

図4. 第3相反応ピーク時における耳介組織抽出液中のサイトカニン・ケモカインの定量。

*:P<0.05 n: negative control p: positive control

S6: STAT6 decoy ODN Sc: Scrambled decoy ODN

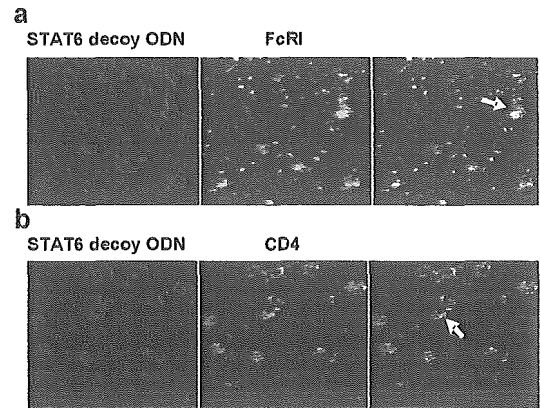


図5. STAT6 decoy ODN の導入細胞。STAT6 decoy ODN (Rhodamin B 標識) は Fc ϵ RI 陽性細胞 (a, 矢印)、CD4 陽性細胞 (b, 矢印) に導入されている。

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免疫アレルギー学分野 教授

研究要旨 抗原特異的IgE トランスジェニックマウスあるいはIgE で感作した正常マウスに多価の抗原を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（即時相と遅発相）に引き続き、強い好酸球浸潤を伴う遅延型の皮膚腫脹が誘導された。この遅延型皮膚腫脹はIgE/FcεRI を介する反応であるが、マスト細胞非依存のかつT細胞非依存の遅延型アレルギー炎症反応であることがわかり、IgE-DTH と命名した。IgE-DTH を惹起しない FcεRI 欠損マウスに正常マウス骨髄を移入すると IgE-DTH を誘発することができた。そこで骨髄細胞の各細胞分画を移入したところ、c-kit⁺DX5⁺FcεRI⁺細胞が IgE-DTH 誘発に必須であることがわかった。表面マーカー、核形態、ギムザ染色などの解析から、この細胞が好塩基球であることが判明した。これまでエフェクター細胞のひとつとしてしか考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細胞非依存の慢性アレルギー炎症反応誘発機構が存在することが明らかとなった。

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。そこで、我々は抗原特異的 IgE トランスジェニックマウスを樹立し、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。抗原を皮内投与すると、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（即時相と遅発相）に引き続き、強い好酸球浸潤を伴う遅延型の皮膚腫脹が誘導された（図 1）。これまでの研究で、この遅延型皮膚腫脹は IgE/FcεRI を介する反応であるが、マスト細胞非依存のかつT細胞

非依存の遅延型アレルギー炎症反応であることがわかり（図 2）、IgE-DTH と命名した。本年度は、このユニークな IgE-DTH を引き起こす責任細胞の同定を行った。

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。IgE-DTH を呈さない FcεRI 欠損マウス (FcRy 鎖ノックアウトマウス) に放射線照射したのちに、正常マウス骨髄細胞を移入し、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

放射線照射した FcεRI 欠損マウスに正常マウスの骨髄細胞を移入して血球細胞を再構築したところ、IgE-DTH が誘導されたが、FcεRI 欠損マウス由来の骨髄細胞の移入では IgE-DTH は誘導されなかった。骨髄細胞移入後 4 日目の抗原チャレンジでも IgE-DTH が誘発されたことから、比較的分化の進んだ骨髄由来細胞が責任細胞であると考えられた。そこで、正常マウス由来の骨髄細胞を細胞表面マーカーにより分画し、各分画を FcεRI 欠損マウスに移入したところ、NK 細胞マーカーである DX5 陽性分画が IgE-DTH を引き起こすことが明らかとなった (図 3)。さらなる解析から、c-kit⁺DX5⁺FcεRI⁺細胞が IgE-DTH 誘発に必須であり、表面マーカー、核形態、ギムザ染色などの特徴から、この細胞が好塩基球であることが判明した。

D. 考察

FcεRI 欠損マウスへの正常骨髄細胞移入実験の結果から、好塩基球が IgE-DTH を引き起こす責任細胞であることが明らかとなった。IgE-DTH 耳介腫脹の局所に浸潤している細胞の多くは、好酸球や好塩基球であり、好塩基球はわずか 1-2% を占めるに過ぎない (図 4)。したがって、IgE-DTH においては、好塩基球は単にアレルギー炎症のエフェクター細胞として機能しているのではなく、好酸球浸潤を特徴とする慢性アレルギー炎症を誘発するイニシエーターとして働いていることが強く

示唆される (図 5)。本研究成果は、好塩基球が主役となる新たな T 細胞非依存的慢性アレルギー炎症誘発機構の存在を明確に示すものであり、そのプロセスの詳細を解析することにより、新たな創薬のターゲットの同定が期待される。

E. 結論

これまでエフェクター細胞のひとつとしてしか考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することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maezawa, Y., Nakajima, H., Seto, Y., Suto, A., Kumano, K., Kubo, S., Karasuyama, H., Saito, Y., Iwamoto, I.: IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Clin Exp Immunol.* 135: 12-18, 2004.
- 2) Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. and Karasuyama, H.: Ly49Q, a member of Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 1016-1021, 2004.
- 3) Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, Nagai Y, Yasuda T, Suzuki H, Horai R, Iwakura Y, Yamamoto T, Karasuyama H, Miyake K, Yamanashi Y.: Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide -induced signaling. *J Exp Med.* 201: 333-9, 2005.
- 4) 鳥山 一; 「IgE 受容体研究の最近の進歩」

Animus.34:22-25,2004

- 5) 鳥山 一; 「遺伝子改変モデル動物で誘導される新たな慢性アレルギー炎症反応に対するシクロスポリンの作用」 医薬ジャーナル. 40: 183-187,2004
- 6) 向井香織、松岡邦枝、鳥山 一; 「IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機構」 臨床免疫. 41(2):195-199,2004

2. 学会発表

- 1) H Karasuyama, K Mukai, K Matsuoka, H Yonekawa, T Kubota, N Toyama-Sorimachi, Y Minegishi; Novel mechanism of antigen-specific, IgE/FcεRI-mediated induction of chronic allergic inflammation, American Association of Immunologists 2004 meeting 2004.4.17-21 Washington DC, USA
- 2) 久保田俊之、久保秀一、向井香織、米川博通、峯岸克行、鳥山 一; IgE 結合による FcεRI の発現亢進機構の解析, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 3) 向井香織、松岡邦枝、久保田俊之、佐藤英一郎、平原一樹、米川博通、峯岸克行、鳥山 一; 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序の解析, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 4) 小俣合歓子、大嶋勇成、安富素子、山田彰子、鳥山 一、眞弓光文; T細胞の経口免疫寛容成立に及ぼす抗原特異的 IgE の影響, 第16回日本アレルギー学会春期臨床大会 2004.5.12-14.前橋
- 5) H Karasuyama, K Mukai, K Matsuoka, H Yonekawa, T Kubota, N Toyama-Sorimachi, Y Minegishi; Chronic allergic inflammation induced by a novel mechanism in an antigen-specific, IgE/FcεRI-dependent and T cell/mast cell-independent manner., 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS 2004.7.18-23. Montreal, Canada
- 6) 鳥山 一; IgE トランスジェニックマウスを用いた新たな慢性アレルギー発症機構の解明, 第16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜
- 7) 向井香織、久保田俊之、峯岸克行、鳥山一; 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16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜、
- 8) 久保田俊之、向井香織、峯岸克行、鳥山一; IgE 結合による FcεRI 発現調節機構の解析, 第16回日本アレルギー学会総会 2004.11.4-6. 横浜
- 9) 向井香織、久保田俊之、峯岸克行、鳥山一; IgE/FcεRI を介する新たな慢性アレルギー炎症誘発機序の解析, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌
- 10) 久保田俊之、向井香織、峯岸克行、鳥山一; IgE 結合による FcεRI 発現調節機構の解析, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌
- 11) 金井康真、横関博雄、呉 明花、鷺見浩史、佐藤貴浩、片山一郎、鳥山 一、西岡 清; STAT6 decoy ODN を用いた TNP 特異的 IgE 誘導性第3相耳介腫脹反応の抑制, 第34回日本免疫学会 2004.12.1-3. 札幌

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10-32334号

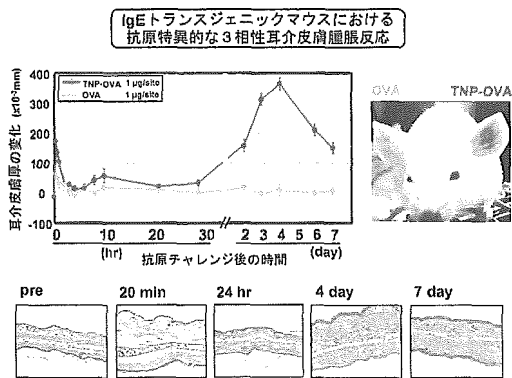


図1. IgE トランスジェニックマウスにおける3相性耳介皮膚腫脹反応

抗原の皮内投与により、典型的な即時型アレルギー性皮膚腫脹（即時相と遅発相）に引き続き、強い好酸球浸潤を伴う遅延型皮膚腫脹が誘導された。

Basophils constitute only a minor population among cells infiltrated in the skin lesion of IgE-DTH

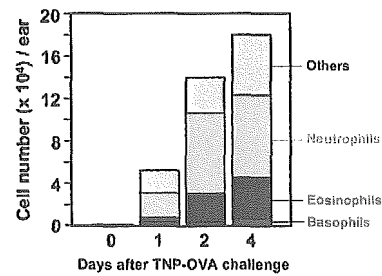


図4. 第3相性耳介皮膚腫脹反応における浸潤細胞の動態変化

抗原チャレンジ後、2日目に皮膚における好塩基球数の増加が観察されたが、皮膚浸潤細胞における割合は2%程度であり、好酸球・好中球が大部分を占めていた。

T cells and mast cells are dispensable for the development of IgE-DTH

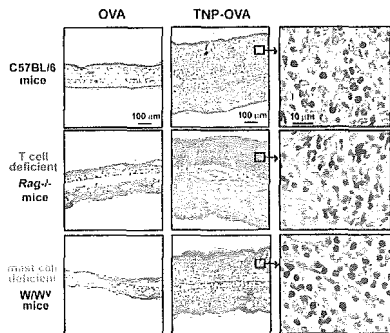


図2. 第3相耳介皮膚腫脹にはT細胞もマスト細胞も必須ではない。

T細胞欠損マウスでもマスト細胞欠損マウスでも好酸球浸潤をとまう第3相耳介皮膚腫脹が誘発された。

好塩基球が主役となる新たな慢性アレルギー炎症誘発機構

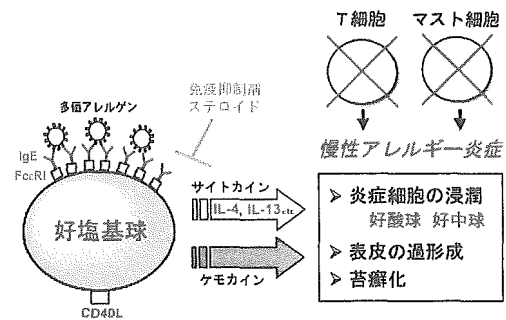


図5. 好塩基球が主役となる慢性アレルギー炎症誘発機構

DX5⁺ but not DX5⁻ bone marrow cells from normal mice reconstituted IgE-DTH in FcεRI^{-/-} mice

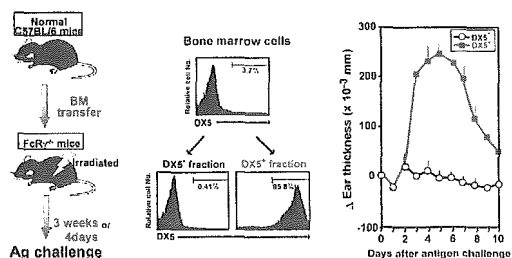


図3. 正常マウスのDX5陽性骨髄細胞をFcεRI欠損マウスに移入することにより第3相耳介皮膚腫脹が誘発された。

DX5陽性骨髄細胞の約20%がFcεRI陽性の好塩基球であった。

FcεR1 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 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

中村敏明 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ー機能の障害や 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始まらないという挙動に着目し、lipid raft を不活化あるいは FcεR1 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 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 の皮疹が改善できることがわかった。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を用いて抽出。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 fl (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、FcεR1 と lipid raft の局在をコンフォーカル顕微鏡で観察することで確認した。

C. 研究結果

健常人およびアトピー性皮膚炎患者 PBMC 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、Fig. 1 に示す通り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。IL-10 においても同様の結果を認め末梢血から樹立した樹状細胞においてもアトピー性皮膚炎特有の表現型が存在する可能性が示唆された。樹状細胞にはヒスタミン受容体も発現していることからヒスタミン $1 \times 10^{-6} M$ を IgE と共刺激したがこれらの分子の発現に相乗効果は認められなかった。Fig. 2 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。Fig. 3 に示す通り IgE 誘導性 IL-10 産生もコレステロールで抑制できた。しかしコレステロールへの反応性はアトピー性皮膚炎患者で健常人より若干低下していた。

次にコレステロール負荷に伴う FcεR1 と lipid raft の局在をみた所、Fig. 4 に示す通りコレステロール負荷をしていない樹状細胞では FcεR1 は細胞膜全体に均一に分布しており、IgE 添加によって capping するとともに lipid raft と一致する部位に lipid raft が集まってくる。しかしコレステロ

ール負荷をした樹状細胞では FcεR1 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。Cholera-toxin B で染色した lipid raft もコレステロール負荷なしと比較すると染色性が低下していた。

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。

まず、病態の理解においては 1) 樹状細胞にも AD 特有の表現型がある、2) FcεR1 の局在はコレステロール負荷に影響される、3) AD ではコレステロールに対する応答性が悪い、という点が今回判明した。1) は前回検討した FcεR1 の発現が AD 末梢血由来樹状細胞で増強していた現象の裏を見ている可能性がある。さらに今回ヒスタミン刺激を加えた所、ヒスタミンに対する応答性も AD 群では増強していた。まだヒスタミン受容体の発現量の検討は行っていないがこれら一連の変化が樹状細胞樹立に用いている IL-4, GM-CSF に対する影響で生じている可能性もあり今後検討していきたいと考えている。2) は全く予期せぬ現象であった。まずコレステロールで細胞死が引き超されているのではないかと考えたが、トリパンブルー染色や Hoechst33342 による染色で生細胞であることを確認した。この局在の異常がコレステロール負荷に伴う影響を引き出している可能性は推察できる。症例数は 3 とまだ少ないといわざるを得ず、症例の蓄積をしていきたい。3) では AD で脂質ホメオスタシスの異常、ABC カセット・LDL 受容体の発現の異常な

どが生じている可能性が伺える。今後、AD 患者における血液中脂質含有量の検討を行っていきたいと思う。

治療的側面においても現時点では2)によると思われるコレステロールの AD 皮疹の治療効果の裏が確認できた。今後、モデル動物などに対してコレステロール負荷を行い、改善できるかを確認したいと考えている。

E. 結論

樹状細胞における lipid raft を標的とした治療戦略は AD 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。中でもコレステロールは AD の病態的側面の理解深めるとともに新規治療戦略としての潜在能力を持つものと考えられた。

G. 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

H. 知的所有権の所得状況
なし

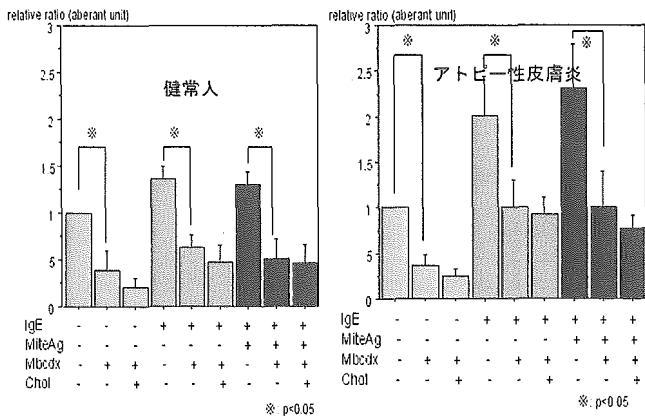


図1. 末梢血単核球由来樹状細胞(MoDC)のmethyl-b-cyclodextrin(Mbcdx)処理によるlipid raftの失活でTARCの産生は有意に抑制される。またアトピー性皮膚炎患者由来のMoDCではIgE処理によって健康人よりも強いTARCの産生を認めた。

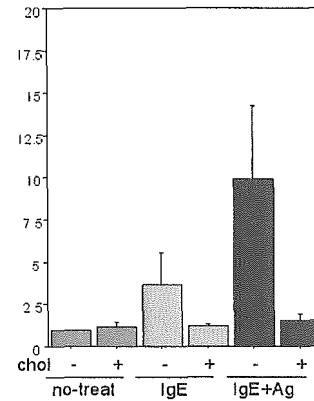


図3. MoDCからのIL-10の産生もコレステロール処理によって抑制される。

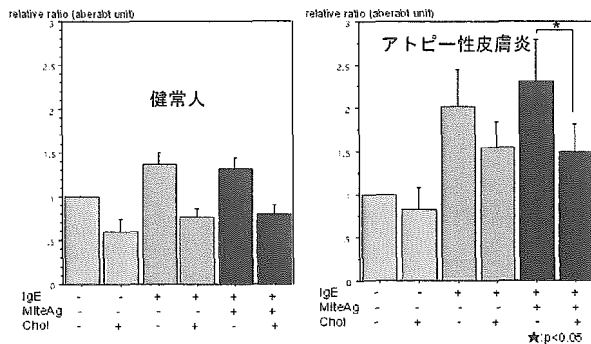


図2. MoDCのコレステロール処理によってTARCの産生は抑制される。この抑制効果はアトピー性皮膚炎患者由来MoDCでは健康人に比し幾分か弱い傾向が認められた。

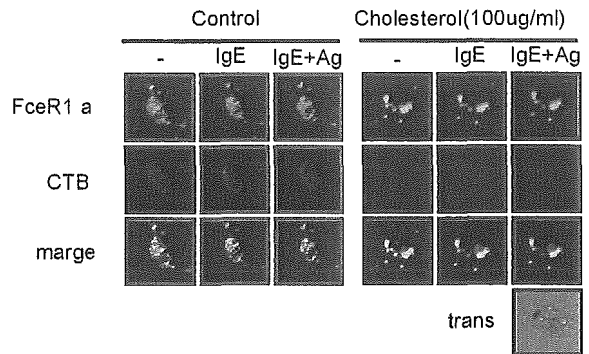


図4. コレステロール負荷時のFcεR1の局在。緑がFcεR1,赤がラフト、青がヘキストを示す。コレステロール処理をしていない方はIgE処理によってラフト上に移動する傾向が認められたが、コレステロール負荷するとFcεR1の局在に異常が生じ、IgE刺激でも反応しない。

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 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

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

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 $DX5^+ \text{asialoGM1}^+ \text{Fc}\epsilon\text{RI}^+$ 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、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。

B. 研究方法

1. IgE/FcεRI を介する第 3 相反応の責任細胞の解析 (鳥山)

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、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。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ギー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、FcεRI 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、FcεRI 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/FcεRI を介する第 3 相反応の責任細胞の解析 (鳥山)

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て明らかにし、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

VII 平成 17 年度分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（免疫アレルギー疾病予防・治療研究事業）

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う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 週間を継続できた症例は、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