

厚生労働科学研究費助成金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 片山 一郎 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座・教授

研究協力者 室田 浩之 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座

研究要旨 アトピー性皮膚炎(AD)においては皮膚バリア機能の障害やIgE抗体の過剰産生などの免疫異常がその発症、伸展に大きな関与をしている。アレルギー性炎症反応に強く関与するIgE抗体の上昇に際し、IgE抗体による肥満細胞、好塩基球あるいは樹状細胞上に存在する高親和性IgEレセプター(FcεR1)のクロスリンクが即時型・遅発型のアレルギー反応を引き起こすと考えられている。FcεR1を標的とするヒト型抗体の臨床応用が進められているが副作用や医療コストが大きな問題として残されており、作用点が明解かつ安全で確実にしかも選択的にアレルギー性炎症を抑制できる治療戦略の確立が望まれている。われわれはFcεR1が細胞膜の一区画であるlipid raftに局在しないと下流のシグナル伝達が開始できないという挙動に着目し、lipid raftを不活化させる事でIgEを介したアレルギー性疾患の増悪を防げるのではないかと考えた。今回アレルギー炎症増幅機序におけるlipid raftの関与を検討するとともに、lipid raftを標的とした治療薬の開発のため、ヒト末梢血より樹立した樹状細胞におけるFcεR1の局在と下流の遺伝子発現がlipid raftを失活させる試薬でどのような影響を受けるか検討したので報告させていただく。

A. 研究目的

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

これまでに、Methyl-β-cyclodextrin処理で末梢血由来樹状細胞のIgE刺激依存的なTARC産生を抑えられることからADに

対するLipid Raftを標的とした治療が現実味を帯びてきた。さらに外来性コレステロール負荷もLipid Raftの不安定化を導く事が知られており、実際過去に魚鱗癬に使用されていたコレステロール軟膏を塗布することでADの皮疹が改善することがわかった。今回、このコレステロールが何故奏功するのかを中心に検討した。

B. 研究方法

同意の得られた健常人およびアトピー性皮膚炎罹患者(ダニ特異的 IgE が class IV 以上を選出)の末梢血単核球(PBMC)を IL-4 および GM-CSF 存在下で 4 日間培養する事で樹状細胞を樹立。さらに同患者の血清から IgE をアフィニティーカラムによって抽出。コレステロール(200ug/ml) 負荷 6 時間の前処理ある群とない群それぞれに IgE(10ng/ml)とリコンビナントダニ抗原 Der f1 (200ng/ml)を刺激し 2 4 時間後の培養上澄を回収し TARC、IL-10 を ELISA 法で測定するとともに、FceR1 と Lipid Raft の局在をコンフォーカル顕微鏡とスクロース濃度勾配分画法で確認した。さらにクロロホルムに溶解したコレステロール塗布が角質バリア機能に与える影響を検討するためにアセトンで処理した SKH. マウスの角質水分蒸散量 (TEWL) を 3 3 時間モニターした。また DNFB で感作したマウスにおける接触過敏反応におけるコレステロールの効果も検討した。

C. 研究結果

健常人およびアトピー性皮膚炎患者由来樹状細胞(monocyte-derived dendritic cell: MoDC) に対する IgE、および IgE と抗原同時添加群で TARC の発現を比較した所、アトピー性皮膚炎群において健常群より強い IgE 誘導性 TARC 産生誘導が認められた。Fig. 1 に示す通りコレステロール負荷はこのような IgE 誘導性 TARC 産生

誘導を有意に抑制した。

次にコレステロール負荷に伴う FceR1 と Lipid Raft の局在をみた所、Fig. 2 に示す通りコレステロール負荷をした樹状細胞では処理後 1 時間で FceR1 が IgE 刺激前からある一領域に集まるように局在し IgE 刺激でも動くことはなかった。この局在異常によって FceR1 が lipid raft を利用できなくなると考え、スクロース濃度勾配分画法を用いて lipid raft と FceR1 の局在を生化学的に検討した。Fig. 3 に示すとおり、IgE と抗原刺激で見られる FceR1 の lipid raft への局在はコレステロール処理した MoDC では観察されなかった。

次にコレステロール塗布が角質バリア機能に与える影響をアセトン処理後の皮膚の TEWL を 3 3 時間モニターし検討した。Fig. 4 に示す通り、アセトン処理後に溶媒であるクロロホルムを塗布した際の TEWL はアセトン処理 3 0 分後にピークを迎え、5 時間後にはもとに戻る一方、コレステロールを塗布した群では直後より TEWL の著名な改善を認めていた。

コレステロールは Fig. 5 に示す通り DNFB 感作後の接触過敏反応も抑制した。

D. 考察

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

実際、「10%コレステロール軟膏」はアトピー性皮膚炎における皮膚炎症状を改善させることができた。今回の検討の結果、この抗炎症効果の一部は FcεR1 の lipid raft を介したシグナルが入らない事でもたらされると説明できる。この FcεR1 不活効果は環境抗原による皮疹の増悪の予防にもつながる可能性を秘めていると言えよう。

さらにコレステロールの塗布は TEWL で評価した際に著しい角質バリア機能回復能を持っていると考えられた。アトピー性皮膚炎治療の選択肢の一つがステロイド外用剤であるが、ステロイドは局所塗布した際に炎症を抑えても局所の皮膚乾燥を導く事が知られている。コレステロール塗布は炎症も角質バリア機能も改善させることができる点でステロイド外用剤よりも優れている。

今回の検討ではコレステロールが接触過敏反応における耳介腫脹反応も抑制した。コレステロールは FcεR1 を介した系以外にも何らかの影響を及ぼし炎症を終息させる事ができる潜在能力を持つと考えられる。安全性に関しては、コレステロールの表皮細胞の及ぼす毒性を LDH 放出を測定することで検討している。normal human keratinocyte、HaCaT 細胞に対してコレステロール処理を行っても大きな毒性作用がない事を確認している。

冒頭で MoDC からの IgE 依存的 TARC 産生をコレステロールが抑制する事を示したが、この抑制効果はアトピー性皮膚炎

で健常人よりも低い傾向が認められていた。この事からアトピー性皮膚炎患者ではコレステロールの取り込み、代謝が低下している可能性が考えられた。そこで外来受診アトピー性皮膚炎患者の重症度と血液中の脂質（トリグリセリド、不飽和脂肪酸、総コレステロール、LDL、HDL）と BMI を測定したが皮疹の重症度への相関は認められなかった。しかし PBMC における LDL 受容体は免疫ブロット法で重症度に応じてその発現が低下する傾向が認められた。これらの結果からアトピー性皮膚炎では脂質代謝が何らかの形で低下していると考えられる。

E. 結語

コレステロールはアトピー性皮膚炎治療の潜在能力を持つと考えられた。皮膚恒常性維持機能の破綻とアトピーの発症の関連、その是正が今後の新規治療戦略確立において重要である事は否めない事実であろう。近年のアトピー性皮膚炎の増加は入浴習慣、食生活の変化、清潔志向の向上などライフスタイルが原因とも考えられていることから、本研究の結果をもとにしたライフスタイルとアトピー性皮膚炎に関するフィールドワークを行う事でアトピー性皮膚炎の予防戦略確立にもつながると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 片山一朗: 難治性アトピー性皮膚炎の

- 治療法. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp239-241, 2003
- 2) 室田浩之、Bae SangJae、堀内保宏、片山一朗: 線維芽細胞における TLR2, 4 の発現とその意義. 臨床免疫, 40(3): 272-275, 2003
- 3) Murota H, Hamasaki Y, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Matsuyama T: Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. Arthritis Rheumatism 48(4): 1117-1125, 2003
- 4) 片山一朗: アトピー性皮膚炎の悪化因子と患者指導. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp236-238, 2003
- 5) Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Katayama I, Nishimoto K: The role of keratinocyte on defense system in dermatophyton infection. Proceedings of the 12th Korean-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2002 (Nov 8-9, 2001 Tokyo, Japan)
- 6) Eishi K, Lee JB, Bae SJ, Takenaka M, Katayama I: Impaired sweating function in adult atopic dermatitis: results of the quantitative sudomotor axon reflex test. Br J Dermatol, 147: 683-688, 2002
- 7) 片山一朗: 【臨床皮膚科 最近のトピックス Clinical Dermatology 2002】皮膚疾患の病態 アトピー性皮膚炎とリモデリング. 臨床皮膚科, 56(5 増): 39-42, 2002
- 8) Katayama I, Takenaka M, Yamamoto K: Advisory guidelines for the avoidance of exacerbating factors of atopic dermatitis in daily-life. JMAJ (Jpn Med Assoc J), 45(11): 466-471, 2002
- 9) Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I. Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol. 2006 Jan;31(1):100-4.
- 10) Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I. FK506 (tacrolimus) inhibition of intracellular production and enhancement of interleukin 1alpha through glucocorticoid application to chemically treated human keratinocytes. Skin Pharmacol Physiol. 2005 Sep-Oct;18(5):241-6.
- 11) Horiuchi Y, Bae S, Katayama I. Nerve growth factor (NGF) and epidermal nerve fibers in atopic dermatitis model NC/Nga mice. J Dermatol Sci. 2005 Jul;39(1):56-8.
- 12) Bae SJ, Lee JB, Takenaka M, Tanaka Y, Shimizu K, Katayama I. Topical glucocorticoid augments scratching behaviour in

dinitrofluorobenzene-sensitized
mice by the induction of substance P.
Exp Dermatol. 2004 Dec;13(12):780-5.

13) 室田浩之、中村敏明、片山一朗：ヒト樹状細胞の TRAC 産生におけるヒスタミンの影響と抗ヒスタミン薬、アレルギー・免疫, Vol 12, No7; 19-26, 2005

2. 学会発表

1) 2005, European Society of Dermatological Research,

G. 知的所有権の所得状況

なし

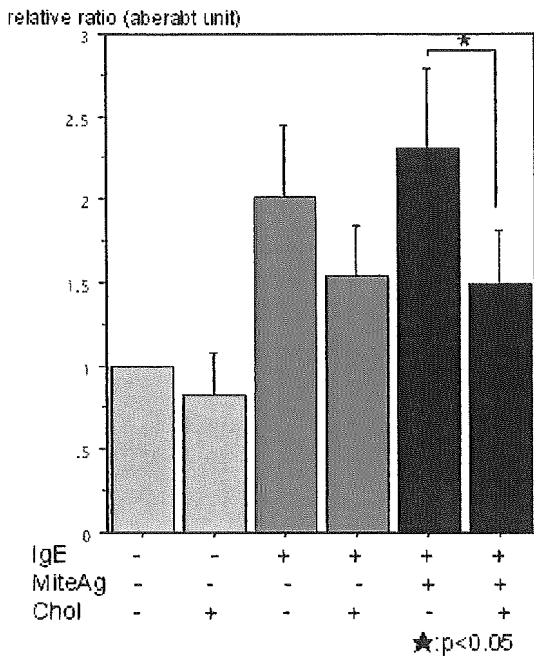


Fig. 1 コレステロールは末梢血単核球由来樹状細胞のIgE 依存的TARC生産を抑制する

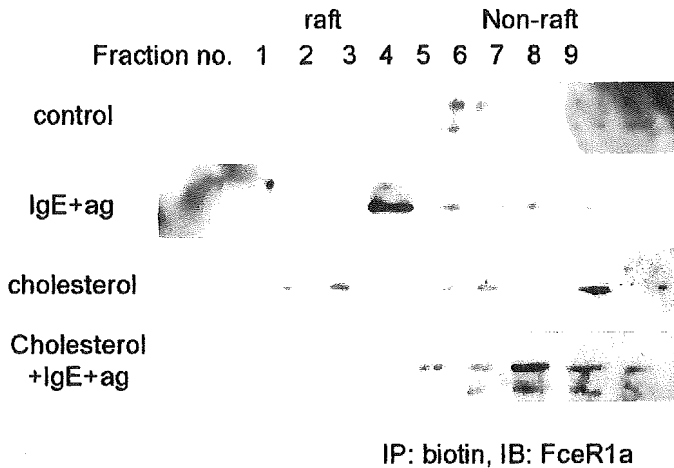


Fig. 3 スクローズ濃度勾配分画法: コレステロールによってFceR1はlipid raftに局在しなくなる。

Cholesterol-treated MoDC

Green: FceR1a
Red: CTB (raft)

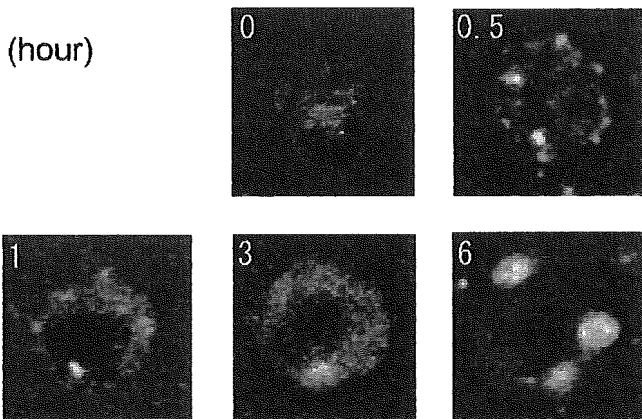


Fig. 2 コレステロールによる FceR1 の局在異常

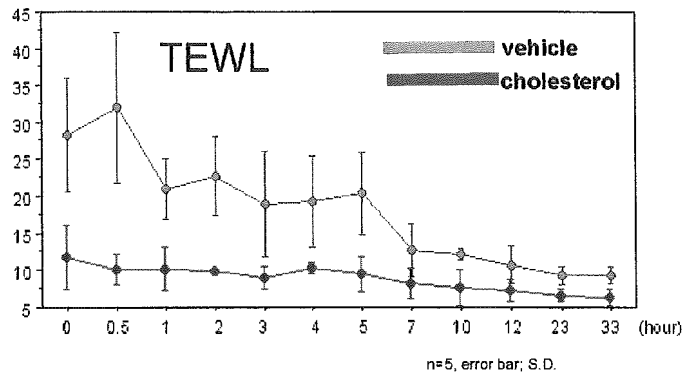


Fig. 4 コレステロール塗布はアセトン処理に伴う角質除去後のTEWLを速やかに改善させる。

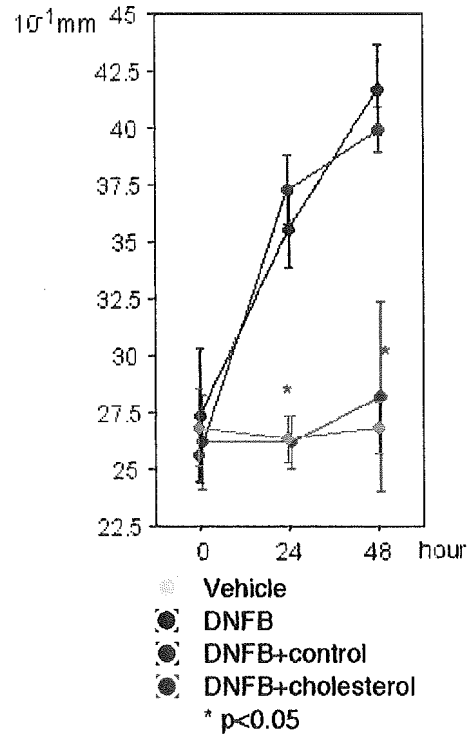


Fig. 5 コレステロール塗布はCH反応における耳介腫脹反応を抑制する。

■アトピー疾患群の増加は入浴習慣・食事・清潔指向などライフスタイルに影響をうけているのではないかとアトピー=ライフスタイル病? フィールドワーク (チベットの乾燥地帯・酪農主体)

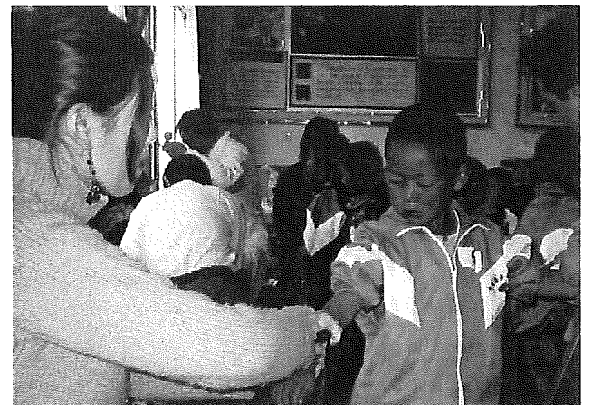


Fig. 6 Lipid raftの不安定化を生じさせるコレステロールはADの皮疹を改善させる事ができる

III 研究成果の刊行一覧

III 研究成果の刊行一覧

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
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) Kawano, Y., Yoshikawa, S., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Selection of stereotyped VH81X- μ 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.
 - 18) 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
 - 19) Murota H, Hamasaki Y, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Matsuyama T: Disruption of tumor necrosis factor receptor p55 impairs collagen turnover in experimentally induced sclerodermic skin fibroblasts. *Arthritis Rheumatism* 48(4): 1117-1125, 2003
 - 20) Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Katayama I, Nishimoto K: The role of keratinocyte on defense system in dermatophyton infection. Proceedings of the 12th Korean-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2002 (Nov 8-9, 2001 Tokyo, Japan)
 - 21) Eishi K, Lee JB, Bae SJ, Takenaka M, Katayama I: Impaired sweating function in adult atopic dermatitis: results of the quantitative sudomotor axon reflex test. *Br J Dermatol*, 147: 683-688, 2002

- 22) Katayama I, Takenaka M, Yamamoto K: Advisory guidelines for the avoidance of exacerbating factors of atopic dermatitis in daily-life. JMAJ (Jpn Med Assoc J), 45(11): 466-471, 2002
- 23) Bae SJ, Lee JB, Takenaka M, Tanaka Y, Shimizu K, Katayama I. Topical glucocorticoid augments scratching behaviour in dinitrofluorobenzene-sensitized mice by the induction of substance P. Exp Dermatol. 2004 Dec;13(12):780-5.
- 24) Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I. Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol. 2006 Jan;31(1):100-4.
- 25) Horiuchi Y, Bae SJ, Katayama I. FK506 (tacrolimus) inhibition of intracellular production and enhancement of interleukin 1alpha through glucocorticoid application to chemically treated human keratinocytes. Skin Pharmacol Physiol. 2005 Sep-Oct;18(5):241-6.
- 26) Horiuchi Y, Bae S, Katayama I. Nerve growth factor (NGF) and epidermal nerve fibers in atopic dermatitis model NC/Nga mice. J Dermatol Sci. 2005 Jul;39(1):56-8.
- 27) Horiuchi Y, Bae S, Katayama I. Nerve growth factor (NGF) and epidermal nerve fibers in atopic dermatitis model NC/Nga mice. J Dermatol Sci. 2005 Jul;39(1):56-8.
- 28) 片山一朗: 【臨床皮膚科 最近のトピックス Clinical Dermatology 2002】 皮膚疾患の病態 アトピー性皮膚炎とリモデリング. 臨床皮膚科, 56(5 増): 39-42, 2002
- 29) 片山一朗: 難治性アトピー性皮膚炎の治療法. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp239-241, 2003
- 30) 室田浩之、Bae SangJae、堀内保宏、片山一朗: 線維芽細胞における TLR2,4 の発現とその意義. 臨床免疫, 40(3): 272-275, 2003
- 31) 片山一朗: アトピー性皮膚炎の悪化因子と患者指導. アレルギー疾患 専門医にきく最新の臨床, 中川武正、片山一朗、岡本美孝編集, 中外医学社(東京), pp236-238, 2003
- 32) 室田浩之、中村敏明、片山一朗: ヒト樹状細胞の TRAC 産生におけるヒスタミンの影響と抗ヒスタミン薬、アレルギー・免疫, Vol 12, No7; 19-26, 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 29th annual meeting of the JSID, April 14-16, 2004, Kyoto

- 3) 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
- 4) 久保田俊之、向井香織、峯岸克行、鳥山一； $\gamma\delta 2$ 型ヒト Fc ϵ 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
- 5) 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
- 6) 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 ϵ 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
- 7) 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
- 8) 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、峯岸克行、鳥山一；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
- 9) Katayama I .2005, European Society of Dermatological Research,

3. 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

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
重症アトピー性皮膚炎の難治化機序を踏えた
治療法の確立に関する研究班
平成17年度 総括・分担研究報告書
(H15-免役-006)

発行 平成18年3月31日

発行者 厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
重症アトピー性皮膚炎の難治化機序を踏えた
治療法の確立に関する研究班
主任研究者 西岡 清

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