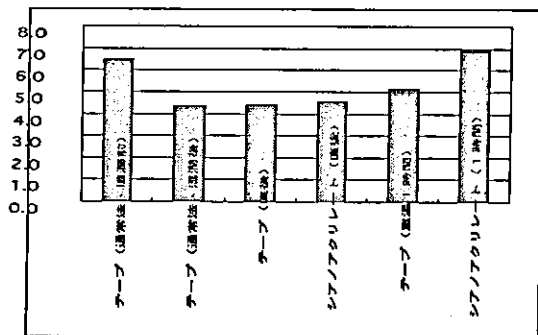
C. 研究結果

- ① これまで用いていたリボフラビンを指標としたバリア機能測定法においては、 $1\sim 2\text{cm}$ 角の部位から角層を採取し測定を行っていたが、本法では屈曲部などで採取の際の技術的影響が認められたため、採取面積の低減検討を行った。その結果 $\phi 5\text{mm}$ で充分再現性のある結果が得られた。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

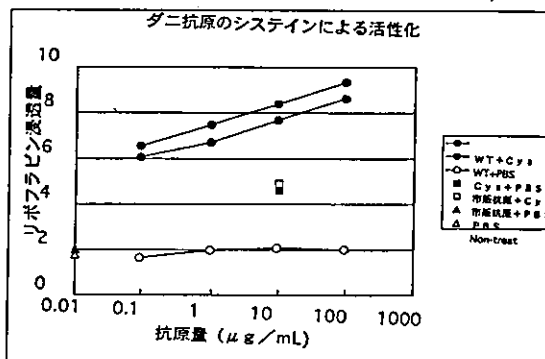


が可能となった。

② 本方法において、使用するリボフラビンが水溶液で適用されるため、処理部位が発汗等により含水していると正確なバリア機能が測定できない場合が認められる。その点を改良すべく、リボフラビン処理前に角層を採取し、30分から1時間程度乾燥後にリボフラビン処理を実施することで湿潤による影響を相殺する可能性が示唆された。湿潤条件により乾燥条件に差が認められたため、実際の使用条件を加味した最適化についてはさらに検討が必要と考えた。



③ ユカタンマイクロプロタ皮膚を拡散セルに装着し、100 μg/mLから段階希釈したダニ抗原溶液を塗布し、高井・中村らから提供されたダニ抗原およびその



システイン活性化等の影響を測定した。システインを添加しなくとも活性が認められるケースも存在したが、これについては皮膚上に存在するシステインの影響による可能性が示唆された。市販のダニ抗原混液についてはシステインの影響は

認められなかった。

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。さらに手法の改良により精度向上を図ることができた。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

The destruction of skin barrier function by house dust mite allergen: 光石幸市、中村年伸、高井敏朗、平嘉也子、奥田峰広、小川秀興；第29回日本研究皮膚科学会

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：アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の病態において白血球の皮膚への遊走に関与する血管内皮細胞の役割を明らかにする目的で、リンパ管内皮細胞を取り除いたヒト皮膚血管内皮細胞（BEC）を純粋培養し、炎症性サイトカイン刺激下でのケモカイン遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析した。更に大血管系のヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の遺伝子発現と比較検討した。その結果、BEC と HUVEC の両者において、CCL20, IL-8 は TNF- α 刺激下でのみ、MIG は IFN- γ 刺激下でのみ発現が亢進した。RANTES と MCP-2 は IFN- γ および TNF- α の同時刺激により発現が著明に亢進し、相乗作用を示した。以上のことから、アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患では、活性化された単核球より分泌された IFN- γ や TNF- α などによって皮膚血管内皮細胞のケモカインの発現が亢進し、これらのケモカインが白血球の皮膚への遊走に重要な役割を担っていることが示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の病態には、活性化した血管内皮細胞が重要な役割を担っていると考えられるが、詳細な検討は少ない。血管中の活性化された T 細胞や単球は、血管内皮細胞に発現された接着分子を介して、ケモカインの作用により皮膚へ遊走する。血管内皮細胞は、ケラチノサイトやマクロファージと同様にケモカインの重要な産生細胞であり、皮膚への遊走に直接関与している。皮膚微小循環系は血管とリンパ管で構成されているが、これまでの研究報告は二つの細胞を明確に分離して検討していない。そこで、ヒト皮膚血管内皮細胞だけを純粋培養し、炎症性サイトカイン刺激下でのケモカイン遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析し、

大血管系のヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の遺伝子発現と比較した。

B. 方法

新生児包皮より細胞を分離し、抗 PECAM-1 抗体および抗 podoplanin 抗体結合磁気ビーズを用いて、PECAM-1 陽性 podoplanin 陰性細胞だけを皮膚血管内皮細胞（BEC）として分離・培養した。HUVEC は Cambrex 社から購入した。BEC および HUVEC を IFN- γ および TNF- α 単独、または両者で 4 時間刺激し、そのケモカインおよび接着分子の遺伝子発現をオリゴヌクレオチドマイクロアレイ（Affymetrix 社）を用いて解析した。一部は RT-PCR 法により発現量を確認した。さらに培養上清中のケモカイン蛋白量を ELISA で測定した。

新生児包皮の使用に当たっては、研究機

関の倫理委員会で承認を受け、保護者の十分な同意を得て実施した。使用した細胞の一部は購入したものである。

C. 結果

BEC では VEGF-C などが優位に発現し、リンパ管内皮細胞に発現する Prox-1 や podoplanin などは発現していなかった。BEC と HUVEC の両者において、CCL20, IL-8 は TNF- α 刺激下でのみ、MIG は IFN- γ 刺激下でのみ発現が亢進した。RANTES と MCP-2 は IFN- γ および TNF- α の同時刺激により発現が著明に亢進し、相乗作用を示した。GCP-2 は TNF- α 刺激下の HUVEC において発現がより亢進し、MCP-2 は IFN- γ 刺激下の BEC において発現がより亢進した。

D. 考察

無刺激下での BEC と HUVEC のケモカイン遺伝子発現パターンは異なるが、IFN- γ および TNF- α 刺激下でのケモカインの遺伝子発現は類似していた。MCP-2 は IFN- γ 刺激下の BEC で有意に発現が亢進しており、皮膚微小循環系に特異的な反応である可能性が示唆された。IFN- γ および TNF- α はそれぞれ異なるケモカインの発現を調節していた。

E. 結論

アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患では、活性化された単核球より分泌された IFN- γ や TNF- α などによって皮膚血管内皮細胞のケモカインの発現が亢進し、これらのケモカインが白血球の皮膚への遊走に重要な役割を担っていることが示唆された。

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. 論文発表

Okubo Y, Tsuboi R, Connolly AJ
The chemokine expression of human dermal microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells by tumor necrosis factor -alpha and interferon-gamma
(submitted to J Invest Dermatol)

2. 学会発表

大久保ゆかり、坪井良治、Connolly AJ
TNF- α と IFN- γ 刺激によるヒト皮膚血管内皮細胞のケモカイン遺伝子発現の解析
第 796 回日本皮膚科学会研究東京地方会
東京 (2004.12-18)

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

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
—ヒト末梢血好酸球における TGF- β シグナル伝達経路についての解析—

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：金丸裕（順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター）

山崎美令（山梨大学医学部皮膚科学講座）

研究要旨：好酸球は、喘息の気道リモデリング病態の形成に Transforming growth factor- β (TGF- β)の産生を介して寄与している。一方、好酸球自体も TGF- β 受容体を発現し、その作用をうけるはずであるが、その詳細については未だ明らかにされていない。我々は本研究でヒト末梢血由来好酸球における Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナル伝達について解析した。その結果、正常ヒト末梢血由来好酸球においては、Smad2 経路だけで TGF- β シグナルが細胞内で伝達されている可能性が示唆された。この知見は好酸球が他の細胞に比し、ユニークな TGF- β シグナル伝達経路を用いている可能性を示唆した。今後それらの経路の特異的な役割を解明することによって好酸球をターゲットとしたアレルギー治療の新しい標的分子の同定につながるかもしれない。

A. 研究目的

好酸球は、喘息の気道リモデリング病態の形成に重要な役割を果たしていることが近年明らかにされ注目を集めている。とりわけ、好酸球が産生するサイトカインの1つである Transforming growth factor- β (TGF- β)がこの好酸球による気道リモデリング形成作用に重要であると考えら

れている。一方、好酸球自体も TGF- β 受容体を発現し、その作用をうけるはずであるが、その詳細については未だ明らかにされていない。我々は本研究でヒト末梢血由来好酸球における Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナル伝達について解析した。

B. 研究方法

ヒト末梢血由来好酸球を percoll

density gradient 法ならびに CD14 negative selection 法によって分離精製し、TGF- β 作用の主要な細胞内シグナル伝達系である Smad 経路の活性化の有無ならびにその機能的役割についてウエスタンブロット法、ELISA 法によって検討した。

C. 研究結果

正常ヒト末梢血由来好酸球において TGF- β 刺激による Smad2 のリン酸化が観察された。Smad3/Smad4 の発現はウエスタンブロットでは認められなかった。Smad4 の発現はプロテアーゼ阻害剤である MG132 の添加によって回復した。Smad3/Smad4 発現の欠如は、TGF- β /Smad 経路に依存する Smad7 遺伝子、c-jun 遺伝子の発現には影響を与えなかった。

D. E. 考察および結論

正常ヒト末梢血由来好酸球においては、Smad2 経路だけで TGF- β シグナルが細胞内で伝達されている可能性が示唆された。現在、正常ヒト末梢血由来好酸球機能における Smad2 活性の阻害効果について検討している。また気管支上皮細胞や線維芽細胞との相互作用が、好酸球における Smad 分子発現に及ぼす効果についても検討中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Kanamaru Y, Sumiyoshi K, Ushio H,

Ogawa H, Okumura K, Nakao A:

Smad3 deficiency in mast cells provides efficient host protection against acute septic peritonitis. *J Immunol* (in press)

2. Okamoto A, Kawamura T, Kanbe K, Kanamaru Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A: Suppression of serum IgE response and systemic anaphylaxis in a food allergy model by orally administered high-dose TGF- β . *Int Immunol* (in press)

3. Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A: Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 66:597-604, 2004

4. 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* 318:422-427, 2004

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

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 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師

研究要旨：アレルギー性鼻炎および喘息における一酸化窒素の産生が鼻粘膜および気道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および気管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 (NT) が生ずることを確認した。そこでアレルギー性鼻炎および喘息患者より鼻腔洗浄液および呼気を凍結して得られる breath condensate を回収し、その中に存在する NT を測定し、呼気中の NO と比較検討した。NT は鼻腔洗浄液中では測定閾値以下であり、その回収および測定には更なる工夫が必要であった。NT は呼気中の NO と同様に喘息の重症度に相関して産生されることが示唆された。さらに、ステロイドの服用により、NT は有意に産生量が低下し、呼気中の NO 産生以上にステロイドの影響を受けることが示唆された。上皮内に産生される NT は、これまでのアレルギー炎症の指標であった NO 以上に炎症の程度を反映する指標となる可能性が示唆された。

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 ($O_2^{\cdot -}$) 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 (NT) が生ずることを確認した。そこで実際にどの程度の NT がアレルギー性鼻炎

および喘息患者において産生されているかを評価し、疾患の重症度との関連について検討した。

B. 方法

アレルギー性鼻炎患者および喘息患者においては、鼻腔および呼気中の NO 濃度を測定した。アレルギー性鼻炎患者では片側の鼻腔を生理食塩水 10ml にて洗浄し、回収した。喘息患者においては、呼気蒸気 (breath condensate : BC) を呼気蒸気の回収器 (EcoScreen, Jaeger, Würzburg, Germany) を用いて回収した。鼻腔洗浄液および BC を凍結乾燥し、再度適当な濃度に溶解後、NT を EIA (Cayman Chemical, MI) を用いて測定した。

本研究に参加するか否かは対象者の自由意志であり、研究に参加しない場合でも不利益を受けることはないこと、一旦同意した場合でも不利益を受けることなくいつでもこれを撤回できることを明記した説明書によって説明し、対象者の人権擁護に配慮し。

また、本研究で得られた個人情報外部に洩れることのないよう厳重に管理した。試料等は、個人情報管理者及び分担管理者を設け、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しないこととした。

C. 結果

アレルギー性鼻炎患者および喘息患者においては、健康者に比べ有意に鼻腔および呼気中の NO 濃度の上昇を確認した。鼻腔洗浄液中の NT は希釈されるためか、EIA の測定閾値以下であった。一方、呼気蒸気中の NT 濃度は喘息の重症度に比例して有意に上昇しており、ステロイド吸入により、その産生濃度は有意に抑制されていた。喘息患者における NT 産生量は呼気中 NO 濃度と有意に相関して増大した。また、ステロイドの服用により NO 以上に NT 産生量は低下することが確認された。

D. 考察

アレルギー性鼻炎患者においては、NT の産生量を評価することができなかったため、鼻腔からの回収方法および測定法を検討する必要があると考えた。喘息患者においては、重症化に伴い NO 濃度が有意に上昇すると同様に、NT 濃度の有意な上昇を確認した。さらに、ステロイド吸入によ

り、その産生量は減少し、NO 濃度よりも著明な低下を示すことより、NO 以上に NT は気道上皮内での oxidative stress の生成を反映するものと考えられた。

E. 結論

気道上皮内の oxidative stress は、アレルギー炎症の重症度に伴い増大することが示唆され、nitrotyrosine (NT) 産生量の評価はアレルギー炎症の NO 以上に鋭敏な指標となり得る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 花澤豊行, 岡本美孝. 鼻肺反射, 鼻閉の肺呼吸への影響. *One Airway, One Disease -アレルギー性鼻炎と喘息- Progress in Medicine* 24:3193-3197, 2004.
- 2) 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. 知的所有権の取得状況

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

内因性リガンドによる Toll 様受容体を介したマスト細胞の活性化がアレルギー疾患に
及ぼす影響

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：内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントによる Toll-like receptor (TLR) を介したマスト細胞の活性化の機序とそれが関節炎に及ぼす影響を調べた。ファイブロネクチンのフラグメントは、用量依存的にマスト細胞を活性化し、サイトカインの産生を促した。また、その反応は TLR4 を介したものではあった。また関節炎モデルでは、マスト細胞上の TLR4 に依存した関節の腫脹が認められ、これらの機序がさまざまなアレルギー疾患に関与している可能性が示唆された。

- A. 研究目的：内因性リガンドによる Toll-like receptor (TLR) を介したマスト細胞の活性化がアレルギー疾患に及ぼす影響を検討することを目的とする。マウスの骨髄由来培養マスト細胞は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、TLR 依存的に活性化されることを報告してきた。TLR4 のリガンドには、これらの病原微生物由来の物質に加えて、生体が傷害された際に生じるファイブロネクチンやヒアルロン酸などのフラグメントが報告されている。これらのフラグメントは関節リウマチ等の疾患において増加し、病態にかかわっていることが報告されているが、その詳細なメカニズムについては不明である。そこで本研究では、マスト細胞が TLR を介して内因性リガンドにより活性化されるか否か、またその活性化がアレルギーの病態に関与するかどうかを検討することを目的とする。
- B. 方法：TLR2 欠損、TLR4 欠損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た。それぞれのマスト細胞をさまざまな濃度のファイibroネクチンのフラグメントである extra domain A (EDA)、タイプ III₁₁ およびタイプ III₁₂ で刺激し、6 時間後に採取した培養上清中のサイトカインを ELISA 法にて測定した。また NF- κ B の活性化はウェスタンブロッティング法により検出した。脱顆粒への影響は β -ヘキソースアミニダーゼの放出を指標に検出した。またファイibroネクチンのフラグメントを膝関節内に注入し、関節の腫脹、局所の炎症およびサイトカイン産生を調べた。同じ実験をマスト細胞欠損 WBB6F₁-W/W^y マウスおよびマスト細胞欠損マウスの局所のマスト細胞を TLR4 欠損マスト細胞で修復したもので行い、マスト細胞上の TLR の関与を調べた。
- C. 結果：野生型マウス由来の骨髄培養マスト細胞はファイibroネクチンのフラグメントである EDA により濃度依存的に活性化され、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IL-6) を産生したが、III₁₁ および III₁₂ にその作用はなかった。EDA によるマスト細胞活性化効果は TLR4 を欠損したマスト細胞では消失していたが、TLR2 欠損マスト

細胞では野生型のものと同程度であった。EDA は TLR4 依存的に NF- κ B を活性化したが、脱顆粒には影響しなかった。EDA を膝関節内に注入することにより、野生型マウスでは関節が腫脹するが TLR4 欠損マウスではみられなかった。また III₁₁ および III₁₂ の注入では関節は腫脹しなかった。マスト細胞欠損 WBB6F₁-W/W^y マウスでも EDA により腫脹はみられるが、野生型マウスに比べて有意に軽度であった。マスト細胞欠損マウスのマスト細胞を野生型マウス由来の培養マスト細胞で修復すると腫脹は野生型のものと同程度になった。同じ現象は TLR4 を欠損した培養マスト細胞の修復ではみられなかった。局所のサイトカインの産生 (IL-1 β , TNF- α ,) は脚の腫脹と平行していた。

D. 考察: マスト細胞の TLR は、他の自然免疫系の細胞 (マクロファージや樹状細胞) で報告されているようなリガンドを認識することがわかった。このことは、前回の MD-2 の結果とあわせると、マスト細胞が TLR の認識様式において他の免疫細胞にならう可能性が高いことを示唆するものである。今後、マスト細胞に特異的な機能 (脱顆粒等) に影響する TLR からのシグナル伝達経路の解明が、IgE 抗体が関与しないアレルギー疾患におけるマスト細胞の役割をより明らかにするために役立つであろう。

E. 結論: マスト細胞は病原微生物由来の物質に加えて、内因性リガンドであるファイブロネクチンのフラグメントにより TLR4 を介して活性化され、リウマチなどのアレルギー疾患の病態に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報: 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Warnnissorn P, Nakao A, Suto H, Ushio

H, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K, Ogawa H: Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 148:829-831. 2003.

2) Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H: Up-regulation of interleukin-13 receptor alpha1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 33:31-40. 2003.

3) Ushio H, Nakao A, Supajatura V, Miyake K, Okumura K, Ogawa H: MD-2 is required for the full responsiveness of mast cells to LPS but not to PGN. *Biochem Biophys Res Commun* 323:491-498, 2004.

4) Sampantharak P, Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. The effect of antibacterial peptide human beta-defensin-2 on interleukin-18 secretion by keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 37(3):188-91. 2005.

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

6) 牛尾博子: Toll-like receptor とアレルギー、*アレルギー* 53:469-475, 2004.

7) 牛尾博子: 自然免疫とマスト細胞、炎症と免疫 13:47-53, 2005

2. 学会発表

1) 牛尾博子: 蕁麻疹におけるマスト細胞の活性化、第 102 回日本皮膚科学会総会、イブニングシンポジウム、2003 年 5 月

2) 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