

高い患者では、痒疹をが見られ、中等症から重症の内因性アトピー性皮膚炎では痒疹が高頻度である可能性がある。これについて、現在この重症度での症例数を増やしてさらに検討することになっている。

#### D 考察

我々は、痒疹患者から痒疹結節部の皮膚組織から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて IL-4、IL-5、IL-10 の mRNA 発現を確認し、また痒疹患者に対して recombinant IFN- $\gamma$  を投与したところ症状が改善したことから、Th2 細胞が痒疹の病態に関与していることを示唆した<sup>5)</sup>。本研究においても Th1 サイトカイン IFN- $\gamma$  の発現は 2 例中 1 例は正常コントロールと比較して減少し、Th2 サイトカイン IL-4 は 2 例とも増加していることから、IL-4 の痒疹の病態への関与の可能性が追試された。IL-22 は 2 例とも発現が増加しており、双方とも臨床像、病理組織像において表皮の肥厚を認めていることから、これまで報告されているように、表皮ケラチノサイトの分化に IL-22 が関わっていることが推察された。IL-31 の発現もコントロールと比較すると痒疹患者は 2 例とも増加し、2 例とも痒みが強く、痒みと IL-31 との相関について今後さらに検討を加えることが必要かと考えられた。

#### E 結論

今回の検討により痒疹において Th2 細胞、Th17 細胞、T22 細胞などのさまざまな細胞が病態形成に関与している可能性が示唆された。

また内因性アトピー性皮膚炎と痒疹病変との関わりが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Koga C et al. J Invest Dermatol 2008; 128: 2625-30
- 2) Duhon T et.al. Nat Immunol 2009; 10: 857-63
- 3) Nograles KE et.al. J Allergy Clin Immunol 2009;123:1244-52
- 4) Sonkoly E et.al. J Allergy Clin Immunol 2006;117:411-7
- 5) Tokura. et. Al. Acta Derm Venerol 1997; 77: 231-234
- 6) Park K et al. Eur J Dermatol 21: 135-136, 2011.
- 7) Tokura Y. J Dermatol Sci 58: 1-7, 2010.

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1)Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. Br J Dermatol 160: 297-304, 2009.
- 2)Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y. IL-10-Producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin. J Invest Dermatol 129: 705-713, 2009.
- 3)Atarashi K, Mori T, Yoshiki R, Kabashima K, Kuma H, Tokura Y. Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing CD4+CD25+ regulatory T cells. J Dermatol Sci 53: 216-221, 2009.

- 4) Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol* 18: 1036-1043. 2009.
- 5) Sugita K, Kobayashi M, Mori T, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Antihistaminic drug olopatadine downmodulates CCL17/TARC production by keratinocytes and Langerhans cells. *J Dermatol* 36: 654-657, 2009.
- 6) Fukamachi S, Nakamura M, Tokura Y. Cisplatin-induced acral erythema. *Eur J Dermatol* 19: 171-172, 2009.
- 7) Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 58: 1-7, 2010.
- 8) Tokura Y, Mori T, Hino R: Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases. *J UOEH* 32: 317-328, 2010.
- 9) Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y. Inducible Nitric Oxide Synthase Downmodulates Contact Hypersensitivity by Suppressing Dendritic Cell Migration and Survival. *J Invest Dermatol* 130: 464-471, 2010.
- 10) Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 162: 83-90, 2010.
- 11) Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tabata Y, Kohno K, Tokura Y. Involvement of Wnt signaling in dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 176: 721-732, 2010.
- 12) Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssimus* extract. *Am J Pathol* 176: 2385-2393, 2010.
- 13) Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J-I, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y. The mandatory role of IL-10-producing and OX40L-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol* 184: 5670-5677, 2010.
- 14) Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120: 883-893, 2010.
- 15) Sugita K, Kabashima K, Sakabe J-I, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y. FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late phase skin reaction in mice. *Am J Pathol* 177:1881-1887, 2010.
- 16) Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Haruyama S, Kabashima R, Sugita K, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y. Chondrodermatitis of the auricle in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 20:813-814. 2010.
- 17) Kabashima R, Sugita K, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Tokura Y. Increased circulating Th17 frequencies and serum IL-22 levels in

patients with acute generalized exanthematous pustulosis. J Eur Acad Dermatol Venereol 25: 485-488, 2011.

18) Fukamachi S, Mori T, Sakabe J-I, Shiraishi N, Kuroda E, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Topical Cholecystokinin Depresses Itch-Associated Scratching Behavior in Mice J Invest Dermatol 131: 956-961, 2011.

19) Fukamachi S, Bito T, Shiraishi N, Kobayashi M, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. J Dermatol Sci 61:118-123, 2011.

20) Hino R, Kabashima R, Kawakami C, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y. Circulating Th17 cell fluctuation in psoriatic patients treated with topical calcipotriol and betamethasone butyrate propionate. J Eur Acad Dermatol Venereol 25:242-244, 2011.

21) Park K, Mori M, Nakamura M, Tokura Y. Increased expression of mRNAs for IL-4, IL-17, IL-22 and IL-31 in skin lesions of subacute and chronic forms of prurigo. Eur J Dermatol. 21:135-136, 2011.

## 2.学会発表

1) Tokura Y. Atopic dermatitis and skin barrier in the extrinsic and intrinsic types. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association. 2011.11.26. Taipei, Taiwan.

2) Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. Ancillary Meeting on Atopic Dermatitis. 22<sup>nd</sup> World Congress of

Dermatology 2011. 2011.5.24. Seoul, Korea.

3) Tokura Y. Skin barrier impairment is heterogeneous in atopic dermatitis. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011.12.10. Kyoto, Japan.

G 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 動物モデルを用いた痒疹の病態解析

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** 慢性痒疹・皮膚癢痒症の発症機序解明にはマウスモデルを用いた解析が重要である。本研究では、マウス皮膚炎症部位に浸潤する好塩基球に注目し、その機能解析をおこなった。まず好塩基球選択的に発現するプロテアーゼ mMCP-8 ならびに mMCP-11 に対する特異抗体を作製した結果、皮膚組織標本における好塩基球の同定が可能となった。さらに mMCP-8 遺伝子座にジフテリア毒素受容体遺伝子を挿入することで、任意のタイミングで好塩基球を選択的に除去できるモデルマウスを開発した。これらの好塩基球解析ツールを駆使して、IgE 依存性皮膚アレルギー炎症において好塩基球が皮膚に浸潤し、炎症を誘発していることが判明した。mMCP-11 をマウス皮内投与すると、血管透過性の亢進・組織浮腫が誘導された。このことから、好塩基球が mMCP-11 をはじめとする様々な因子を分泌することで、皮膚炎症をひき起こしていることが示唆された。

### A. 研究目的

慢性痒疹・皮膚癢痒症の発症機序解明に向け、マウス皮膚炎症モデルを用いて、好塩基球の動態・機能解析をおこなう。従来、好塩基球はマスト細胞のバックアップ的存在であると考えられていたが、最近になって好塩基球がマスト細胞とは異なるユニークな働きをしていることが報告され、注目を浴びている。本研究では、好塩基球の動態・機能解析に有用な好塩基球特異抗体ならびに好塩基球欠損モデルマウスを樹立して、皮膚炎症における好塩基球の役割を解析する。

### B. 研究方法

1. 好塩基球に発現するプロテアーゼ mMCP-8 と mMCP-11 のリコンビナント蛋白を作製し、それぞれに対するモノクローナル抗体を樹立した。
2. mMCP-8 遺伝子座にジフテリア毒素受容体遺伝子を挿入したノックインマウス (*Mcpt8<sup>DTR</sup>* マウス) を樹立した。
3. リコンビナント mMCP-11 蛋白をマウス耳介皮内に投与し、生体反応を調べた。  
(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

1. 作製した抗 mMCP-8 抗体は、皮膚組織に浸潤する好塩基球を特異的に検出した。
2. *Mcpt8<sup>DTR</sup>* マウスでは、ジフテリア毒素投与によって、好塩基球のみが除去された。好塩基球除去により、IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症ならびにマダニに対する耐性獲得が消失した。
3. mMCP-11 をマウス皮内投与すると、血管透過性の亢進・組織浮腫が誘導された。この反応は、インドメタシンによって抑制された。

## D. 考察

1. 抗 mMCP-8 抗体の樹立により、皮膚組織における好塩基球の同定が容易かつ確実に行えるようになった。
2. 好塩基球欠損 *Mcpt8<sup>DTR</sup>* マウスの樹立により、生体の好塩基球の機能解析が可能となった。
3. 好塩基球より分泌される mMCP-11 がプロスタグランディンを介して血管透過性亢進を誘導することで、皮膚炎症に寄与することが判明した。

## E. 結論

世界に先駆けて、マウス好塩基球特異的抗体ならびに好塩基球欠損モデルマウスの樹立に成功した。好塩基球の mMCP-11 が皮膚炎症促進因子として機能することが判明した。これにより、慢性痒疹・皮膚瘙癢症など皮膚疾患における好塩基球の

役割解明がさらに進むものと期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y. and Obata, K.: Newly-discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 9-13, 2009.
- 2 Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T. and Taki, S.: Fc receptor  $\gamma$ -chain, a constitutive component of the interleukin 3 receptor is required for interleukin 3-induced interleukin 4. *Nat. Immunol.* 10: 214-222, 2009.
- 3 Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y. and Karasuyama, H.: New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy. *Allergol. Int.* 58: 11-19, 2009.
- 4 Ugajin, T., Kojima, T., Mukai, K., Obata K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Eishi Y., Yokozeki, H., and Karasuyama, H.: Basophils preferentially express mouse mast cell protease 11 among the mast cell tryptase family in contrast to mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 86: 1417-1425, 2009.
- 5 向井香織、小畑一茂、辻村祐佑、鳥山一：「好塩基球とアレルギー」日本臨床 67(11)：2095-2099, 2009.
- 6 鳥山一：「アレルギーにおける好塩基球の新たな役割」実験医学増刊「アレルギー疾患の免疫機構」27 (20)：68-74, 2009.

- 7 Karasuyama, H., Tsujimura Y., Obata, K., and Mukai, K.: Role for basophils in systemic anaphylaxis. *Chem. Immunol. Allergy*. 95: 85-97, 2010.
- 8 Wada, T., Ishiwata, K., Koseki, H., Ishikura, T., Ugajin, T., Ohnuma, N., Obata, K., Ishikawa, R., Yoshikawa, S., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Yokozeki, H., Watanabe, N., and Karasuyama, H.: Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J. Clin. Invest.* 120: 2867-2875, 2010.
- 9 Matsushima, Y., Kikkawa, Y., Takada, T., Matsuoka, K., Seki, Y., Yoshida, H., Minegishi, Y., Karasuyama, H., and Yonekawa, H.: An atopic dermatitis-like skin disease with hyper-IgEemia develops in mice carrying a spontaneous recessive point mutation in the Traf3ip2 (Act1/CIKS) gene. *J. Immunol.* 185: 2340-2349, 2010.
- 10 Karasuyama, H., Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y., Kawano, Y., and Minegishi, Y.: Nonredundant roles for basophils in immediate- and delayed-onset allergic reactions. *The Open Allergy Journal*. 3: 73-80, 2010.
- 11 Ishikawa, R., Tsujimura, Y., Obata, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 742-746, 2010.
- 12 烏山 一:「急性ならびに慢性アレルギー発症における好塩基球の新たな役割」炎症と免疫 18(1): 23-27, 2010
- 13 烏山 一:「好塩基球が主役を演じる IgE 依存性慢性アレルギー炎症」IgE practice in asthma 1-5, 2010
- 14 烏山 一:「吸血ダニに対する抵抗性、好塩基球が鍵を握っていた」メディカルバイオ (オーム社) 7 (6): 52-55, 2010
- 15 Karasuyama, H., Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y., and Wada, T.: Nonredundant roles of basophils in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 45-69, 2011.
- 16 Saito, M., Nagasawa, M., Takada, H., Hara, T., Tsuchiya, S., Agematsu, K., Yamada, M., Kawamura, N., Ariga, T., Tsuge, I., Nonoyama, S., Karasuyama, H., and Minegishi, Y.: Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 208: 235-249, 2011.
- 17 Karasuyama, H., Wada, T., Yoshikawa, S., and Obata, K.: Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites. *Trends Immunol.* 32: 125-130, 2011.
- 18 Jönsson, F., Mancardi, D.A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Shimizu, T., Daëron, M., and Bruhns, P.: Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* 121: 1484-1496,

- 2011.
- 19 Nishikado, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: NK cell-depleting anti-asialo GM1 Ab exhibits a lethal off-target effect on basophils *in vivo*. *J. Immunol.* 186: 5766-5771, 2011.
- 20 Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, M., Nakata, K., Takagawa, T., Funada, Y., Kotani, Y., Karasuyama, H., Yoshida, M., and Nishimura, Y.: Antigen-specific IgG ameliorates allergic airway inflammation via Fcγ receptor IIB on dendritic cells. *Respir. Res.* 12: 42, 2011.
- 21 Karasuyama, H., Obata, K., Wada, T., Tsujimura, Y., and Mukai, K.: Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy* 66: 1133-1141, 2011.
- 22 Porcherie, A., Mathieu, C., Peronet, R., Schneider, E., Claver, J., Commere, P-H., Kiefer-Biasizzo, H., Karasuyama, H., Milon, G., Dy, M., Kinet, J-P., Louis, J., Blank, U., and Mecheri, S.: Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J. Exp. Med.* 208: 2225-2236, 2011.
- 23 Yamagishi, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Obata, K., Ugajin, T., Sato, S., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Basophil-derived mouse mast cell protease 11 induces microvascular leakage and tissue edema in a mast cell-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 709-713, 2011.
- 24 Sawaguchi, M., Tanaka, S., Nakatani, Y., Harada, Y., Mukai, K., Matsunaga, Y., Ishiwata, K., Oboki, K., Kambayashi, T., Watanabe, N., Karasuyama, H., Nakae, S., Inoue, H., and Kubo, M.: Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 188:, 2012.
- 25 鳥山 一:「最近クローズアップされた好塩基球の重要性」 感染・炎症・免疫 (医薬の門社) 40 (4): 12-21, 2011.
- 26 鳥山 一:「アレルギーと生体防御における好塩基球の新たな役割」 アレルギー・免疫 (医薬ジャーナル社) 18 (4): 42-49, 2011.
- 27 小畑一茂、石川亮、鳥山 一:「慢性アレルギーと好塩基球」 慢性炎症—多様な疾患の基盤病態 実験医学増刊号 29 (10): 151-155, 2011.
2. 学会発表
- 1 Hajime Karasuyama : Newly discovered roles for basophils- a neglected minority gains new respect. 6th Biennial International Symposium of the International Eosinophil Society (Eosinophils 2009). 2009.07.08 Bruges, Belgium.
- 2 鳥山 一 : 教育講演「アレルギーにおける好塩基球の2面性 - 悪玉細胞それとも善玉細胞？」 第59回日本アレルギー学術秋季学術大会 2009. 10. 30 秋田

- 3 Hajime Karasuyama: Novel roles for basophils in allergy. International Symposium; Eosinophils, other inflammatory cells and molecules in allergy. 第59回日本アレルギー学術秋季学術大会 2009.10.30 秋田
- 4 烏山 一: 特別講演「好塩基球による皮膚慢性アレルギーの誘導と炎症終焉」第39回皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2009.11.07京都
- 5 Yoshikawa, S., Wada, T., Mukai, K., Ugajin, T., Ishikawa, R., Shitara, H., Taya, C., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Dynamics of basophil behavior in immune and allergic responses: in vivo imaging analysis using basophil-specific GFP mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12.2-4.大阪
- 6 Karasuyama, H.: Novel roles for immune and allergic responses. The 97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Immunologists. Baltimore, USA. 2010.05.08.
- 7 烏山 一: 好塩基球の新たな役割: 悪玉細胞それとも善玉細胞? 第75回日本インターフェロン/サイトカイン学会 小倉 2010.06.26
- 8 烏山 一: 好塩基球とアレルギー 第31回日本炎症・再生医学会 東京 2010.08.06
- 9 Karasuyama, H.: Novel roles for basophils in allergy and immunity. International Congress of Immunology 2010. Kobe, 2010.08.26.
- 10 Karasuyama, H.: Nonredundant role for basophils in antibody-mediated, acquired immunity against ticks. The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji 2010.09.10.
- 11 Karasuyama, H.: Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. The 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology. Leipzig, Germany 2010.09.23.
- 12 烏山 一: 特別講演「好塩基球による皮膚慢性アレルギーの誘導と炎症終焉」第39回皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2009.11.07京都
- 13 Karasuyama, H.: Novel roles for basophils in allergy and protective immunity. Cold Spring Harbor-Asia Conference 'Frontiers of Immunology in Health & Diseases'. Suzhou, China. 2010.11.09.
- 14 Karasuyama, H.: Basophils as a non-redundant player in allergy and protective immunity. The 20<sup>th</sup> Annual Johns Hopkins Asthma and Allergy Center Symposium. Baltimore, USA. 2010.11.19.
- 15 烏山 一: アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2010.11.26



- 16 鳥山 一:好塩基球研究の新展開〜日陰者が一気に檜舞台に〜 第47回日本小児アレルギー学会特別講演 横浜 2010.12.04 Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in protective and pathological immunity. SIgN Seminar, Singapore. 2011.04.18.
- 17 Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in protective and pathological immune responses. JSICR-MMCB2011. Osaka, 2011.05.26.
- 18 Karasuyama, H.: Pathogenesis of hyper-IgE (Job) syndrome characterized by atopy, immunodeficiency and bone anomaly. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases. Stanford, USA, 2011.06.20.
- 19 鳥山 一:特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割」第67回臨床アレルギー研究会 2011.07.23.
- 20 鳥山 一:「新たなアレルギー発症機構の解明とその制御」CREST シンポジウム 2011.09.30.
- 21 鳥山 一:特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割」東海小児アレルギー懇話会 2011.10.09.
- 22 鳥山 一:特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割」第7回中国研究皮膚科セミナー 2011.11.05.
- 23 Karasuyama, H.: Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. Japan-Korea-China Joint Symposium 'Inflammatory cells in allergic diseases' 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010. 11.10.
- 24 鳥山 一:教育講演「好塩基球研究のルネサンス」第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010. 11.11.
- 25 鳥山 一:特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割」第15回栃木県血液疾患講演会 2011.11.17.
- 26 Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in protective and pathological immune responses. EMBRN-COST International Mast Cell and Basophil Meeting. Southampton, UK. 2011. 11.25.

## 蚊アレルギー性痒疹発生機序に関する研究

研究分担者 安東嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 准教授  
研究協力者 穂山 祐 カルフォルニア大学デービス校 ポスドク  
榎田 晃久 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生  
岩田 剛 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生  
高木あゆ美 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 学部生（卒業研究）  
真野 陽介 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 学部生（卒業研究）  
倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授  
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

研究要旨 アレルギー性痒疹の発生機序へのマスト細胞—histamine 系の関与が、これまで示唆されてきた。しかしながら、多くのアレルギー素因を含む痒疹性皮膚疾患の痒みが抗 histamine 薬に抵抗性を示す場合が多い。そこで、抗 histamine 薬抵抗性を示す即時型蚊アレルギー性痒疹マウスモデルを用いて、アレルギー性痒疹の新たな発生機序の解明を試みた。その結果、皮膚内細胞として、マスト細胞以外に樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞、マクロファージ、好塩基球がその発生に関与することを明らかにした。また、痒み発生関連因子として granzyme A、lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>)、及び IL-18 を見出した。これらの結果は、即時型アレルギー性痒疹反応発生には、マスト細胞—histamine 系だけでなく、多くの皮膚内免疫系細胞並びにこれらが産生・遊離するプロテアーゼ、リン脂質代謝物及びサイトカインが関与することを示唆する。

### A. 研究目的

「痒み」は、多くの皮膚疾患の主な症状の一つである。痒みによる皮膚の搔破は、皮膚症状の更なる悪化を招き、過度のストレスに加え、皮膚治療の妨げにもなっている。H<sub>1</sub> histamine 受容体拮抗薬は、多くの痒疹性皮膚疾患の痒みの第一選択薬となっている。これは、マスト細胞—histamine 系が痒み発生の主要な機序として考えられてきた由縁である。しかしながら、臨床におい

ては、アトピー性皮膚炎などの難治性の痒疹性皮膚疾患の痒みは、H<sub>1</sub> histamine 受容体拮抗薬ではコントロールできない場合が多い。このことは、マスト細胞—histamine 系以外の痒みの発生機序の存在を示唆する。

我々は、蚊唾液腺抽出物（ESGM: Extract of the Salivary Gland of Mosquito）を抗原として感作した即時型蚊アレルギー性痒疹マウスモデルを作出した。本マウスモデルの特徴の一つにマスト細胞—histamine 系の関

与が小さいことが挙げられる。そこで、本研究では、本アレルギー性痒痒マウスモデルを用いて、新たな痒みの発生機序の解明を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 実験動物

実験には、雄性 ICR 系マウス(日本 SLC、静岡)を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、富山大学動物実験指針に則り、富山大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### 2) 蚊唾液腺抽出物 (ESGM) の作製と感作

当研究室にて飼育した雌性ヒトスジシマ蚊の唾液腺を含む胸部よりタンパク質を抽出し、抗原 (ESGM) として用いた。

感作は、ESGM をマウス尾側背部に 1 週間に 2 回、4 週間皮内注射した。チャレンジは、マウス吻側背部に ESGM を皮内注射した。

### 3) 行動実験

行動実験の数日前にマウス吻側背部を脱毛した。実験当日、行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に 1 時間放置し、馴化した。その後、ESGM をマウス吻側背部に皮内注射し、無人環境下に 8mm ビデオカメラでその後の行動を撮影した。行動評価は、ビデオの再生により、後肢による注射部位とその周辺への掻き動作数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

### 4) セリンプロテアーゼ活性

N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilide acetate salt を用い、酵素により切断された

p-nitroanilide を吸光度 (420 nm) で測定し、評価した。

### 5) 組織化学染色

マウス皮膚凍結切片を作製し、トルイジンブルー染色あるいは、細胞特異的抗体を用いて蛍光染色し、光学顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

### 6) Revers transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Granzyme A や lipoxin 受容体 (LXR) の mRNA 発現は、特異的プライマーを用いて、RT-PCR 法で検出した。

### 7) ウエスタンブロッティング

mMCP-8 (好塩基球特異的マーカー)、Langerin 及び GAPDH のタンパク質は、特異的抗体を用い、常法に従ってウエスタンブロッティング法で検出した。

## C. 研究結果

### 1) 蚊アレルギー痒痒反応へ皮膚内免疫系細胞除去試薬あるいは抗体の効果

マクロファージに毒性を示す 2-chloroadenosine や樹状細胞に毒性を示す etretinate のマウスへの処置により、蚊アレルギー性痒痒反応は、抑制された。また、好塩基球除去に用いられる抗 Ba103 抗体の処置においても蚊アレルギー性痒痒反応は、抑制された。

### 2) 蚊アレルギー性痒痒マウスモデルの皮膚内免疫系細胞

皮膚組織学的手法及びウエスタンブロッティング法による検討の結果、蚊アレルギー性痒痒マウスモデルの皮膚では、非感作健常マウスと比べて、CD4 陽性 T 細胞、マクロファージ及び好塩基球の増加が認められた。一方、マスト細胞及び樹状細胞は変

化がなかった。

### 3) セリンプロテアーゼ granzyme A と proteinase-activated receptor 2 (PAR2)

セリンプロテアーゼ阻害薬 (nafamostat mesilate 及び AEBSF) や PAR2 中和抗体は、蚊アレルギー性痒疹反応を抑制した。また、抗原チャレンジによりチャレンジ部位皮膚でセリンプロテアーゼの遊離が認められた。

CD4 陽性 T 細胞から産生される granzyme A が感作マウス皮膚で増加し、granzyme A の皮内注射は痒み反応を惹起した。この反応は、PAR2 中和抗体で抑制された。

### 4) LXA<sub>4</sub>

蚊アレルギー性痒疹反応は、LXR 拮抗薬 (Boc-1) により抑制された。

感作マウス皮膚への抗原チャレンジにより皮膚での LXA<sub>4</sub> 産生が増加した。一方、非感作マウスでは LXA<sub>4</sub> 産生の増加は認められなかった。

LXA<sub>4</sub> の感作マウスへの皮内注射により痒み反応は惹起されたが、非感作マウスでは痒み反応は認められなかった。この反応は、Boc-1 及び、PAR2 拮抗薬で抑制された。

LXR mRNA は、皮膚から単離した CD4 陽性 T 細胞に発現していたが、後根神経節では発現していなかった。

### 5) IL-18

蚊アレルギー性痒疹反応は、IL-18 中和抗体により抑制された。また、IL-18 の皮内注射により痒み反応が惹起された。

## D. 考察

本研究では、蚊唾液腺抽出物 (ESGM) を抗原として感作したアレルギー性痒疹マウスを用い、その痒みの発生機序の解明を試みた。

蚊アレルギー性痒疹反応は、セリンプロテアーゼ—PAR2 系が関与することが本研究で明らかとなった。PAR2 は、皮膚では主にケラチノサイト及び一次感覚神経に発現している。皮膚内で産生・遊離させたセリンプロテアーゼがケラチノサイトに作用し、間接的に一次感覚神経を興奮させて、あるいは直接的に興奮させて痒みが惹起されるかもしれない。

ESGM 感作マウスでは、非感作マウスに比べ、皮膚内の CD4 陽性 T 細胞の増加が認められた。CD4 陽性 T 細胞は、セリンプロテアーゼの granzyme A を産生・遊離する。Granzyme A の皮内注射が、マウスに痒み反応を惹起し、この反応が PAR2 阻害により抑制されたことから、本アレルギー性痒疹反応に granzyme A—PAR2 系が関与しているかもしれない。

LXA<sub>4</sub> は、感作マウス皮膚において抗原チャレンジにより産生が増加した。一方、非感作マウスでは LXA<sub>4</sub> 産生の増加は認められなかった。興味あることに、LXA<sub>4</sub> の皮内注射は、感作マウスで痒み反応を誘発し、非感作マウスでは認められなかった。LXA<sub>4</sub> 受容体である LXR の mRNA は、後根神経節で発現しておらず、感作により増加した CD4 陽性 T 細胞に発現していた。感作マウス皮膚から単離した CD4 陽性 T 細胞を非感作マウス皮膚へ養子移入し、抗原チャレンジすると LXA<sub>4</sub> 産生が増加した (未報告)。これらの知見は、CD4 陽性 T 細胞が LXA<sub>4</sub> を産生し、LXA<sub>4</sub> が一次感覚神経に直接作用するのではなくオートクラインあるいはパラクライン的に CD4 陽性 T 細胞に作用することが示唆される。また、LXA<sub>4</sub> 誘発痒疹反応が、PAR2 拮抗薬で抑制されたことから、

LXA<sub>4</sub>がCD4陽性T細胞に作用し、granzyme Aを遊離し、ケラチノサイト或いは一次感覚神経上のPAR2に作用して痒み反応が惹起されると考えられる。

本研究では、感作によりCD4陽性T細胞、マクロファージ及び好塩基球が皮膚で増加し、それぞれの除去試薬や抗体処置によりアレルギー性痒痒反応は抑制された。一方、皮膚樹状細胞は感作によりその増加は観察されなかったが、その除去試薬の処置によりアレルギー性痒痒反応が減弱した。このことから、CD4陽性T細胞、マクロファージ及び好塩基球に加え、樹状細胞も即時型アレルギー性痒痒に関与することが示唆される。ケラチノサイトと共にマクロファージや樹状細胞からは、IL-18が産生することが知られている。IL-18の皮内注射により痒み反応が誘発された。IL-18受容体は、ケラチノサイトや一次感覚神経に発現している。また、好塩基球にも発現が報告されている。したがって、抗原チャレンジにより産生されたIL-18が、直接一次感覚神経に作用、あるいはケラチノサイトや好塩基球を介して痒み反応を誘発しているかもしれない。

好塩基球は、その痒みへの役割は未だ理解されていない。本研究では、感作による皮膚での増加とアレルギー性痒痒への関与が明らかとなった。しかしながら、好塩基球が遊離する痒み関連因子は未だ明らかとなっていない。好塩基球はマスト細胞と同様にhistamineを産生遊離するが、本アレルギー性痒痒反応へのhistamineの関与は小さい。したがって、他の因子たとえばmMCP-11などが関与している可能性がある。今後、詳細に機序を検討する必要がある。

## E. 結論

即時型蚊アレルギー性痒痒反応の誘発にCD4陽性T細胞、マクロファージ、樹状細胞及び好塩基球に加え、これらが産生遊離するgranzyme A、LXA<sub>4</sub>及びIL-18が関与することが明らかとなった(図1)。今後さらに、これら細胞間の相互作用に関連する因子が同定されることにより、新規鎮痒薬開発の重要な情報源となると期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Akiyama-Nakano T., **Andoh T.**, Enokida A., Kuraishi Y. Involvement of granzyme A in itch-associated responses of mosquito allergy in mice. (in preparation)
- 2) Zhang Q., **Andoh T.**, Konno M., Lee J.B., Hattori M., **Kuraishi Y.** Inhibitory effect of methanol extract of *Ganoderma lucidum* on acute itch-associated responses in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 909-911, 2010.
- 3) **Andoh T.**, Zhang Q., Yamamoto T., Tayama M., Hattori M., Tanaka K., **Kuraishi Y.** Inhibitory effects of methanol extract of *Ganoderma lucidum* on mosquito allergy-induced itch-associated responses in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 114: 292-297, 2010.
- 4) Gotoh Y., **Andoh T.**, **Kuraishi Y.** Clonidine inhibits itch-related response through stimulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the spinal cord in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 650: 215-219, 2011.
- 5) Gotoh Y., Omori Y., **Andoh T.**, **Kuraishi Y.** Tonic inhibition of allergic itch signaling by the descending noradrenergic system in

- mice. *J. Pharmacol. Sci.*, (2011) (in press)
- 6) **安東嗣修**, 倉石 泰: 瘙癢行動の評価法. 実践行動薬理学. 日本薬理学会. 武田弘志, 辻稔, 赤池昭紀編. 金芳堂, 京都, 102-112, 2010.
  - 7) **安東嗣修**: 皮膚における痒みの発生メカニズム: ケラチノサイトの産生する新規痒み因子と痒み増強因子. 実践行動薬理学. 日本薬理学会. 武田弘志, 辻稔, 赤池昭紀編. 金芳堂, 京都, 242-250, 2010.
  - 8) **安東嗣修**: 皮膚における痒み因子. *アレルギー・免疫* 17: 1506-1510, 2010.
  - 9) Gotoh Y., Omori Y., **Andoh T.**, Kuraishi Y.: Tonic inhibition of allergic itch signaling by the descending noradrenergic system in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, 115: 417-420, 2011.
  - 10) Gotoh Y., **Andoh T.**, Kuraishi Y.: Noradrenergic regulation of itch transmission in the spinal cord mediated by  $\alpha$ -adrenoceptors. *Neuropharmacol.*, 61: 825-831, 2011.
  - 11) **Andoh T.**, Haza S., Saito A., Kuraishi Y.: Involvement of leukotriene B4 in spontaneous itch-related behavior in NC mice with atopic dermatitis-like skin lesions. *Exp. Dermatol.*, 20: 894-898, 2011.
  - 12) **Andoh T.**, Kuwazono T., Lee JB, Kuraishi Y.: Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice. *Peptides*, 32: 2098-2103, 2011.
  - 13) **安東嗣修**: オピオイドと痒み: 臨床医必携—全身とかゆみ. 宮地良樹編, 診断と治療社, 東京, 日本, 110-111, 2011.
2. 学会発表
    - 1) **安東嗣修**: 動物をもちいた皮膚のかゆみ試験評価法の重要なポイント. 第4回皮膚基礎研究クラスターフォーラム. 2009. 7. 23, 東京.
    - 2) **安東嗣修**, 倉石 泰: 皮膚における痒みの発生機構. 第37回薬物活性シンポジウム. 2009. 10. 9-10. 仙台.
    - 3) **安東嗣修**: 動物モデルと痒みの評価法. 第109回日本皮膚科学会総会. 2010. 4. 16-18. 大阪.
    - 4) **安東嗣修**: アレルギー疾患の新規バイオマーカーグランザイム A. 2010 バイオアカデミーフォーラム, 2010. 6. 30. 東京.
    - 5) **Andoh T.**, Kuraishi Y.: Peripheral mechanisms of the induction of itch. Neuro2010.9.3-4. 神戸.
    - 6) Gotoh Y, Haza S, Yoshida T, **Andoh T.**, Kuraishi Y.: Milnacipran produces anti-pruritic effect through the activation of  $\alpha$ -adrenoceptors. 第20回国際痒みシンポジウム. 10. 30-31. 東京.
    - 7) 羽座沙都美, **安東嗣修**, 倉石泰: アトピー性皮膚炎のマウスモデルの自発的掻き動作におけるロイコトリエン B4 の関与, 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
    - 8) **安東嗣修**, 穂山祐, 榎田晃久, 倉石泰: 蚊アレルギー性瘙癢へのプロテアーゼ活性化受容体2とCD4陽性T細胞由来グランザイム A の関与. 第84回日本薬理学会年会, 2011, 3, 22-24, 横浜. (震災のため誌上開催)

- 9) 歌大介, 後藤義一, 安東嗣修, 倉石泰, 井本敬二, 古江秀昌: 痒み物質セロトニンの皮膚塗付により誘起される脊髄後角におけるシナプス伝達の in vivo パッチクランプ記録法を用いた解析. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011, 3, 28-30, 横浜. (震災のため誌上開催)
- 10) Andoh T., Akiyama T., Enokida A., and Kuraishi Y.: Granzyme A and proteinase-activated receptor 2 are involved in the induction of itch-associated responses to mosquito allergy in mice. the 6th World Congress on Itch, International Workshop for the Study of Itch, 2011, 9, 4-6, Brest, France.
- 11) Yamakoshi T., Andoh T., Takayama Y., Lee J.-B., Sano A., Shimizu T., and Kuraishi Y.: Involvements of protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch. 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 2011, 9, 7-10, Barcelona, Spain.
- 12) 歌大介, 後藤義一, 安東嗣修, 倉石泰, 井本敬二, 古江秀昌: In vivo パッチクランプ法を用いた膠様質細胞におけるセロトニンにより誘発される痒みのシナプス伝達の解析. 第34回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.
- 13) 安東嗣修: アレルギー性痒痒と新規疾患分子マーカー. 富山大学コラボフェスタ 2011, 2011, 9, 28, 富山.
- 14) 山本拓, 安東嗣修, 榎本愛, 倉石泰: マウスにおけるインターロイキン-2 による痒み増強作用. 第62回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
- 15) Andoh T.: Regulation of itch in atopic dermatitis using traditional medicine. 13th International Symposium on Traditional Medicine, 2011, 10, 13-14, Toyama.
- 16) Andoh T., and Kuraishi Y.: Proteases and itch. 21st International Symposium of Itch, 2011, 10, 29, Toyonaka.
- 17) Sasaki A., Adhikari S., Shimoda N., and Andoh T., and Kuraishi Y.: Involvement of spinal BB2 receptor-expressing neurons in the itch-associated behaviors after human herpes virus 1 inoculation in mice. 21st International Symposium of Itch, 2011, 10, 29, Toyonaka.
- 18) Andoh T., Gotoh Y., Omori Y., and Kuraishi Y.: Tonic inhibition of itch signaling by the descending noradrenergic system in mice. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011, 11, 12-16, Washington D.C., USA.
- 19) Uta D., Gotoh Y., Andoh T., Kuraishi Y., Imoto K., and Furue H. In vivo patch-clamp analysis of pruriceptive and nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal dorsal horn. The 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2011, 11, 12-16, Washington D.C., USA.
- 20) Andoh T.: Mechanisms of itch in atopic dermatitis and the therapy using Traditional Kampo Medicine. Symposium in Research Institute of

Korean Oriental Medicine in Suncheon National University, 2011, 11, 22, Suncheon, Korea.

- 21) 高木あゆ美, 安東嗣修, 原田絢子, 倉石泰: 蚊アレルギー性痒痒反応への langerin 陽性樹状細胞と IL-18 の関与. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 11, 27, 金沢. (優秀ポスター賞受賞)
- 22) 高山祐輔, 安東嗣修, 山腰高子, 清水忠道, 佐野文子, 倉石泰: 皮膚糸状菌誘発痒痒反応へのプロテアーゼとプ

ロテアーゼ活性化受容体 2 の関与. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 国際特許出願 (PCT/JP2008/ 73175), アメリカへの移行 (2010/4); 安東嗣修, 中野 祐, 倉石 泰: アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用



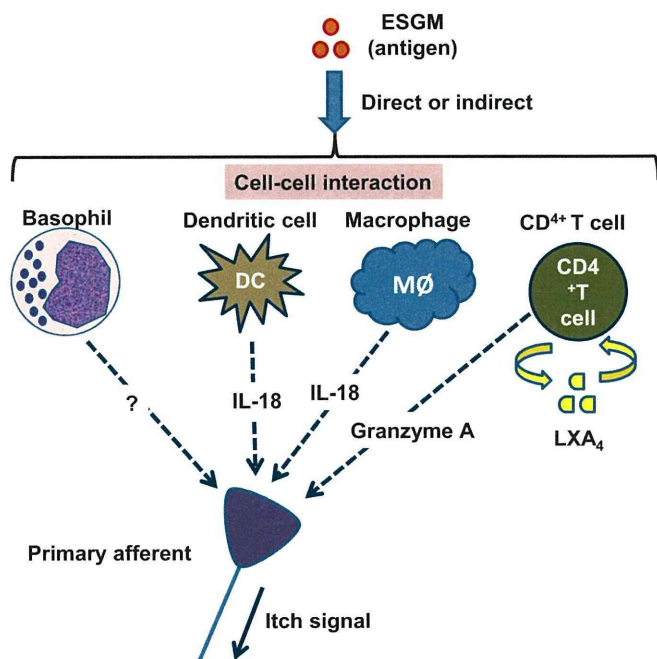


図 1 蚊アレルギー性癢痒発生機序のまとめ

## アトピー性皮膚炎モデルと痒みメディエーターとの関わり

研究分担者 宮地良樹 京都大学 医学研究科 皮膚科学 教授  
研究協力者 椛島健治 京都大学 医学研究科 皮膚科学 准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎は痒痒を伴う慢性の湿疹である。近年アトピー性皮膚炎発症の原因の一つにフィラグリン遺伝子異常があることが解明され、バリア機能破綻による免疫系への影響を解明することが重要課題となっている。そこで、皮膚炎の発症機序を解明するために、フィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスを用いて新規マウス皮膚炎モデルの確立を試みた。flaky tail マウスにバリア破壊刺激を行わずにダニ抗原を塗布することにより皮膚炎、高 IgE、バリア破綻、重度の皮膚痒痒を呈する新規マウスモデルを確立した。また、蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤の痒痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外の痒痒伝達物質の存在が示唆される。一方、シクロスポリンがアトピー性皮膚炎の痒痒抑制に有効であることより T 細胞が産生する痒痒伝達物質の存在の可能性が上げられる。近年 IL-31 が T 細胞から産生される痒痒誘発サイトカインとして注目されている。本サイトカインはアトピー性皮膚炎で上昇しており、また、シクロスポリン投与により痒痒の抑制と共に IL-31 の血清中の濃度も低下する。以上の結果より、IL-31 は、アトピー性皮膚炎の痒痒誘発に関与している可能性が示唆される。

### A. 研究目的

皮膚痒痒症を評価する上で、より生理的条件に近いマウスモデルの確立は、今後新規薬剤の評価を行ったりする上で重要なツールとなり得る。アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis; AD)はバリア破壊、免疫・アレルギーの制御異常、痒痒過敏などの様々な要素により誘導される。近年フィラグリン遺伝子異常に伴うバリア異常が AD の発症に関与していることが明らかになったが、マウスモデルの確立や、そのマウスを用いた痒痒の評価系は確立されていない。そこで、ヒトアトピー性皮膚炎の原因遺伝子として知られるフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスを用いた新規マウス皮膚炎モデルの確立と痒痒の定量的評価系を築くことを本研究の目的とする。

アトピー性皮膚炎は痒痒を伴う慢性の湿疹である。蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤の痒痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外の痒痒伝達物質の存在が示唆される。一方、シクロスポリン

がアトピー性皮膚炎の痒痒抑制に有効であることより T 細胞が産生する痒痒伝達物質の存在の可能性が上げられる。近年 IL-31 が T 細胞から産生される痒痒誘発サイトカインとして注目されている。

そこで、アトピー性皮膚炎における痒痒がシクロスポリン投与によりどの程度軽減されるのか、また、IL-31 の血清中の濃度がどの程度抑制されるのかを検証することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

バリア機能の維持に重要な役割を果たすフィラグリンの発現が低下した flaky tail マウスにおいて、バリア破壊を行わずにダニ抗原を耳介や背部に塗布し、臨床症状、耳介腫脹反応、組織学的所見を検証した。コントロールには C57BL/6 マウスを用いた。

また、14 歳から 82 歳（平均 40 歳）の男性 16 名においてネオオーラル 3mg/kg で内服開始した。期間中はステロイド内服をしない。かゆみは VAS で表し、0、3、

7、14、28 日目に評価を行った。また、血清 IL-31 のレベルを市販のキットを使用し、ネオオーラル治療前と治療後で測定する

#### (倫理面への配慮)

組換えDNA実験は、遺伝子組換え生物などの使用の規制による生物多様性の確保に関する法律と京都大学組換えDNA実験安全管理規定に従って行う。

マウスを使用する実験は、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管などに関する基準」に記載されている方法により、また、京都大学動物実験及び飼育倫理審査にて承認されたプロトコール（承認番号080150）に則り遂行する。遺伝子改変動物の取り扱いにおいては、第二種使用等拡散防止措置確認申請を行い、そのプロトコールに従って研究を遂行する。

臨床検体を用いる研究では、京都大学の医の倫理委員会に申請し承認を得ており（承認番号E778番）、研究に参加していただく作業には文書および口頭で今回の研究内容についての説明を行い、承諾書（検体の取り扱い・個人情報の保護・解析結果の公表・解析後の検体の取り扱い、協力した場合の利益・不利益などに関する項目など）を得た後に研究を遂行した。

#### C. 研究結果

flaky tail (*fl/fl*) マウスにダニ抗原を耳介周囲に反復塗布していくと耳介腫脹、scratching 回数の増加、耳介・顔面のびらんなどを認め、さらに病理組織において炎症細胞の強い浸潤を認めた。さらに、flaky tail マウスでは血清 IgE 値の上昇、経皮水分蒸散量(TEWL)の上昇を認め、バリア機能の低下をみとめた。これらの所見は C57BL/6 マウスにおける同様の処置では認められなかった (図 1)。

皮膚搔破行動を Sclaba Real (Noveltec) をもちいて観察した。このマウスは、皮膚搔破行動が著明に亢進していた (図 2)。

シクロスポリン投与によりアトピー性皮膚炎患者の癢痒の VAS スコアは経時的に減少した。(図 3)。また、投与 3 日後には有意に癢痒を抑えていた (図 4)。この時点では皮疹はまだ抑えられていなかった (data not shown)。

また、血清中の IL-31 値は健常人では 10pg/mL 以下であるが、AD の患者では、140.3 $\pm$ 14.3pg/mL と高値であった。ところがこの高 IL-31 値は、シクロスポリンの投与により有意に低下した。投与 28 日後の血清 IL-31 の値は 21.4 $\pm$ 4.4pg/mL であった。

#### D. 考察

flaky tail マウスにバリア破壊を行わずにダニ抗原を塗布するのみで皮膚炎を発症した。この反応は C57BL/6 マウスでは認められないことより、flaky tail マウスが外来抗原刺激に対して皮膚炎を誘導しやすい状態にあることを示唆するため、アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患モデルマウスとしての可能性を呈した。

また、本マウスでは、搔破行動の亢進も認められた。したがって、今後、痒みを制御する薬剤の効果の判定、痒みのメカニズムの解明など、様々な領域に応用できる可能性がある。

一方、シクロスポリン投与により、アトピー性皮膚炎の患者の癢痒と血清 IL-31 値が有意に減弱した。癢痒の抑制はシクロスポリン投与 3 日後には著明に認められたが、この時点では皮疹は軽度にしかな抑制されていなかった。従って癢痒の抑制が単に皮疹の改善に伴って二次的に認められたという訳ではなく、シクロスポリンが癢痒を直接的に抑制したことが示唆される。

#### E. 結論

Filaggrin 遺伝子に異常を有する flaky tail マウスにおいて、ダニ抗原を塗布することにより、皮膚炎や痒みを誘発することが明らかとなった。本モデルマウスは今後薬剤の評価など多方面において有用なツールとなることが期待される。

また、アトピー性皮膚炎の癢痒はシクロスポリンで抑制させる。その際に血清中の IL-31 値も抑制される事から、IL-31 がアトピー性皮膚炎の癢痒の形成に関わっている可能性がある。今後更なる症例の蓄積が重要である。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 原著論文

1. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y. 2010. The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol* 184: 5670-7
2. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120: 883-93
3. Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, Honda T, Nakajima S, Moniaga CS, Otsuka A, Ishizaki T, Tomura M, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Okada T, Kabashima K. 2010. Rho-mDial pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. *Blood* 116: 5875-84
4. Nakajima S, Honda T, Sakata D, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Moniaga CS, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. 2010. Prostaglandin I2-IP signaling promotes Th1 differentiation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Immunol* 184: 5595-603
5. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K. 2010. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am J Pathol* 176: 2385-93
6. Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. PGD2 induces eotaxin-3 via PPAR $\gamma$  from sebocytes: A possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol* (2012)
7. Otsuka A, Tanioka M, Nakagawa Y, Honda T, Ikoma A, Miyachi Y, Kabashima K. 2011. Effects of cyclosporine on pruritus and serum IL-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 21: 816-7
8. Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Nakae S, Miyachi Y, Kabashima K. 2011. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One* 6: e25538
9. Otsuka A, Honda T, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. 2011. An H1-histamine receptor antagonist decreases serum interleukin-31 levels in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 164: 455-6
10. Moniaga CS, Egawa G, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. 2011. Histamine modulates the responsiveness of keratinocytes to IL-17 and TNF-alpha through the H1-receptor. *J Dermatol Sci* 61: 79-81

#### 2. 学会発表

1. What's new in immunology of metal allergy K Kabashima (17<sup>th</sup> International Contact Dermatitis Symposium 2009)

2. K Kabashima (symposist). Actin cytoskeleton formation through mDial1 is essential for DC-T cell interaction and T cell