

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 玉置 邦彦

平成 17 (2005) 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、常深祐一郎、鑑 慎司、小宮根真弓

2. 皮膚特異的リンパ球および好酸球の遊走制御に関する研究----- 10

分担研究者 義江 修

3. 表皮海綿状態の発症機序と Th1/Th2 サイトカインバランス----- 14

分担研究者 師井洋一

4. 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----- 17

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----- 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 23

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 玉置 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- α や IFN- γ などによる刺激で産生誘導ないし増強される TARC/CCL17, MDC/CCL22 に加えて、Eotaxin-3/CCL26, CTACK/CCL27, MEC/CCL28 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。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。動物モデルとして作成した CCL17 Tg の解析から、CCL17 はそれのみでは炎症を引き起こさないが、一旦炎症がおこると CCR4 陽性 Th2 細胞を遊走させ、Th2 優位な状態を誘導して炎症を修飾すると考えられた。VEGF Tg の解析から、VEGF が炎症細胞浸潤、血管増生を誘導するうえで重要な分子であることが明らかとなった。また、マウスの CCR4、CCR6、CCR8、CCR10 に対する単クローン抗体作製に成功した。さらに、EBV 感染による B 細胞での CCL22 発現誘導機構を明らかにすることが出来た。今後、皮膚 KC での CCL22 を含めたケモカインの発現制御を明らかにするためには、KC に高効率に遺伝子を導入する方法の確立が重要である。表皮シートのイオンおよび蛋白透過性の実験から、AD の急性病変である海綿状態には Th2 細胞由来の IL-4 が、慢性病変である苔癬化局面には Th1 細胞由来の IFN- γ が関与している可能性が示唆された。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、治療の混乱などで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労働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べて研究が進んでおり、最近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、主に粘膜免疫に関与する MEC/CCL28 とその受容体 CCR10, CCR3 を中心に研究をすすめてきた。3 年目である本年は主として CCL17, CCL26, CCL27, CCL28, CCR4, CCR10 について、動物モデルの解析を含めて研究を展開した。

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)、菌状肉肉症 (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。また、AD 患者における CCL26, CCL27 の重要性についても明らかにした。今年度は AD 患者や BP 患者における CCL28 の血清中の値を ELISA で検討した。(2) 玉置らは KC から産生される CCL17, CCL22 の産生制御についてこれまで報告してきたが、今年度は KC からの CCL26, CCL27, CCL28 産生制御について主に HaCaT 細胞を用い、シグナル伝達系を含めて検討した。(3) 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。(4) 義江らはマウスの CCR4, CCR6, CCR8 および CCR10 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。(5) 義江らは CCL22 のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーター遺伝子のシリーズを作製し、CCL22 の発現制御機構を解析した。(6) 師井らは皮膚湿疹反応の代表的な組織所見である表皮の海綿状態の発症機序を明らかにするため、ヒト表皮細胞株 HaCaT を用いて表皮シートを

作成後、その電気抵抗 (イオン透過性) および蛋白透過性を測定した。(7) 玉置、師井らは血中 TARC/CCL17 値の臨床におけるマーカーとしての可能性について検討した。

C. 研究結果

(1) 玉置らは AD や BP 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 CCL28 が高値を示すことを明らかにした。さらに、AD や PsV 患者の病変部皮膚の KC で CCL28 が発現していることを示した。(2) 玉置らは HaCaT 細胞からの CCL26 産生が IL-4 や IL-13 により増強されること、また CCL27 や CCL28 産生が TNF- α と IL-1 β によって増強されることを明らかにした。さらに、CCL26 産生調節には STAT6 が、CCL27 産生調節には JNK, p38 が、CCL28 産生調節には ERK, NF- κ B が各々関与することを示した。またロキシシロマイシンの臨床上の有用性についての機序を明らかにした。(3) 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。CCL17 Tg で皮膚炎の自然発症はみられなかったが、oxazolone (OX) および FITC による、単回 (acute) もしくは繰返し (chronic) 惹起による、contact hypersensitivity (CHS) を行った。Tg マウスでは Non-Tg マウスと比較して、Th1 型 CHS 反応 (OX acute CHS) は抑制され、Th2 型 CHS 反応 (OX chronic CHS および FITC acute CHS) は増強された。OX CHS では acute でも chronic でも、浸潤 CCR4 陽性細胞数は Tg マウスで多かった。OX chronic CHS では Tg マウスで Non-Tg マウスと比較して肥満細胞数が有意に増加していた。OX CHS において、Tg マウスでは Non-Tg マウスと比較して IL-4 mRNA 発現が常に増強し、IFN- γ mRNA 発現が減弱していた。Chronic CHS を行うと、血清中 IgE が増加した。これは OX より FITC で著明であり、Tg マウスでは

Non-Tg マウスと比較して有意に増加していた。中村らは KC 特異的に発現する VEGF Tg を作成した。VEGF Tg マウスでは TNCB による皮膚炎の惹起において著明な皮膚炎の増悪を認め、真皮内血管の増加や T 細胞浸潤の増加を認めた。浸潤細胞は CD8 陽性細胞が主体であり、これらの細胞の多くは IFN- γ を産生した。また Tg マウスでは tape stripping による角層刺激によって著明な皮膚炎が誘導され、それは長期間継続し表皮内には T 細胞浸潤が誘導された。(4) 義江らはマウスの CCR4, CCR6, CCR8 および CCR10 を認識する単クローン抗体を作製することに成功した。これらの単クローン抗体を用いてマウスでのこれらのレセプターの発現細胞の同定と機能解析が現在進行中である。(5) 義江らはまず別途見出した EBV 感染による B 細胞での CCL22 発現誘導機構を解析し、ウイルス遺伝子産物 LMP1 が NF- κ B の活性化を介して CCL22 の発現を誘導することを明らかにした。そこで同様の解析を皮膚角化細胞で開始した。皮膚角化細胞の場合は遺伝子導入効率が極めて悪いため、まず効率のよい遺伝子導入法の検討から始めており、現在進行中である。(6) 師井らは表皮シートのイオンおよび蛋白透過性の実験で、IFN- γ 添加群ではイオン透過性、蛋白透過性共に抑制されるのに対して、IL-4 添加群ではイオン透過性に変化は認められなかったが、蛋白透過性は有意に亢進させることを明らかにした。さらに、フローサイトメトリーによる解析で、重要な細胞接着関連分子である E-カドヘリンおよびデスモグレイン-3 の発現が INF- γ 添加によって増強し、IL-4 添加によって減弱することを示した。(7) 玉置、師井らは血清 TARC/CCL17 値が日常臨床で AD のマーカーとして用いられる可能性を示唆する結果を得た。

D. 考察

これまでの研究によって、(1) KC からサイトカインによる刺激で産生増強される CCL17, CCL22 に加えて、KC から産生される CCL26, CCL27, CCL28 なども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。CCL17, CCL22 では CCR4 発現 Th2 細胞の、CCL26, CCL28 では CCR3 発現好酸球の、CCL27, CCL28 では CCR10 発現 T 細胞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。(3) 動物モデルとして作成した CCL17 Tg の解析から、CCL17 はそれのみでは炎症を引き起こさないが、一旦炎症がおこると CCR4 陽性 Th2 細胞を遊走させ、Th2 優位な状態を誘導して炎症を修飾すると考えられた。その際、肥満細胞数の増加、血清 IgE 濃度の増強といった AD に似た状態がみられ、こういった AD の病態に CCL17 が関与していることが示唆された。現在、抗炎症作用を有するシグナル伝達阻害剤 (CX-659S など) の軟膏を用いて、動物モデルで惹起された炎症の抑制効果を検討中である。また、別に作成した CCL27 Tg の解析も現在進めている。また VEGF Tg の解析から、VEGF が炎症細胞浸潤、血管増生を誘導するうえで重要な分子であることが明らかとなった。接触皮膚炎をはじめとするアレルギー反応を誘導する VEGF Tg マウスを用いて炎症細胞浸潤の動態を検討することは、皮膚炎の治療を確立するうえで重要である。これらの動物モデル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。(4) マウスの CCR4, CCR6, CCR8, CCR10 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。(5) EBV 感染による B 細胞での CCL22 発現

誘導機構を明らかにすることが出来た。今後、皮膚 KC での CCL22 を含めたケモカインの発現制御を明らかにするためには、KC に高効率に遺伝子を導入する方法の確立が重要である。(6) 表皮シートのイオンおよび蛋白透過性の実験から、表皮細胞は IL-4 の存在下では細胞接着分子の適切な細胞内分布に障害をきたし、細胞間の接着性が減弱するものと思われた。一方、IFN- γ 存在下では細胞間接着性は増強することも明らかとなった。AD の病態において急性期には Th2 が優位であり、慢性期には Th1 も関与することが知られている。急性期の海綿状態には Th2 細胞由来の IL-4 が、慢性期の苔癬化局面には Th1 細胞由来の IFN- γ が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

我々は AD、PsV などのアレルギー性皮膚疾患患者の血清中ケモカイン濃度の測定に始まり、培養 KC を用いた in vitro でのケモカイン産生機序に関する解析、さらに表皮 KC にケモカイン・サイトカインを過剰発現させた in vivo での動物モデルの解析へと研究を進めてきた。その結果、皮膚アレルギー炎症発症には TARC/CCL17, MDC/CCL22 とその受容体 CCR4、CTACK/CCL27, MEC/CCL28 とその受容体 CCR10、Eotaxin/CCL11, Eotaxin-3/CCL26 とその受容体 CCR3 や、VEGF, IL-4, TNF- α などのサイトカインが重要な働きをしていることを明らかにした。このような皮膚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より深まり、さらに新たな治療戦略の開発へと結びついていくものと期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita H, Asahina A, Gao P, Fujiwara H, Tamaki K. Expression and regulation of RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, and MIP-1 β /CCL4 in mouse Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1331-3.
- 2) 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* 2004; 122: 783-90.
- 3) Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients. *Exp Dermatol* 2004; 13: 715-9.
- 4) Nakayama T, Kato Y, Hieshima K, Nagakubo D, Kunori Y, Fujisawa T, Yoshie O. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J Immunol* 2004; 173: 2078-83.
- 5) Hieshima K, Kawasaki Y, Hanamoto H, Nakayama T, Nagakubo D, Kanamaru A, Yoshie O. CC Chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol* 2004; 173: 3668-75.
- 6) Hirata T, Furukawa Y, Yang BG, Hieshima K, Fukuda M, Kannagi R, Yoshie O, Miyasaka M. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J Biol Chem*

- 2004; 279: 51775-8.
- 7) Moroi Y, Yu B, Urabe K, Koga T, Nakahara T, Dainichi T, Furue M. Effects of MAPK inhibitors on CCR4-mediated chemotaxis against thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17). J Dermatol Sci 2004; 36: 186-8.
- 8) Kobayashi J, Inai T, Morita K, Moroi Y, Urabe K, Shibata Y, Furue M. Reciprocal regulation of permeability through a cultured keratinocyte sheet by IFN- γ and IL-4. Cytokine 2004; 28: 186-9.
- 9) Furukawa H, Nakamura K, Zheng X, Tojo M, Oyama N, Akiba H, Nishibu A, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Enhanced TARC production by dust-mite allergens and its modulation by immunosuppressive drugs in PBMCs from patients with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2004; 35: 35-42.
- 10) Furukawa H, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F. Effect of an antiallergic drug (Olopatadine hydrochloride) on TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production by PBMCs from patients with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2004; 36: 165-72.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 特許出願 2004-210465
2. 実用新案登録 なし
3. その他 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
常深祐一郎 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学
鑑 慎司 東京大学大学院医学系研究科皮膚科学
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、KC からサイトカインによる刺激で産生増強される TARC/CCL17, MDC/CCL22 に加えて、KC から産生される Eotaxin-3/CCL26, CTACK/CCL27, MEC/CCL28 なども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。CCL17, CCL22 では CCR4 発現 Th2 細胞の、CCL26, CCL28 では CCR3 発現好酸球の、CCL27, CCL28 では CCR10 発現 T 細胞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。動物モデルとして作成した CCL17 Tg の解析から、CCL17 はそのみでは炎症を引き起こさないが、一旦炎症がおこると CCR4 陽性 Th2 細胞を遊走させ、Th2 優位な状態を誘導して炎症を修飾すると考えられた。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, Eotaxin-3/CCL26, CTACK/CCL27, MEC/CCL28 について検討する。また、(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。さらに、(3)動物モデルを作成しアレルギー性皮膚疾患発症機序を in vivo で解析し、併せて薬剤の効果を検討する。また、(4)遺伝子多型に関する研究も展開し、(5)血中ケモカイン値の日常臨床におけるマーカーとしての可能性についても検討を始めている。

B. 研究方法

(1)これまでに AD, BP, MF における CCL17, CCL22, CCL26, CCL27 の重要性に

ついて明らかにし報告してきた (J Allergy Clin Immunol 2001, Clin Exp Immunol 2002, Br J Dermatol 2003, J Am Acad Dermatol 2003, J Allergy Clin Immunol 2003, Clin Exp Immunol 2003)。今年度は AD 患者や BP 患者における CCL28 の血清中の値を ELISA で検討した。(2) KC から産生される CCL17, CCL22 の産生制御についてこれまで報告してきたが (Cytokine 2002, J Dermatol Sci 2003)、今年度は KC からの CCL26, CCL27, CCL28 産生制御について主に HaCaT 細胞を用い、シグナル伝達系を含めて検討した。さらに、(3)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。(4) 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 CCR4 に関する解析を行なった。さらに、CCL17 の promoter 領域の遺伝子多型が CCL17 遺伝子の promoter 活性に与える影響を検討した。(5) 血清 CCL17 値の臨床におけるマーカーとしての可能性について検討した。

C. 研究結果

(1) AD や BP 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 CCL28 が高値を示すことを明らかにした。さらに、AD や PsV 患者の病変部皮膚の KC で CCL28 が発現していることを示した (文献 1)。(2) HaCaT 細胞からの CCL26 産生が IL-4 や IL-13 により増強されること、また CCL27 や CCL28 産生が TNF- α と IL-1 β によって増強されることを明らかにした。さらに、CCL26 産生調節には STAT6 が、CCL27 産生調節には JNK, p38 が、CCL28 産生調

節には ERK, NF- κ B が各々関与することを示した (投稿中)。またロキシシロマイシンの臨床上の有用性についての機序を明らかにした (投稿中)。(3) 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。CCL17 Tg で皮膚炎の自然発症はみられなかったが、oxazolone (OX) および FITC による、単回 (acute) もしくは繰返し (chronic) 惹起による、contact hypersensitivity (CHS) を行った。Tg マウスでは Non-Tg マウスと比較して、Th1 型 CHS 反応 (OX acute CHS) は抑制され、Th2 型 CHS 反応 (OX chronic CHS および FITC acute CHS) は増強された。OX CHS では acute でも chronic でも、浸潤 CCR4 陽性細胞数は Tg マウスで多かった。OX chronic CHS では Tg マウスで Non-Tg マウスと比較して肥満細胞数が有意に増加していた。OX CHS において、Tg マウスでは Non-Tg マウスと比較して IL-4 mRNA 発現が常に増強し、IFN- γ mRNA 発現が減弱していた。Chronic CHS を行うと、血清中 IgE が増加した。これは OX より FITC で著明であり、Tg マウスでは Non-Tg マウスと比較して有意に増加していた。(4) AD に関して CCR3 の多型解析 (1014C/T) を行なったが、健常人と比べて有意差は認められなかった (文献 2)。また、CCL17 の promoter 領域の遺伝子多型 (-431C/T) に関しては、-431T の方が -431C より promoter 活性が有意に高いことを示した (文献 3)。(5) 血清 TARC/CCL17 値が日常臨床で AD のマーカーとして用いられる可能性を示唆する結果を得た。

D. 考察

これまでの研究によって、KC からサイト

カインによる刺激で産生増強される CCL17, CCL22に加えて、KCから産生される CCL26, CCL27, CCL28 なども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。CCL17, CCL22 では CCR4 発現 Th2 細胞の、CCL26, CCL28 では CCR3 発現好酸球の、CCL27, CCL28 では CCR10 発現 T 細胞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。動物モデルとして作成した CCL17 Tg の解析から、CCL17 はそれのみでは炎症を引き起こさないが、一旦炎症がおこると CCR4 陽性 Th2 細胞を遊走させ、Th2 優位な状態を誘導して炎症を修飾すると考えられた。その際、肥満細胞数の増加、血清 IgE 濃度の増強といった AD に似た状態がみられ、こういった AD の病態に CCL17 が関与していることが示唆された。現在、抗炎症作用を有するシグナル伝達阻害剤 (CX-659S など) の軟膏を用いて、動物モデルで惹起された炎症の抑制効果を検討中である。また、別に作成した CCL27 Tg の解析も現在進めている。

E. 結論

我々は AD、PsV などのアレルギー性皮膚疾患患者の血清中ケモカイン濃度の測定に始まり、培養 KC を用いた in vitro でのケモカイン産生機序に関する解析、さらに表皮 KC にケモカイン・サイトカインを過剰発現させた in vivo での動物モデルの解析へと研究を進めてきた。その結果、皮膚アレルギー炎症発症には TARC/CCL17, MDC/CCL22 とその受容体 CCR4、CTACK/CCL27, MEC/CCL28 とその受容体 CCR10、

Eotaxin/CCL11, Eotaxin-3/CCL26 とその受容体 CCR3 や、IL-4, TNF- α などのサイトカインが重要な働きをしていることを明らかにした。このような皮膚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より深まり、さらに新たな治療戦略の開発へと結びついていくものと期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kagami S, Saeki H, Kakinuma T, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Komine M, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. Significant elevation of serum levels of MEC/CCL28 in patients with atopic dermatitis, psoriasis vulgaris and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol*, in press.
- 2) Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, Kakinuma T, Fujita H, Kagami S, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Lack of association of CCR4 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese patients. *Acta Derm-Venereol* 2004; 84: 187-90.
- 3) Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic

- dermatitis in Japanese patients. *Exp Dermatol* 2004; 13: 715-9.
- 4) Fujita H, Asahina A, Gao P, Fujiwara H, Tamaki K. Expression and regulation of RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, and MIP-1 β /CCL4 in mouse Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1331-3.
- 5) 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* 2004; 122: 783-90.
- 6) Tsunemi Y, Ihn H, Saeki H, Tamaki K: The lesional skin of linear IgA bullous dermatosis express growth-regulated peptide (GRO)- α . *J Dermatol* 31: 546-51, 2004.
- H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

皮膚特異的リンパ球および好酸球の遊走制御に関する研究

分担研究者 義江 修 近畿大学医学部細菌学教授

研究要旨：マウスの CCR4、CCR6、CCR8 およびヒトの CCR10 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はじめて成功し、それぞれの特異性をマウスおよびヒトのすべてのケモカイン受容体 18 種を強制発現させたマウス L1.2 細胞パネルを用いて確認した。さらにこれらの抗体を用いてマウスの正常リンパ組織やヒト末梢血単核球での発現細胞を解析した。皮膚をはじめとした様々な組織へのリンパ球や樹状細胞の帰巢・浸潤をマウスやヒトの様々な病態で解析する上でこれらの抗体はきわめて有用な手段を提供すると思われる。また以前、我々は新規のヒト CC ケモカイン LEC/CCL16 を報告し、それが肝実質細胞できわめて特異的に発現することや、CCR1、CCR2、CCR5 の低親和性リガンドであることを報告したが、今回さらに LEC/CCL16 は最近同定された好酸球特異的新規ヒスタミン受容体 H4 の機能的リガンドでもあり、H4 に高親和性に結合するとともに、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。そのため LEC/CCL16 は好酸球の生理的帰巢や病的浸潤において何らかの役割をはたす可能性がでてきた。

A. 研究目的

ヒトの皮膚指向性メモリー/エフェクター T 細胞は CCR4、CCR6、CCR8、CCR10 などのケモカイン受容体を特異的に発現することが報告されている。そのため、これらのケモカイン受容体およびこれらに作用するケモカインは免疫アレルギー性皮膚疾患の発症や病態形成に重要な役割をはたすと推測される。そこでこれらの受容体の発現と機能をマウスの各種病態モデルを用いて解析するために、マウスでのこれらの受容体に対する単クローン抗体を作製する。また、ヒトの CCR10 に対単クローン抗体は市販されておらず、そこでヒトの CCR10 に対する単クローン抗体も作製する。さらに、H4 は新たに同定された好酸球に特異的に発現するヒスタミン受容体である。そこで H4 の細胞遊走における役割を解析し、あわせて H4 の新たなリガンドを探索する。それによって免疫アレルギー性疾患の重要なエフェクター細胞である好酸球の遊走を制御する新たな分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

マウスの CCR4、CCR6、CCR8、CCR10 およびヒトの CCR10 のそれぞれの N 末端細胞外領域に対応するペプチド鎖を合成し、キャリアータンパク KLH に結合してア

ジュバンドとともに雄のアルメニアンハムスターのフッドパッドに複数回免疫した。血清抗体価を BSA と結合したペプチドをコートした 96 穴プレートをもちいた ELISA で測定し、抗体価の上昇した個体から最終免疫 3 日後に脾臓および所属リンパ節を摘出してリンパ球を調製し、常法に基づいてマウス SP2 ミエローマ細胞と融合した。ハイブリドーマ培養上清をそれぞれの受容体に対する染色活性でスクリーニングし、陽性クローンは限界希釈法を繰り返してクローニングした。

報告されたヒトのヒスタミン受容体 H1、H2、H3、H4 の cDNA 配列に基づいてプライマーを設定し、それぞれを PCR クローニングした。クローン化された cDNA は塩基配列を確認の後、IRES により GFP も同時に発現するレトロウイルスベクターのクローニングサイトに導入し、組換えレトロウイルスを作製した。マウス L1.2 細胞にこれらの組換えレトロウイルスを感染し、GFP 陽性細胞を FACS ソーティングを繰り返すことにより純化した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は近畿大学医学部実験動物取扱い指針に基づいて行った。またヒトのドナーからの採血は書類によるインフォームドコンセントに基づいて行った。

C. 研究結果

マウスの CCR4、CCR6、CCR8 およびヒトの CCR10 に対するアルメニアンハムスター単クローン抗体を作製することに成功し、それぞれ 2G12、29-2L17、10-18、51210-7 と命名した。これらの単クローン抗体の特異性はマウスおよびヒトの 18 種すべてのケモカイン受容体を発現させたマウス L1.2 細胞パネルを用いて確認した。そこでこれらの受容体の正常細胞での発現を検討した。その結果、抗mCCR4 は胸腺細胞のダブル陽性細胞と一部の CD4 シングル陽性細胞を染色した。抗 mCCR6 は脾臓、リンパ節、パイエルパッチ、末梢血中の B 細胞を染色した。抗mCCR8 は胸腺で CD4 シングル陽性細胞の一部とダブル陰性細胞のごくわずかと反応した。また抗ヒト CCR10 はヒト末梢血中の CD4 陽性メモリーT 細胞の一部を染色した。これらの結果はこれまでに報告されているこれらの受容体の発現分布の成績とよく一致していた。CCR6 についてはさらにマウスのヘルペス性角膜炎モデルを用いて浸潤細胞での発現を解析した。まず感染にともない角膜上皮細胞と角膜実質細胞はともに CCR6 のリガンドである CCL20 を産生してくることを見出した。そして CCR6 を発現する MHC クラス II 陽性細胞が角膜実質に浸潤してくることを抗mCCR6 で明らかにした。現在、さらにこれらの抗体を用いてマウスおよびヒトの各種病態での各発現細胞の解析を進めている。

ヒスタミンはマスト細胞から刺激によって大量に放出され、血管拡張や血管透過性亢進を誘導する。これまでヒスタミン受容体には H1 から H3 までが知られていた。一方、ヒスタミンは好酸球の細胞遊走を誘導することが報告されていたが、これらの受容体ではそのような活性は説明できなかった。ところが最近、好酸球に特異的に発現する新規のヒスタミン受容体 H4 が同定された。そしてヒスタミンによる好酸球の遊走は H4 を介して行われることが示唆された。そこで我々は報告された配列に基づ

き H4 をクローニングし、L1.2 細胞に強制発現させた。さらに H1 と H2 もクローニングし、同様に強制発現させた。H3 についてはその配列にきわめて GC リッチな領域があり、そのためいろいろ試みたが PCR クローニングはできなかった。そこで H1、H2、H4 についてヒスタミンによる一過性の細胞内カルシウム上昇反応と遊走反応を検討した。その結果、いずれのレセプターもヒスタミンによって細胞内カルシウム濃度の一過性上昇を誘導したが、H4 のみが細胞遊走を誘導した。また H4 によるカルシウム濃度上昇や細胞遊走は百日咳毒素で抑制されることから、H4 は 3 量体 Gタンパク質の $G_{\alpha i}$ クラスに共役していることが確認された。これらの結果から、ヒスタミンは H4 に作用して好酸球の遊走を誘導することが証明された。

7 回膜貫通型受容体はしばしばまったく構造の異なる複数のリガンドと反応しうることが知られている。H4 は細胞遊走を誘導する受容体である。そこで H4 を中心にヒスタミン受容体とケモカインとの反応性を系統的に調べた。その結果、調べた 32 種のヒト組換え型ケモカイン (CC ケモカイン: 1、2、3、4、5、7、8、11、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、24、25、26、27、28; CXC ケモカイン: 4、8、9、12、13、16; C ケモカイン: XCL1; CX3C ケモカイン: CX3CL1) のうち、LEC/CCL16 が H1、H2、H4 のうち、H4 に特異的に反応し、H4 を発現する L1.2 細胞に百日咳毒素感受性の細胞内カルシウム濃度上昇と細胞遊走を誘導することを見出した。また CCL16 は H4 に $K_d=17\text{nM}$ で結合し、その結合はヒスタミンにより阻止された。さらに CCL16 は H4 を発現するヒトおよびマウスの好酸球を H4 依存的に遊走することが確認された。

D. 考察

ヒトで CCR4 は Th2 細胞や CLA 陽性の皮膚指向性メモリーT 細胞に選択的に発現することが報告されている。また CCR8 は

正常人の皮膚に存在する T 細胞に選択的に発現することが報告されている。さらに CCR4 と CCR8 はともに制御性 T 細胞に発現することも報告されている。また CCR6 は B 細胞、未熟樹状細胞、 $\alpha 4 \beta 7$ 陽性腸管指向性メモリー T 細胞、および一部の CLA 陽性皮膚指向性メモリー T 細胞で発現することが報告されている。そのためマウスの CCR4、CCR6、CCR8 に対する単クローン抗体を用いることにより、各種免疫アレルギー疾患におけるこれらの受容体の役割をマウスの疾患モデルで解析することが可能となる。その結果、これらの受容体の病態形成における役割や治療標的としての有用性もマウスのモデルで詳細に解析することが可能となる。

またヒトの CCR10 はやはり CLA 陽性皮膚指向性メモリー T 細胞の一部と形質細胞での発現が報告されている。ヒトの CCR10 に対する単クローン抗体はいまだ市販されておらず、そのため我々の抗ヒト CCR10 抗体はヒトでの各種病態における CCR10 の発現解析と機能解析に威力を発揮すると期待される。マウス CCR10 に対する単クローン抗体の作製は今後の課題である。

マスト細胞は刺激されるとヒスタミン、プロスタグランジン D₂、セロトニンなどの強力なメディエーターを放出する。以前我々は新規のプロスタグランジン D₂ 受容体 CRTH2 を同定し、それが好酸球の遊走を誘導することを報告した。さらに最近ヒスタミンに対する新規の受容体 H₄ が同定され、好酸球での特異的発現と細胞遊走機能が示唆された。また興味深いことにセロトニンもセロトニン受容体の 1 種である 5-HT_{2A} を介して好酸球の遊走を誘導することが最近報告された。このように、マスト細胞から放出されるメディエーターはいずれも好酸球を遊走することが明らかとなった。我々は H₁、H₂ および H₄ をマウス L1.2 細胞に強制発現させることにより、H₄ が G α i クラスの 3 量体 G タンパク質と特異的に共役して細胞内のカルシウム濃度上昇と細胞遊走を誘導することを明

らかにした。さらにヒスタミン受容体に対するケモカインの交叉反応性を系統的に調べ、新たに LEC/CCL16 が H₄ のリガンドとして作用しうることを明らかにした。抗菌ペプチドの 1 種である β デフェンシンがケモカイン受容体 CCR6 のリガンドとして作用することが報告されている。しかしながら、ケモカインがケモカイン受容体以外の GPCR に作用することが示されたのは今回がはじめてである。CCL16 は肝実質細胞や IL-10 で処理した単球で産生されるケモカインであり、正常人の血漿中にも高濃度で存在する。そのため CCL16 は好酸球の骨髄からの生理的動員に関与する可能性がある。また CCL16 は薬剤障害などでみられる好酸球の肝組織への浸潤や Th₂ 型の炎症での好酸球浸潤にも関与する可能性が示唆され、今後の研究が待たれる。

E. 結論

マウスの CCR4、CCR6 および CCR8 に対する単クローン抗体を作製することに成功した。これらの単クローン抗体はそれぞれのケモカイン受容体の生理的および各種病態における役割をマウスを用いて解析することを可能とし、それによってこれらの受容体の治療標的としての可能性を評価することが可能となる。またヒトの CCR10 に対する単クローン抗体も CCR10 の皮膚指向性 T 細胞や形質細胞での発現を解析し、ヒトの各種病態での役割を明らかにするのに有用である。LEC/CCL16 が好酸球に特異的に発現する新たなヒスタミン受容体 H₄ のリガンドであることが明らかとなり、それによって好酸球の遊走制御や組織浸潤において LEC/CCL16 が何らかの役割をはたす可能性が新たに明らかにされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakayama, T., Kato, Y., Hieshima, K., Nagakubo, D., Kunori, Y., Fujisawa, T., Yoshie, O. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16

attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J. Immunol.* 173:2078-2083, 2004.

2) Shirane, J., Nakayama, T., Nagakubo, D., Izawa, D., Hieshima, K., Shimomura, Y., Yoshie, O. Corneal epithelial cells and stromal keratocytes efficiently produce CC chemokine-ligand 20 (CCL20) and attract cells expressing its receptor CCR6 in mouse herpetic stromal keratitis. *Current Eye Reseach* 28:297-306, 2004.

3) Hieshima, K., Kawasaki, Y., Hanamoto, H., Nakayama, T., Nagakubo, D., Kanamaru, A., Yoshie, O. CC Chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J. Immunol.* 173:3668-3675, 2004.

4) Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B.G., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O., Miyasaka, M. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J. Biol. Chem.* 279:51775-51778, 2004.

2. 学会発表

1) 稗島州雄、中山隆志、長久保大輔、義江修「IgA 抗体産生細胞の腸管粘膜固有層へのホーミングを誘導するケモカインの解析」第 34 回日本免疫学会学術集会、札幌 (2004.12.1)

2) 中山隆志、加藤佳子、稗島州雄、長久

保大輔、藤沢隆夫、義江修「Liver-expressed chemokine/CCL16 のヒスタミン H4 レセプターに対する作用と好酸球遊走」第 34 回日本免疫学会学術集会、札幌 (2004.12.1)

3) 渡邊賀子、中山隆志、長久保大輔、稗島州雄、義江修「ドーパミンレセプターD3 を介した CD8 陽性 T 細胞の遊走」第 34 回日本免疫学会学術集会、札幌 (2004.12.1)

4) Hirata, T., Hieshima, K., Yoshie, O., Miyasaka, M. PSGL-1 expressed on the cell surface regulates CCL27-induced cell response. 第 34 回日本免疫学会学術集会、札幌 (2004.12.1)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2004-210465 (出願日 2004 年 7 月 16 日) 発明の名称「肝臓疾患等の予防または治療剤のスクリーニング法」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表皮海綿状態の発症機序とTh1/Th2サイトカインバランス

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：急性湿疹の病理学的特徴である表皮細胞の海綿状態の発症機序を解明する目的で、培養表皮シートにTh1, Th2サイトカインを添加することによる表皮細胞の物質透過性および接着分子の発現変化を検討した。

A. 研究目的

近年のサイトカイン・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。アトピー性皮膚炎においては、急性期はTh2、慢性期にはTh1タイプが優位なサイトカイン発現を示すことが判明している。一方、急性湿疹の海綿状態、慢性湿疹の苔癬化の発症機序は明らかにされてこなかった。我々はこれらの所見をふまえて、培養表皮シートにTh1サイトカインであるIFN- γ やTh2サイトカインであるIL-4を添加することによって表皮細胞の物質透過性、および表皮細胞間の接着分子の発現変化を検討した。

B. 研究方法

ヒト表皮細胞株であるHaCaT細胞を用い培養表皮細胞シートをニトロセルロース膜上で作製した。以降の検討はコントロール群、IFN- γ 添加群、IL-4添加群で比較した。サイトカインは0.002-2ng/mlで使用し、接着分子発現実験についてはサイトカイン濃度5-10ng/mlを使用した。培養開始後2日、4日、6日に培養シート上下での電気抵抗値を測定した。また、6日目に約40kDの蛍光色素-デキストラン粒子の培養2時間における透過性についても検討した。さらに、それぞれのサイトカイン添加後の接着分子の発現を各種モノクローナル抗体を用いて免疫プロット法、蛍光染色法、フローサイトメトリー

で確認した。

(倫理面への配慮)

すべてヒト表皮細胞株を用いた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

IFN- γ 添加群では経時的に表皮シート上下での電気抵抗値が上昇したが、IL-4添加群では変化はなかった。デキストラン粒子の透過性はIFN- γ 添加群では減少し、IL-4添加群では上昇していた。サイトカイン添加前後の各種接着分子(E-カドヘリン関連分子)発現を免疫プロット法で確認したところ、細胞内でのタンパク質の総量では変化のないことが判明した。そこで、蛍光抗体法による染色をしたところ、IL-4添加群では、接着因子は細胞質内にびまん性に分布するように発現し、IFN- γ 添加群では細胞膜上により強く発現していた。E-カドヘリン、デスモグレイン3の細胞膜上の発現をフローサイトメトリーで検討すると、IFN- γ 添加群で発現が増強し、IL-4添加群で発現が減弱していた。

D. 考察

サイトカイン添加によって、表皮の電気抵抗値が変化するという事は、イオンの透過性が変化すると同義であると考えられる。デキストランの40kDの大きさはアルブミンの66kDとほぼ同等であり、血漿成分の透過性を意味している。すなわちこれらの結果

より、Th2サイトカインによって皮膚炎症性疾患局所において浸出液の透過性が亢進していること、また、Th1サイトカインでは減弱していることが明らかとなった。表皮細胞間にはE-カドヘリンを中心としたアドヘレンスジャンクションとデスモグレインを中心としたデスモゾームによって接着していると考えられており、これらがサイトカインによって発現（細胞内分布）が変化することが判明した。すなわちTh1サイトカインでは細胞膜上に分布しお互いの接着を強固なものとし、Th2サイトカインでは細胞質内にびまん性に分布することで、その接着を減弱させていた。E-カドヘリンの細胞膜上での発現調節はTh2細胞を遊送させるケモカインであるTARCやMDCの発現調節とも密接に関連しており、(Th1サイトカインで発現↑、Th2サイトカインで発現↓) これらが協調的に皮膚症状の形成に関与しているものと考えられた。

E. 結論

今回の検討より以下のことが推測される。アトピー性皮膚炎の病初期においては、Th2サイトカインが優位であり、表皮細胞間の接着が弱まるため、海綿状態や浸出傾向の強い臨床像の形成が促進される。その後、慢性化に伴ってTh1サイトカインが優位になると細胞間接着が強固となり、滲出液が減少し、乾燥性の苔癬化局面が形成される。このように、Th1/Th2バランスのシフトは表皮細胞の構造と機能に直接的な変調をもたらし、臨床像の形成に深く関与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Furue M, Terao H, Moroi Y, Koga T, Kubota Y, Nakayama J, Furukawa F, Tanaka Y, Katayama I, Kinukawa N, Nose Y, Urabe K.

Dosage and adverse effects of topical tacrolimus and steroids in daily management of atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 31, 277-283 (2004)

2. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on the maturation of human monocyte-derived dendritic cells induced by LPS. *Int Immunol* 16, 1701-1709 (2004)

3. Moroi Y, Yu B, Urabe K, Koga T, Nakahara T, Dainichi T, Furue M. Effects of MAPK inhibitors on CCR4-mediated chemotaxis against thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17). *J Dermatol Sci* 36 186-188 (2004)

4. Kobayashi J, Inai T, Morita K, Moroi Y, Urabe K, Shibata Y, Furue M. Reciprocal regulation of permeability through a cultured keratinocyte sheet by IFN- γ and IL-4. *Cytokine* 28, 186-189 (2004)

2. 学会発表

1. 古江増隆、内 博史、中原剛士、師井洋一

皮膚炎の裏側 - keratinocyte response modifier という新たな概念について - 日本化粧品科学会誌, 別冊 2004. 3. 28

2. 深川修司、中原剛士、師井洋一、古江増隆. IFN- β による DC 誘導および IL-1 β +IFN- γ による成熟化についての検討. 第 29 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2004. 4. 14-16

3. 吹譯紀子、占部和敬、師井洋一、古江増隆. 尋常性乾癬におけるマスト細胞の CXCR3 発現の検討. 第 29 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2004. 4. 14-16

4. 中原剛士、内博史、陳其潔、師井洋一、占部和敬、古江増隆. JNK シグナルのヒト単球由来樹状細胞の活性化に与える影響. 第 29 回日本研究皮膚科学会学術大会・総会 2004. 4. 14-16

5. 森田圭祐、永井竜児、占部和敬、師井洋一、古賀哲也、堀内正公、古江増隆. 糖化蛋白 (AGEs) による上皮細胞遊走の阻害効果の検討. 第 29 回日本研究皮膚科学会 学術大会・総会 2004. 4. 14-16

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を

含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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
—VEGF の皮膚炎症における役割の検討—

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 アレルギー反応、炎症反応を司る分子である VEGF (vascular endothelial growth factor) を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成し解析した。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 Tg マウスを作成し、表皮ケラチノサイトの VEGF 産生を確認した。VEGF Tg マウスファウンダーは加齢とともに皮膚炎を生じ、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。Tg マウスで TNCB を用いて接触皮膚炎を惹起すると著明な皮膚炎を生じ、この皮膚炎は遷延化して認められ炎症反応が長期に及んだ。皮膚炎に浸潤する T 細胞は CD8 陽性細胞が主体であり、表皮内にも多数の CD8 陽性細胞浸潤を認め、VEGF による炎症反応への関与が認められた。浸潤細胞は IFN- γ を産生する細胞であった。VEGF Tg マウスでは、皮膚の角層に刺激を加えることによって皮膚炎が誘導された。以上の結果から VEGF が皮膚炎における血管増生、リンパ球、組織球の細胞浸潤の誘導に重要であることを示しており、これらの過剰反応を制御することが皮膚炎症反応の治療に重要であると考えられた。

A. 研究目的

Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) は血管内皮細胞、マクロファージから産生されるサイトカインで、Th1 反応の誘導に関与している。VEGF の作用として血管増殖、リンパ管増殖能、マクロファージの遊走活性作用などがあり、細胞浸潤を誘導するサイトカインである。これまで、アレルギー性皮膚疾患において血清 VEGF 値の増加が報告されている。今年度は、ケラチン 14 プロモーターを用いて 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た。VEGF による炎症反応の制御を解析することは皮膚炎の治療を考えるために重要であると考えられた。

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、皮膚炎における Tg マウスの組織学的変化について解析した。

C. 研究結果

ケラチン 14 プロモーターを用いて、表皮ケラチノサイト(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(founder)では著明な皮膚炎を認めた。VEGF マウスに TNCB による皮膚炎を惹起すると、著明な皮膚炎の増加を認めた。TNCB を用いて惹起した皮膚炎の増悪に伴い、真皮血管内皮の増加、真皮内 T 細胞の浸潤の増加を認めた。浸潤細胞は CD8 陽性細胞が主体であり、CD4 陽性細胞の軽度増加を認めた。表皮内に浸潤する細胞も CD8 陽性細胞が主体であった。これらの細胞の多くは IFN- γ を産生する細胞であった。また Tg マウスにおいて、tape stripping を用いて皮膚角層に刺激を加えて、皮膚炎の惹起について検討した。TG マウスでは tape stripping による角層刺激によって著明な皮膚炎が誘導され、長期間皮膚炎が継続した。皮膚炎では表皮内に T 細胞浸潤が誘導された。

D. 考察

皮膚炎をはじめとするアレルギー炎症において、VEGF が炎症細胞浸潤、血管増生を誘導するうえで重要な分子であることが明らかとなった。TNCB を用いた皮膚反応の惹起においては CD8 陽性細胞浸潤が誘導され、IFN- γ を産生する Th1 反応が有意に誘導された。接触皮膚炎をはじめとするアレルギー反応を誘導する VEGF TG マウスを用いて接触皮膚炎における細胞浸潤の動態を検討することは、皮膚炎の治療を確立するうえで重要であると考えられた。

E. 結論

VEGF が皮膚炎の惹起、誘導に重要であることが TG マウスモデルから明らかとなった。Tg マウスにおける T 細胞の浸潤パターンを検討することは皮膚炎の治療を確立するうえで重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

問題ない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients. *Exp Dermatol.* 2004; 13(11):715-9.
2. Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, Kakinuma T, Fujita H, Kagami S, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K. Lack of association of CCR4 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in

Japanese patients. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(3):187-90.

3. Furukawa H, Nakamura K, Zheng X, Tojo M, Oyama N, Akiba H, Nishibu A, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Enhanced TARC production by dust-mite allergens and its modulation by immunosuppressive drugs in PBMCs from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2004 ; 35(1):35-42.
 4. Mitsui H, Watanabe T, Saeki H, Mori K, Fujita H, Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tamaki K. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2004; 122(1):95-102.
 5. Furukawa H, Takahashi M, Nakamura K, Kaneko F. Effect of an antiallergic drug (Olopatadine hydrochloride) on TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production by PBMCs from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2004; 36(3):165-72.
 6. Yanagihori H, Tojo M, Inoue T, Nakamura K, Kaneko F, Nishida T, Mizuki N. Lack of association of interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphism with Behcet's disease in the Japanese population. *J Dermatol Sci.* 2004; 34(2):112-4.
- ##### 2. 学会発表
1. Functional analysis of human vascular endothelial growth factor using a transgenic approach: the possible implication in establishing psoriasis model mouse. Yanagihori H, Nakamura K, Oyama N, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. The 65th Annual Meeting of the SID 2004. April 28- May 1. Rhode Island