

20050075/A

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 18 (2006 年) 3 月

# 目 次

## I 平成 17 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 17 年度分担研究報告書

1. STAT6 decoy ODN 含有軟膏による成人型アトピー性皮膚炎の治療  
(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 を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機構」  
(東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野) 烏山 一

-----13

3. Lipid Raft を標的とした新しいアレルギー性疾患治療戦略の検討

(大阪大学大学院皮膚科学講座) 片山 一郎

----- 19

## III 研究成果の刊行一覧

----- 25

# I 平成 17 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、3カ年計画の3年目の研究において以下の成果を得た。

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、アレルゲン投与後3～4日目にピークとなり、長期間にわたって持続する、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、好塩基球であると同定された。
2. IL-4 受容体からのシグナル伝達分子である 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) ならびに第3相反応の一部を抑制することをすでに明らかにしたので、本年度は、STAT6 含有軟膏による成人型アトピー性皮膚炎の治療を行い、良好な結果を得、治療薬としての位置づけができた。
3. FcεRI が局在する細胞膜上の lipid raft を修飾する外来コレステロールが樹状細胞と表皮細胞の機能を修飾してアレルギー炎症を抑制し、10%コレステロール軟膏によりアトピー性皮膚炎の症状の改善が認められた。

以上、アトピー性皮膚炎の新しい治療標的が明らかとなったこと、また、STAT6 decoy とコレステロール外用薬という新しい治療薬の開発の第一歩が踏み出された。今後、これらの成果を継続して発展させ、アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析ならびに難治性アトピー性皮膚炎の治療薬の開発を行う必要がある。

### 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学  
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 大阪大学大学院皮膚科学講座  
教授

近年増加傾向にあるアトピー性皮膚炎に対して、新しい治療薬が開発・導入されているが、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こと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 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。

### A. 研究目的

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外用療法で比較的容易に治療が可能となっているが、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十分なものとなっていない。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、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、FceRI 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。

## B. 研究方法

### 1. IgE/FceRI を介する第 3 相反応の責任細胞の解析 (烏山)

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の存在を発見している。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。

この反応は、T 細胞あるいは B 細胞を欠損するマウス、肥満細胞欠損マウスにおいても検出され、FceRI 欠損マウスでは検出されないことから、肥満細胞以外の FceRI 陽性細胞が責任細胞であると考えられる。そこで、正常あるいは種々の変異マウスを TNP 特異的 IgE で監査し、耳介に TNP-OVA を皮内注射して耳介反応を観察した。また、正常マウスの各種細胞文革を移入して第 3 相反応の責任細胞を検討した。

### 2 STAT6 おとり核酸を道板アトピー性皮膚炎の治療 (西岡、横関)

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の発現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た。正常マウスにおける IgE 受動感作による遅発型反応ならびにアレルゲン反復投与によっ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、IgE を介する第 3 相反応も STAT6 decoy により部分的に抑制されたことから、STAT6 おとり核酸の臨床応用を試みた。

STAT6 decoy 核酸を 2% に含有する外用薬を調整し、成人型アトピー性皮膚炎患者に使用し、その治療効果を検討した。

### 3 Lipid raft を標的とした治療法の開発 (片山)

細胞膜 lipid raft を標的とした治療法の検討の中で、コレステロールが細胞膜に作用し、FceRI の局在以上を引き起こし、下流のシグナル伝達に以上を起こすことを見出した。また、アトピー性皮膚炎に対してコレステロールが治療効果を示した。そこで、コレステロールの作用を検討するため、アトピー性皮膚炎患者の末梢単核球の LDL 受容体の発現、FceRI の局在とコレステロールの皮膚バリア機能に対する役割と表皮細胞に対する役割を検討した。

## C. 研究結果

### 1 IgE/FceRI を介する第 3 相反応の責任細胞の解析 (烏山)

FcεRI 欠損マウスに正常マウスの骨髄細胞を移入したところ、第3相反応が誘導され、さらに、骨髄の種々の細胞分画を移入したところ、NK 細胞マーカーDX5 陽性分画を移入した時のみ、第3相反応が再構築できた。DX5 陽性骨髄細胞の約20%が FcεRI を発現しており、電子顕微鏡下で、分葉核を有し、分泌顆粒を有する好塩基球であることが明らかとなった。第3相反応の浸潤細胞は、好酸球（約40%）と好中球（約15%）が主で、好塩基球はわずか1-2%を占めるにすぎなかったが、新たに樹立したマウス好塩基球特異的モノクローナル抗体をマウスに投与して生体内から好塩基球を除去したところ、第3相反応はまったく誘導されなかった。以上より、第3相反応の責任細胞が好塩基球であることが明らかとなった。

## 2 STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制（西岡、横関）

男性2名、女性1名の成人型アトピー性皮膚炎患者の顔面紅斑に2%STAT6 おとり核酸含有軟膏を2回/日外用した。3例とも外用開始4週後には、紅斑の減少が認められた。外用薬による大きな副作用症状は認められなかった。

## 3 Lipid raft を標的とした治療法の開発（片山）

重症のアトピー性皮膚炎患者の単核球糖 LDL 受容体の発現は低下していた。コレステロール処理でアセトン処理した皮膚のバリア機能は増強し、表皮細胞の可溶性 I 型 TNF 受容体の産生が増加した。

## D. 考察

平成17年度の研究によって、IgE を介する第

3相反応の責任細胞が好塩基球であることが明らかになった。この第3相反応の浸潤細胞中に、好塩基球はわずか1-2%を占めるにすぎないにも拘らず、好塩基球を除去することによって第3相反応が消失したことから、アレルギー反応における好塩基球の役割が新しくクローズアップされ、治療法開発の標的となった。

マウスモデルにおいて治療効果が期待されていた STAT6 decoy が成人型アトピー性皮膚炎の顔面紅斑に治療効果を発揮したことから、今後の治療薬としての開発が期待できるものとなった。症例数を増加させ、検討を加える必要がある。細胞膜上の lipid raft を修飾する外来性コレステロールが、アセトン処理後の皮膚でバリア機能回復効果を示し、TNF を中和する可溶性 I 型受容体を産生増強することから、コレステロールが樹状細胞のみならず表皮細胞にも作用して抗炎症効果を発揮する可能性が示された。

## E. 結論

以上の成果は、アトピー性皮膚炎の炎症反応に好塩基球が関与することをはじめ明らかなに、STAT6 decoy、コレステロールがそれぞれ作用機序の違いはあるが、新しい治療薬となることを示す価値ある成果と考える。特に治療薬については、症例数を増加し、今後引き続いての研究が必要と考える。

## F. 研究発表 別紙参照

## G. 健康危機情報 特になし

## H. 知的財産権の出願、登録状態 別紙参照

## Ⅱ 平成 17 年度分担研究報告書

---

---

STAT6 decoy ODN 含有軟膏による成人型アトピー性皮膚炎の治療

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 井川 健 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 助手

**研究要旨** 前年度までの研究では、IL-4 受容体からの細胞内シグナル伝達を調節する転写因子である STAT6 の働きを、おとり核酸医薬である STAT6 decoy ODN によって抑制することことで、アトピー性皮膚炎のモデル動物における皮膚反応が治療されるかについて検討してきた。その結果、抗原特異的 IgE 誘導性遅発型反応、ハプテン連続塗布マウス、TNP 特異的 IgE 遺伝子を導入した transgenic マウスにおける皮膚の炎症反応の抑制に、STAT6 decoy ODN の皮下投与が有用であることを明らかにした。今回の研究では、2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏を作成しアトピー性皮膚炎患者に外用しその臨床効果を検討した。2% STAT6 Decoy ODN をワセリン軟膏に混合して STAT6 decoy ODN 含有軟膏を作成した後、アトピー性皮膚炎患者に一日 2 回、単純塗布し、2 週間目と 4 週間目に臨床的な有効性を検討した。対象は重症成人型アトピー性皮膚炎患者 5 症例（顔面の紅斑性病巣 4 例、体幹の紅斑性病巣 1 例）で、大学内の倫理委員会に承認を得たプログラムに沿って十分なインフォームドコンセントを得た。写真撮影、Eczema Area and Severity Index (EASI) score を利用した皮膚症状の点数 (Clinical score)、Visual Analogue Scale (VAS) score による痒みの数値、末梢血好酸球数や血清 IgE 値などをデータとして集計し評価した。全ての症例において、軟膏の塗布による皮膚刺激感などは認めなかった。顔面の紅斑性病巣に外用を試行した 4 症例のうち、1 症例が患者の都合により 2 週間目にて終了となったが、残る 4 症例については、4 週間の STAT6 decoy ODN 含有軟膏の外用によって臨床症状の改善（平均 Clinical score 6.1 から 1.8 へ）、ならびに痒みの著明な改善（平均 VAS score 50.3 から 5.6 へ）がみられた。好酸球数、血清 IgE 値には変化が認められなかった。このように、今回の研究によって、STAT6 decoy ODN 含有軟膏が重症成人型アトピー性皮膚炎の新しい治療薬になる可能性が示唆された。紅斑の改善に比較して VAS score が著明に改善した結果は、STAT6 を介するシグナル伝達の阻害がより痒みの抑制に効果的である可能性も考えられ、さらなる検討を加えていく必要がある。



## A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の病態形成には、Th2型サイトカインであるIL-4/IL-13が重要な役割を果たす。Th2型サイトカインレセプターを介する細胞内シグナル伝達が転写調節因子 Signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) によって担われていることから、これまで、アトピー性皮膚炎モデル動物を用いてSTAT6の役割を検討してきた。その結果、接触過敏症ならびにIgEを介する遅発型反応にSTAT6が関与し、STAT6のDecoy ODN (おとり核酸) によってIgEの遅発型反応、ハプテン繰り返し塗布による遅発型反応がともに抑制されることを明らかにした。すなわち、アトピー性皮膚炎のアレルギー炎症モデルにおける炎症反応をSTAT6 decoy ODNが抑制すること明らかにした。

核酸医薬であるSTAT6 decoy ODNは、Cis-elementと同じ配列のODN (オリゴヌクレオチド) を2重鎖にしたもので、STAT6とCis elementの結合を競合的に阻害し、本来発現されるべき一連の遺伝子発現を効果的に抑制する作用を持っている。これまでの研究成果を基にして、今回、STAT6 decoy ODN含有軟膏を作製し、STAT6 decoy ODNのアトピー性皮膚炎に対する臨床効果を検討した。

## B. 研究方法

一連の研究は、東京医科歯科大学附属病院倫理委員会において承認を得たプロ

グラムに沿って行った。

1) 2% STAT6 decoy ODN含有軟膏の作製

Table 1に示す組成にて2% STAT6 decoy ODN含有軟膏を作製した。なお、本軟膏の作製は、株式会社アンジェスMGに依頼して行った。

2) 対象

対象は、HanifinとRajkaの診断基準を満たす成人型アトピー性皮膚炎患者5人(男4人、女1人)とし、東京医科歯科大学附属病院倫理委員会において承認を得て作製した同意書により十分なインフォームドコンセントを得た。なお、2% STAT6 decoy ODN含有軟膏外用を開始するに当たって、ステロイドや免疫抑制剤の内服は1ヶ月以上、外用は1週間以上行っていないことを確認した。また、全期間を通じて、抗アレルギー剤の内服や保湿剤の併用は制限しなかった。

3) 投与スケジュールと評価

被験者の顔面あるいは体幹の紅斑性病巣に対して、一日2回、2% STAT6 decoy ODN含有軟膏を単純塗布した。外用期間は4週間とし、評価は外用開始時、外用開始2週間後、外用終了時(4週間後)の3点で行った。写真撮影、Eczema Area and Severity Index (EASI) scoreを利用した皮膚症状の点数(Clinical score、Table 2)、Visual Analogue Scale (VAS) scoreによる痒みの数値、末梢血好酸球数や血清IgE値などをデータとして集計し評価した。

## C. 研究結果

男性 3 例、女性 1 例（症例 1-4）の顔面の紅斑性病巣と男性 1 例（症例 5）の体幹の紅斑性病巣、計 5 例について検討を行った。それぞれの詳細は Table 3 に示す。なお、症例 4 は、患者の都合により外用開始後 2 週間で終了となり、外用 4 週間で継続できた症例は、顔面の紅斑性病巣を示す男性 2 例、女性 1 例、体幹の紅斑性病巣を示す男性 1 例の 4 例であった。

### 1) 顔面の紅斑性病巣

2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏を 1 日 2 回顔面に単純塗布し、症状の改善度合いを観察した。

途中脱落した男性 1 例を含めたすべての症例において、外用時の皮膚刺激感などの副作用は認めなかった。また、外用により悪化が見られた症例もなかった。最終判定の外用開始後 4 週間目の時点で（途中脱落した男性は 2 週間目の時点）、全症例とも外用開始時に比べて皮膚症状の改善を認めた。代表的な例（症例 1）を Fig. 1 に示す。また、EASI score を利用した皮膚症状の点数（Clinical score）の変化を Fig. 2 に示した。平均 EASI score は 6.1 から 2 週間で 4.5 へ、また、4 週終了時点で 1.8 となった。4 週目まで検討した 3 例いずれも、2 週目の時点では改善はあるものの、まだ不十分であり、4 週目まで外用すると十分な抗炎症効果を認めた。

痒みに関しては、皮膚症状改善が不十分にみえる外用初期の段階から改善傾向

がみられた。VAS score を用いた検討を Fig. 3 に示す。平均 VAS score は、投与前 50.3 であったものが、2 週間目の時点ですでに、29.8 と外用開始時のおよそ半分まで改善が見られ、4 週間目では 5.6 とほとんど痒みを感じない状態にまで著明に改善した。

### 2) 体幹の紅斑

男性 1 例について、体幹（胸部から上腹部の範囲）の紅斑性病巣に対して、右側に 2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏を、左側に通常の保湿剤（ワセリン）を外用してもらい、皮膚症状の変化を観察し、左右差の有無を検討した。評価方法は顔面病巣と同様のデータを比較した。体幹病巣への 2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏外用時の刺激感は見られなかった。

2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏を外用した右側は、ワセリンのみの左側に比べて明らかに皮膚症状の改善が見られた（Fig. 4, 5）。痒みの改善に関しても顔面同様明らかであり、自覚的にはもちろんのこと、投与前の VAS score 66 が投与 2 週間後には 35 となり、2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏を外用している右側で改善がみられた（Fig. 5）。

すべての症例において、4 週間の 2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏の試行期間終了後は通常に加療を継続しているが、2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏により改善した皮膚症状が、悪化することもなく良好に経過している。

#### D. 考察

これまでの研究成果で、STAT6 decoy ODN は、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎のマウスモデルの炎症反応を抑制することを明らかにしてきた。今年度の研究では、アトピー性皮膚炎患者に STAT6 decoy ODN を投与し、その臨床効果を検討した。アトピー性皮膚炎の皮膚病変の発症は Th2 型の反応のみではなく、Th1 型の反応の関与も考えられていることから、アトピー性皮膚炎に対して STAT6 decoy ODN による抗炎症効果がどの程度までみられるかは我々にとっても大きな疑問の一つであった。しかしながら、STAT6 decoy ODN を 2% の濃度で調整した軟膏を外用することにより、アトピー性皮膚炎患者の皮膚の炎症を抑制することができたことに加え、マウスの実験時にはわからなかった、痒みが効果的に抑制される可能性もみられ、STAT6 を標的としたアトピー性皮膚炎の治療戦略の可能性はより大きくなったと考えられる。しかし、十分な治療効果を発現するには 2-4 週間の外用が必要ではあった。以下、STAT6 decoy 含有軟膏が効果を発揮したメカニズムやこれからの課題について簡単に考察する。

マウスを使用した実験から、STAT6 decoy ODN 含有軟膏の外用によって、STAT6 decoy ODN 自体はマスト細胞やリンパ球などの炎症性浸潤細胞や、微小環境を構成する真皮の線維芽細胞、さらには表皮角化細胞などに取り込まれることが確認されている。治療効果の発現が STAT6

を介するシグナル伝達の阻害であることから推測すると、IL-4/IL-13 など Th2 型サイトカインの刺激による免疫活性化によって大きな影響を受けるマスト細胞は、STAT6 decoy ODN 含有軟膏による抗炎症作用発現における主要な標的細胞と考えられる。塗布された STAT6 decoy ODN 含有軟膏が既に出現している皮膚症状を抑制することは難しいが、続いて起こるマスト細胞の活性化を STAT6 decoy ODN が抑制する可能性が考えられる。STAT6 decoy ODN 含有軟膏の効果発現が遅延したのはこのためである可能性を考えた。今後、STAT6 decoy ODN 含有軟膏の外用前後における組織学的検討などにより確認していく必要がある。

今回、成人型アトピー性皮膚炎患者に使用して得られた知見のうち注目すべきことは、STAT6 decoy ODN 含有軟膏を外用することによって、痒みが著明に抑制されたことである。全症例において、紅斑性病巣の改善がまだ不十分と思われる比較的早い時期から、痒みの改善を認めている。そう痒の発現には、前述のマスト細胞の関与以外にも、表皮角化細胞の関与（表皮角化細胞由来の神経ペプチド産生等）が考えられる。この点についても、さらに検討を加えるべきである。

今回の試行結果から、STAT6 decoy ODN 含有軟膏の抗炎症効果は強力とはいえないものであった。これに関しては、STAT6 decoy ODN の至適濃度についての検討と、ステロイド外用薬を含めた抗炎症外用薬

との比較を含めての検討が必要であろう。

## E. 結論

2% STAT6 decoy ODN 含有軟膏は成人型アトピー性皮膚炎の皮膚症状に対して抗炎症作用を示した。アトピー性皮膚炎の皮膚症状に対して、STAT6 を標的とした遺伝子治療の有効性が明らかになったことは、新たな治療薬の開発においておおきな可能性を切り開くものと考ええる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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
- 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) Igawa K, Matsunaga T, Nishioka K. Involvement of UV-irradiation in pemphigus foliaceus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004 Mar;18(2):216-7.
- 4) 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
- 5) Satoh T, Kanai Y, Wu MH, Yokozeki H, Kannagi R, Lowe JB, Nishioka K: Synthesis of {alpha}(1,3) fucosyltransferases IV- and VII-dependent eosinophil selectin ligand and recruitment to the skin. *Am J Pathol*. 2005 Sep;167(3):787-96.
- 6) Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K, Hirokawa K, Etori M, Yamashita M, Kubota T, Minegishi Y, Yonekawa H, Karasuyama H: Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):191-202.
- 7) Okiyama N, Yamamoto T, Watanabe K,

- Yokozeki H, Nishioka K: Juvenile dermatomyositis in association with 22q11.2 deletion syndrome. Br J Dermatol. 2005 Jun;152(6):1370-2.
- 8) Oi M, Satoh T, Yokozeki H, Nishioka K: Infectious urticaria with purpura: a mild subtype of urticarial vasculitis? Acta Derm Venereol. 2005;85(2):167-70.
- 9) 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, 2005 Feb;157(1):1-11.
- 10) 横関博雄: アトピー性皮膚炎の遺伝子療法 STAT6 デコイ ODN による核酸医薬療法. 日本小児皮膚科学会雑誌. 23(2) :183-186, 2004
- 11) 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): 1077-1083, 2005
- 12) 西岡清: STAT6 decoy によるアトピー性皮膚炎の治療. 医学のあゆみ 211(2):198-199, 2005
- 13) 鷺見浩史, 横関博雄, 西岡清: STAT6 decoy ODN による接触か敏捷の抑制
- 臨床免疫 41(6):691-695, 2005
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



fig.1 臨床経過（顔面紅斑性病巣）

### Clinical Score

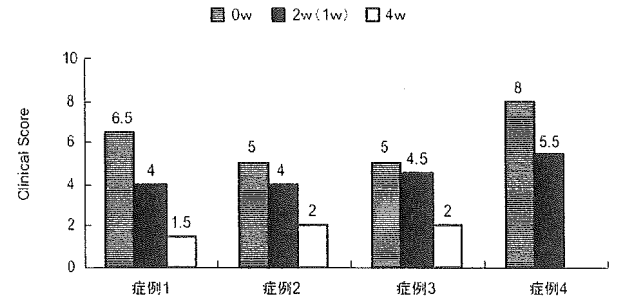


fig.2 Clinical Scoreの変化（顔面紅斑性病巣）

### VAS

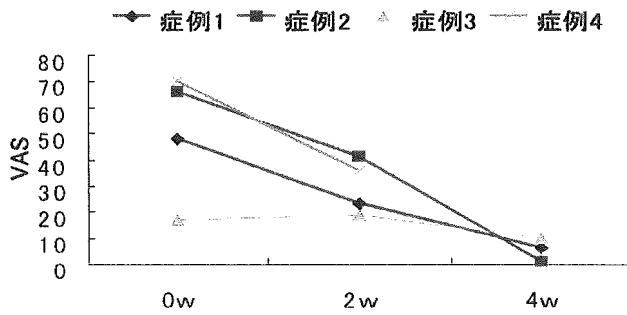


fig.3 顔面紅斑性病巣に対するSTAT6 decoy含有軟膏外用時のVAS Score

### VAS

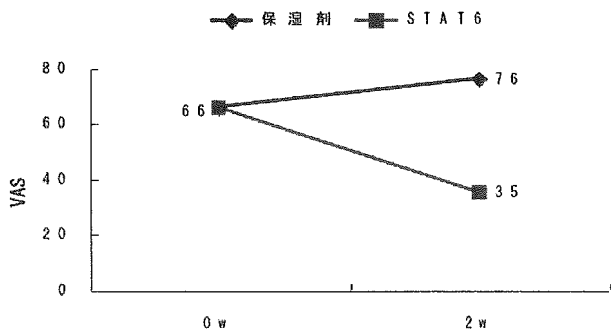


fig.5 体幹紅斑性病巣左右塗り分け比較時のVAS Score

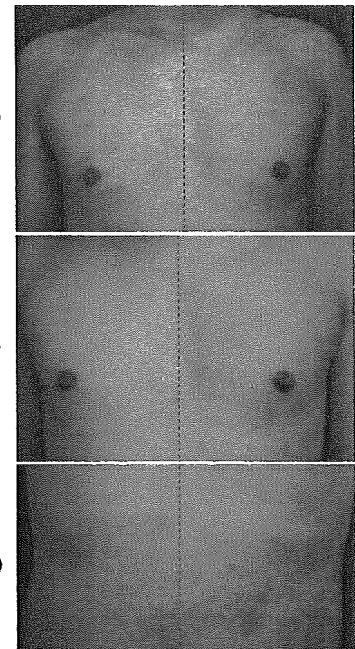


fig.4 体幹紅斑性病巣左右塗り分け比較  
 (A) 外用前  
 (B) 外用2W後（胸部）  
 (C) 外用2W後（腹部）  
 右：STAT6 decoy含有軟膏  
 左：保湿剤（ワセリン）

## 2% STAT6 Decoy ODN含有軟膏

STAT6 decoy ODN	2.0 %
ステアリルアルコール	5.0 %
白色ワセリン	93.0%

STAT6 decoy ODN (M.W.19228.6)

```

5' -GATCAAGACCTTTTCCCAAGAAATCTAT-3'
3' -CTAGTTCTGGAAAAGGGTTCTTTAGATA-5'
    
```

table.1

### Clinical Score

紅斑	重症度	0・1・2・3
	面積	%
浸潤・丘疹	重症度	0・1・2・3
	面積	%
糜爛	重症度	0・1・2・3
	面積	%
苔癬化	重症度	0・1・2・3
	面積	%

重症度: 0:なし, 1:軽症, 2:中等症, 3:重症

面積: 0:なし, 1:10%以下, 2:10-30%, 3:30-50%, 4:50-70%, 5:70-90%, 6:90%以上

- ① 紅斑、浸潤・丘疹、糜爛、苔癬化それぞれについて重症度×面積でScoreを算出する。
- ② Clinical Score = 紅斑Score + 浸潤・丘疹Score + 糜爛Score + 苔癬化Score

table.2

	性	年齢	血清IgE (U/ml)	好酸球数 ( $\mu$ l)	Clinical score (外用部位)
症例 1	女	40	17871	897	6.5
症例 2	男	35	15536	520	5
症例 3	男	34	4549	207	5
症例 4	男	34	14479	1352	8
症例 5	男	27	2201	2264	7

table.3

## 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** 前年度までの研究で、マスト細胞やT細胞を欠損するマウスにおいても、抗原特異的かつ IgE 依存的に慢性型の皮膚アレルギー炎症反応が惹起されることを明らかにした。細胞移入実験により、この慢性アレルギー炎症反応の誘導には c-kit 陰性 DX5 陽性 FcεRI 陽性の分葉核を有する細胞が必須であり、電子顕微鏡等による解析から、その細胞が好塩基球であることが明らかとなった。皮膚慢性アレルギー炎症巣における浸潤細胞の大部分は好酸球と好中球であり、好塩基球はわずか2%を占めるに過ぎないことから、好塩基球はアレルギー炎症のエフェクターというよりもイニシエーターとして機能していることが示唆された。マウス好塩基球に対するモノクローナル抗体を樹立し、マウスに投与したところ、好塩基球数の劇的な減少とともに、皮膚慢性アレルギー炎症反応が完璧に抑制された。本研究により、好塩基球が主役を演じる新たな慢性アレルギー炎症誘発機構が存在し、好塩基球が慢性アレルギー炎症治療の標的になることが判明した。

#### 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。我々は、前年度までの研究で、マスト細胞やT細胞を欠損するマウスにおいても、抗原特異的かつ IgE 依存的に慢性型の皮膚アレルギー炎

症反応が惹起されることを明らかにした。

本年度は、この新たな慢性アレルギー炎症反応に関わる責任細胞を詳細に解析し、それを標的とした慢性アレルギー炎症治療の可能性について検討した。

#### B. 研究方法

正常ならびに種々の変異マウスをあらかじめ TNP 特異的 IgE で受動感作したのち、耳介に抗原 TNP-OVA を皮内注射し、経時的



に耳介皮膚厚を計測した。さらに、正常マウスの各種細胞分画を変異マウスに細胞移入したのち、同様の実験をおこなうとともに、電子顕微鏡で責任細胞の形態学的解析をおこなった。好塩基球に対するモノクローナル抗体を樹立し、慢性アレルギー炎症反応に対する効果を検討した。

(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

骨髄細胞分画の移入実験により、IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘導には c-kit 陰性 DX5 陽性 FcεRI 陽性の分葉核を有する細胞が必須であることが判明した。この細胞を電子顕微鏡で観察したところ、密度の高い典型的な分泌顆粒の存在が確認され、好塩基球であることが証明された (図 1)。

最近、好塩基球が Th2 サイトカインの重要な産生細胞であることがいわれている。そこで、皮膚アレルギー炎症巣における IL-4 の発現を調べたところ、好塩基球の浸潤に呼応して IL-4 の発現が確かに亢進してくることが判明し、好塩基球が皮膚組織内で活性化されていることが強く示唆された (図 2)。

寄生虫感染させたマウスの骨髄から好塩基球を調製し、ラットに過免疫することにより好塩基球特異的なモノクローナル抗体を樹立することに成功した (図 3)。この抗体をマウスに投与したところ、好塩

基球数の劇的な減少 (図 4) とともに、皮膚慢性アレルギー炎症反応が完璧に抑制された (図 5)。

### D. 考察

細胞移入実験ならびに電子顕微鏡解析により、IgE 依存性慢性アレルギー炎症反応の責任細胞が好塩基球であることが明らかとなった。しかし、皮膚慢性アレルギー炎症巣における浸潤細胞の大部分は好酸球と好中球であり、好塩基球はわずか 2% を占めるに過ぎない (図 2) ことから、好塩基球はアレルギー炎症のエフェクターというよりもイニシエーターとして機能していることが示唆された。

樹立したモノクローナル抗体を用いて生体内から好塩基球を除去することにより、IgE 依存性慢性アレルギー炎症反応を完全に抑制できたことから、好塩基球を標的とした慢性アレルギー炎症に対する創薬の可能性がクローズアップされた。

### E. 結論

これまでマスト細胞の陰に隠れて脇役としてしか捉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し、好塩基球があらたな創薬の標的になることが明らかとなった。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K.,

- Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., Minegishi, Y., Yonekawa, H., and Karasuyama, H.: Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* 23: 191-202, 2005.
- ② Omata N, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Karasuyama H, Mayumi M.: Ovalbumin-specific IgE modulates ovalbumin-specific T-cell response after repetitive oral antigen administration. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 822-7, 2005.
- ③ Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Kikuchi-Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., Karasuyama, H.: Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J. Immunol.* 74: 4621-4629, 2005.
- ④ Kawano, Y., Yoshikawa, S., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Selection of stereotyped VH81X- $\mu$ H chains via preB cell receptor early in ontogeny and their conservation in adults by marginal zone B cells. *Int. Immunol.* 17: 857-867, 2005.
- ⑤ 向井香織、鳥山 一: 「好塩基球が主役を演じる慢性アレルギー炎症誘発機構」アレルギー科、20 (2): 179-185, 2005
- ① 向井 香織、松岡邦枝、久保田俊之、峯岸克行、米川博通、鳥山一; 好塩基球が主役を演じる慢性アレルギー炎症; 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005. 10. 20-22. 盛岡
- ② 久保田俊之, 向井香織, 峯岸克行, 鳥山一;  $\gamma\delta 2$  型ヒト Fc $\epsilon$ RI の発現調節機構の解析; 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会 2005. 10. 20-22. 盛岡
- ③ 峯岸克行、齋藤雅子、森尾友宏、水谷修紀、上松一永、野村明彦、原寿郎、金子秀雄、近藤直美、川村信明、有賀正、崎山幸雄、土屋滋、谷内江昭宏、柘植拓也、大石勉、城宏輔、岩田 力、別所文雄、宮脇利男、野々山恵章、鳥山 一; 常染色体劣性高 IgE 症候群の原因遺伝子の検討; 第35回日本免疫学会総会・学術集会 2005. 12. 13-15. 横浜
- ④ 久保田俊之, 山本直樹, 向井香織, 峯岸克行, 鳥山一;  $\gamma\delta 2$  型ヒト Fc $\epsilon$ RI の発現調節機構の解析; 第35回日本免疫学会総会・学術集会 2005. 12. 13-15. 横浜
- ⑤ 向井香織、松岡邦枝、餌取真紀、山下誠、久保田利之、峯岸克行、米川博通、鳥山一; 好塩基球が中心的な役割を演じるT細胞・マスト細胞非依存性慢性アレルギー炎症; 第35回日本免疫学会総会・学術集会 2005. 12. 13-15. 横浜
- ⑥ 小畑一茂, 向井香織, 小島恵理, 吉川宗一郎, 辻村祐佑, 久保田俊之, 石渡賢治, 渡辺直熙, 小島利之, 佐藤眞悟,

## 2. 学会発表

峯岸克行, 烏山一; マウス好塩基球特異的モノクローナル抗体の樹立とその応用; 第35回日本免疫学会総会・学術集会 2005. 12. 13-15. 横浜

#### 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

**FcεRI<sup>+</sup> cells in the DX5<sup>+</sup> bone marrow population were identified as basophils**

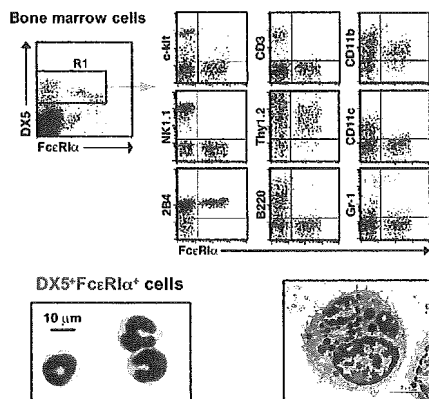


図1. IgE 依存性慢性アレルギー炎症反応の責任細胞は好塩基球である

責任細胞である DX5 陽性 FcεRI 陽性の骨髄細胞は、分葉核を有し、電子顕微鏡像で特徴的な分泌顆粒を有する好塩基球であることが判明した。

**Basophils constituted a minority of cells infiltrating into the skin lesions**

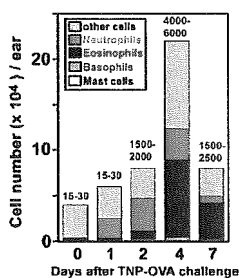
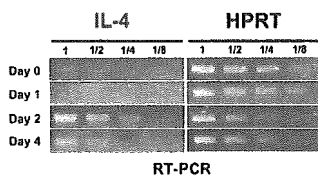


図2. 好塩基球は浸潤細胞の2%を占めるに過ぎない  
好塩基球は、慢性アレルギー炎症の責任細胞であるにもかかわらず、浸潤細胞のわずか2%を占めるに過ぎない。好塩基球の浸潤に伴い、病巣における IL-4 の発現亢進が認められた。



**Establishment of mAbs specific for mouse basophils**

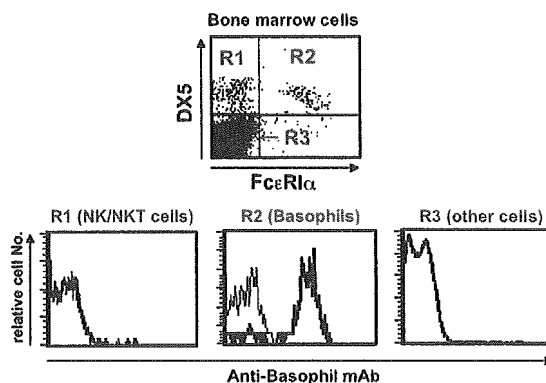


図3. 好塩基球特異的モノクローナル抗体の樹立  
寄生虫感染させたマウスの骨髄から好塩基球を調製し、ラットに過免疫することで、好塩基球を特異的に認識するモノクローナル抗体を樹立した。

**Treatment with anti-basophil mAb depletes basophils *in vivo***

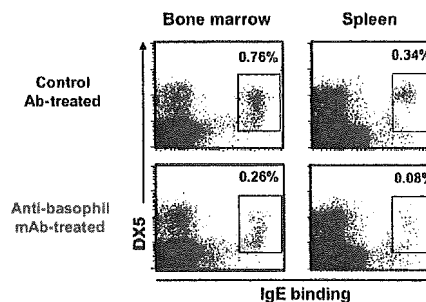


図4. 抗体投与による好塩基球の生体内からの除去

好塩基球特異的モノクローナル抗体をマウスに静脈注射したところ、好塩基球数の劇的減少が観察された。

**The Ab treatment abolishes the development of IgE-CAI**

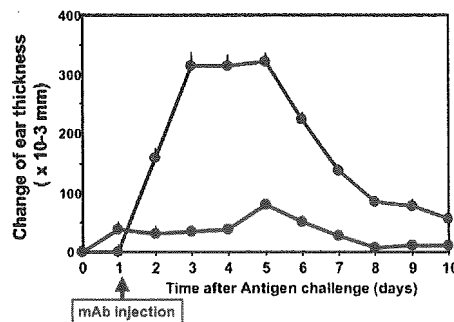


図5. 抗体投与による慢性アレルギー炎症の抑制

好塩基球特異的モノクローナル抗体をマウスに静脈注射したところ、皮膚慢性アレルギー炎症が完璧に抑制された。