

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 鳥山 一

東京医科歯科大学大学院感染分子制御学 教授

研究要旨 高 IgE 血症を呈する抗原特異的 IgE トランスジェニックマウスに多価の抗原 (TNP-OVA) を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹 (第 1 相と第 2 相) に引き続いて、強い細胞浸潤をともなう遅延型の皮膚腫脹が誘導された。この第 3 相目皮膚腫脹は IgE/FcεRI を介する反応で、しかもマスト細胞非依存的かつ T 細胞非依存的な遅延型アレルギー炎症反応である。FcεRI 欠損マウスへの正常細胞移入実験結果から、皮膚を構成するケラチノサイトや線維芽細胞などではなく、骨髄由来血球系細胞 (マスト細胞、好塩基球、リンパ球、血小板を除く) がその発症に深く関与していることが判明し、これまでに知られていない全く新しい慢性アレルギー炎症誘発機構が存在することが強く示唆された。さらに、この慢性アレルギー炎症反応の制御には IL-4R/STAT6 を介するシグナル伝達に関与していることが明らかとなった。第 3 相皮膚腫脹の責任細胞ならびに液性因子の同定はあらたな創薬のターゲットの発見につながるものと期待される。

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、IgE が花粉症のような即時型アレルギー反応を引き起こすことは教科書的事実として広く認知されているのに対して、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。従来のアレルギー疾患モデル動物では、抗原を繰り返しチ

細胞が感作・活性化されてしまい、IgE 単独の病態への関与を解析することは不可能であった。そこで、我々は抗原特異的な IgE を高レベルで産生するトランスジェニックマウスを樹立し、事前の抗原免疫をせず単回の抗原投与のみでアレルギー反応を誘発させて、慢性アレルギー疾患の病態形成・遷延化における IgE の役割を解析した。

B. 研究方法

ハプテン TNP 特異的 IgE トランスジェニッ

ク (Tg) マウスあるいは TNP 特異的 IgE であ
らかじめ受動感作した種々の変異マウスの耳
介に抗原 TNP-OVA あるいは OVA を皮内注射し、
経時的に耳介皮膚厚の計測、病理組織学的解
析をおこなった。第 3 相耳介腫脹を呈さない
FceRI 欠損マウスに放射線照射したのちに、
正常マウス骨髓細胞を移入し、第 3 相耳介腫
脹出現の有無を解析した。

(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

Fc ϵ RI を発現できない Fcg 鎖ノックアウト
マウスでは第 3 相耳介腫脹は出現しないので、
このマウスをレシピエントとして第 3 相耳介
腫脹の責任細胞の同定を進めた。放射線照射
した Fc ϵ RI 欠損マウスに正常マウスの骨髓
細胞を移入して血球細胞を再構築したところ、
第 3 相耳介腫脹が誘導された。一方、Fc ϵ RI
欠損マウス由来の骨髓細胞の移入では第 3 相
耳介腫脹は誘導されなかった。さらに、責任
細胞を絞り込むために、正常マウス骨髓細胞
から *in vitro* でマスト細胞ならびに好塩基球
を分化させ Fc ϵ RI 欠損マウスに移入した。い
ずれの場合も第 3 相耳介腫脹は誘導されな
かった。また、正常マウスの血中から血小板を
単離して FceRI 欠損マウスに移入したが、第
3 相耳介腫脹は誘導されなかった。

次に、細胞浸潤に寄与する液性因子を明ら
かにするために、IL-1 欠損、IL-6 欠損、IL-18
欠損、TNF α 欠損、IL-5R 欠損、CCR5 欠損、INF
 γ 欠損マウスなどの変異マウスを解析したと

ころ、いずれのマウスにおいても正常マウス
と同程度の第 3 相耳介腫脹が誘導された。興
味あることに、STAT6 欠損マウスならびに
IL-4R α 欠損マウスでは正常マウスに比べよ
り強い耳介腫脹が認められた。

D. 考察

TNP 特異的 Tg マウスならびに TNP 特異的
IgE 受動感作マウスに多価の抗原を皮内投与
して誘導される第 3 相目皮膚腫脹は、IgE/Fc
 ϵ RI を介する反応で、しかもマスト細胞非依
存的かつ T 細胞非依存的な遅延型免疫応答で
ある。FceRI 欠損マウスへの正常細胞移入実
験結果から、皮膚を構成するケラチノサイト
や線維芽細胞などではなく、骨髓由来血球系
細胞がその発症に深く関与していることが判
明した。個々の細胞系譜の移入実験ならびに
各種ノックアウトマウスの解析から、マスト
細胞、好塩基球、血小板ならびにリンパ球の
関与は否定的である。以上の結果は、既成概
念では説明できない全く新しい慢性アレルギー
炎症誘導機構が存在することを強く示唆し
ている。

代表的な炎症性サイトカインである IL-1、
IL-6、TNF α 欠損マウスにおいても正常マウス
と同程度の第 3 相耳介腫脹が誘導されたが、
STAT6 欠損マウスならびに IL-4R α 欠損マウ
スでは正常マウスに比べより強い耳介腫脹が
認められたことから、この慢性アレルギー炎症
反応の制御には IL-4R/STAT6 を介するシグ
ナル伝達に関与していると考えられる。

E. 結論

IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症反応が存在することが明らかとなった。この反応にはマスト細胞、好塩基球、リンパ球は必須ではなく、これまで知られていないユニークな慢性アレルギー炎症誘発機構の存在が強く示唆され、新たな創薬のターゲットの同定が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., Karasuyama, H.: Long-term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J. Immunol.* 170: 775-780, 2003.
- ② Sato, E., Hirahara, K., Wada, Y., Yoshitomi, T., Azuma, T., Matsuoka, K., Kubo, Taya, C., Yonekawa, H., Karasuyama, H. and Shiraishi, A.: Chronic inflammation in skin can be induced in IgE transgenic mice by a single challenge of multivalent antigen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 143-148, 2003.
- ③ Maezawa, Y., Nakajima, H., Kumano, K., Kubo, S., Karasuyama, H., Iwamoto, I.: Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 131 Suppl 1: 2-6, 2003.

2. 学会発表

- ① 烏山一: IgE トランスジェニックマウスにおける遅延型皮膚アレルギー炎症第15回日本アレルギー学会春期臨床大会 2003, 5.12.

横浜

- ② 向井香織、烏山 一他: アレルギー疾患モデルマウスを用いた慢性アレルギー炎症誘発機構の解析 第33回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12.8-10 福岡
- ③ 久保田俊之、烏山 一他: 高親和性 IgE 受容体 FcεRI の発現調節における α 鎖膜直上領域の役割 第33回日本免疫学会総会・学術集会 2003.12.8-10 福岡

G. 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10-3233

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 一朗 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析・制御学講座教授
研究協力者 室田 浩之 長崎大学皮膚科
Bae SangJae 長崎大学皮膚科
堀内 保宏 長崎大学皮膚科

研究要旨 アトピー性皮膚炎においては皮膚バリアー機能の障害や I g E 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 (Fc ϵ R1) 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。Fc ϵ R1 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 Fc ϵ R1 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を開始できないという挙動に着目し、lipid raft を不活化あるいは Fc ϵ R1 の dominant negative form を lipid raft に発現させる事で 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 Fc ϵ R1 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

Fc ϵ R1 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。樹状細胞を用いて検討を行い、外用剤としての適応を念頭においている。

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。樹状細胞分画はフローサイトメトリーを用いて Fc ϵ R1 (+) CD1a (+) 細胞を検出する事で確認した。抗原・抗体刺激には患者

血清とリコンビナントダニ抗原を用いた。Fc ϵ R1の活性を下流のSykのリン酸化で、局在をTriton-X100 insolubility assayにて検討した。lipid raftを失活させるcholesterol脱失試薬としてmethyl-beta-cyclodextrin (MBCD)を用い、抗原抗体刺激に伴うTARCのmRNAの発現をRT-PCRで検討し、この試薬に対する影響をみた。さらにlipid raftを不安定にするとして知られるコレステロール負荷による影響を見るために、すでに魚鱗癬に適応が検討されていたコレステロール軟膏(10% w/w)をアトピー性皮膚炎罹患者に同意を得た上で外用していただいた。二重盲検比較試験の対照として溶媒であるワセリンを用いた。

C. 研究結果

健康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。

D. 考察

これまでFc ϵ R1の生理的機能はラット的好塩基細胞株を用いて解析されてきた。Fc ϵ R1とlipid raftの関与もこの細胞を用いた系で立証されてきた。ヒトの細胞、中でも樹状細胞におけるFc ϵ R1とlipid raftの関与については知られていなかった。われわれの今回の検討でヒトの樹状細胞においてもその関与を示唆する所見を得ることができた。

近年、アトピー性皮膚炎症状増悪のメカニズムの中に樹状細胞を始めとする抗原提示細胞が重要な役割を担う事が知られてきており、抗原と抗原特異的なIgEの作用によって様々なサイトカイン・ケモカインを産生し、皮膚構成細胞のリモデリングはもとより炎症細胞の炎症の場へのリクルートにも関与するとされている。実際、今回の検討においても樹立した樹状細胞に対する抗原・抗体刺激によって単球の遊走を促すケモカインであるTARCのmRNAの発現誘導が認められた。しかも、この誘導はlipid raftをMBCDによって失活させることで抑制できる。この事はlipid raftを失活させる事で樹状細胞が抗原・抗体特異的活性を受け、さらなる炎症を引き起こそうとするカスケードを抑制できる可能性を示唆していた。

一方でコレステロールの負荷はlipid raft

の安定性を損なわせる方法の一つとして用いられる。一方で表皮細胞は分化とともにセラミドなどのスフィンゴリピッドと同様にコレステロールの含有量が増加するといわれている。しかしアトピー性皮膚炎皮疹部では角質層におけるコレステロール含有量が低下しているとする報告もある。このことは従来魚鱗癬などに応用されていたコレステロール軟膏がアトピー性皮膚炎の症状を改善できる可能性を想像させる。実際、われわれはコレステロール軟膏をアトピー性皮膚炎罹患者に外用していただき、対照に比し皮疹の著しい改善を認めた。

Lipid raft を標的とした治療はアトピー性皮膚炎の全く新しい治療戦略を提供していると考えられる。今後はいかに Fc ϵ R1 特異的な反応を抑止できるかが重要な問題であり、最終的には lipid raft に常に局在するような Fc ϵ R1 dominant negative form の構築を行っていきたいと考えている。

E. 結語

樹状細胞における Lipid raft を標的とした治療戦略はアトピー性皮膚炎治療の全く新しい視野を提供するとともに、症状改善および増悪の抑止に十分な潜在能力を持つものと考えられた。

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

G. 知的所有権の所得状況

なし

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西岡 清

平成 17 (2005 年) 3 月

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

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活動し、以下の研究成果を得た。

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、アレルギー投与後3～4日目にピークとな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⁺ asialoGM1⁺ FcεRI⁺ 細胞で、好塩基球に相当する細胞であることが明らかになった。

2 IL-4 受容体からのシグナルを伝達する分子である 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) を抑制することをすでに明らかにしたので、今年度は、第3相反応に対する STAT6 decoy の抑制効果を検討した。STAT6 decoy の前投与によって、第3相反応の約40%が抑制された。

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。

以上、アトピー性皮膚炎の治療の標的ならびに新しい治療薬開発の可能性を示す価値ある成果が得られた。

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

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。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軟膏療法で比較的容易に治療が可能であるが、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確立していない。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、この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、FcεRI 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。

A. 研究目的

近年増加傾向にあるアトピー性皮膚炎に対して、種々の治療薬の導入が行われているが、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事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

B. 研究方法

昨年度の活動に引き続いて、以下の成果が得られ

た。

1. IgE/FcεRI を介する第3相反応の解析

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が発見された。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と考えられる。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、T細胞、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、FcεRI 欠損マウスでは検出されないことから、肥満細胞以外の FcεRI 陽性細胞が責任細胞であると考えられる。分担研究者の鳥山は、昨年引き続き、各種抗体で処理した骨髄由来細胞を移入したマウスを用いて、第3相反応の責任細胞を明らかにする研究を行った。FcεRI 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もち、NK細胞マーカー (DX5)、asialoGM1 を表面に発現する FcεRI 陽性細胞であり、好塩基球あるいは好塩基球様細胞であることが明らかになった。今後この細胞を標的とした治療法の開発が考えられる。

2. STAT6 おとり核酸によるアレルギー炎症の抑制

主任研究者の西岡と分担研究者の横関は、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ている。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ることをすでに明らかにしている。今年度は、IgE を介する第3相反応に対する STAT6 decoy の炎症反応抑制効果を検討した。STAT6 decoy を惹起反応前に前処理することにより、第3相反応の約40%が抑制された。反応局所の炎症細胞は、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。この抑制を明らかにするため、肥満細胞欠損マウスである W/W マウスと SL/SL マウスについて検討したところ、W/W マウスでは、骨髄由来培養肥満細胞を移入することにより第3相反応を誘導できたが、細胞内シグナル伝達が障害されている SL/SL マウスでは反応の回復が見られなかった。この差は、それぞれのマウスで、肥満細胞の欠損を誘導するメカニズムが異なっているためと考えられる。第3相反応は、STAT6 decoy によって100%抑制されなかったことは、第3相反応は、鳥山らが明らかにした責任細胞に加え、肥満細胞が関与していることを示唆するものと考えられる。この点についてはさらに検討する必要がある。しかし、STAT6 decoy が即時型反応、遅発型反応に加えて、第3相反応の一部を抑制することから、アレルギー炎症に対する新しい治療薬となりうることが示唆される。

3. FcεRI を標的としたアレルギー疾患治療薬の開発

細胞膜上の受容体や抗原を含む細胞膜関連蛋白は、Triton X などの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。IgE を結合する FcεRI 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 内に移動することが想定されている。分担研究者の片山は、昨年度に確立した樹状細胞の IgE 依存性 TARC 発現を指標として、lipid raft 機能を測定した。健康者あるいはアトピー性皮膚炎患者の樹状細胞に IgE ならびに抗原を投与することによって TARC 産

生が亢進する。これに Lipid raft を修飾する操作を加え、FcεRI 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、健常者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 FcεRI 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。以上から、Methyl-β-cyclodextrin、コレステロールをはじめとする Lipid raft を修飾する薬物の検討により、新しい治療薬が開発できる可能性を示した。

C. 研究結果

今年度の研究成果として、①IgE を介する慢性アレルギー反応のモデルとなる IgE を介する第3相反応の責任細胞が、DX5⁺ asialoGM1⁺ FcεRI⁺ の骨髄細胞で、抗塩基球あるいは抗塩基球様細胞あることが明らかとなり、今後、慢性アレルギー反応の治療薬開発の標的細胞が絞られてきたこと、②IgE を介する即時型反応、遅発型反応に続いて、第3相反応の約40%強の反応が STAT6 decoy の前投与によって抑制されること、さらに、③lipid raft を不活化あるいは不安定化をきたす Methyl-β-cyclodextrin や外来性コレステロールがアレルギー炎症を抑制すること、が明らかになった。特に、第3相反応は、STAT6 decoy の投与で反応の一部が抑制されることから、第3相反応の責任細胞である DX5⁺ asialoGM1⁺ FcεRI⁺好塩基球と肥満細胞との関わりがどのようになっているかの検討が必要となってきた。好塩基球が抗原刺激

を受けた後、どのような形で、また、どのような細胞の助けを得て、超遅延型（3～4日後にピークとなる）反応を発現してくるのか、また、肥満細胞がどのように関与するかについての検討が必要となる。さらに、好塩基球機能を調節する薬物の検討が必要となろう。STAT6 decoy はアレルギー炎症に対する一つの治療薬としての位置を得るところまでできているが、第3相反応の責任細胞が明らかになったことにより、さらに新しい治療薬開発の可能性ができています。

一方、Lipid raft 機能調節によってアレルギー炎症の抑制の可能性が示されたことは、今後の治療薬開発に新しい方向性を示すものと期待される。

D. 考察

平成16年度の研究によって、IgE を介する第3相反応の責任細胞を明らかにすることができた。この第3相反応に対して STAT6 decoy がその炎症反応の一部を抑制したことから、STAT6 decoy がアレルギー炎症の治療薬となりうることが明らかになった。さらに、細胞膜上の lipid raft を修飾する外来性コレステロールが皮膚炎の治療薬となる可能性が示されたことは、アトピー性皮膚炎の治療法開発にとって価値ある成果が得られたと考える。

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。

V 平成 16 年度分担研究報告書

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

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 金井康真 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 大学院生
鷺見浩史 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 大学院生

研究要旨 今までに、我々は STAT6 decoy ODN が抗原特異的 IgE 誘導性遅発型反応、急性、慢性接触過敏症の耳介腫脹反応を抑制することを明らかにした。近年、TNP 特異的な IgE 遺伝子を導入した transgenic マウスが確立された。このマウスは耳介皮下に TNP-OVA を単回投与すると即時型反応（第 1 相）ならびに遅延型反応（第 2 相）の耳介腫脹反応が現れ、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。また、この反応は抗 TNP-IgE 抗体を受動感作させることによっても誘導できる。今回、このモデルを用いて STAT6 decoy ODN の有用性を検討した。マウスの尾静脈に 300 μ g の抗 TNP-IgE 抗体を投与し受動感作させ、耳介に約 0.3nmol/ear の STAT6 decoy ODN を皮下投与した。1 日後に 10 μ g /ear の TNP-OVA を耳介に皮下注射し、第 3 相耳介腫脹反応について病理組織、および ELISA 法による組織中のサイトカイン・ケモカイン量を検討した。陰性対照群には 10 μ g /ear の OVA を皮下注射した。STAT6 decoy ODN 投与群は陽性対照群、Scrambled decoy ODN 投与群に比較して耳介腫脹反応が抑制され、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。さらに、組織中の IL-4、IL-6、IL-13、TARC、CTACK、eotaxin、MIP-1 α 、MCP-1、TCA-3 の蛋白量も減少した。STAT6 decoy ODN が IgE 誘導性の第 3 相耳介腫脹反応を抑制したことから、IgE 依存性炎症反応に対する遺伝子治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の皮膚病変形成には、IL-4・IL-13 などの Th2 サイトカインが重要であると考えられている^{1,2)}。そして IL-4・IL-13 受容体のシグナル伝達に関わる転写調節因子は Signal Transducers and Activators of the Transcription 6 (STAT6) として知られている³⁾。従って、STAT6 の制御はアトピー性皮膚炎に代表される IgE 依存性の慢性アレルギー性炎症反応治療において有効な手段になると推測される。

近年、慢性アレルギー性炎症のモデルマウスとし

て 2,4,6-trinitrophenol (TNP) 特異的な IgE を恒常的に発現しているマウス (TNP-IgE transgenic マウス) が樹立された⁴⁾。このマウスでは TNP-OVA の皮下投与により即時型皮膚反応 (第 1 相反応)、遅発型皮膚反応 (第 2 相反応) さらに、慢性アレルギー性皮膚炎症反応 (第 3 相反応) が誘導される⁵⁾。そして第 3 相反応では、好酸球などの細胞浸潤数の増加や表皮の肥厚が観察され、アトピー性皮膚炎病変部の組織反応に類似する^{1,5)}。また、これらの反応は、抗 TNP-IgE 抗体による受動感作によっても誘導できる。

今回我々は、この IgE 依存性皮膚炎反応モデルを用いて、STAT6 decoy ODN 投与による炎症抑制効果とアトピー性皮膚炎に代表される慢性アレルギー性炎症反応に対する治療薬としての可能性につき検討した。Decoy ODN とは、特定の転写調節因子が対応する部位へ結合するのを競合的に阻害し、プロモーター活性を低下させることにより遺伝子群の発現抑制を行うものである⁶⁾。今回、遺伝子の標的細胞への導入に際し、STAT6 decoy ODN を細胞膜融合能がある HVJ-envelope に封入した⁷⁾。

今回の研究で、IgE 依存性第 3 相反応に対して STAT6 decoy ODN が抑制効果を示すことが明らかとなり、さらにその作用機序についても検討を加えた。

B. 研究方法

BALB/c マウス、C57BL/6J マウス、C3H/HeN マウス、CD-1 (ICR) *-nu/nu* マウスはオリエンタル酵母社より購入した。TNP-IgE transgenic マウス⁴⁾は東京医科歯科大学免疫アレルギー分野の鳥山一教授より供与頂いた。

1) Decoy ODN の合成と投与方法

用いた decoy ODN の配列には次のものを用いた⁸⁾。STAT6 decoy ODN ; 5'-GAT CAA GAC CTT TTC CCA AGA AAT CTA T-3'、3'-CTA GTT CTG GAA AAG GGT TCT TTA GAT A-5'。Scrambled decoy ODN ; 5'-CGA AAA TTC GTT AAA TCA CTA GCT TAC C-3'、3'-GCT TTT AAG CAA TTT AGT GAT CGA ATG G-5'。二重鎖 ODN は TE buffer (Wako 社) に溶解し、95°C から 20°C に 3 時間かけアニーリングし合成した⁸⁾。

2) TNP-IgE transgenic マウスを用いた耳介腫脹反応

の誘導

TNP-IgE transgenic マウスの耳介に 10 μ g の TNP-OVA を皮下投与し、耳介腫脹反応を用いて経時的に測定した。

3) 受動転嫁による TNP 特異的 IgE 依存性耳介腫脹反応の誘導

マウスの尾静脈に 300 μ g の抗 TNP-IgE 抗体を投与。翌日 10 μ g の TNP-OVA を皮下注射し、耳介腫脹反応を経時的に測定した。また、一部の実験では耳介に 1%TNCB (in acetone : olive oil = 1 : 4) を 20 μ L 塗布することで耳介腫脹反応を惹起した。

4) 2,4-Dinitrophenol (DNP) に対する IgE 依存性耳介腫脹反応の誘導

5 μ g の抗 DNP-IgE 抗体 (ICN バイオメディカル社) を尾静脈より投与し、翌日 30 μ g の DNP₄-OVA (LSL 社) を耳介に皮下投与し耳介腫脹反応を経時的に測定した。

5) Decoy ODN 及び抗体の蛍光標識

一部の STAT6 decoy ODN には RodaminB を標識した。MAR-1 抗体 (e-Bioscience 社) と CD-4 抗体 (BioLegend 社) には FITC を標識した。

C. 研究結果

1) STAT6 decoy ODN による第 3 相耳介腫脹反応の抑制

TNP-IgE transgenic マウスにおいて IgE 依存性の第 3 相反応を誘導させ、STAT6 decoy ODN による抑制効果を検討した。Fig. 1 a に示す通り、STAT6 decoy ODN は第 3 相耳介腫脹反応を有意に抑制した。

第 3 相反応のピーク時 (惹起から 4 日後) における病理組織学的検討をしたところ、STAT6 decoy

ODN による細胞浸潤数の顕著な減少が観察された (Fig. 1 b)。

IgE 依存性の第 3 相反応は、抗 TNP-IgE 抗体静脈注射による受動感作によっても誘導することができる。そこで BALB/c マウスを用いて STAT6 decoy ODN の効果を検討したところ、TNP-IgE transgenic マウスと同様に第 3 相耳介腫脹反応の抑制がみられた (Fig. 2 a)。

第 3 相反応の耳介組織では好酸球、好中球、リンパ球、肥満細胞数の減少が確認された (Fig. 2 b, c, d)。さらに総肥満細胞に対する脱顆粒肥満細胞数の割合も陽性対照群・Scrambled decoy ODN 投与群ではそれぞれ 83%、86%であったのに対し、STAT6 decoy ODN 投与群では 37%と低下していた (Fig. 2 d)。

次に、他の strain においても同様の抑制効果が得られるかを検討した。Fig. 3 a, b のように C57BL/6J マウスや C3H/HeN マウスにおいても抑制が確認された。また、TNCB 塗布で惹起時 (Fig. 3 c)、抗 DNP-IgE 抗体で感作後、DNP-OVA で惹起時 (Fig. 3 d) においても STAT6 decoy ODN による抑制効果がみられた。

2) サイトカイン・ケモカインの定量

BALB/c マウスにおいて第 3 相反応のピーク時 (惹起から 5 日後) に採取した耳介組織を用いて STAT6 decoy ODN による局所でのサイトカイン・ケモカイン産生量の変動を ELISA 法で測定した。Fig. 4 に示す通り STAT6 decoy ODN は、IL-4、IL-6、IL-13、TARC、CTACK、eotaxin、MIP-1 α 、MCP-1、TCA-3 の産生量を抑制した。IL-5、MDC、RANTES の産生量においては差が認められなかった。また、IFN- γ 、IP-10 の産生量は、STAT6 decoy ODN 投与群、Scrambled decoy ODN 投与群ともに上

昇しており両者間に差はみられなかった。

3) STAT6 decoy ODN の導入細胞の解析

抗 TNP-IgE 抗体で受動感作した BALB/c マウスに RhodaminB 標識した STAT6 decoy ODN を皮下投与し、

翌日に TNP-OVA にて惹起。Fig. 5 に示す通り Fc ϵ RI 陽性細胞と CD4 陽性細胞への STAT6 decoy ODN の導入が確認された。

また、表皮細胞や真皮の紡錘形の線維芽細胞と思われる細胞にも STAT6 decoy ODN の陽性所見がみられた。

D. 考察

遺伝子治療における手段の一つとして、antisense oligonucleotides (antisense ODN) や decoy oligodeoxynucleotides (decoy ODN) といった核酸医薬剤が注目されている。Antisense ODN は、遺伝子の相補性を利用し、特定の遺伝子の発現を抑制する。従って、antisense ODN の作用機序は転写段階での阻害、RNA の分解促進、RNA の膜透過阻害、翻訳の阻害と考えられる。一方、decoy ODN の作用機序はプロモーター活性の低下である⁶⁾。今回、decoy ODN が antisense ODN より安定性の高いこと、作用機序が明確であることを考慮して decoy ODN による遺伝子治療の可能性を検討することとした。また、decoy ODN の標的細胞へ導入には HVJ-envelope を用いた⁷⁾。HVJ-envelope 上のノイラミニダーゼタンパク質は、細胞膜上に存在するシアル酸受容体と特異的に結合し、HVJ-envelope 上の F₁ タンパク質を活性化することにより膜融合を起こし、decoy ODN を細胞質内に導入する⁷⁾。この膜融合による導入のメリットは、

カチオン性脂質を主成分とした一連の非ウイルス性トランスフェクションツールでみられるリソソームによる導入分子の分解を受けない点である⁷⁾。さらに、*in vitro* だけでなく *in vivo* でも適用が可能であり、従来の HVJ-liposome よりも ODN の細胞導入効率が低いと報告されている⁷⁾。

さて、このようにして調整・作製した STAT6 decoy ODN 皮下投与は抗 TNP-IgE 抗体誘導性第3相耳介腫脹反応を著明に抑制した。また、組織学的検討の結果、STAT6 decoy ODN によりリンパ球浸潤のみならず好酸球、好中球、肥満細胞浸潤も減少していた。

現在、STAT6 のシグナル経路は肥満細胞⁹⁾、好塩基球、CD4 陽性 Th2 細胞、線維芽細胞、内皮細胞において知られている。これらの細胞に STAT6 decoy ODN が導入されているかを検討するために RhodaminB 標識した STAT6 decoy ODN を用いて解析した。結果、FcεRI 陽性細胞と CD4 陽性細胞への導入が確認された。しかし、今回の実験では FcεRI 陽性細胞が肥満細胞か好塩基球かは明らかではない。内皮細胞への導入ははっきりと確認できず、今後検討していく予定である。

STAT6 decoy ODN 投与は組織中の IL-4、IL-13、IL-6 といったサイトカインや TARC、TCA-3、CTACK、eotaxin などのケモカイン産生減少を引き起こした (Fig.4)。IL-4、IL-13 は血管内皮細胞における P-selectin、VCAM-1 の発現を誘導することが知られており、リンパ球や好酸球の浸潤減少にはこれらの接着分子の発現抑制が関与した可能性が考えられる。さらに、減少のみられた TARC、TCA-3、eotaxin はリンパ球、特に Th2 細胞の浸潤において重要な chemoattractant とされている。一方、eotaxin

は好酸球に特異的な chemoattractant であり皮膚における主要な産生細胞は線維芽細胞である。そして IL-4、IL-13 は eotaxin 産生を誘導するサイトカインである。よって eotaxin 産生の低下は IL-4、IL-13 の減少もしくは線維芽細胞に対する STAT6 decoy ODN の直接作用によるものと推測され、これらが好酸球浸潤の低下のさらなる要因と考えられる。また、CD4 陽性 Th2 細胞からの TCA-3 産生は STAT6 を介することがわかっており、これが TCA-3 の減少の一因と考えた。IL-6 は、ヒト胎児肝由来の肥満細胞においてアポトーシスを減衰させることが報告されている。STAT6 decoy ODN により IL-6 が減少したことが、肥満細胞のアポトーシスの減衰を抑えたため、肥満細胞の浸潤数が減少していたのではないかと考えられる。肥満細胞における IL-6 の産生は FcεRI を介した STAT6 経路により産生される⁹⁾。従って組織中の IL-6 の減少の理由の一つに、STAT6 制御による肥満細胞からの IL-6 産生の低下が考えられる。近年、CTACK は皮膚角化細胞で特異的に産生されることが報告されている。STAT6 decoy ODN は表皮細胞に導入されていたが、CTACK の減少が STAT6 抑制による直接作用によるものかどうか不明であり、今後検討を要する。今回の検討では、組織中の IFN-γ、IP-10 が STAT6 decoy ODN 投与により陽性対照群に比べて顕著に上昇していた。しかも同様の現象は Scrambled decoy ODN 投与においても認められた。この現象は、HVJ-envelope 自体による IFN-γ 誘導作用によるものと思われる。

STAT6 decoy ODN の抑制効果は、他系統のマウスを用いた場合、惹起方法を塗布に変えた場合、さらにハプテンを DNP にした場合においても認めら

れた (Fig. 3)。従って、その作用は TNP-IgE/TNP-OVA のみにみられる現象ではないことが明らかになった。

E. 結論

STAT6 decoy ODN を用いた STAT6 の制御がアトピー性皮膚炎のような IgE 依存性の慢性アレルギー性炎症反応の新たな遺伝子治療法のアプローチになることが期待されるが、今後、外用での投与方法には更なる改善が必要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 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) 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

- 4) 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*, in press
- 5) 横関博雄 : 手湿疹と異汗性湿疹、*Seminaria Dermatologie*,167:32-34,2004
- 6) 横関博雄、西岡 清 : アトピー性皮膚炎の診断のすすめ方 81(3):393-397,2004
- 7) 横関博雄 : 皮膚からみた扁桃摘出術の適応、*Johns* 20(5):725-728,2004
- 8) 横関博雄 : 花粉症にみられる皮膚症状とその治療、*臨床医* 30(2):185-187, 2004
- 9) 横関博雄 : スギ花粉皮膚炎、*総合臨床*、53(4): 1559-1560, 2004
- 10) 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),1032-1038, 2004
- 11) Yokozeki H., Nishioka K. : Autoimmune Diseases in *Dermatology*, *JMAJ*47(6): 1-5, 2004

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

G. 知的財産権の出願、登録状態

なし

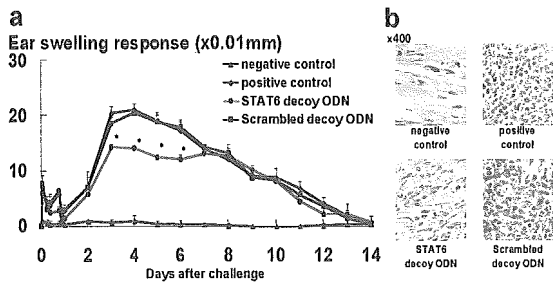


図1. TNP-IgE transgenic マウスにおける第3相反応

(a) STAT6 decoy ODN により第3相耳介腫脹反応が抑制（4日後：34%）された。

(b) 病理組織学的所見：STAT6 decoy ODN により第3相反応ピーク時の細胞浸潤数が減少している。*:P<0.05

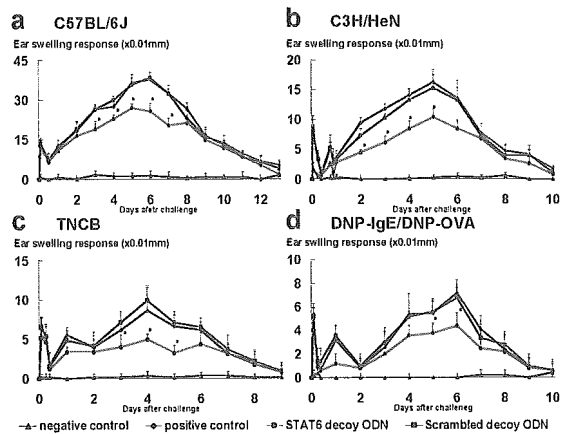


図3. さまざまな方法での第3相耳介腫脹反応の検討。

(a,b) STAT6 decoy ODN による制御はC57BL/6J マウス（6日後：34%）でもC3H/HeN マウス（5日後：32%）でも認められる。

(c,d) BALB/c マウスにおいて、惹起に際しTNCB 塗布を行った場合（4日後：54%）でも抗DNP-IgE抗体で受動感作後にDNP-OVAにて惹起した場合（6日後：35%）でもSTAT6 decoy ODNによる制御が認められた。*:P<0.05

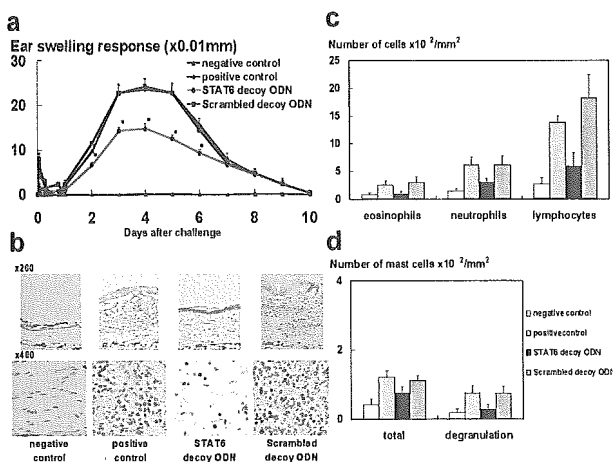


図2. BALB/c マウスにおけるIgE受動感作による第3相反応

(a) STAT6 decoy ODN により第3相耳介腫脹反応が制御（5日後：39%）された。*:P<0.05

(b) 病理組織学的所見：STAT6 decoy ODN により第3相反応ピーク時の細胞浸潤数が減少している

(c) STAT6 decoy ODN により好酸球、好中球、リンパ球が減少した。

(d) 総肥満細胞と総肥満細胞中の脱顆粒肥満細胞の割合も観察された。