

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14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 玉井 克人

平成 17 (2005) 年 4 月

# 目 次

---

## I. 総括研究報告

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

玉井 克人 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. NF $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた重症アトピー性皮膚炎の臨床試験、およびその効果増強のための基礎的研究

玉井 克人 ..... 8

2. 角化細胞におけるNF $\kappa$ Bの機能解析とNDONの臨床応用

橋本 公二 ..... 13

3. リポソームによるアトピー性皮膚炎に対する分子治療法の開発

金田 安史 ..... 19

4. NDON外用療法のプロトコール作成および新規核酸医薬の開発に関する研究

森下 竜一 ..... 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 27

## 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 玉井 克人 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

### 研究要旨

本研究班は、核酸医薬である NFκB decoy oligodeoxynucleotides (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て、平成 14 年から平成 16 年まで研究を行った。平成 14 年度はアトピー性皮膚炎マウスモデルを用いた NDON 効果および安全性の検討と第 1 回臨床試験結果の解析、平成 15 年度は NDON 薬理作用の検討、平成 16 年度は重症アトピー性皮膚炎患者の顔面病変に対する NDON 軟膏第 2 回臨床試験を多施設 2 重盲検のプロトコールで開始した。また、NDON の皮膚透過性亢進により治療効果を増強することを目的として、1) 低侵襲性皮膚角層バリアー除去法の開発、2) 針無し皮下注射器シマジェットを用いた皮膚への遺伝子導入法開発、3) リポソーム・カチオンゼラチンによる高効率遺伝子導入法開発を行った。さらに、NDON 薬理効果に関する基礎研究として、1) アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギー反応が病態の中心をなす気管支喘息のモデル動物を用いた NDON 効果の検討、2) アトピー性皮膚炎増悪機序における表皮角化細胞 Toll like receptor-3 (TLR-3) を介した NFκB 活性化の関与に関する検討を行った。

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 NFκB 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した。NFκB 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。また最近では、NFκB は炎症に伴う発癌にも関与することが明らかとなり、NFκB の作用を特異的に抑制する新薬の開発は、多くの臨床的意義を有すると考えられる。NDON は NFκB 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、NFκB 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 NFκB 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する。

## B. 研究方法

### 1) NDON 前臨床試験

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 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、1.6%スクランプルデコイ (ランダムな配列からなる 20 塩基対 DNA) 軟膏塗布群、基剤 (ワ

セリン) 塗布群、無投与群の 4 群に分けて 2 週に 1 回、計 4 回 (8 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、炎症細胞の NDON 治療前後における浸潤動態変化、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 (平成 14 年度)。

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 (平成 15 年度)。

NDON の抗アレルギー作用を確認するため、アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギー反応が病態の中心である喘息の動物モデルを利用して、吸入による NDON 治療効果を検討した。

### 2) NDON 臨床試験

弘前大学倫理委員会に承認を得た上で、10 名の重症成人型アトピー性皮膚炎患者に同意を得て NDON 軟膏の世界初の臨床研究を行った。NDON 投与前後で

臨床症状の改善度および副作用の有無について検討した（平成14年度）。

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（平成15年度）。

第1回NDON臨床試験において、NDONが特に重症顔面病変に有効であることが明らかとなったため、第2回臨床試験として、アトピー性皮膚炎の重症顔面病変を対象としたNDON軟膏多施設二重盲検試験を行った。具体的には、20歳以上65歳未満の成人アトピー性皮膚炎患者における重症顔面病変を治療対象とし、0.1%、1%および1.5%のNDON軟膏（基剤は白色ワセリン）を1日2回（朝・夕）、3週間連続塗布し、治療開始前、1、2および3週後に効果、局所及び全身性副作用の有無を検討した（平成16年度）。

### 3) NDON薬理作用に関する基礎研究

NDONの標的であるNFkB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、NFkBを活性化するTNF- $\alpha$ 、IL-1を添加し、NFkB-IkB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（平成14年度）。

さらに、NFkBにより誘導されるサイ

トカインの一つMIP3 $\alpha$ 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（平成15年度）。

アトピー性皮膚炎が局所の細菌感染やウイルス感染で増悪することから、表皮角化細胞における自然免疫、特にTLR-3刺激とNFkB活性化との関係を検討した（平成16年度）。

### 4) 生体皮膚への高分子DNA導入法の開発

皮膚は角層のバリアー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。皮膚のバリアーを克服するために、化学的方法論としてケミカルピーリングあるいは酵素学的処理による角層除去法を、物理的にバリアーを透過させる方法として針無し注射器シマジェットを利用した皮膚への遺伝子導入法を、生物学的方法論として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ベクターであるHVJ-Eとカチオニックゼラチンの相互作用による新たな遺伝子導入法開発を行った（平成14、15、16年度）。

## C. 研究結果

### 1) NDON前臨床試験

NC/Ngaを利用したNDON前臨床試験では、マウスコントロール群（基剤のみ、およびランダムDON含有軟膏塗布群）

と比較して、NDON 軟膏塗布群では、臨床的・組織学的に炎症症状の著明改善を認め、さらに真皮内の浸潤肥満細胞におけるアポトーシスと、それに伴う浸潤肥満細胞数の著しい減少が観察された（平成14年度）。

また、タクロリムス投与群と比較して、NFkB 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NFkB 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（平成15年度）。

アトピー性皮膚炎と同様 I 型アレルギーにより発症する喘息のラットモデルを OVA 抗原刺激により作成し、NDON 溶液を気道内に噴霧することにより抗アレルギー効果を検討した。その結果、NDON は喘息モデルラットの気道抵抗を改善するとともに好酸球浸潤を抑制し、その抗アレルギー作用が確認された（平成16年度）。

## 2) NDON 臨床試験

ステロイド外用剤や FK506 軟膏の適応外である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 20bp のオリゴ DNA からなる NDON は分子量約 12,000 で顔面以外の皮膚では吸収が悪いため、その他部位への治療は必ずしも著効せず、より良い

効果を得る為には皮膚に対する高効率核酸導入法の開発が必要である事が明らかとなった。また、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に二重盲検試験は必須である。第2回臨床試験は重症顔面病変に対するNDONの多施設二重盲検試験とし、そのプロトコールを作成した（平成14, 15年度）。

第1回NDON軟膏臨床試験の結果を基に、アトピー性皮膚炎重症顔面病変を対象とした第2回臨床試験を多施設2重盲検プロトコールで倫理委員会に申請し、承認を得た施設から臨床試験を開始した。現在国内3施設の大学附属病院皮膚科で臨床試験が進行中である（平成16年度）。

## 3) NDON 薬理作用に関する基礎研究

表皮角化細胞において、RelA, p50, p52, RelB, I $\kappa$ B- $\alpha$  の発現が認められた。TNF- $\alpha$ 、IL-1 刺激により I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化が生じるとともに、RelA と p50 が NFkB 配列に結合することが確認された。また、TNF- $\alpha$  刺激により RelA, p50 とともに細胞質内から核内へ移行した（平成14年度）。

また、分化した角化細胞は未分化細胞と比較して、TNF- $\alpha$  刺激による MIP3  $\alpha$  産生が有意に増加していた（平成15年度）。

培養ヒト表皮角化細胞の TLR-3 を dsRNA (poly dI・dC) で刺激し、サイト

カインの産生誘導プロフィールを検討することでNFκB経路の活性化の有無について検討した。その結果、IκB-αのリン酸化、さらにMIP-1αの産生誘導が確認され、表皮角化細胞でdsRNAによるTLR-3を介したNFκB経路の活性化が示唆された(平成16年度)。

#### 4) 生体皮膚への高分子 DNA 導入法の開発

グリコール酸および蛋白分解酵素を利用した角質バリアー除去による高分子 DNA 投与方法開発を試みた。ヘアレスラット皮膚を50%グリコール酸5分間処理し、さらに種々の蛋白分解酵素処理を行った後、プラスミド DNA を塗布して遺伝子導入効率を検討した。その結果、単純塗布群に比較してグリコール酸および蛋白分解酵素処置群では遺伝子導入効率が数百倍以上向上することが明らかとなった(平成14年度)。

また、インシュリン投与に利用されている針無し注射器シマジェットを用いて皮膚への遺伝子導入効率を検討した。具体的には、lacZ 遺伝子、あるいはルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドをラット皮膚にシマジェットを用いて導入し、その発現効率を、皮膚への遺伝子導入が可能な方法として報告されている naked DNA injection 法と比較検討した。その結果、シマジェットは naked DNA injection 法に比較して約 100 倍の遺伝子導入効率を得られる

ことが明らかとなった(平成15年度)。

新規遺伝子導入ベクターであるHVJ-Eの遺伝子導入効率をさらに向上させるためにカチオン化ゼラチンとの複合体形成による効果を検討した。その結果、カチオン化ゼラチン及び硫酸プロタミンとHVJ-Eとの複合体を形成することにより、HVJ-E単独の数倍の遺伝子導入効率向上が得られることが明らかとなった(平成16年度)。

#### D. 考察

本研究班では、平成14年度の研究で、NDONが顔面重症アトピー性皮膚炎治療に有効であること、その効果発現には浸潤肥満細胞のアポトーシス誘導が関与することを明らかにした。また、平成15年度の研究では、アトピー性皮膚炎の顔面に対するその他の外用療法として用いられているタクロリムス軟膏とNDON軟膏の治療効果を、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを利用して比較検討し、両者の治療効果がほぼ同等であること、肥満細胞のアポトーシス誘導はNDONに特異的であることを明らかにした。これらの結果を基にして、平成16年度は第2回NDON軟膏臨床試験を開始した。第1回臨床試験ではNDON軟膏はアトピー性皮膚炎の顔面重症病変に対して極めて効果的であったが、体幹、四肢の病変に対しては保湿剤を用いた対照部位と

比較して有意な差を認めなかった。第2回臨床試験では、第1回試験で得られたNDONの治療効果を再確認することを目的として、成人アトピー性皮膚炎患者の重症顔面病変に限定して投与することとした。複数の施設で、3段階のことになる用量を用いた二重盲検法による臨床試験が開始されており、今年度末までに数十例のアトピー性皮膚炎患者にNDON軟膏治療が行われる予定である。本試験によりNDON軟膏の有効性、安全性が確認されれば、新しいアトピー性皮膚炎治療薬としての開発に道が開けると期待される。

NDONは、その分子量が12800と大きいために、生理的にバリアー機能の弱い顔面に重症皮膚病変がある場合にはよく吸収されて効果を発揮するものの、バリアー機能の発達した体幹、四肢の病変では吸収効率が悪いいため、十分な治療効果が得られない。このことは、NDON治療による角層バリアー機能の改善に伴って薬剤吸収量が減少するため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有利であると思われる一方、体幹、四肢の病変にも効果を発揮するためには吸収効率を改善させる必要がある。本研究では、角層バリアーを超えてNDONを皮膚に吸収させる新たな方法論の可能性が示された。特にシマジェットによる噴射式投与は、

疼痛なしに真皮内まで高分子DNAを投与することを可能にし、アトピー性皮膚炎の慢性苔癬化病変や痒疹など、従来の外用療法に極めて抵抗性の難治性病変に対して有効な治療法となることが期待される。また、グリコール酸と蛋白分解酵素を含有する軟膏による安全かつ高効率表皮バリアー除去法が開発されれば、NDON軟膏と併用することにより、その吸収効率を向上させて、顔面以外の病変にも適応拡大が可能になると予想される。さらに、カチオンゼラチンとリポソームの組み合わせを利用した高効率DNA導入法は、特に脂溶性基剤と混合して投与することにより皮膚への高分子導入を可能にすることが予想され、さらなる研究の進展に期待したい。

NDONのアトピー性皮膚炎に対する薬理作用としては、1) 肥満細胞のアポトーシス誘導、2) 表皮角化細胞由来サイトカインの産生抑制、の二つの機序について研究が進みつつある。平成16年度年度の研究で気管支喘息に対するNDONの効果が明らかとなった。またNFκBが表皮角化細胞のTLR-3を介した自然免疫にも関与していることが示されたことより、アトピー性皮膚炎に対するNDONの作用機序は、より多岐にわたることが示唆される。最近NFκBが炎症に伴う発癌に関与しているという報告がなされた。これらの事実は、NDON



がアトピー性皮膚炎のみならず、多くの炎症性疾患の治療薬として効果を持つ可能性を示唆している。

#### E. 結論

本研究班は3年間の研究期間を終了する。しかし、今後も引き続き、アトピー性皮膚炎、その他のアレルギー・炎症性疾患の治療薬としてNDONの可能性を検討していきたい。

**NF $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide (NDON) 軟膏を用いた  
重症アトピー性皮膚炎の臨床試験、およびその効果増強のための基礎的研究**

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基に、重症顔面病変を対象とした第 2 回臨床試験のプロトコールを作成し、多施設二重盲検試験を開始した。また、顔面以外の病変に対する NDON の有効性を獲得するために、低侵襲性皮膚バリアー除去法の開発を進めた。

**A. 研究目的**

NF $\kappa$ B は TNF- $\alpha$  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。本研究班は、NF $\kappa$ B 結合配列を含む 20 塩基の oligodeoxynucleotides (ODN) 含有軟膏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 $\kappa$ B decoy ODN (NDON) に NF $\kappa$ 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を明らかにしてきた。本研究は、重症アトピー性皮膚炎に対する世界初の NDON 臨床応用研究をすすめ、その有効性、安全性を確認するとともに、基礎研究によりその効果及び安全性を増強することを目的とする。

**B. 研究方法**

重症アトピー性皮膚炎患者に対する 2%NDON 軟膏を用いた第 1 回臨床研究結果を基にして、NDON の抗炎症効果を検討した。またその解析結果を基に、顔面重症病変を対象とした多施設 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。承認の得られた施設から順次、臨床試験を開始した。また顔面以外の病変に対しても有効性を獲得する目的で、ケミカルピーリングにより低侵襲性に皮膚のバリアー機能を除去し、超音波による皮膚への核酸導入効率向上を検討した。

**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に対して極めて有効であることが明らかとなった。そこで今年度は、第 1 回 NDON

軟膏臨床試験で得られ有効性、安全性について、より詳細な検討をする事を目的として、多施設2重盲検試験をデザインした。大阪大学、愛媛大学、弘前大学を含む多施設の皮膚科診療機関において、それぞれ倫理委員会にプロトコルを提出し、承認を得た施設から順次、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た。参加希望者に十分なインフォームドコンセントを得た後に2週間のwashout期間をもうけ、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、安全性を検討中である。今年度末までに、より多くの臨床研究参加者(最大50名)を得て、NDON軟膏の有効性、安全性に関する情報を得る予定である。

また、ヘアレスラット皮膚を用いた検討により、黄色ブドウ球菌由来の表皮剥脱性毒素(Exfoliative toxin A, ETA)が皮膚の角層除去に極めて有効であること、この効果はET溶液の皮下投与ではもちろんのこと、5%グリコール酸外用と併用することにより、外用によっても効果を発揮しうる事が示された。ETA/5%グリコール酸外用による皮膚バリアー除去後に超音波エネルギーを利用した核酸導入を試み、その有効性を確認した。

#### D. 考察

本研究班の主要研究テーマとして、顔面のアトピー性皮膚炎重症病変に対するNDONの有効性、および局所及び全身性副作用の有無をより詳細に検討する目的で、第2回NDON臨床試験が多施設2重盲検法により開始された。すでに複数の症例で有効性が示されたと言う情報が得られているが、予定の症例数(50例)の情報蓄積を待って、より正確な効果判定を行う必要がある事は言うまでもない。今回の臨床研究でNDONの効果と安全性が確認されれば、本研究班の当初の目的は達成される。しかし、NFkB活性の多様性を考えると、NDONはアトピー性皮膚炎のみならず、その他多くのアレルギー・炎症性疾患治療薬として有効な可能性があると期待される。また、外用による皮膚への高分子(核酸)導入法開発を目指し、皮膚バリアー機能除去と超音波エネルギーのコンビネーションによりプラスミドなどの高分子を生体皮膚に導入可能なことが明らかとなった。今後より高効率かつ低侵襲なバリアー除去法を開発すれば、NDONの適応を拡大する事が可能になるとと思われる

#### E. 結論

本研究班の研究により、重症アトピー性皮膚炎にNDON軟膏が有効であることが示された。この難治性アレルギー

性皮膚疾患に苦しむ患者さんのために、引き続き NDON 研究を進めていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 英語論文

- 1) Nakamura H., Aoki M., Tamai K., Oishi M., Ogihara T., Kaneda Y. and Morishita R.: Prevention and regression of atopic dermatitis by ointment containing NFkB decoy oligonucleotides in NC/Nga atopic mouse model.: *Gene Therapy*. 2002; 9: 1221-1229
- 2) Meng X., Sawamura D., Ina S., Tamai K., Hanada K., Hashimoto I.: Keratinocyte gene therapy: cytokine gene expression in local keratinocytes and in circulation by introducing cytokine genes into skin.: *Exp Dermatol* 2002;11:456-461.
- 3) Matsuzaki Y., Tamai K., Kon A., Sawamura D., Uitto 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* 2003; 120:308-12.
- 4) 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.
- 5) Kaneda Y., Tamai K.: Current status and future prospects of gene therapy technologies toward the treatment of intractable skin diseases.: *Arch Dermatol Res*. 2003; Apr;295 Suppl 1:S63-6. Epub 2003 Jan 15.
- 6) Kaneko T., Tamai K., Yamazaki T., Harada K., Nakano H., Hanada K.: Superficial granulomatous pyoderma: a case report of two Japanese patients and clinical comparison with foreign patients.: *J Dermatol*. 2003; Jun;30(6):472-6.
- 7) Tamai K., Hashimoto I., Hanada K., Ikeda S., Imamura S., Ogawa H.: Japanese Study Group for Rare Intractable Skin Diseases. Japanese guidelines for diagnosis and treatment of junctional and dystrophic epidermolysis bullosa.: *Arch Dermatol Res*. 2003; Apr;295 Suppl 1:S24-8.
- 8) Hiraoka K., Yamamoto S., Otsuru S., Nakai S., Tamai K., Morishita R., Ogihara T., Kaneda Y.: Enhanced tumor-specific long-term immunity of hemagglutinating [correction of hemagglutinating] virus of Japan-mediated dendritic cell-tumor

- fused cell vaccination by coadministration with CpG oligodeoxynucleotides.: J Immunol. 2004; Oct 1;173(7):4297-307.
- 9) Matsuki A., Yamamoto S., Nakagami H., Aoki M., Tamai K., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.: No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice.: Biochem Biophys Res Commun. 2004; Feb 27;315(1):59-65.
- 10) Oshima K., Shimamura M., Mizuno S., Tamai K., Doi K., Morishita R., Nakamura T., Kubo T., Kaneda Y.: Intrathecal injection of HVJ-E containing HGF gene to cerebrospinal fluid can prevent and ameliorate hearing impairment in rats.: FASEB J. 2004; Jan;18(1):212-4. Epub 2003 Nov 20.
- 11) Umegaki N., Moritsugu R., Katoh S., Harada K., Nakano H., Tamai K., Hanada K., Tanaka M.: Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy.: Clin Exp Dermatol. 2004; Jan;29(1):42-5.
- 12) Odanagi M., Kikuchi Y., Yamazaki T., Kaneko T., Nakano H., Tamai K., Vitto J., Hanada K.: Transcriptional regulation of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene expression by interferon regulatory factor 1 and interferon regulatory factor 2 in normal human epidermal keratinocytes.: Exp Dermatol. 2004; Dec;13(12):773-9.
- 13) Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K., Kaneda Y.: Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin.: J Gene Med. 2005; Mar 8.
- 14) Mima H., Tomoshige R., Kanamori T., Tabata Y., Yamamoto S., Ito S., Tamai K., Kaneda Y.: Biocompatible polymer enhances the in vitro and in vivo transfection efficiency of HVJ envelope vector.: J Gene Med. 2005; Feb 14.

#### 日本語論文

- 1) 玉井克人, 森下竜一, 中邨弘重, 金田安史, 花田勝美. 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, 2003; 10: 350-356.
- 2) 玉井克人. 新規アトピー性皮膚炎治療薬の開発: 転写因子 NFκB を標的とした ODN の臨床応用, アレルギーの臨床, 2003; 23: 196-201.
- 3) 玉井克人. アトピー性皮膚炎の遺伝

子治療、新しい治療のABC16:免疫3、  
アトピー性皮膚炎、最新医学別冊、  
2003.

- 4) 玉井克人、遺伝子治療、特集・皮膚病の最新治療：研究・診断、毎日ライフ、2003；10:60-63.
- 5) 玉井克人、遺伝子治療の現状：おとり型核酸医薬など、特集・最近のトピックス 2004、5. 皮膚科医のための臨床トピックス、臨床皮膚科、2004；58:171-174.
- 6) 玉井克人、金田安史、中邨弘重、青木元邦、森下竜一、片山一郎、花田勝美、重症アトピー性皮膚炎に対する核酸医薬治療：転写因子 NF- $\kappa$ B を標的としたデコイ DNA 軟膏の臨床応用、医学のあゆみ 2004；210: 101-104.
- 7) 玉井克人、金田安史、中邨弘重、森下竜一、花田勝美、板見智、片山一郎、核酸医薬外用剤のアトピー性皮膚炎への臨床応用、アレルギー・免疫 2004；11: 1084-1088.

**G. 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

## 表皮角化細胞における NFκB の機能解析と NDON の臨床応用

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部 教授

### 研究要旨

NFκB decoy oligonucleotide (NDON) の表皮角化細胞に与える効果を検討するためには、まず表皮角化細胞における NFκB-IκB 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を詳細に検討することが NDON の薬理作用を解析する上で必要不可欠である。そこで、この研究では表皮角化細胞における NFκB-IκB 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を明らかにすることを目的として研究を行った。表皮角化細胞においては NF・B が発現・機能しており、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。また、臨床試験に関しては有効性のみならず安全性を示唆する所見が得られたが、さらなる症例の積み重ねが必要であると思われた。

### A. 研究目的

NFκB decoy oligonucleotide (NDON) の表皮角化細胞に与える効果を検討するためには、まず表皮角化細胞における NFκB 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。NFκB-IκB 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を詳細に検討することが NDON の薬理作用を解析する上で必要不可欠である。そこで、この研究では表皮角化細胞における NFκB-IκB 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を明らかにすることを目的とする。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、分化し

た表皮角化細胞における NF・B-I・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・B 活性化により誘導されるサイトカインの産生について検討した。また、アトピー性皮膚炎は局所の細菌感染、ウイルス感染にて増悪することが知られている。細菌感染、ウイルス感染においては自然免疫が重要な役割をはたしており、Toll-like receptor (TLR) からのシグナルにより様々なサイトカインが誘導され、炎症が引き起こされるとされている。そこで、表皮角化細胞においてウイルス由来の dsRNA により活性化される TLR-3 からのシグナルについて検討した。さらにアトピー性皮膚炎患者 3 例に NF・B decoy oligonucleotide (NDON) 外用剤により臨床

試験を行った。

## 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、サイトカイン刺激前には添加物を含まない培地に交換した。その後、炎症性サイトカインの代表で、NFkBを活性化することが知られている分子であるTNF-alpha, IL-1を添加し、NFkB-IkB関連の分子の局在については蛍光抗体法、蛋白の細胞質、核内発現についてはwestern blot法にて検討した。NFkBにbindする蛋白の同定についてはgel shift assayで検討した。各種抗体はSanta Cruz社、TNF-alpha, IL-1はR&D社、Gel Shift AssayはPromega社製を使用した。角化細胞の分化誘導については、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。これらの分化誘導角化細胞を用いて、上記方法にてNF・B-I・B関連の分子の発現を検討した。さらに、NF・B活性化により産生が誘導されるMIP3-β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。同様に、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中にpolyI:C (dsRNA)を添加し、経時的に細胞・培養上

清を回収し、western blot法ならびにELISA法で各種サイトカインの産生量を検討した。NDONの有効性に関しては、愛媛大学医学部臨床倫理委員会の承認を得た後、同意の得られた3例について3週間NDONを顔面に塗布した。

## C. 研究結果

Western blotではRelA, p50, p52, RelB, IkB-alpha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-alpha (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IkB-alphaのリン酸化がみられた。核分画ではRelA, p50, p52, RelB, IkB-alpha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。

Western blotで刺激後RelA, p50の核分画での発現量の増加がみられたため、実際に機能しているかについてGel shift assayで確認した。TNF-alpha (10 ng/ml), IL-1 (10 ng/ml)刺激によりNFkB配列へbindする蛋白が確認された。各種抗体を使用した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・B配列への結合が認められたが、未分



化の状態と比較すると程度は弱いものであった。そこで、TNF-alpha の濃度による binding 活性を検討したところ、1 ng/ml より dose dependent に NFkB 配列への binding 活性の増強が認められた。さらに、I $\kappa$ B の機能を阻害する I $\kappa$ B mutant をアデノウィルスベクターを用いて角化細胞に導入し、TNF-alpha 刺激による binding を検討したところ、この binding 活性は消失した。すなわち、TNF-alpha 刺激で角化細胞内では NFkB シグナルが伝達され、機能していることが明かとなった。Western blot, gel shift assay の結果、NF-kB が核分画に移行することが明かとなったが、さらに蛍光抗体法で確認した。培養表皮角化細胞では無刺激状態では RelA, p50 は細胞質内に存在していたが、TNF-alpha (10 ng/ml) 刺激により RelA, p50 とともに細胞質内から核内へ移行した。NFkB の活性化により誘導されるサイトカインの 1 例として、MIP-3 $\cdot$  の TNF $\cdot$  刺激による産生を mRNA、蛋白レベルで比較した。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。

polyI:C 刺激により二時間後には I $\kappa$ B $\cdot$  のリン酸化が認められた。また、MAP kinase である p38, JNK も同様に 2 時間後にはリン

酸化が認められた。さらにウィルス感染において重要な役割をはたしている IFN の経路について検討したところ、IRF-3 が 30 分後には核内へ移行している像が蛍光抗体法により確認できた。すなわち、polyI:C 刺激では NFkB, p38, JNK, IFN の経路が活性化されていることが確認できた。次ぎに蛋白レベルで NFkB の経路が動いているかについて ELISA 法にて検討した。TNF-alpha は 24 時間後から誘導され、36 時間後には培養液中には 450pg/ml の濃度が検出されたが、コントロール群では検出できなかった。同様に NFkB で誘導されるサイトカインである MIP1 $\cdot$  も産生が亢進していた。NFkB 以外の経路により誘導されるサイトカインである IL-6, I-TAC, MIP-1 $\cdot$  も同様に産生が亢進していた。NDON の臨床応用については、3 例の患者中、2 例で有効性を認めた。1 例は無効と判断したが、増悪は認めなかった。副作用は 3 例とも認めなかった。

#### D. 考察

表皮角化細胞における NFkB, 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 $\kappa$ B-alpha が発現しており、TNF-alpha 刺激により核内へ移行し、NFkB 配列に bind することが明かとなった。さらに、I $\kappa$ B mutant でその機能が消失することは角化細胞において NFkB が重要な役割をはたしていることがしきされた。分化・未分化での表皮角化細胞における NF $\cdot$ 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 $\kappa$ B- $\beta$  が発現しており、TNF- $\alpha$  刺激により核内へ移行し、NF- $\kappa$ 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・未分化により若干差があることが明らかになった。NF- $\kappa$ B 活性化により産生が誘導される MIP3- $\alpha$  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。さらに、表皮角化細胞において dsRNA からのシグナルが伝達され、サイトカインの産生が誘導されることが明らかとなった。このことはウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪が、一部分 TLR-3 を介したサイトカイン産生増加によるものであることを示唆していると思われる。すなわち、ウイルス感染によるアトピー性皮膚炎の増悪が NF $\kappa$ B 経路の活性化によるものであれば、NDON が増悪時に効果を発揮することが期待される。しかし、polyI:C 刺激によりその他の経路も活性化され、様々なサイトカインが誘導されることが明らかとなったことは、NDON 単独では効果が不十分であることも示唆していると思われる。臨床研究については NDON の有効性、安全性を評価するには症例が不十分であるが、3 例中 2 例で有効であったことは評価できるとと思われる。1 例で無効であったが、二重盲検、用量設

定試験であるため使用された濃度が低かったとも考えられた。

## E. 結論

表皮角化細胞においては NF- $\kappa$ 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。また、臨床試験に関しては有効性のみならず安全性を示唆する所見が得られたが、さらなる症例の積み重ねが必要であると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表（平成 16 年度）

### 1. 論文発表

- 1) Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 123:1078-85, 2004
- 2) Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by

- 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>. **J Dermatol Sci.** 36:41-50, 2004
- 3) Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, Hasegawa H, Fujita S, Tohyama M, **Hashimoto K**, Yasukawa M.: Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. **J Gen Virol.** 85:2639-42, 2004
- 4) Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, **Hashimoto K**, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, Ohnishi T.: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy. **Oncol Rep.** 12:73-8, 2004.
- 5) Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, **Hashimoto K**.: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. **J Invest Dermatol.** 122:1356-64, 2004
- 6) Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, **Hashimoto K**.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. **Biochem Biophys Res Commun.** 327:100-5, 2005
- 7) Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, **Hashimoto K**, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. **J Invest Dermatol. in press**
- 8) Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, **Hashimoto K**.: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. **Br J Dermatol. in press**
2. 学会発表
- 1) Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, **Hashimoto K**.: Marked enhancement of IFN-g-induced fractalkine production by IFN-g, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  in normal human keratinocytes. 65<sup>th</sup> annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 2) Tokumaru S, Shirakata Y, Tohyama M, Tsuda T, Tan E, Yahata Y, Yamasaki K, Hanakawa Y, Sayama K, **Hashimoto K**.: Transactivation of EGFR via HB-EGF shedding protects human keratinocytes from UV-irradiation-induced apoptosis. 65<sup>th</sup> annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 3) Yahata Y, Shirakata Y, Tohyama M, Murakami S, Iwatsuki K, **Hashimoto K**.: A patient with severe hypersensitivity to

- mosquito bites and chronic active Epstein-Barr virus infection. 8<sup>th</sup> Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004
- 4) Yang L, Shirakata Y, Dai X, Sayama K, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M, Yahata Y, Hashimoto K.: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalent. 8<sup>th</sup> Japan-China Joint Meeting of Dermatology, Kuming, China, Nov 12, 2004
- 5) Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: HB-EGF shedding is essential for UV-induced EGFR phosphorylation and epidermal hyperplasia. 34<sup>th</sup> annual meeting of European Society for Investigative Dermatology, Vienna, Austria, Sep 8, 2004.
- 6) Sayama K, Dai X, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Hashimoto K.: SOCS-1 negative feedback mechanism of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocyte. 65<sup>th</sup> annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004
- 7) Yahata Y, Yamasaki K, Shirakata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: SOCS 1 is a negative regulator of the MyD88-independent signaling pathway of the LPS-induced TLR4 natural immune response in HDMEC. 65<sup>th</sup> annual meeting of Society of Investigative Dermatology, Rhode Island, USA, April 30, 2004

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