

分担研究報告書

アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質の同定 及び日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践

研究分担者 菅谷 誠 東京大学大学院医学系研究科 皮膚科学 講師

研究要旨

アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質を同定するため、8 週の間隔をあけて血清を採取し、同時にかゆみに対するアンケート調査を行った。アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する血清中生理活性物質として TARC が、逆相関する物質として I-TAC が候補になりうると考えられた。また、LGHT, HVEM はアトピー性皮膚炎におけるリンパ球の活性化に寄与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究の最初の目的は、アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質を同定し、治療に役立てることである。かゆみは自覚的な症状であり、異なる患者のかゆみを客観的に評価、比較することは難しい。そこで同一患者において複数回血清を採取し、同時にかゆみの自己評価を行うことにした。またアトピー性皮膚炎の病勢が極端に変化した 2 点で比較した場合、ほぼ全ての生理活性物質濃度が変化することが予想され、かゆみに特異的な物質を同定することが困難となる。従ってある程度病勢が落ち着いている外来患者を対象に、血清採取、かゆみの評価を行った。

また、本研究と並行し、アトピー性皮膚炎の病勢マーカーとなる血清中生理活性物質の探索も行った。こちらでは様々な重症度のアトピー性皮膚炎患者の血清及び健康人血清中の生理活性物質濃度を測定

し、検討した。

B. 研究方法

当科アトピー外来に通院中の患者のうち、同意を得られた 10 人に対し、8 週の間隔をあけて血清を採取し、同時に日中、夜間のかゆみに対するアンケート調査を行った。かゆみの自己評価に変化のあった 6 名の血清を用い、QIAGEN 社の Human Common Chemokines Multi-Analyte ELISArray Kit を使用して IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin, TARC, MDC, GRO α を測定した。ケモカイン同士の相関の有無はスピアマンの順位相関を用いて検定した。

また R & D Systems 社の human LIGHT/TNFSF14 ELISA kit 及び HVEM/TNFRSF14 Duo set を使用して、アトピー患者 39 名と健康人 17 人の血清中の LIGHT, HVEM 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得ている。人権擁護には十分配慮し、採血時には患者より書面にてインフォームド・コンセントを得ている。

C. 研究結果

6名の患者で1人あたり2検体、計12検体のケモカイン濃度を解析した。IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , の3者間, IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin の4者間に強い相関を認めた。また TARC と MDC の間にも強い相関があり, GRO α は MIP-1 α , IP-10, I-TAC, MIG, Eotaxin と相関を認めた。TARC と I-TAC には弱い負の相関があった。かゆみの自己評価に関しては、日中のかゆみの軽快が1例、不変が4例、悪化が1例、夜間のかゆみに関しては軽快が3例、不変が1例、悪化が2例であった。かゆみの変化と TARC 濃度の変化には正の相関があり、I-TAC 濃度は負の相関があった。

また、アトピー性皮膚炎患者血清中 LIGHT 濃度は 132.2 ± 138.7 pg/ml と、健康人の 70.6 ± 26.4 pg/ml と比べて有意に高かった。重症のアトピー性皮膚炎患者では、中等症及び軽症の患者よりも有意に高かった。一方アトピー性皮膚炎患者の血清中 HVEM 濃度は 2786.6 ± 361.9 pg/ml で、健康人の 3097.5 ± 294.3 pg/ml と比べて有意に低かった。さらにアトピー性皮膚炎患者の血清中 LIGHT 濃度は TARC 濃度及び末梢血中の好酸球数と正の相関を示した。

D. 考察

アトピー性皮膚炎患者の血清中では様々

な生理活性物質の濃度が上昇していることが既に報告されているが、今回は1つの検体に対して複数のケモカインを同時に測定することにより、ケモカイン同士の相関をみることができた。MIP-1 α と MIP-1 β や IP-10, I-TAC, MIG 間の相関は予想通りであったが、好酸球遊走因子である Eotaxin が Th1 ケモカインと強い相関を示すことが分かったのは興味深かった。また好中球遊走因子である IL-8, GRO α は単球を遊走、活性化させる MIP と相関していた。かゆみに関しては、アトピー性皮膚炎の病勢を最も鋭敏に反映する TARC が関与している可能性が考えられた。

また、アトピー性皮膚炎患者の血清中で LIGHTが上昇していることは、アトピー性皮膚炎におけるリンパ球の活性化に寄与している可能性が考えられた。血清中 HVEM は LIGHTが細胞表面の HVEM に結合してシグナルを送るのを競合的に防ぐ可能性があり、アトピー性皮膚炎患者血清中で HVEMが低下していることは、炎症が抑制できないことと関係があると思われた。

E. 結論

アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する血清中生理活性物質として TARC が、逆相関する物質として I-TAC が候補になりうると考えられた。また、LIGHT, HVEM はアトピー性皮膚炎におけるリンパ球の活性化に寄与している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Morimura S, Sugaya M, Kai H, Kato T, Miyagaki T, Ohmatsu H, Kagami S, Asano Y, Mitsui H, Tada Y, Kadono T, Sato S: High levels of LIGHT and low levels of soluble HVEM in sera of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2011 May 30. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04079.x. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

分担研究報告書

マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築

研究分担者 稲垣 直樹 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 教授

研究協力者 田中 宏幸 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授

研究協力者 山下 弘高 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 助教

研究要旨

2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を反復塗布して誘発する BALB/c マウス耳殻の皮膚炎では、顕著な炎症が誘発されるとともに、高頻度の搔破行動が認められる。tacrolimus 溶液の DNFB 塗布部位への外用は、炎症を抑制するとともに搔破行動を明らかに抑制する。tacrolimus 塗布部位では神経線維の表皮内への伸長が明らかに抑制され、表皮ケラチノサイトの神経成長因子 (NGF) 発現が低下する。したがって、tacrolimus の搔破行動抑制には NGF 発現の低下に伴う神経線維伸長の抑制が関わる可能性が示唆される。一方、種々の遺伝子のノックダウンに用いられている siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対の二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊する。そこで、NGF 特異的な siRNA を用い、NGF の遺伝子発現を制御することによる掻痒の制御戦略、さらにはアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試みた。

(1) 予備検討として、マウス 3T3 線維芽細胞を用い、市販の 3 種の NGF 特異的 siRNA の効果を検討した。2 種 (#1 および #3) の siRNA は TNF- α 刺激によって誘発した 3T3 線維芽細胞の NGF mRNA 発現を強く抑制した。(2) 培養マウス皮膚ケラチノサイトを用い、2 種 (#1 および #3) の siRNA の効果を検討した。いずれの siRNA も TNF- α 刺激による培養ケラチノサイトの NGF mRNA 発現を強く抑制することを確認した。(3) 培養ケラチノサイトで有効性を確認した siRNA (#1) を用い、in vivo での効果を検討した。ICR マウス耳殻への substance P 注射による NGF mRNA 発現の上昇は、substance P 注射部位への siRNA の注射によって有意に抑制された。(4) テープストリッピングによる NC/Nga マウス NGF mRNA 発現の増強はクリームに混和して塗布した siRNA (#1) によって有意に抑制された。

以上、得られた成績から、NGF 特異的 siRNA がケラチノサイトの NGF mRNA 発現を抑制すること、マウスにおいて皮膚バリアを破壊することによって外用した siRNA が NGF mRNA 発現を抑制することが確認できた。したがって、皮膚バリアが障害されているアトピー性皮膚炎患者において、siRNA は外用によって効果を発揮することが期待できると考えられる。

A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎患者の重要な訴えであり、誘発される搔破行動は皮膚症状を増悪する重要な因子である。これまでに、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を反復暴露することにより、高頻度の搔破行動を伴うマウス皮膚炎モデルを確立し、tacrolimus が表皮ケラチノサイトの神経成長因子 (NGF) 産生抑制を介して搔破行動を抑制する可能性を示した。ケラチノサイトは種々の刺激に対して様々な因子を産生し、皮膚炎および掻痒の誘発に関与すると推定される。したがって、ケラチノサイトを標的とし、搔破行動誘発あるいは皮膚炎増強に関与する因子の産生抑制法を確立することは掻痒抑制ならびに皮膚炎の軽減に有用である

と考えられる。本年度は、表皮ケラチノサイトを標的とし、siRNA を用いて NGF 産生を制御する手法を確立するための基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

マウス培養ケラチノサイトは BALB/c マウス新生仔から皮膚を採取し、表皮を分離した後、細胞浮遊液を調製し、培養して得た。また、予備検討ではマウス 3T3 線維芽細胞も使用した。NGF 特異的な siRNA は市販品 3 種を入手して使用した。siRNA はトランスフェクション試薬 lipofectamine を用いて細胞に導入し、腫瘍壊死因子 (TNF- α) あるいは substance P 刺激による NGF mRNA 発現を real time RT-PCR 法で評価した。また、ICR マウ

ス皮膚における substance P 刺激による NGF mRNA 発現に及ぼす siRNA 注射の影響、および NC/Nga マウスにおけるテープストリッピングによる NGF mRNA 発現に及ぼす siRNA 外用の影響を検討した。トランスフェクション試薬として in vivo 用 lipofectamine を用い、mRNA 発現は real time RT-PCR 法を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

動物を使用する実験はすべて岐阜薬科大学における動物実験の実施に関する規程にしたがい、実験計画を委員会に提出して審査、承認を受けて実施した。

C. 研究結果

(1) マウス 3T3 線維芽細胞を用いた検討

マウス 3T3 線維芽細胞を用い、TNF- α による NGF 産生の確認、トランスフェクション試薬 lipofectamine の濃度検討を行い、TNF- α 30 ng/ml、lipofectamine 5 μ l を用いることとした。lipofectamine 5 μ l はほとんど細胞毒性を示すことなく、最大のトランスフェクション効果を示した。3 種の NGF 特異的 siRNA (#1~#3) 30 pmol および lipofectamine で処置した線維芽細胞を TNF- α で刺激し、24 時間後のノックアウト効果を比較した。2 種 (#1 および #3) の siRNA は TNF- α 刺激によって誘発した 3T3 線維芽細胞の NGF mRNA 発現を強く抑制した。

(2) マウス培養ケラチノサイトを用いた検討

BALB/c マウス新生仔皮膚からのケラチノサイトの培養法を確立し、培養したケラチノサイトを用いて siRNA の効果を検討した。

培養ケラチノサイトは 30 ng/ml の TNF- α 刺激によって NGF mRNA 発現が亢進し、NGF 分泌量は 48 時間まで増加したが、48 時間では生細胞数が減少したため、刺激時間は 24 時間とした。siRNA (#1 および #3) 30 pmol および lipofectamine 5 μ l の処置により、TNF- α 刺激による培養ケラチノサイトの NGF mRNA 発現は強く抑制された。

つぎに、in vivo の検討の予備実験として、substance P 刺激による培養ケラチノサイトの NGF mRNA 発現について検討した。10⁻⁷ M substance P は 6 時間の処置によって NGF mRNA 発現を顕著に増大させることを確認した。

(3) ICR マウスの NGF mRNA 発現に及ぼす影響

ICR マウスの耳殻へ substance P を注射し、NGF mRNA 発現を検討した。100 nmol/20 μ l の substance P の注射により、3 時間後から NGF mRNA 発現の増大が認められ、6 時間後、12 時間後においても有意な増大が確認された。substance P による発現増強は 6 時間後が最も顕著であると考えられた。

ICR マウスの耳殻へ substance P を注射して誘発される NGF mRNA 発現の増強に対する siRNA の影響

を検討した。substance P 注射の 1 時間前に siRNA (#1) 10 μ g を耳殻へ注射し、刺激 6 時間後の mRNA 発現を検討した。siRNA 注射は NGF mRNA 発現に対して抑制の傾向を示すに過ぎなかった。

そこで、siRNA (#1) 10 μ g にトランスフェクション試薬 in vivo 用 lipofectamine 10 μ l を加え、substance P 注射の 1 時間前に 2 箇所に分けて注射した。siRNA 注射は substance P 注射による NGF mRNA 発現の増大を有意に抑制した。

(4) NC/Nga マウスの NGF mRNA 発現に及ぼす影響

NC/Nga マウス耳殻を 20 回テープストリッピングすることによって NGF mRNA 発現の増大を誘導できることが報告されている。これを参考に、テープストリッピングによる NC/Nga マウスの NGF mRNA 発現を検討した。テープストリッピング後 6 時間、12 時間および 24 時間に顕著な mRNA 発現の増大が認められたが、6 時間後が最も顕著であった。そこで、6 および 24 時間後の mRNA 発現に対する siRNA の影響を検討した。テープストリッピングによって皮膚表層のバリアが障害され、siRNA の透過性が高まることが期待されるため、siRNA はクリームに混和し、テープストリッピング後にマウス耳殻に塗布した。siRNA クリームの外用は、6 時間後の増大した NGF mRNA 発現には明らかな抑制効果を示さなかったが、24 時間後の mRNA 発現を有意に抑制した。

D. 考察

siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対から成る低分子二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊して遺伝子発現を制御する。ウイルス感染に対して生体が発達させた防御の仕組みと考えられる。近年、種々の遺伝子のノックダウンに汎用されるようになり、臨床への応用も期待されているが、生体内では不安定であり、ノックダウン効果も持続しないことが知られている。さらに、特定の標的細胞へ到達させる手法が確立されていないため、臨床応用には解決すべき問題が残されている。

一方、局所適用により、局所で特定の遺伝子発現を制御する場合には実用性は高いと考えられる。例えば、アトピー性皮膚炎の患部皮膚では表皮のバリア機構が破綻をきたしており、比較的大きな siRNA も透過することが期待できる。皮膚表層に分布する表皮ケラチノサイトを標的細胞とする場合には、外用した siRNA は有効性を発揮する可能性が高いと考えられる。siRNA による遺伝子のノックダウン効果は生体内では持続しないとされるが、外用の回数、間隔で対応できる可能性がある。さらに、標的細胞以外の細胞で不要な作用を発現した場合でも、その効果が持続しないと推定され、安全性が高いと考えられる。

本年度の検討では、アトピー性皮膚炎患者皮膚のケラチノサイトを標的とし、siRNA を用いて遺伝子発現を

制御することによる搔痒の軽減、さらには皮膚炎の抑制を可能にする治療戦略を構築するための基礎的検討を行った。

これまでのマウス皮膚炎モデルを用いた検討の結果から、表皮ケラチノサイトが産生する NGF が知覚神経線維の伸長に関わり、痒み感覚が強められる可能性を示唆してきた。そこで、NGF をモデル標的とし、はじめに *in vitro* において NGF 特異的 siRNA のノックダウン効果を確認した。前年度から検討してきたマウス皮膚ケラチノサイトの培養系の確立まではマウス 3T3 線維芽細胞を用いて予備的検討を実施した。マウス 3T3 線維芽細胞、マウス培養ケラチノサイトのいずれにおいても TNF- α 刺激によって誘発した NGF mRNA 発現の増大は siRNA によってノックダウンされることを確認した。

ついで、*in vitro* において効果を確認した siRNA を用い、*in vivo* における効果を検討した。ICR マウスの耳殻に substance P を注射すると NGF mRNA 発現が増大する。siRNA の注射は substance P による NGF mRNA 発現の増大を抑制することを確認した。さらに、テープstriッピングは皮膚表層のバリアを傷害し、アトピー性皮膚炎患者の病変部皮膚の状況に類似した状態を作り出すが、同時に NGF mRNA 発現の増大も誘発する。siRNA を混和したクリームの外用はテープstriッピングによる NGF mRNA 発現の増大を抑制した。

したがって、siRNA を含有する外用剤の適用によって皮膚ケラチノサイトの遺伝子発現を制御する可能性が確認できたものと考ええる。次年度は、DNFB あるいはダニ抗原を反復塗布して誘発するマウスアトピー性皮膚炎の病態モデルにおいて siRNA の効果を確認する。

表皮ケラチノサイトは NGF のみならず、種々の遺伝子産物を放出してアトピー性皮膚炎の病態形成に関わると推定される。したがって、それらの因子はいずれも siRNA の標的となると考えられる。siRNA のカクテルを用い、複数の遺伝子の発現を制御することは、より有効な治療戦略となることが期待される。将来は、アトピー性皮膚炎の病態モデルを用いた siRNA カクテルの評価につなげていきたい。

E. 結論

本年度の成績から、NGF 特異的 siRNA がケラチノサイトの NGF mRNA 発現を抑制すること、マウスにおいて皮膚バリアを破壊することによって外用した siRNA が NGF mRNA 発現を抑制することが確認できた。したがって、皮膚バリアが障害されているアトピー性皮膚炎

患者において、siRNA は外用によって効果を発揮することが期待できると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shah MM et al., *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 Induces CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells and Suppresses Allergic Contact Dermatitis. *Biol Pharm Bull* (in press).

Yamada Y et al., Inhibition of mouse allergic dermatitis by an extract from a mushroom, *Ganoderma lucidum*. (submitted).

2. 学会発表

山内文史, 他: ICR マウスの特徴を有するヘアレスマウスに関する基礎的検討. 第 57 回 日本薬学会東海支部大会, 名古屋, 2011.7.9. (要旨集 p.47)

山内文史, 他: ICR マウスの特徴を有するヘアレスマウスに関する基礎的研究. 東海実験動物研究会 2011 年 7 月 例会, 名古屋, 2011.7.23.

久芳亮輔, 他: siRNA によるアレルギー性皮膚炎に伴う搔痒に対する治療戦略の構築. 第 21 回 国際痒みシンポジウム, 千里, 2011.10.29

佐田 建, 他: ダニ抗原反復塗布により誘発されるマウス皮膚炎における opioid receptor の関与に関する検討. 第 61 回 日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2011.11.10-12. (アレルギー 60, 1434, 2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

小児アトピー性皮膚炎に対する proactive 治療に関する研究

研究分担者 大矢幸弘（独）国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科医長
研究協力者 樺島重憲 同上 臨床研究員 立川相互病院小児科
中里純子 同上 臨床研究員
津村由紀 同上 臨床フェロー
二村昌樹 同上 医員
成田雅美 同上 医員

研究要旨

平成20～22年度に実施した厚生労働省研究班（古江班）で実施した文献研究により、ステロイド外用薬の長期間欠塗布（proactive療法）の有効性と安全性が示唆された。一方、国立成育医療研究センターにおいて行ったコホート研究によれば、湿疹のある乳児では、ない乳児と比較して、1歳までに食物アレルギーを発症するリスクが著しく高かった。これには、食物抗原による経皮感作のメカニズムが関わっていることが推測された。加えて、近年、抗原蛋白の早期摂取により、食物アレルギーの発症が抑制されるとの報告が散見されるようになってきている。以上の検討から、①アトピー性皮膚炎のある乳児にproactive療法を施すことにより、食物アレルギーの発症が抑制されるか ②アトピー性皮膚炎のある児に、乳児期早期より抗原蛋白を摂取させることで食物アレルギーの発症が抑制されるか、の2点について前方視介入研究を行うこととした。具体的には、アトピー性皮膚炎と診断された生後4-5ヶ月の乳児200名をリクルートし、1歳までの卵除去食を指示した上で、生後6ヶ月から加熱卵粉末を経口摂取する群と、プラセボを摂取する群に無作為割り付けを行う。1歳時に食物負荷試験を行って、卵アレルギーの発症の有無を調べる。また、アトピー性皮膚炎の治療法として、proactive療法と従来のreactive療法のいずれかを行い、サブクラス解析によってその影響を調べる。

現在までに、臨床研究を立案・計画し、実施に向けた準備作業として、食品メーカーに依頼し、加熱卵粉末及びプラセボの開発と供給体制の構築を行うとともに、食品衛生法に準拠した安全性の確認を行った。また、対象者のリクルートに関しては当センターにて出生した児を中心に関連施設における広報を行い実施する体制を整えた。ランダム化比較試験の事前登録をUMINに申請し、当センター倫理委員会の審査も併せて申請中である。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎治療におけるステロイド外用薬の有効性と安全性につき、2009年までの範囲で文献研究を行った前回の検討（平成20～22年度厚生労働省研究班：古江班）において、ステロイド外用薬の長期間欠塗布（proactive療法）の有効性と安全性が示唆された。一方、乳児のアトピー性皮膚炎に注目すると、乳児期に湿疹を有する児では即時型食物アレルギー（以下、食物アレルギー）の発症が高率であると報告されている。この背景

には、dual-allergen-exposure hypothesisとして知られる、食物抗原による経皮感作があると考えられる。この仮説は、食物抗原による感作経路には、経腸感作と経皮感作があり、前者は食物抗原に対する免疫寛容を誘導し、後者は即時型アレルギーを誘導するとするものである。この観点から、湿疹のある児では皮膚のバリア機能が破綻しているために、経皮感作が強まって食物アレルギーを発症しやすいものと考えられる。当センターにおいて実施したコホート研究においても、生後6ヶ月で湿疹がある児では、湿疹がない児と比較して、1

歳までの食物アレルギー発症のオッズ比は25.2（未調整）、3歳までのオッズ比は12.7（未調整）と著しく高値であった。このことより、アトピー性皮膚炎のある乳児においては、発症早期から proactive 療法を行って皮膚の状態を正常化することで、食物アレルギーの発症が予防できる可能性があると考えた。さらに、アトピー性皮膚炎のある児では、卵や牛乳などの食品の除去を医師よりしばしば指示される現状があるばかりでなく、アトピー性皮膚炎のない児であっても、離乳食開始時にこれらの食品の初回摂取を遅らせる一般的傾向がある。しかしながら、先の dual-allergen-exposure hypothesisによれば、むしろ早期に食物蛋白を摂取した方が、免疫寛容の誘導が進むとの考えも成り立つ。事実、抗原蛋白の早期摂取により、食物アレルギーの発症が抑制されるとの報告が散見されるようになってきている。Koplinらの横断研究によれば、生後6ヶ月までに卵の摂取を開始した児では、10ヵ月以降に開始した児と比較して、1歳での卵アレルギーの有病率が有意に低く、データ上は半数以下となっている。

以上をふまえて本研究では、①アトピー性皮膚炎のある乳児に proactive 療法を施すことにより、食物アレルギーの発症が抑制されるか ②アトピー性皮膚炎のある児において、乳児期早期より抗原蛋白を摂取することで食物アレルギーの発症が抑制されるか、の2点について前方視介入研究を行うこととした。

B. 研究方法

特に基礎疾患のない、アトピー性皮膚炎のある生後4-5ヶ月の乳児をリクルートし、二重盲検ランダム割り付け研究を行う。介入群（卵蛋白群）には、生後6ヶ月から1歳まで鶏卵蛋白の連日摂取を指示する。対照群には、同様にしてプラセボの連日摂取を指示する。その一方で、両群とも卵

そのものおよび卵を含有する食品の摂取を1歳まで制限する。この間の湿疹の治療については、保護者の希望も勘案して、proactive 治療とするか、従来から行われている reactive 治療（保湿によるスキンケアを基本とし、湿疹の悪化時のみスポット的にステロイド外用薬を使用する）とするかの2群に分ける。以上の介入の後、1歳で食物負荷試験を実施し、卵アレルギーの有無を調べる。なお湿疹の治療法の選択については、ランダム割り付けが困難であるため、サブグループ解析を行って、その影響を調べることとする。

C. 研究結果

1. 必要症例数

アトピー性皮膚炎乳児患者における食物アレルギー発症率に関する文献データを基に、必要となる症例数を検討した。伊藤らは、食物負荷試験または即時型誘発症状の病歴による診断に基づき、アトピー性皮膚炎のある4.9±5.1歳の小児における即時型食物アレルギーの合併率が48.9%であり、そのうち卵アレルギーが42.7%であったと報告している。さらに、食物アレルギーの合併は、低年齢ほど高率であったとも述べている。池松らも同様の検討で、これに近い値を報告している。これらを勘案すると、乳児期よりアトピー性皮膚炎のある1歳児では、卵アレルギーの合併が少なくとも20%程度あるものと推定される。これが、介入により半数程度に減少するものと仮定すると、両側検定で、検出力80%を確保するのに必要な標本の大きさは介入群、プラセボ群各々100例となる。

2. 試験試料

介入群に摂取させる鶏卵蛋白として、品質の安定性、摂取量のコントロールの容易さ等を考慮して、加熱卵粉末を使用することとした。これは、全卵をスチーム加熱した後、スプレードライ法に

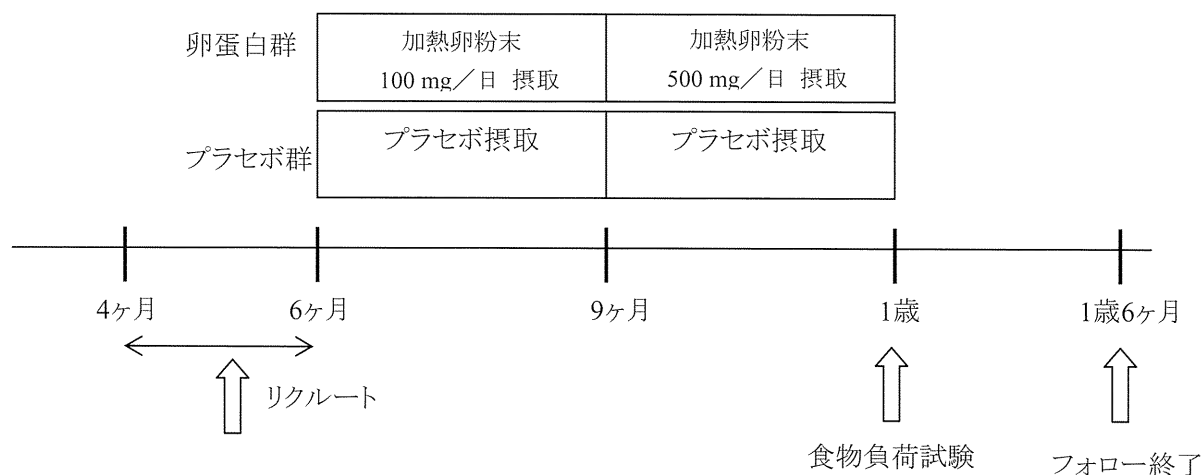


図1. 研究のプロトコル

より粉末化したもので、粉末重量の約 50%の卵蛋白を含有する。

プラセボには、乳児であっても抵抗無く摂取しやすいこと、食物アレルギーの原因食物となりにくいこと等を考慮し、カボチャを用いることとした。スチーム殺菌したカボチャを、ジェット気流粉碎により粉末化したものである。介入群においても、盲検化および嵩を増して取扱いを容易にする目的で、カボチャ粉末と加熱卵粉末とを混合したものを試験試料として使用することとした。

これらの試験試料については、食品メーカーに開発を依頼して、大豆、乳、小麦といった鶏卵以外の食品蛋白や細菌の混入がないことを確認し、食品衛生法に準拠した安全性の確認を行った。

3. 湿疹の治療

湿疹の治療に関しては、proactive 療法と reactive 療法とで、治療の手順が全くことなるため、盲検化が困難である。また、リクルートを容易にするためにも、治療の方針について、ある程度保護者の意向をくまざるを得ない。このため、湿疹の治療法の違いが食物アレルギーの発症に及ぼす影響については、サブクラス解析を行って調べることとした。

(倫理的配慮)

本研究が対象としている児は、もともと食物アレルギー発症の高リスク群である。本研究の介入により、食物アレルギーの発症が抑制される可能性がある一方で、試験試料の加熱卵粉末を摂取することにより、即時型アレルギー反応が誘発される可能性がある。本研究においては安全性に配慮して、6ヶ月の介入期間のうち最初の3ヶ月間は、摂取させる加熱卵粉末を 100 mg/日（卵蛋白の量としては 50 mg/日）と少量に留め、初回摂取時には、外来で摂取させて安全を確認することとしている。また、ある程度免疫寛容が誘導されてきたことが期待できる介入期間の後半（生後 9ヶ月以降）は、加熱卵粉末の摂取量を 500 mg/日に増量するが、この際も、初回摂取時は外来で摂取させ、安全を確認することとしている。

D. 考察

現状では、多くのアトピー性皮膚炎の乳児において、保湿剤を中心としてスキンケアを行い、湿疹の増悪時に短期間ステロイド外用薬を用いる reactive 型の治療が行われており、無治療の児は決して多くない。しかし、このような介入が行われていながら、アトピー性皮膚炎のある乳児において、高率に食物アレルギーが発症するのはすでに述べたとおりで、reactive 療法では、皮膚のバ

リア機能を十分に回復させて、経皮感作を防ぐことは困難であると考えられる。これに対し、proactive 療法は短期間のうちに皮膚の炎症を沈静化させ、ステロイド外用薬の予防的投与により、湿疹を再発させないようにしながら治療を進める方法であり、早期に皮膚のバリア機能が回復するため、経皮感作を予防する効果が期待できる。これまで、アトピー性皮膚炎を食物アレルギーの原因として捉える考え方はあったものの、皮膚炎の治療を行うことで食物アレルギーの発症予防を図る試みは例がなかった。これは、アトピー性皮膚炎を継続的にコントロールすることが困難であったのが、一つの要因である。Proactive 療法によって皮膚炎のコントロールが可能となったことで、本研究のアプローチが可能となった。

原因食物の摂取開始時期と食物アレルギーの発症率の関係については、出生コホートの水準の観察研究、前方視介入研究の報告はまだない。これは、早期摂取が有利であるとの知見が、比較的新しいものであることに加え、介入研究を行おうとする場合、大きな標本数が必要で、研究の実施が困難であることが要因となっている。本研究では、食物アレルギーの発症が高率である、アトピー性皮膚炎の乳児を対象とすることで、比較的少ない標本数で有効な検討ができるよう計画している。

E. 結論

乳児アトピー性皮膚炎の患者に対し、proactive 治療を実施して皮膚バリア機能を修復することと、早期からの食物蛋白摂取をすすめることで、食物アレルギーの発症を予防できる可能性があることを指摘した。この仮説を検証するため、乳児アトピー性皮膚炎患者を対象とする前方視介入研究を計画した。二重盲検ランダム割り付け研究とし、検討に必要な症例数の検討を行った。また、摂取させる鶏卵粉末、プラセボ粉末の内容や量について検討し、食品メーカーに依頼して供給体制を整え、食品衛生法に準拠した安全性の確認を行った。関連施設において広報を行い、リクルートを行う体制を整えた。ランダム化比較試験の事前登録を UMIN に申請し、当センター倫理委員会の審査も併せて申請中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(学会発表)

Ohya Y. EAACI meeting June, 2011, Istanbul.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

「かゆみ」のある小児患者の保護者における治療行動の調査

研究分担者 浜崎 雄平 佐賀大学医学部小児科学教授
 研究協力者 山本 修一 佐賀大学医学部小児科学講師
 研究協力者 稲田 由紀子 佐賀大学医学部小児科医員

研究要旨

「かゆみ」を持つ小児アトピー性皮膚炎 (AD) 患者の保護者の受診・治療行動を明らかにするために、乳児健診受診者を対象としたアンケート調査を行い2485件の回答を得た。AD患者の90%以上が「かゆみ」に困り医療機関を受診しており、「かゆみ」が患児及びその保護者のQOLを低下させている実態がうかがえた。60%の者が「かゆみ」に対する治療の情報を医師から得たのに対し、インターネットから得た者は6.5%であった。当研究班がインターネット上に開設しているホームページ「アトピー性皮膚炎、かゆみをやっつけよう！」を知っている者は全体の3%、AD患者の7%であり、患者においてある程度の利用があるものと考えられる。しかしながら、調査期間を3期に分けた検討では、HPの認知は進んでいなかった。

A. 研究目的

「かゆみ」で困っている小児アトピー性皮膚炎患者に対し疾患の正しい知識、治療法を啓蒙するためには、患児の保護者がそれに対しどのように対応、行動するかを明らかにする必要がある。さらに、現在当研究班がインターネット上に開設しているホームページ「アトピー性皮膚炎、かゆみをやっつけよう！」が実際にどの程度活用されているのか、その活用を促進するためにはどのような方法があるのか、についても検討する。

B. 研究方法

佐賀市で実施している1歳児 (1歳半) および3歳児 (3歳半) 健診を受診した小児の保護者に対し、匿名のアンケート調査を行った。アンケートには14個の設問があり、「かゆみ」に対する受診行動、情報の取得源、HPを知っているかどうかの質問を含む。アンケートは佐賀大学倫理委員会で倫理上の問題について審査され実施を承認された。アンケートの実施に関しては、佐賀市健康づくり課に協力を要請した。

今回は調査期を以下の3期に分けた検討も行った。第1期:2009年10月～2010年6月、第2期:2010年7月～2011年3月、第3期:2011年4月～2011年12月。

C. 研究結果

2009年10月より2011年12月の期間、佐賀市1歳児および3歳児健診に随伴しアンケート調査を行った。この期間に1歳児健診を受診した1281人、3歳児健診の1204人、計2485人に対するアンケートが回収されたので、それについて検討した。

これまでに医師からADの診断を受けた者は、1歳児が1.4%、3歳児は2.4%と差を認め

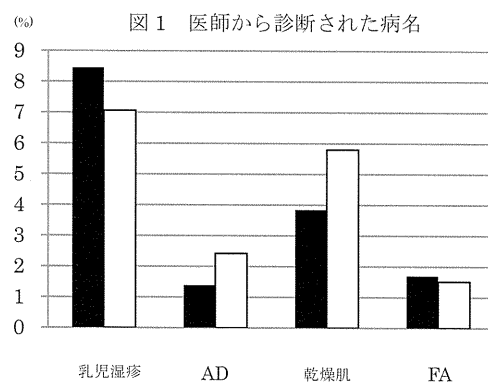
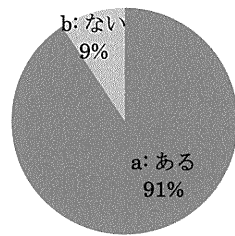
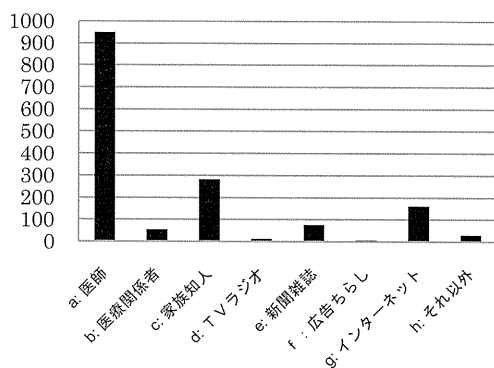


図2 かゆみに困ったことがあるか？(AD)



た(図1)。「かゆみ」に困ったことがある者は全体の42%であり、ADと診断された者の91%(図2)、乾燥肌と診断された者の81%がかゆみで困ったと答えた。かゆみで困った者の80%が医療機関を受診していた。ADと診断された者の92%は医療機関を受診した。時々またはよくインターネットを利用する者は全体の73%であったが、「かゆみ」治療の主な情報源として利用した者は6.5%であった。これに対し医師から情報を得たと答えた者は60%だった(図3)。

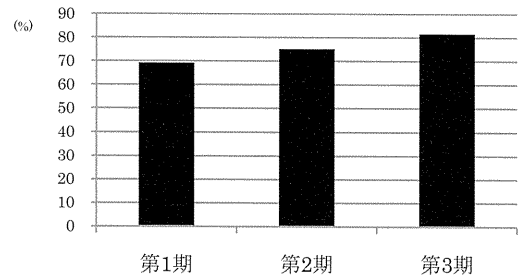
図3 かゆみ治療法の情報源



インターネットを使用する者に、「かゆみ」の治療についてインターネットが有用であったかどうかを尋ねた設問では、有用であると答えた者は徐々に増加していた(図4)。

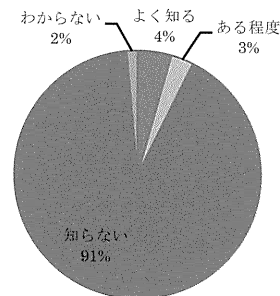
当研究班が開設しているHPを知っていた者は全体の3%であり、ADと診断された者の7%であった(図5)。HPを知っている者のうち57%が検索エンジンを使用していたのに対し、医療関係者から教えられた者は10%であった。HPの内容について、よく理解できたものは25%、ある程度理解できた者は

図4 インターネットで有益な情報が得られたか？



55%であった。このHPが治療に役立ったと答えた者は88%であった。HPに対して、ADやかゆみを理解できたという肯定的な意見が多かったが、見づらい、スマートフォンに対応してほしいという意見が聞かれた。期別のHPの認知度を検討では、よく知っている、またはある程度知っている者はそれぞれの期間において、全体の4%、3%、2%であり、AD患者においてはそれぞれ、5%、14%、0%であった。

図5 HP認知度(AD)



D. 考察

「かゆみ」で困ったことのある者は全体の42%にのぼり、「かゆみ」は乳幼児において一般的な問題であることが分かる。AD、乾燥肌の診断を受けている者のそれぞれ9割、8割が「かゆみ」に困り医療機関を受診していることから、「かゆみ」が乳幼児およびその保護者のQOLを大きく損なっている実態が考えられる。疾患に対する知識や、治療に対する情報は医師から得た者が多く、医師に対する強い信頼がうかがわれる。インターネットを主な情報源としている者は

比較的少なかった。一方では、インターネットにより有用な情報を得ていると感じている者は増加傾向であり、インターネットに対するユーザーの慎重な態度があると同時に、情報を取捨選択している姿が想像される。

当研究班が開設しているHPを、AD患者の7%が知っていると答え、患者の間ではある程度周知されているものと考えられたが、期別の検討では残念ながら認知度が高まっているとは言えない。HPの内容については肯定的な意見が多かったが、一方では内容が多すぎる、見づらい、それ以上見る気がしないという意見も聞かれ、近年のスマートフォンの普及も考えると、これに対応したHPの作成も考慮すべきであると考えられる。今後さらにHPの周知を図るためには、このHPの内容が信頼に値するものであるとユーザーが容易に判断できるような工夫をするとともに、AD患者は医療機関を高率に受診していることから、医師をはじめとする医療関係者におけるHPの存在を知らせることが早道であると考えられる。

E. 結論

「かゆみ」は小児やその保護者にとっては一般的な問題である。特にAD患者はそのために高率に医療機関を受診しており、そのQOLを著しく低下させていると考えられる。保護者の多くが疾患や治療の情報を医師から得ていた。当研究班のHPはAD患者の7%に知られており、ある程度活用されていることが分かった。さらなるHP利用促進のためには、本HPが信頼できるものであることを分かりやすく示し、HPを見やすく使いやすくする必要がある。同時に、医師、特に小児科医に対しHPの周知を図り、医師から患児の保護者に知らせることが早道であると考えられる。

アトピー性皮膚炎の病態における樹状細胞の役割の解析と標準治療の確立に関する研究

研究分担者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）

研究協力者 滝口光次郎（埼玉医科大学皮膚科助教）

宮野恭平（埼玉医科大学皮膚科助教）

アトピー性皮膚炎(AD)の病態には角層のバリア機能異常、免疫異常が関与しており、血清 IgE 値や TARC 値上昇を認める。TARC の産生細胞として皮膚角化細胞、樹状細胞が存在する。AD 患者の樹状細胞の産生する TARC 産生、MDC 産生を検討した。AD 樹状細胞産生能は、TARC、MDC いずれも健常人と比較して高値を示した。樹状細胞の MDC 産生能は重症度と相関していた。血清 MDC 高値の産生細胞として樹状細胞が重要であること、樹状細胞の産生する MDC は皮膚炎の活動性を反映しており、樹状細胞を標的とした治療の可能性が示された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)の病態は、Th2 サイトカイン産生異常を中心とした免疫異常や、バリア機能によって生じる角層の水分保持能の低下にみられる乾燥症状、さらにかゆみによる搔破が関与している。AD の免疫異常を誘導する皮膚の担当細胞として樹状細胞が存在する。これまで、アトピー性皮膚炎(AD)患者で、血清 TARC 値が高値を示し、重症度と相関していること、さらに短期間で変動することを報告してきた。現在、血清 TARC 値は AD の補助診断として認められているが、皮膚における TARC 産生細胞は完全には明らかではない。樹状細胞の TARC 産生、MDC 産生、他のサイトカイン産生の調節機序、刺激による調節機序を明らかにする。

B. 研究方法と結果：

AD 患者末梢血より単核球を分離し、培養系において樹状細胞を作成する。培養系における TARC、MDC 産生能を測定した。AD 患者末梢血より作成した樹状細胞の MDC 産

生は、健常人と比較して高値を示した（AD：平均 52,210 (pg/ml)、健常人：平均 29,025 (pg/ml)）。さらに重症度と相関した。AD 患者末梢血より作成した樹状細胞の TARC 産生能については、健常人と比較してやや高い傾向を示したが有意差は認めなかった（AD：19,749 (pg/ml)、健常人：15,655 (pg/ml)）。

D. 考察

AD 患者末梢血由来の樹状細胞は TARC 値が高値であり、TARC、MDC 産生細胞として樹状細胞の存在が明らかになった。とくに樹状細胞由来の MDC 産生が重症度と相関していた。

E. 結論

樹状細胞の TARC 産生、MDC 産生を検討すると、いずれも AD 患者で高値を示し、MDC 産生は AD 患者の重症度と相関したことから、皮膚樹状細胞の Th2 細胞の遊走活性に関与することが考えられた。今後、樹状細胞の Th2

ケモカイン産生の調節について検討する。AD の病態における樹状細胞の重要性が示され、樹状細胞を標的とした治療の可能性が示された。今後、AD 患者における樹状細胞の MDC、TARC、他のサイトカインの調節作用について検討する予定である。

F.健康危険情報：なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Higashi T, Shimojo N, Suzuki S, Nakaya M, Takagi R, Hashimoto K, Nakagome K, Nakamura K, Kohno Y, Matsushita S. Coenzyme A contained in mothers' milk is associated with the potential to induce atopic dermatitis. *Int Immunol.* 23(12):741-9, 2011

2. 中村晃一郎。民間療法。アトピー性皮膚炎。よりよい治療のための EBM データ集。第 2 版。編集：古江増隆。81-86, 2011.

3. 中村晃一郎、滝口光次郎。アトピー性皮膚炎の病態と治療。アトピー性皮膚炎におけるサイトカイン異常の最近の知見。 *Derma.* 175: 15 – 19, 2011

2. 学会発表

中村晃一郎。小児アレルギー疾患の現状と問題点。アトピー性皮膚炎の病態と治療。第 48 回日本小児アレルギー学会（福岡）。平成 23 年 10 月 29 日。

H.知的財産権の出願、登録状況

1. 新生登録状況：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

分担研究報告書

アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター、チームリーダー

研究協力者 広田 朝光、同上、研究員

研究要旨

本研究は遺伝子多型解析を用いてアトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。今回、我々は従来、アトピー性皮膚炎患者の血清で上昇し、大量のIgEにより好塩基球より産生されるCCL22に着目し、その遺伝子多型について関連解析を行った。遺伝子発現に影響を与える多型(Gain of function)がアトピー性皮膚炎発症に強く関連($P = 8.9 \times 10^{-6}$)することが示された。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の基盤整備が進み、SNPsを用いた関連解析により様々な疾患において遺伝的要因の解明が急速に進んでいる。本研究は症例対照関連解析の手法を用い、アトピー性皮膚炎の病態に関連のある遺伝子群を同定し、痒みとアレルギー炎症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。CCL-22 (MDC)はTh2型のサイトカインであり、臨床検体を用いた検討からアトピー性皮膚炎の病態との関連が示唆されている。我々はCCL-22を疾患候補遺伝子と考え、遺伝子多型を用い関連解析を行なった。さらに近年、ヨーロッパ(Nature genetics 41:596-601,2009)、中国(Nature genetics 43:690-4,2011)の大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)が報告されているが、この結果の一部について日本人の集団で検証を行なった。

B. 研究方法

第1集団としてアトピー性皮膚炎患者1950名、非アトピー性皮膚炎患者1032名について検討を行なった。さらに独立に収集した第2集団(アトピー性皮膚炎患者1034名、非アトピー性皮膚炎患者1004名)について関連の検証(replication study)を行なった。遺伝子型タイピングは、日本人集団のHapMap databaseより抽出したCCL-22遺伝子のTag SNPを対象にTaqMan法を用いて実施した。最も強い関連を示したrs4359426については周辺の連鎖不平衡の強いSNPsを含め、機能解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

CCL-22遺伝子領域より7個のTag SNPsを選出した。このうち第1集団においてロジスティック回帰分析(additive genotype model)によりrs4359426において強い関連を認めた($P = 0.0072$; OR, 0.77; 95% CI, 0.64-0.93)。第2集団においても関連を認め($P = 0.00037$; OR, 0.71; 95% CI, 0.59-0.86)、2つの集団の結果をinverse

variance法で統合したところ、(meta-analysis, $P = 0.0000096$; OR, 0.74; 95% CI, 0.65-0.85)と非常に強い関連を認めた。リスクアレルはMajor alleleであり、関連の方向性も2つの集団で一致していた。日本人EB virus不活化B細胞、合計21株を用いて、アレル特異的mRNA定量解析を行なったところ、リスクアレルで発現増加の傾向($P=6.3 \times 10^{-6}$, Mann-Whitney's U test)を認めた。さらにrs4359426と完全連鎖不平衡にあるrs170359, rs223821, rs72030112についてelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)を用いて転写因子との結合について検討を行なったところ、LPS(1・g/ml)刺激後のTHP-1細胞核抽出物とrs223821のGアレルとのより強い結合を認めた。

GWASにより同定されたC11orf30領域(ヨーロッパ)、TNFRSF6B領域(中国)について日本人集団で検証を行い、それぞれ、($P = 2 \times 10^{-9}$; OR, 1.21)、($P = 1.3 \times 10^{-8}$; OR, 1.18)と強い関連を認めた。

D. 考察

CCL-22の遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の発症しやすさとの関連を見いだした。CCL22はTh2 type chemokineであり、近年アトピー性皮膚炎患者の血清中でのCCL-22上昇、皮膚炎局所でのCCL-22発現亢進が報告されている。近年、IgEが大量に存在すると好塩基球が活性化し、特異抗原なしにCCL-22が分泌されることも報告されている。アトピー性皮膚炎において、CCL22遺伝子多型を通じてCCL22の過剰産生が生じ、Th2炎症の増強につながる可能性が考えられた。

C11orf30、TNFRSF6B領域は日本人の集団でもアトピー性皮膚炎との強い関連が認められ、人種を超えたアトピー性皮膚炎関連領域と考えられた。C11orf30領域については、最近、アレルギー性鼻炎や気管支喘息のGWASにおいても関連が報告されており興味深い。

E. 結論

アトピー性皮膚炎感受性に関連するCCL-22の遺伝子多型を同定した。この関連は独立に収集された2つのサンプル集団において検証され、リスクアレルはCCL22遺伝子の発現量に影響を与え(Gain of function)発症に関与する可能性が示唆された。(PLoS ONE, 2011;6:e26987.)ヨーロッパGWASおよび中国GWASで

同定された C11orf30、TNFRSF6B領域は日本人集団でも強い関連が認められた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:787-93.

2. Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome-Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int*. 2011; 60(3):247-52.

3. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Lower FEV(1) in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV(1), total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:181-9.

4. Okada Y, Hirota T, Kamatani Y, Takahashi A, Ohmiya H, Kumasaka N, Higasa K, Yamaguchi-Kabata Y, Hosono N, Nalls MA, Chen MH, van Rooij FJ, Smith AV, Tanaka T, Couper DJ, Zaki NA, Ferrucci L, Longo DL, Hernandez DG, Witteman JCM, Harris TB, O'Donnell CJ, Santhi K, Ganesh SK, Koichi Matsuda K, Tsunoda T, Tanaka T, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M, Yamamoto K, Kamatani N. Identification of nine novel loci associated with white blood cell subtypes in a Japanese population. *PLoS Genet* 2011;7(6):e1002067.

5. Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, Duan QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szeffler S, Lazarus SC, Lemanske RF, Peters SP, Lima JJ, Nakamura Y, Tamari M, Weiss ST. Genome-wide association of GLCCI1 with asthma steroid treatment response. *N Engl J Med* 2011;365:1173-1183

6. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai TK, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S,

Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Soo-Jong Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Iwai N, Tomoike H, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet* 2011 Jul;7(7):e1002170.

7. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Miyagawa T, Adachi M, Tanaka H, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Taniguchi M, Lima JJ, C. G. Irvin, S. P. Peters, B. E. Himes, Litonjua AA, Tantisira KG, Weiss ST, Kamatani N, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics* 2011;43(9):893-6.

8. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. An interaction between Nrf2 polymorphisms and smoking status affects annual decline in FEV1: a longitudinal retrospective cohort study. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):97.

9. Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. NOD2 Gene Polymorphism was associated with prevalence and severity in Japanese COPD patients. *Respirology* 2012;17:164-71.

10. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Ezaki H, Takeuchi S, Furue M, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M. Variants of C-C motif Chemokine 22 (CCL22) are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. *PLoS One* 2011;6:e26987.

11. Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, His E, Hank Joo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M. ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and

Taiwanese populations. PLoS One 2012 in press.

日本語総説

玉利 真由美、富田かおり、広田 朝光、III. 診断の進歩、ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患、Annual Review 呼吸器 2011 140-146

広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集:呼吸器疾患とエイジング、総説 薬剤の効果と遺伝要因 呼吸と循環 59:597-604, 2011

広田朝光、富田かおり、玉利真由美 特集II:食物アレルギー研究の新たな展開、食物アレルギーの遺伝子多型 臨床免疫・アレルギー科 55:629-635, 2011

玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集:インフラマソーム、インフラマソームのNLRP3遺伝子多型とアレルギー疾患 生体の科学 62:233-236, 2011

玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集:遺伝子解析からアレルギー疾患の治療戦略を考える、アレルギー疾患と大規模遺伝子解析 小児科 52:817-822, 2011

玉利真由美、富田かおり、広田朝光 総説:他領域からのトピックス、アレルギー疾患の発症や重症化への遺伝子多型の関与 日本耳鼻咽喉科学会会報 114:477-484, 2011

玉利真由美 特集:アトピー性疾患のゲノム研究 アップデート、序:アレルギー疾患の病態解明・遺伝要因からのアプローチの現況 アレルギー・免疫 18:1283-1285, 2011

広田朝光、富田かおり、田中翔太、玉利真由美 特集:アトピー性疾患のゲノム研究 アップデート、VII:食物アレルギーのゲノム解明の現況 アレルギー・免疫 18:1330-1336, 2011

玉利真由美、富田かおり、広田朝光 特集:気管支喘息 包囲網ー喘息死ゼロへ向けた最後の10年へ、トピックス:自然免疫と気管支喘息 内科 108:485-488, 2011

2. 学会発表

口頭発表

アレルギー週間講演会 2011年2月 青山こどもの城
アレルギー最新研究情報 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第16回免疫アレルギーアカデミー 2011年2月 愛知医科大学
アレルギー疾患、好酸球関連疾患の遺伝子解析研究

の現況 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第9回大阪Zensoku懇話会 2011年3月 リーガロイヤルホテル大阪
気管支喘息重症化のメカニズム 最新の知見から 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第42回御堂筋アズマネットワーク勉強会 2011年3月 大日本住友製薬株式会社本社
気管支喘息の遺伝要因の研究最前線 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第一回みんなで楽しく学ぼう!アレルギーっ子ライフ!
2011年4月 大阪府立呼吸器アレルギー医療センター
玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 2011年5月 千葉幕張メッセ
テーマ館フリータイムプログラム 鼻アレルギーの新たな知見 アレルギー疾患と遺伝子 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

第2回次世代医療システム産業化フォーラム2011 2011年7月 シティプラザ大阪
アレルギー疾患関連遺伝子研究の現況 玉利真由美、広田朝光、富田かおり、田中翔太

第31回六甲カンファレンス 2011年7月 ウェスティン都ホテル
喘息の修飾因子をめぐって 体質(遺伝)基礎 玉利真由美、広田朝光

Open Speech in University 2011年9月 Kaohsiung Medical University, Taiwan
Effects of genetic polymorphisms in allergic diseases
Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota.

第29回呼吸器免疫シンポジウム 2011年10月 Top of the square
アレルギー疾患関連遺伝子解析 玉利真由美、広田朝光

India-Japan Symposium on Global Challenges in Health and Environment 2011年10月 Indian Embassy Auditorium
Genetic analysis of bronchial asthma
Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota

第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール
(1)教育講演9 アレルギー疾患関連遺伝子・ゲノムワイド

関連解析を中心に 玉利真由美、広田朝光

(2)一般演題 健常者における1秒量の経年変化とNrf2 遺伝子多型の検討 増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤隆志、坂本透、野口恵美子、広田朝光、玉利真由美

(3)一般演題 アレルギー性鼻炎患者におけるORMDL3 (ORM1-like 3)の関連解析 富田かおり、坂下雅文、広田朝光、藤枝重治、玉利真由美

(4)一般演題 血清IgEおよび吸入抗原特異的IgEを用いた感作パターン解析ー茨城県と北海道の比較ー 飯島弘晃、増子裕典、金子美子、坂本透、内藤隆志、広田朝光、玉利真由美、今野哲、西村正治、檜澤伸之

(5)一般演題 ゲノムワイド関連解析による成人気管支喘息発症に関連する3つの新規ゲノム領域の同定 広田朝光、富田かおり、田中翔太、玉利真由美

第48回日本小児アレルギー学会第16回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会合同学術大会 2011年10月 福岡国際会議場

(1)シンポジウム3-1 アレルギー関連遺伝子と感染 玉

利真由美、広田朝光

(2)ミニシンポジウムM2-1 日本人における喘息とマトリックスメタロプロテアーゼ12遺伝子多型との関連 山出史也、真下陽一、下条直樹、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、土居悟、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一

第1回重症喘息研究フォーラム SARF 2011年12月 経団連会館

重症喘息のメカニズム TSLPを中心に 玉利真由美 広田朝光 富田かおり 田中翔太

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2011-151111(平成23年7月7日出願)

一塩基多型に基づく免疫疾患の検査方法

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究

(副題) 痒み・搔破行動と皮膚炎増悪メカニズムに関するアトピーモデルを用いた研究

研究分担者 竹内 聡 九州大学大学院医学研究院皮膚科学 助教

研究協力者 古江増隆 (同 教授)、江崎仁一 (同大学院生)

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の慢性皮膚病変部においては、表皮内知覚神経侵入・伸長とその執拗な痒みとの関連が指摘されている。マウスの Th2 型慢性皮膚炎モデルにおいて、アトピー性皮膚炎治療外用薬であるタクロリムス (FK506 ; FK) は表皮内神経伸長を抑制し、搔破行動も抑制すると報告され、これらの関連が指摘されている。我々はこれまでに、ハプテンおよびダニ抗原誘発性のアトピー性皮膚炎モデルにおいて、MAPK /ERK kinase1/2 (MEK1/2) 阻害薬のひとつである CX659S (CX) が、FKと同程度に表皮内神経伸長は抑制する一方、FKとは異なり搔破行動の抑制はしないことを確認した。

FKの作用メカニズムの一つとして、NF κ B系の遺伝子群の調節の他に、成長因子受容体下流にある Akt のリン酸化を抑制することが報告されており、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- Akt 経路の制御系として知られている。そこで、PI3K阻害薬のひとつである LY294002 (LY) の抗かゆみ効果について検証したい。

B. 方法

NC/Ngaマウスの剃毛した背部と耳に、精製ダニ蛋白抗原 (ビオスタ AD[®]) を週に 2 回、4 週間塗布して慢性皮膚炎を発症させた。同時に外用薬として ステロイドの betamethasone (BV)、FK、CX、LY を用いて連日外用し、搔破行動、皮膚炎の状態、組織像、血清、mRNA 等を比較検討した。

C. 結果

「耳介腫脹反応」および「皮膚炎スコア」については、BV、FK外用群では陽性対照群と比較して有意に抑制されたものの、CX、LY外用群では抑制されず、陽性対照群と同等の「耳介腫脹反応」が見られた。第 4 週目における「搔破行動」においても、BV、FK外用群で陽性対照群と比較して有意に抑制されたものの、CX、LY外用群では抑制される傾向がみられなかった。第 4 週後の血清総 IgE 値は BV、FK外用群でのみ有意に減少していたが、血清 TARC 値は BV 外用群でのみ有意に減少していた。第 4 週後の背部皮膚炎惹起部の組織学的解析では、BV、FK、CX外用群ともに陽性対照群と比較して、浸潤している「炎症細胞数」、「肥満細胞数」、および「IL-4陽性細胞数」は有意に少なかった。一方で「IL-31 陽性細胞数」「IFN- γ 陽性細胞数」には有意差は見られなかった。また「IL-17 陽性細胞数」は BV、FK外用群でのみ有意に減少していた。「PGP9.5 陽性神経線維」による表皮内神経伸長に関しては、BV、FK、CX外用群ともに陽性対照群と比較して、有意に神経伸長の程度が抑制されていた。病変部皮膚から抽出した mRNA レベルでの発現量では、BV、FK外用群でのみ IL-17a、TSLP、IL-6 の有意な発現量低下を認めた。

D. 考察

今回、精製ダニ蛋白抗原塗布を用いてアトピー性皮膚炎モデルの NC/Nga マウスに皮膚炎を発症させ、PI3K阻害薬の搔破行動に対する効果を検討した。臨床的および組織学的な皮膚炎、神経伸長、搔破行動のいずれに関しても LY 外用群では抑制が見られなかった。このことから、FK の搔破行動の抑制効果は、PI3K-Akt 経路制御とは異なるメカニズムにより起きているという可能性が示唆された。搔破行動を抑制している BV と FK では IL-17a および血清 IgE 上昇を抑制していたが、CX は血清 IgE 上昇を抑制せず、病変部皮膚における IL-17a の mRNA 発現量が増加していた。血清 IgE や IL-17a の抑制と搔破行動に何らかの関連がある可能性が考えられた。

E. 結論

FK の搔破行動の抑制効果は PI3K-Akt 経路とは異なる経路により制御されており、血清 IgE や IL-17a の抑制と搔破行動に何らかの関連がある可能性が考えられた。アトピー性皮膚炎で臨床問題となる痒みのメカニズム及び治療を考える上で重要な知見と考える。(平成 24 年 2 月 1 日)

アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究

(副題) 1. 脊髄内痒み神経の同定に関する研究 2. 石垣島コホート研究

研究分担者 古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授

研究協力者 竹内 聡、蜂須賀淳一 (同皮膚科助教)、江崎仁一 (同大学院生)、古庄憲浩 (同感染環境医学准教授)

A. 研究目的

1. 痒みという感覚は「掻きたいとう欲求を引き起こす不快な感覚」であり、皮膚における痒みを伝達する一次求心性神経線維に関してはC線維がその役割を担っていることが知られている。一方で、C線維は痛みや冷温覚をはじめとした痒みとは異なる感覚を伝達することも知られている。我々はこれまでに、痒み特異的な一次求心性神経線維の同定のため、ラットにセロトニン(5-HT)塗布による痒み知覚モデルを作製して脊髄後根神経節における電気生理学的記録を行い、5-HTによる痒み刺激に特異的に反応するC線維を同定した。本研究では後根神経節で記録した一次求心性神経線維が脊髄後角ではどの部分に入力し、その後どの神経伝導路を通り伝達されていくのかを検討したい。

2. アトピー性皮膚炎の発症に寄与する諸因子の解明は重要な課題であるが、我が国におけるコホート研究は数少ない。そのような現状の中、我々はこれまでに平成13年度から沖縄県石垣島の乳幼児(保育園児)の集団検診と保護者への質問票によるアンケート調査、採血による血液データの解析を開始し、石垣島の乳幼児コホートの前向き調査を可能としている。これまでに、発症頻度・IgE値・感染症の合併・本症発症の寄与因子などを報告してきた。今後、CCL17/TARCやCCL22/MDCなどのTh2ケモカインの推移とアトピー性皮膚炎の発症や予後を検証したい。

B. 方法

1. SDラットの胸髄を麻酔下に露出し、末梢に5-HTを塗布してパッチクランプ法にて脊髄後角部の膜電流を測定することで、脊髄後角における5-HTによる痒み刺激の入力部位を検討した。

2. 患者アンケート調査の結果、病歴、血清CCL17/TARCの結果を元にデータ解析を行った。

C. 結果

1. 5-HTによる痒み刺激に応答するC線維は、応答しないC線維と比較すると有意に脊髄後角の浅層に入力していた。また、5-HTによる痒み刺激に反応する脊髄後角ニューロンは、後根神経節ニューロンと同じく機械的刺激に反応する性質を持っていた。

2. アンケート調査の多変量解析の結果、患児のアトピー性皮膚炎罹患の危険因子として、本人の気管支喘息または卵アレルギーの既往、父親や同胞のアトピー性皮膚炎の既往が挙げられた。採血の結果では、アトピー性皮膚炎や卵アレルギーのある園児は有意に血清TARC値が高く、またアトピー性皮膚炎でかつ卵アレルギーの既往のある患児は有意に血清TARC値が高かった。一方、気管支喘息、アレルギー性鼻炎の既往の有無では、患児の血清TARC値に有意差はなかった。

D. 考察

1. 5-HTによる痒み刺激に反応する1次求心性神経線維は、後根神経節においてC線維の中で機械的刺激にも反応する多様式なニューロンであり、脊髄後角においても同様の性質を持っていた。脊髄後角での入力部位に関しては浅層であることから、侵害刺激や温熱刺激の伝導路と同一部位であることが確認された。

2. 卵アレルギーの既往がアトピー性皮膚炎の危険因子のひとつであり、乳幼児期のアトピー性皮膚炎には卵アレルギーが深く関わっていることが示唆された。また、卵アレルギーの既往があることで血清TARC値(アトピーの疾患重症度マーカー)が高かった。これまでに卵アレルギーの程度とアトピー性皮膚炎の重症度が相関することが報告されていることから、今回の結果はその報告に合致する結果と考えられた。

E. 結論

1. より中枢における痒み特異的神経の伝導路に関する検討を行う必要がある。

2. より詳細なTh2ケモカインの推移などの疫学調査が必要である。(平成24年2月1日)