

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 15~17 年度 総合研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 18 (2006 年) 3 月

目次

I	平成 15~17 年度総合研究報告書	
	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 15 年度総括研究報告書	
	アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と遺伝子療法の開発に関する研究 (東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野) 西岡 清	7
III	平成 15 年度分担研究報告書	
	1. STAT6 Decoy ODN を用いた接触過敏反応および抗原特異的 IgE 誘導性第 3 相耳介腫脹反応の発症機序の解析と抑制 (東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野) 横関 博雄 西岡 清	11
	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感染分子制御学分野) 烏山 一	15
	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 (長崎大学医学部皮膚科学) 片山 一朗	19
IV	平成 16 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	23
V	平成 16 年度分担研究報告書	
	1. STAT6 decoy ODN による TNP 特異的 IgE 誘導性第 3 相耳介腫脹反応の抑制機序の解析 (東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野) 横関 博雄 西岡 清	27
	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	35
	3. FcεRI 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 一朗	41

VI	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	
	(東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野) 西岡 清	
	-----	45
VII	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	
	-----	49
	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	
	-----	57
	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 一朗	
	-----	63
VIII	研究成果の刊行一覧	
	-----	69

I 平成 15～17 年度総合研究報告書

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

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 アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と新しい治療法の開発を目指して、平成 15～17年度の3年間で以下の成果が得た。

1 アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介するアレルギー炎症が重要な役割を果たすことから、IgE のトランスジェニックマウスあるいは IgE の受動感作を行ったマウスに抗原を投与することによって、即時型、遅発型反応に続く第3相目の強い炎症反応が出現することを発見した。この反応はアトピー性皮膚炎の難治化に関与する可能性を考えられ、その発症機序を検討した。第3相反応は、T細胞、B細胞、肥満細胞とも異なる Fc RI 陽性骨髄由来造血細胞によって起こり、さらに各種の抗体で処理した骨髄細胞の移入実験により、骨髄由来の DX5⁺asialoGMI⁺Fc RI⁺細胞であり、マウスには存在しないとされていた好塩基球であることを明らかにした。アレルギー炎症における好塩基球を標的とする治療法開発の道が開かれた。

2 IgE による遅発型反応ならびにハプテン繰り返し塗布により引き起こされる皮膚反応は、ともにアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症のモデルとされている。アレルギー炎症に重要な役割を果たす IL-4/IL4 受容体の細胞内シグナル伝達を司る STAT6 の作用を抑制する STAT6 decoy（おとり核酸）を作成し、炎症反応に対する抑制効果を検討した。STAT6 decoy の投与によって、IgE による遅発型反応とハプテン繰り返し塗布によるアレルギー炎症反応を共に抑制できた。また、STAT6 decoy は IgE を介する第3相反応を約 50%抑制したが、完全な抑制はできなかった。次いで、STAT6 decoy を 2%含有する軟膏を作成し、アトピー性皮膚炎の治療を行ったところ、皮膚症状の改善が得られ、新しい治療薬となることが明らかになった。

3 FcεRI が局在する細胞膜上の lipid raft を修飾する Methyl-β-cyclodextrin あるいは外来コレステロールがアレルギー炎症を抑制する可能性が示された。細胞膜上の lipid raft の機能を測定するため、健常人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a⁺ FcεRI⁺樹状細胞を効率よく回収する方法を確立し、この細胞に IgE あるいは IgE+抗原を添加し、FcεRI 下流が活性化されてケモカイン産生が起こる実験系を開発した。この実験系に Lipid raft 機能を修飾する Methyl-β-cyclodextrin あるいはコレステロールを添加すると、樹状細胞からのケモカイン産生が抑制された。しかし、アトピー性皮膚炎患者由来の樹状細胞では、すでに多くのシグナルが入っているために、lipid raft 修飾薬の添加による十分なケモカイン産生の抑制は見られなかった。同時に、10%コレステロール軟膏によるアトピー性皮膚炎の治療を試みたところ、著明な治療効果が得られ、樹状細胞での実験結果と一部乖離が見られた。この乖離の説明のために検討を加えたところ、患者血液中の単核球の LDL 受容体が減少していた。また、コレステロールは皮膚の保湿機能を示すと同時に、表皮細胞からの可溶性 I 型 TNF 受容体の産生を亢進させた。

以上より、コレステロールは、樹状細胞の lipid raft 機能を抑制すると同時に、表皮細胞機能に影響を与え、アトピー性皮膚炎に対する治療効果を発揮していることが考えられ、新しい治療薬になることが明らかになった。

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

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 大阪大学大学院医学研究科分子病態医学皮膚科学講座 教授

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の多くは、乳幼児期に発症し、消退をくり返して自然治癒するが、近年のアトピー性皮膚炎では、自然治癒が起らず、また、成人期に再燃あるいははじめて発症して、難治性の成人型アトピー性皮膚炎へと移行する。本症の病院として、皮膚バリア機能異常と IgE を介するアレルギー炎症が指摘されている。前者の皮膚バリア機能異常に対しては、環境整備と種々の保湿剤の開発によってコントロールが可能となっているが、後者のアレルギー炎症に対してはステロイドが汎用されているが、さらなる治療薬開発が急務となっている。

本症の難治化機序はまだ十分に明らかにされていないが、難治化機序の一つとして Th2 細胞を介する炎症反応の増強と持続が指摘されている。Th2 細胞を介した IgE 抗体産生異常に基づく病態形成に対しては、環境アレルゲンの検出と除去以外に方法がなく、根本的治療法の確立が急務となっている。本研究では、アトピー性皮膚炎の Th2 細胞を中心とする免疫学的炎症反応の解析と新しい治療法の開発を目的とした。アレルゲン特異的 IgE トランスジェニックマウスを作成しているため、その皮膚反応を解析し、アトピー性皮膚炎の難治化機序を明らかにする。また、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 受容体を介するシグナル伝達の重要な転写調節因子である STAT6 機能を制御することにより新しい治療法の開発を行い、また、細胞膜上の Lipid raft 機能を修飾する薬物を検討し、アトピー性皮膚炎治療薬の開発を行う。

B. 研究方法

1. IgE/Fc RI を介する新たな慢性アレルギー炎症の解析 (烏山)

卵白アルブミン (OVA) 特異的 IgE 遺伝子を導入した IgE トランスジェニックマウスを作成し、OVA による皮膚反応を観察した。また、マウスに抗原特異的 IgE を静脈注射して受動感作を行い、抗原投与による皮膚反応を観察した。皮膚反応は、第 1 相反応である即時型反応、第 2 相反応である遅発型反応に続いて、抗原投与後 3~4 日にピークに達し、長期にわたって持続する第 3 相反応が出現した。

新しく発見された第 3 相反応の責任細胞を解析するため、病理学的検討、電子顕微鏡観察、Flowcytometry 解析、遺伝子欠損マウスに対する骨髓細胞移入実験、種々の抗体処理を行った骨髓細胞の移入実験を行った。また、マウス抗塩基球に対する単クローン抗体を作成し、第 3 相反応の責任細胞の同定を行った。

2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制 (西岡、横関)

正常マウスに抗 TNP 特異的 IgE 単クローン抗体を静脈投与して受動感作し、マウス耳介に TNCB を塗布することにより IgE の遅発型反応を惹起した。この惹起反応前に STAT6 decoy を皮下投与し、遅発型反応の変化を観察した。また、TNCB で感作したマウスの耳介に隔日に TNCB を 10 回塗布して遅発型反応を誘導した。このマウスの最終惹起反応前に STAT6 decoy を投与し、皮膚反応の変化を観察した。第 3 相反応に対しても抗原投与前に STAT6 decoy を投与し皮膚反応の変化を観察した。

さらに、STAT6 decoy を 2% 含有する軟膏を作成し、成人型アトピー性皮膚炎患者に投与し、皮膚症状の改善度合いを観察した。

3. Lipid raft 機能の修飾による治療法の開発 (片山)

健康者ならびにアトピー性皮膚炎患者の末梢血を Flowcytometry で分画し、CD1a⁺FcεR1⁺細胞を得た。

この細胞に IgE あるいは IgE+抗原を添加して培養し、TARC 産生を測定した。この系に lipid raft 機能を修飾する Methyl- β -cyclodextrin あるいはコレステロールを添加し、TARC 産生に及ぼす影響を観察した。同時に、表皮細胞をコレステロール添加下で培養し、可溶性 TNF 受容体の産生を観察した。

10%コレステロール軟膏を作成し、成人型アトピー性皮膚炎患者に外用させ、皮膚症状の完全度合いを観察した。

C. 研究結果

1. IgE/Fc RI を介する新たな慢性アレルギー炎症の解析 (鳥山)

IgE 遺伝子導入マウスの皮膚反応を検討する課程で、即時型反応、遅発型反応に続いて出現する、長期に持続する第 3 相目の強い皮膚炎症反応を発見した。新たに発見した第 3 相反応は、抗原投与 3~4 日後にピークを示し、長期にわたって持続する炎症反応であった。この反応は IgE の受動感作したマウスにおいても観察され、アトピー性皮膚炎における炎症の遷延化に関連することが考えられた。

IgE 受動感作実験において、第 3 相反応は、T 細胞欠損マウス、B 細胞欠損マウス、肥満細胞欠損マウスにおいても検出され、Fc RI 欠損マウスでは検出されないことから、肥満細胞以外の Fc RI 陽性細胞が責任細胞であると考えられた。

そこで、第 3 相反応の病理組織学的解析、flow cytometry 解析、細胞移入実験などを行ったところ、第 3 相反応の責任細胞は、リンパ球、肥満細胞、好酸球、血小板以外の Fc RI 陽性の骨髄由来血球系細胞であった。

Fc RI 欠損マウスに正常骨髄細胞を移入することにより第 3 相反応は誘導されたが、脾臓細胞あるいは骨髄細胞由来培養肥満細胞の移入では、反応は誘導されなかった。さらに検討を加えた結果、責任細胞

は、骨髄由来の放射線感受性を持ち、NK 細胞マーカーである DX5、asialoGM1 を表面に発現する Fc RI 陽性細胞であった。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。これらの結果から、IgE - 肥満細胞を介する反応とは異なる新しい慢性アレルギー炎症誘発機構が存在し、好塩基球を標的とする治療薬開発の必要性が示唆された。

2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制 (西岡、横関)

IgE 抗体産生に大きく関与する IL-4/IL-4 受容体のシグナル伝達因子である STAT6 の欠損マウスにおいて IgE 受動感作による遅発型反応が抑制されることを見出した。そこで、STAT6 のおとり核酸 (STAT6 decoy) を作成し、アトピー性皮膚炎の炎症反応の抑制を試みた。IgE 受動感作による遅発型反応は、STAT6 decoy の投与によって著明に抑制された。

アレルギー反復投与モデルにおける炎症反応に対して、STAT6 decoy は、最終惹起反応前日に投与することによって炎症反応を抑制し、また、第 3 相反応に対しては、惹起反応前に STAT6 decoy で前処理することにより、第 3 相反応を 50~60%抑制したが、完全な抑制は得られなかった。

抑制された皮膚内の炎症細胞を検討すると、両反応共に、炎症部位内に浸潤する好中球、リンパ球、好酸球、脱顆粒した肥満細胞が著明に減少していた。

アレルギー反復投与による炎症反応と新しく発見された慢性アレルギー炎症である第 3 相反応も共に STAT6 decoy によって抑制できることが明らかとなり、STAT6 のおとり核酸が IgE を介するアレルギー

炎症反応の治療薬となる可能性が示唆された。

そこで、STAT6 decoy を2%含有する軟膏を作成し、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。また、痒みの著明な減弱が観察された。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 機能の修飾による治療法の開発 (片山)

細胞膜上の受容体や抗原を含む細胞膜関連蛋白は、界面活性剤によっても分解されない細胞膜構成領域 (lipid raft) に局在することが明らかになっている。

IgE を結合する Fc RI も同様に、細胞膜上を自由に移動しているが、IgE と抗原のクロスリンクによって lipid raft 内に移動する。Lipid raft の機能を解析するため、健常人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a⁺ Fc RI⁺ 樹状細胞を効率よく回収する方法を確立した。この細胞に IgE あるいは IgE+抗原を添加し、樹状細胞からのケモカインの一つである TARC 産生を指標とする実験系を確立した。

健常人あるいはアトピー性皮膚炎患者の樹状細胞に IgE ならびに抗原を添加することによって TARC 産生が亢進する。これに lipid raft を修飾する操作を加え、Fc RI のシグナル伝達を阻止すると TARC 産生が抑制される。コレステロール枯渇による lipid raft の不活化をきたす Methyl- β -cyclodextrin は、樹状細胞の IgE 依存性 TARC 産生を著明に抑制した。また、lipid raft を不安定化させる外来性コレステロールの添加によっても、TARC 産生が抑制された。しかし、アトピー性皮膚炎患者由来の樹状細胞による TARC 産生に対する抑制効果は、健常人由来樹状細胞に比して、比較的弱いものであった。これは、患者樹状細胞で Fc RI からのシグナルがより多くだされているためと考えられる。

そこで、試験的に、アトピー性皮膚炎患者に 10%コレステロール軟膏を外用させたところ、皮膚症状の

改善がみられた。しかし、コレステロール軟膏の効果と樹状細胞の機能異常との間に一部乖離があることから、さらにコレステロールの作用を検討したところ、重症アトピー性皮膚炎患者の単核球の LDL 受容体の発現は低下しており。アセトン処理した皮膚のバリア機能はコレステロール処理で増強し、表皮細胞の可溶性 I 型 TNF 受容体の産生が増加したことから、コレステロールは、樹状細胞のみならず、表皮細胞にも影響を及ぼし、治療効果をあげていることが明らかになった。

D. 考察

平成 15 年度から平成 17 年度の 3 年間の研究成果として、①慢性アレルギー反応の新しい反応、すなわち、IgE を介する第 3 相反応を発見し、その責任細胞がマウスでは存在しないとまで言われていた好塩基球であることが明らかになったこと、②STAT6 decoy の投与によって、IgE 受動感作による遅発型反応、アレルギー反復投与によるアレルギー炎症ならびに第 3 相反応が抑制され、STAT6 decoy 含有軟膏によって成人型アトピー性皮膚炎の皮膚症状が改善されたこと、さらに、③lipid raft 機能を修飾するコレステロール軟膏によってアトピー性皮膚炎の皮膚症状を改善し、その機序として、樹状細胞の lipid raft 機能を修飾し、同時に表皮細胞機能に影響を与えてアトピー性皮膚炎の皮膚症状を改善させたこと、が明らかとなった。

これまで、マウスにおける好塩基球の存在は否定的であったところで、第 3 相反応の責任細胞が好塩基球であったことを証明したことは、今後のアレルギー炎症を考える上で価値ある知見と考えられる。しかも、微量にしか存在しない好塩基球がどのような機序を経て炎症反応を惹起するのか、また、炎症反応発現までのタイムラグ、長期

にわたって持続する炎症反応の機序などの検討が引き続き行われる必要がある。さらに、今回の研究成果から、アレルギー炎症の新しい側面の出現と、その解析による炎症反応に対する介入（治療）方法の開発が行われる必要がある。

STAT6 おとり核酸は、アレルギー炎症のモデルである IgE の遅発型反応を完全に抑制したが、第 3 相反応については約 50%しか抑制できなかった。これは第 3 相反応の機序が肥満細胞を介する反応でなく、好塩基球を介する反応であることから理解できる場所であり、第 3 相反応を完全に抑制できる治療薬の開発が急務となる。しかし、STAT6 decoy 軟膏によって、アトピー性皮膚炎の皮膚症状の改善が見られ、また、患者の訴えから、かゆみに対して効果を発揮していることが示唆されていることから、アトピー性皮膚炎の新しい治療薬になる可能性が示された。現在限られた症例での知見しか得られていないので、今後さらに症例数を増加させて治療効果を明らかにする必要がある。

コレステロール軟膏によるアトピー性皮膚炎治療においても同様で、症例数の増加による検討が必要となっている。また、lipid raft 機能の測定法を開発できたことにより、コレステロール以外の lipid raft 機能を修飾する抗炎症薬の開発が可能であり、今後さらに継続して検討を加える必要がある。

E. 結論

アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介する第 3 相反応の役割が考えられ、その責任細胞が好塩基球であることが明らかになり、アレルギー炎症の新しい側面が開かれた。STAT6 デコイがアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症モデルである IgE の遅発型反応、ハプテン繰り返し塗布による炎症反応のみでなく、

第 3 相反応の一部をも抑制でき、成人がアトピー性皮膚炎の皮膚症状を改善したことから、アトピー性皮膚炎の新しい治療薬となることが示された。また、Lipid raft 機能を修飾するコレステロールによってアトピー性皮膚炎の皮膚症状が改善されたこと、そして、その機序として Fc RI を持つ細胞の lipid raft 機能の修飾と表皮細胞に対する影響を明らかにした。これらの成果をさらに発展させ、新しい治療薬が開発される可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

別紙参照。

H. 知的所有権の所得状況

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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 16 (2004 年) 3 月

II 平成 15 年度総括研究報告書

アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と遺伝子療法の開発に関する研究

主任研究者 西岡 清 東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎の難治化機序の解析と遺伝子治療の開発を目指して、平成15年度では以下の成果が得た。

1. アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介するアレルギー炎症が重要な役割を果たすことから、IgE のトランスジェニックマウスあるいは IgE の受動感作を行ったマウスに抗原を投与することによって、即時型、遅発型反応に続く第3相目の強い炎症反応が出現することを見つけたし、これがアトピー性皮膚炎の難治化に関与する可能性を考え、その発症機序を検討した。第3相反応は、T細胞、B細胞、肥満細胞とも異なる Fc ϵ RI 陽性骨髄由来造血細胞によって起こることを明らかにした。
2. IgE による遅発型反応ならびにハプテン繰り返し塗布により引き起こされる皮膚反応は、共にアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症のモデルとされている。IL4 受容体のシグナル伝達を司る STAT6 の作用を抑制する STAT6 デコイを用いて炎症反応に対する抑制効果を検討した。STAT6 デコイの投与によって、IgE による遅発型反応とハプテン繰り返し塗布によるアレルギー炎症反応を共に抑制できることが明らかとなり、STAT デコイによるアレルギー炎症の遺伝子療法の可能性を示した。
3. 細胞膜上の lipid raft の分解あるいはこの領域に dominant negative Fc ϵ RI を発現させることによるアトピー性皮膚炎の治療法の開発を行うため、健常人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a(+) Fc ϵ RI(+)細胞を効率よく回収する方法を確立し、この細胞に IgE あるいは IgE+抗原の添加し、Fc ϵ RI 下流で活性化される Syk のリン酸化を指標とする lipid raft 機能を解析する実験系を開発した。

分担研究者

鳥山 一 東京医科歯科大学大学院感染分子
制御学分野 教授
片山 一朗 長崎大学大学院皮膚病態学分野
教授

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の多くは、乳幼児期に発症し、消退をくり返して自然治癒するが、一部は、成人期に再燃あるいははじめて発症して、難治性の成人型アトピー性皮膚炎へと移行する。難治化した本性患者における難治化機序

はまだ十分に明らかにされていない。難治化機序の一つとして Th2 細胞を介する炎症反応の増強と持続が指摘されている。Th2 細胞を介した IgE 抗体産生異常に基づく病態形成に対しては、環境アレルゲンの検出と除去以外に方法がなく、病因論に基づく治療法の確立が急務となっている。本研究では、アトピー性皮膚炎の Th2 細胞を中心とする免疫学的炎症反応の解析と新しい治療法の開発を目的とする。アレルゲン特異的 IgE トランスジェニックマウスの解析から、アレルゲン特異的 IgE が即時型、遅発型反応に続いて出現する、炎症反応が長期にわたって持続する第 3 相反応が存在することを世界に先駆けて明らかにしている。この第 3 相反応を解析することによって、アトピー性皮膚炎の難治化機序を明らかにする。また、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 受容体を介するシグナル伝達の重要な転写調節因子である STAT6 機能を制御することによって、また、細胞膜上の lipid raft に変異型 Fc ϵ RI 分子を導入発現することによって、アトピー性皮膚炎治療法の開発を行う

B. 研究方法と結果

1. IgE/Fc ϵ RI を介する新たな慢性アレルギー炎症の解析

IgE 遺伝子導入マウスの皮膚反応を検討する課程で、即時型反応、遅発型反応に続いて出現する、長期に持続する第 3 相目の強い皮膚炎症反応が発見された。新たに発見された第 3 相反応は、抗原投与 3-4 日後にピークを示す長期にわたって持続する炎症反応であり、

IgE 受動感作によっても引き起こされることから、アトピー性皮膚炎における炎症の遷延化に関連することが考えられる。第 3 相反応発現機序の実体は明らかにされていないが、第 3 相反応は、IgE 受動感作によって、T 細胞欠損マウス、B 細胞欠損マウス、肥満細胞欠損マウスにおいても検出され、Fc ϵ RI 欠損マウスでは検出されないことから、肥満細胞以外の Fc ϵ RI 陽性細胞が責任細胞であると考えられる。分担研究者の烏山は、第 3 相反応の病理組織学的解析、flow cytometry 解析、抗体による細胞除去、細胞移入実験などを行った。細胞移入実験結果から、責任細胞は、リンパ球、肥満細胞、好塩基球、血小板以外の Fc ϵ RI 陽性の骨髄由来血球系細胞であり、IgE-肥満細胞を介する反応とは異なる新しい慢性アレルギー炎症誘発機構が存在することを明らかになった。さらに、この慢性アレルギー反応の抑制に IL-4R/STAT6 を介するシグナルが関与していることが明らかとなり、第 3 相反応の抑制を標的とした創薬開発の可能性が示された。

2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制

主任研究者の西岡は、IL-4 受容体のシグナル伝達因子の STAT6 欠損マウスにおいて IgE 受動感作による遅発型反応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炎症反応の抑制を試みている。IgE 受動感作による遅発反応は、STAT6 decoy の投与によって著明に抑制されることをすでに明らかにしている。今回、STAT6 decoy がアレルゲンの反復投与のよっ

て引き起こされるアレルギー炎症反応、ならびに IgE を介する第 3 相反応に対する抑制効果を検討した。アレルゲン反復投与モデルにおける炎症反応に対して、STAT6 decoy は、最終惹起反応前日に投与することによって炎症反応を抑制し、また、第 3 相反応に対しては、惹起反応前に STAT6 decoy で前処理することにより、第 3 相反応の 50-60% を抑制した。抑制された皮膚内の炎症細胞を検討すると、両反応共に、炎症部位内に浸潤する好中球、リンパ球、好酸球、脱顆粒した肥満細胞が著明に減少していた。アレルゲン反復投与による炎症反応と新しく発見された慢性アレルギー炎症である第 3 相反応も共に STAT6 decoy によって抑制できることが明らかとなり、STAT6 のおとり核酸が IgE を介するアレルギー炎症反応の治療薬となる可能性が示された。今後、ヒトアレルギー炎症への応用に向けた検討を開始する必要がある。

3. Syk リン酸化を指標とした Lipid raft 機能の解析と治療への応用

細胞膜上の受容体や抗原を含む細胞膜関連蛋白質は、界面活性剤によっても分解されない細胞膜構成領域 (lipid raft) に局在することが明らかになっている。IgE を結合する Fc ϵ RI も同様で、細胞膜上を自由に移動しているが、IgE と抗原のクロスリンクによって lipid raft 内に移動する。分担研究者の片山は、lipid raft の分解あるいはこの領域での dominant negative Fc ϵ RI の発現によるアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発を試みている。健常人及びアトピー性皮膚炎患者の末梢血から CD1a(+) Fc ϵ RI(+)細胞を効率よく

回収する方法を確立し、この細胞に IgE あるいは IgE+抗原の添加し、Fc ϵ RI 下流で活性化される Syk のリン酸化を指標とすることにより、lipid raft 機能を解析することが出来ることを示し、治療法開発のためのツールとなる実験系を開発した。今後、この実験系を利用して、種々の薬物の投与、遺伝子導入などを行い、治療薬の開発を行っていく予定である。

C. 研究結果

今年度の研究成果として、①慢性アレルギー反応の新しい反応、すなわち、IgE を介する第 3 相反応の責任細胞についての詳細な情報が得られたこと、②アレルゲン反復投与によるアレルギー炎症ならびに第 3 相反応が STAT6 のおとり核酸によって抑制されること、さらに、③lipid raft 調節による創薬開発のための研究システムとして Syk リン酸化を指標とする実験系を確立したことは、アトピー性皮膚炎の新しい治療法を開発する上で非常に重要な成果が得られたものと考えられる。第 3 相反応の責任細胞についての情報は得られたが、未だ責任細胞を同定分離するに至っていないこと、STAT6 おとり核酸はヒトアトピー性皮膚炎にどのように適応できるかの検討が必要であること、また、lipid raft 機能の測定法が開発によって、lipid raft 機能を調節する薬物の検索、あるいは dominant negative 遺伝子の導入による抗炎症効果の検定が必要であることなど、今後さらに継続して検討を加える予定である。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の難治化に IgE を介する第 3 相反応の役割が考えられ、その責任細胞が T 細胞、B 細胞、肥満細胞、ランゲルハンス細胞とも異なる骨髓細胞であることから、さらに責任細胞の同定分離を行い、責任細胞の機能を検討することにより、アトピー性皮膚炎の難治化機序を明らかにできる可能性を示唆した。STAT6 デコイがアトピー性皮膚炎のアレルギー炎症モデルであるハプテン繰り返し塗布による炎症反応のみでなく、第 3 相反応も抑制できる可能性が示し、STAT6 デコイを用いた遺伝子治療のヒトへの応用の可能性が出てきた。Lipid raft を利用した遺伝子治療の開発は、まだ端緒についた所であるが、dominant negative Fc ϵ RI 導入による遺伝子治療の基礎が固まりつつあり、今後の進展が期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

分担研究者報告を参照。

G. 知的所有権の所得状況

分担研究者報告を参照。

Ⅲ 平成 15 年度分担研究報告書

STAT6 Decoy ODN を用いた接触過敏反応および抗原特異的 IgE 誘導性第 3 相耳介腫脹反応の発症機序の解析と抑制

分担研究者	西岡 清	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・教授
研究協力者	横関博雄	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・助教授
	鷺見浩史	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生
	呉 明花	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生
	金井康真	東京医科歯科大学大学院環境皮膚免疫学分野・大学院生

研究要旨 重症アトピー性皮膚炎の皮膚病変の形成に抗原特異的 IgE 抗体が重要な役割を果たすと考えられている。また、アトピー性皮膚炎の増悪因子として種々の外用剤などによる接触皮膚炎が問題となっている。すでに、抗原特異的 IgE 誘導性遅発型反応で STAT6 が重要な役割を果たすこと、また接触過敏症の誘導においても STAT6 が重要な役割を果たすことについて明らかにしている。前回の班会議では、STAT6 欠損マウスと Wild Type (WT: C57BL/6) マウスの腹部に 5%TNCB を塗布後、1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応）を誘導し比較検討した結果、両者とも経時的な耳介腫脹反応は同様の経過をたどったが、欠損マウスでは WT マウスに比べ耳介の腫脹が明らかに減弱していたことを報告した。今回、STAT6 Decoy ODN を用いて、耳介の惹起後の腫脹反応について有用性を検討した。その結果、STAT6 Decoy ODN 投与群では明らかに Scrambled decoy ODN 投与群、PBS 投与群に比べ耳介腫脹反応が抑制されていた。組織学的には好酸球、リンパ球、脱顆粒した肥満細胞の浸潤数が減少していた。惹起部皮膚のサイトカイン量を ELISA で測定した。その結果、IL-4, IL-6, Eotaxin が STAT6 decoy ODN 投与群で抑制されていた。

さらに、TNP 特異的 IgE 遺伝子導入マウスの耳介皮内に TNP-OVA を皮下投与し惹起後 2 4 時間後の遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応のみならず、さらに 3～4 日目に出現する第 3 相の耳介腫脹反応も STAT6 Decoy ODN 皮下投与により耳介腫脹反応が抑制された。

A. 研究目的

前回の班会議では、STAT6 欠損マウスと Wild Type (WT: C57BL/6) マウスの腹部に

5%TNCB を塗布後、1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応）を誘導し比較検討した結果、両者とも経時的

な耳介腫脹反応は同様の経過をたどったが、欠損マウスでは WT マウスに比べ耳介の腫脹が明らかに減弱していたことを報告した。今回、STAT6 Decoy ODN を用いて、急性、慢性接触皮膚炎の耳介惹起後の腫脹反応について経時的に比較検討し STAT6 の役割を解析する。

また最近、TNP 抗原特異的 IgE 遺伝子導入マウスにて、耳介皮内に TNP-OVA を投与すると抗原特異的即時型反応（第 1 相）ならびに遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応のみならず、さらに 3～4 日目より第 1 相、第 2 相を凌ぐ第 3 相の耳介腫脹反応を示すことが明らかにされている。このモデルマウスを用いて STAT6 Decoy ODN の有用性を検討。STAT6 decoy ODN 投与群では Scrambled decoy ODN, PBS 皮下投与群に比較して第 3 相耳介腫脹反応は有意に抑制された。

B. 研究方法

BALB/c マウスの腹部に 5%TNCB を塗布した 4 日後に、耳介に 1%TNCB を塗布して 1 回目の惹起反応（急性接触過敏反応:Acute CHS）を誘導、さらに隔日に反復塗布して 12 回目の惹起反応（慢性接触過敏反応:Chronic CHS）を誘導し惹起前日に、0.2mM, 2mM, 20mMSTAT6 Decoy ODN（おとり型核酸医薬）、Scrambled Decoy を耳介の皮下に投与して、耳介の惹起後の腫脹反応について経時的に比較検討し STAT6 の役割を解析した。他のハプテン（DNFB, Oxazolone）により誘導された CHS においても STAT6Decoy ODN の効果を判定した。一方、TNP 抗原特異的 IgE 誘導性 3 相反応は TNP 特異的 IgE 導入マウス（鳥山教授より供

与）の耳介に STAT6 Decoy ODN, scrambled decoy ODN, PBS を皮内注射した。24 時間後に 10mg/ear の TNP-OVA を耳介に皮内注射にて惹起反応を誘導。

C. 研究結果

健常人およびアトピー性皮膚炎患者 PBMC から IL-4, GM-CSF およびダニ抗原刺激を加える事で CD1a(+) Fc ϵ R1(+) 細胞を効率良く得る事ができた。これに対し IgE、および IgE と抗原同時添加群で Fc ϵ R1 の下流で活性化される Syk のリン酸化をみたところ Tyr323 がクロスリンクに伴いリン酸化しており、これら樹状細胞には機能的 Fc ϵ R1 の発現が確認できた。さらに抗原・抗体刺激に伴い、Triton-X100 に不溶性の分画に Fc ϵ R1 が検出されることから、Fc ϵ R1 は刺激によって lipid raft に局在していると考えられた。さらにこれら樹状細胞に抗原・抗体刺激を加えると TARC の mRNA 発現増強が認められるが、このことは MBCD の濃度依存的に抑制された。さらにコレステロール軟膏を実際アトピー性皮膚炎罹患者に外用していただくと外用部は対照群と比し著しい改善が認められた。これらの結果は lipid raft を標的とした治療がアトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患を改善させる十分な潜在能力をもつ事を示唆していた。

C. 研究結果

20mMSTAT6 Decoy ODN を投与した群では Scrambled Decoy 投与群に比べ、明らかに acute CHS, Chronic CHS における惹起後の耳

介腫脹反応が減弱していた。また、他のハプテンにより誘導された acute CHS, chronic CHS ともに STAT6 decoy ODN は有効であった。惹起した耳介を病理組織学的に検討したところ、急性、慢性接触過敏反応ともに STAT6 Decoy 投与群は Scrambled Decoy 投与群に比較して浮腫性反応のみならず、好酸球、肥満細胞、脱顆粒肥満細胞数が有意に減少していた。さらに、耳介組織中のサイトカイン量を ELISA で解析した結果 STAT6 Decoy 投与群の惹起皮膚では IL-4、IL-6、eotaxin の蛋白量が減少していたが、IFN- γ の蛋白量については有意差がなかった。

また、TNP-IgE 遺伝子導入マウスに誘導した第3相反応では、STAT6 DecoyODN 投与群は陽性対照群、Scrambled Decoy 投与群に比較して耳介腫脹反応が 50~60%抑制され、病理組織学的に、浸潤する好酸球、好中球、肥満細胞、脱顆粒した肥満細胞、リンパ球の数が減少した。

D. 考察

これらのことより、STAT6 Decoy を投与することにより惹起部の皮膚局所のサイトカイン、ケモカインの誘導を制御することにより急性、慢性接触過敏反応及び抗原特異的 IgE 誘導性第3相反応を抑制することが明らかになった。

E. 結語

慢性湿疹、アトピー性皮膚炎に STAT6 Decoy による遺伝子治療法の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wu M.-H., Yokozeki H., Takagawa, S., Yamamoto T., Satoh T., Kaneda F. and 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
- 2) Yokozeki H., Wu M.-H., Miyazaki Y., Sumi K., Katayama I., Takeda K., Akira S., Nishioka K., Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice., Clin. Exp. Immunol., 132, 385-392, 2003
- 3) Satoh T., Kaneko M., Wu M.-H., Yokozeki H., Nishioka K.: Contribution of selectin ligands to eosinophil recruitment into the skin of patients with atopic dermatitis., Eur. J. Immunol., 32, 1274-1281, 2002
- 4) Awad S., Yokozeki H., Miyazaki Y., Igawa K., Minatohara K., Satoh T., Nishioka K.: Glucocorticoids induced the production and gene expression of IL-1 α through AP-1 and partially NF- κ B activation in murine epidermal cells, J. Med. Dent. Sci., 49, 27-35, 2002
- 5) Yokozeki H., Watanabe K., Igawa K., Miyazaki Y., Katayama I., Nishioka K.: gd T cells assist ab T cells in the adoptive transfer of contact hypersensitivity to

para-phenylenediamine. Clin Exp Immunol, 125:351-359, 2001

- 6) Katayama I., Bae S-J, Hamasaki Y, Igawa K, Miyazaki Y, Yokozeki H, Nishioka K: Stress Respinse, Tachykinin, and Cutaneous Inflammation. (Symposium Proceeding6), J. Invest. Dermatol., 81-86, 2001
- 7) 横関博雄、呉 明花 : STAT6 欠損マウスを用いた IgE 関与遅発型反応の発症機序の解析、臨床免疫, 36(4):547-551, 2001
- 8) 横関博雄: 遅延型アレルギーにおける STAT6 の関与臨床免疫, 36 (2) : 260-265, 2001
- 9) 横関博雄: アレルギー-性接触皮膚炎の effector 細胞、アレルギー科、13:219-232、2002
- 10) 横関博雄: アトピー性皮膚炎: 病態に即した診断へのアプローチ、Modern Phisician, 4, 417-420, 2002
- 11) 横関博雄: 免疫疾患 アトピー性皮膚炎、医学のあゆみ、512-515. Ver. 2, 2002

G. 知的所有権の所得状況

なし