

201229041A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と  
病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横関 博雄

平成 25 年(2013 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな  
新規治療の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横関 博雄

平成25年(2013)年 3月

# 【目 次】

I. 平成24年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発	3
横関博雄 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野)	
III. 分担研究報告	
1. アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究	9
烏山 一 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野)	
2. アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究	12
安東嗣修 (富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学)	
3. アトピー性皮膚炎モデルとかゆみメディエーターとの関わり	16
宮地良樹 (京都大学医学研究科皮膚科学)	
4. 外因性・内因性アトピー性皮膚炎における臨床症状、かゆみ関連因子の比較検討	19
戸倉新樹 (産業医科大学皮膚科学)	
5. アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発	22
片山一朗 (大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室)	
室田浩之 (大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室)	
6. 痒疹マウスモデル作成と病態に関する研究	26
横関博雄 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野)	
佐藤貴浩 (防衛医科大学校皮膚科学講座)	
7. 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究	28
金田安史 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
V. 班会議プログラム	95

I. 平成24年度構成員名簿

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな  
新規治療の開発

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	横関 博雄	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	教授
研究分担者	片山 一朗	大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室	教授
	金田 安史	大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座	教授
	烏山 一	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野	教授
	佐藤 貴浩	防衛医科大学校皮膚科学講座	教授
	戸倉 新樹	浜松医科大学皮膚科学	教授
	宮地 良樹	京都大学医学研究科皮膚科学	教授
	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
	室田 浩之	大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室	講師
研究協力者	高森 建二	順天堂大学浦安病院	院長
	塩原 哲夫	杏林大学医学部皮膚科	教授
	三橋 善比古	東京医科大学皮膚科	教授
	森田 栄伸	島根大学医学部皮膚科	教授
	柊島 健治	京都大学医学研究科皮膚科学	准教授
	坂部 純一	浜松医科大学皮膚科学	特任助教
	山口 隼人	浜松医科大学皮膚科	診療従事者
	龍野 一樹	浜松医科大学皮膚科	助教
	羽座 沙都美	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	大学院生
	倉石 泰	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	教授
	中島 沙恵子	京都大学医学研究科皮膚科学	研究員
	井川 健	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	講師
	高山 かおる	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	講師
	西澤 綾	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	講師
	宇賀神 つかさ	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	メディカルフェロー
	端本 宇志	防衛医科大学校皮膚科学講座	助教

## II. 総括研究報告

## アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 本研究は重症型アトピー性皮膚炎 (AD) における難治性皮膚病変 (痒疹、紅皮症、顔面紅斑) などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症の発症頻度を明らかにするためのアンケート用紙を作成し検討した。ADの難治性皮膚症状である痒疹は治療には非常に難渋することが多い。痒疹の病理組織像は、表皮の肥厚とともに真皮脈管周囲のリンパ球や好酸球浸潤があり、さらに好塩基球も多数浸潤していることが判明している。一部の痒疹病変の形成過程はマウスにおけるIgE依存性慢性アレルギー性炎症 (IgE-CAI) に類似している面があり、また好塩基球はIgE-CAIの成立に必須である。今年度は、IgE-CAIを持続させることによりマウスに痒疹類似病変を惹起し、その病態を解析し痒疹と同じサイトカインパターンであることが明らかになった。さらに、IgE-CAIを終焉化させる好塩基球の役割も解析され、好塩基球由来のIL-4の作用によって炎症性単球がM2マクロファージに分化し抑制に働くことが明らかになった。また、ADモデルマウスを用いて痒みにおける好塩基球が重要な役割をすることが明らかになった。今後の将来的展望として好塩基球をターゲットとした痒疹型AD病変の新規治療法の開発する予定である。神経栄養因子アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認した。フィラグリン遺伝子のみの変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、ADモデルとしての可能性を検証した。遺伝子を導入するために開発したSendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ)を紫外線等で不活化した粒子に mild detergent と遠心で遺伝子や siRNA を封入し、膜融合作用によって直接細胞質内に導入できるベクターであるHVJ-Eベクターが樹状細胞からのIFN- $\beta$ 産生はToll-like receptor非依存性でRIG-I依存性であることが分かった。

### 研究分担者

佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科 教授  
片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科  
情報統合医学講座皮膚科学 教授  
戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科 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  
安東嗣修 富山大学大学院応用薬理学 准教授  
宮地良樹 京都大学医学研究科皮膚科 教授  
室田浩之 大阪大学大学院医学系研究科  
情報統合医学講座皮膚科学 講師  
金田安史 大阪大学大学院医学系研究科  
遺伝子治療学講座 教授

### 研究協力者

梶島健治 京都大学医学研究科皮膚科学 准教授  
坂部純一 浜松医科大学皮膚科学 特任助教  
山口隼人 浜松医科大学皮膚科 診療従事者  
龍野一樹 浜松医科大学皮膚科 助教  
端本宇志 防衛医科大学校皮膚科 助教  
井川 健 東京医科歯科大学医学部 講師

### A. 研究目的

本研究は重症型アトピー性皮膚炎 (AD) におけ

る難治性皮膚病変 (痒疹、紅皮症、顔面紅斑) などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症の発症頻度を明らかにするためのアンケート用紙を作成し検討する。さらに、各種のADの皮膚病変のモデルマウス (痒疹モデルマウス、TNP 特異的IgE産生マウス、flaky tail マウス、雄性NC系マウス) を用いてADの発症機序を解析する。

### B. 方法

1) 外因性・内因性アトピー性皮膚炎 (AD) における臨床症状、かゆみ関連因子の比較検討

浜松医大皮膚科通院中のAD患者および産業医大皮膚科にて戸倉が診察したAD患者において、以下の項目について調査・検討した。(1) 臨床症状重症度: SCORAD, VAS (かゆみ)、(2) 特徴的

臨床症状：Dennie-Morgan fold, 尋常性魚鱗癬, palmar hyperlinearity、(3) 合併症：アレルギー性鼻炎、喘息(4) 不安定：STAI (特性, 状態)、(5) 一般血液検査：LDH, 総IgE値, 特異的IgE (Df, Dp), TARC, 好酸球数、(6) 先進的検査 (倫理委員会承認)：フィラグリン遺伝子変異, 血中 CCK8。(7) 金属パッチテスト：Ni, Co, Cr など

## 2) 痒疹モデルの作成

TNP 特異的 IgE 産生マウス (TNP-IgE マウス) の耳介皮内、あるいは背部皮内に TNP-OVA を反復して3回投与し、IgE-CAI を持続させた。

## 3) IgE-CAI における好塩基球の機能解析

IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細胞の種類を Flow cytometry で解析した。それぞれの細胞に発現しているケモカイン受容体を解析した。

## 4) AD でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立

近年、神経栄養因子アーテミンが皮膚の熱感受性を増感させることを見出した。アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認する。

## 5) AD マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与

実験には、AD マウスモデルである雄性 NC 系マウスを用いた。痒み反応の評価は、無人環境下にマウスを撮影用ケージにいれ、8mm ビデオカメラでその行動を撮影し、その後、ビデオの再生により行った。マウスは、1秒間に数回後肢で搔くので、足を挙げて降ろすまでの一連の搔き動作を1回として、全身への搔き動作回数を数えた。皮膚内の好塩基球数は、パラフィン切片と好塩基球特異的抗体 (TUG8) を用いた免疫染色により行った。

## 6) フィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスの解析

近年用いられているフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウス (Moniaga CS et al. Am J Pathol. 2010) を C57BL/6 マウスでバッククロスし、本マウスの詳細な解析の施行を可能にする。本マウスの免疫学的特徴と痒みの評価を実施する。

## 7) 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関

する研究

アレルギー性鼻炎マウスや健常マウスの鼻腔内に HVJ-E のみを滴下して脾臓細胞からのサイトカイン産生を ELISA 法で評価した。脾臓細胞や骨髄由来の樹状細胞を健常マウスや Myd88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup>マウスから分離して HVJ-E を作用させ、サイトカインの産生を ELISA で測定した。Polyethylene imine 法を用いて RIG-I siRNA を樹状細胞に導入した。

## C. 結果

1) AD 患者は、48 人の外因性 AD (29.4±16.2 歳、M:F 36:14、V A S 53.6、血清 I g E 13221±15249 IU/L、好酸球 10.1%、LDH 276 IU/L)、14 人の内因性 AD (36.1±10.0 歳、M:F 4:10、V A S 52.3、血清 I g E 136.7±151.7 IU/L、好酸球 7.4%、LDH 206 IU/L) であった。Dennie-Morgan fold は有意差がないものの内因性で高頻度 (25%)、魚鱗癬と palmar hyperlinearity は外因性で高頻度 (18%)、痒疹は内因性で高頻度 (21% vs 6%)、フィラグリン遺伝子変異は外因性で高頻度、喘息と鼻炎は外因性で高頻度であった。金属パッチテストは、Co で内因性 AD が有意に高頻度 (42% vs 13%)、Ni でも内因性で高頻度 (31% vs 26%) の傾向があった。

2) TNP-OVA を耳介皮内に高濃度、連続性に反復投与した TNP-IgE マウスでは、耳介腫脹は初回抗原投与から 10 日前後でピークとなり、1ヶ月以上遷延した。次に、TNP-OVA を背部皮内に反復投与した TNP-IgE マウスでは、初回抗原投与から 14 日目に角化をともなう充実性の紅色丘疹が出現した。病変部の病理組織学的所見は、表皮肥厚と、真皮上層の密な、単核球、好酸球、肥満細胞、そして好塩基球が浸潤し、pSTAT3、pSTAT6 が表皮細胞核内に染色されていた。さらに、PGP9.5 陽性神経線維が表皮内へ伸張していた。病変部のサイトカインパターンはヒトのサイトカインパターンと同じであった。また、B57BL/6 由来の STAT6 欠損マウスを用いて同様の反応を惹起させたところ、意外なことに反応が増強した。

3) IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細



胞でもっとも多いのは単球・マクロファージであった。それらは Ly-6C ならびにケモカイン受容体 CCR2 を発現していることから、血中を循環している炎症性単球に由来することがわかった。IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している好塩基球も CCR2 を発現していることから、好塩基球と炎症性単球が CCR2 を介して皮膚病変部に遊走し、その結果アレルギー炎症が誘発されるものと推察された。そこで CCR2 欠損マウスを解析したところ、IgE-CAI は軽減されず、むしろ増悪・遷延化することが判明した。さらなる解析から、IgE-CAI 皮膚病変部において IgE とアレルゲンによって活性化された好塩基球から分泌された IL-4 が、浸潤してきた炎症性単球に作用して 2 型マクロファージ (M2) へと分化誘導すること、この炎症性単球の M2 への分化が抗炎症作用発揮には必須であることが明らかとなった。

4) アーテミンがヒトの AD の皮膚病変部真皮に蓄積していることが確認された。アーテミンを皮下投与したマウスは 38 度の環境下で全身を wiping する行動が確認された。ところが 42 度の環境下では飛び跳ねるなどの異常な行動が確認された。

5) 健常 NC マウスと比べて、AD 誘発 NC マウスでは、明らかな皮膚炎及び自発的掻き動作が誘発した。皮膚における好塩基球に対する免疫染色では、皮膚炎誘発 NC マウスの吻側背部皮膚では、健常マウスと比べて有意に好塩基球の増加が認められた。また、好塩基球除去抗体 (Ba103) の投与により、非選択的コントロール抗体投与群と比べると皮膚炎誘発 NC マウスの自発的掻き動作が有意に抑制された。

6) フィラグリン変異を有するマウスを C57BL/6 マウスへバッククロス (99.9%以上) した。本マウスでは、自然発症の皮膚炎、皮膚組織への好酸球や肥満細胞の浸潤、TSLP 発現の上昇、Th2 や Th17 サイトカイン発現の上昇や、血清 IgE 値の上昇を認めた。また、sclaba real を用いた解析により、そう痒行動を起こしていることも明らかとなった。

7) アレルギー性-鼻炎マウスの鼻腔内に HVJ-E

のみを滴下して脾臓細胞からの interferon (IFN)- $\gamma$  の産生が上昇し、interleukin (IL)-4, IL-5 の産生は抑制された。一方、健常マウスの鼻腔内に HVJ-E のみを滴下しても認められなかった。健常マウスの骨髄由来の樹状細胞からは IFN- $\beta$  は産生された。HVJ-E による樹状細胞からの IFN- $\beta$  の産生機構を解析するため、Myd88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup>マウスの樹状細胞に HVJ-E をかけたが、野生型マウスの樹状細胞と同じように産生が見られた。

#### D. 考察

今回の調査で内因性 AD は女性に多く、その特徴的皮疹として痒疹があることが示唆された。内因性 AD では Co パッチテストの陽性率が有意に高かった。またフィラグリン遺伝子変異は外因性であっても 20%を越えるものではなかった。ヒトにおける痒疹については既に、病変部皮膚において IL-4, 17, 22, 31 の mRNA 発現が増加し、病変部の表皮核内に pSTAT3, pSTAT6 が局在していることが報告されている。今回作成した痒疹モデルマウスの皮膚病変は、組織学的にも皮膚局所サイトカインプロファイルもヒト痒疹と類似していた。ヒト痒疹では好塩基球の病変部への浸潤が明らかであり、今回のマウスモデルも好塩基球依存性である。マウスモデルにおいて好塩基球を除去すると反応が減弱することから、ヒト痒疹において好塩基球は治療のターゲットとなりうる可能性があると考えられた。また、B57BL/6 由来の STAT6 欠損マウスを用いて同様の反応を惹起させたところ、意外なことに反応が増強した。さらに、基球由来の IL-4 の作用によって炎症性単球が M2 マクロファージに分化するという新事実が明らかとなった。従来、M2 マクロファージは、アレルギー炎症を誘導あるいは悪化させるものと考えられていたが、本研究により、過剰なアレルギー反応を抑制する働きがあることが判明した。この抑制の働きの欠損が痒疹モデルマウスにおいて STAT6 欠損マウスで反応が増強するメカニズムの一部である可能性が示唆された。また、アトピー性皮膚炎では皮膚局所におけるアーテミンの蓄積がなんらかの形で中枢

神経を増感させることによって痒みが誘導されるのではないかと考えられた。また、AD誘発 NC マウスでは、健常 NC マウスと比べると掻くことのできる皮膚炎発症部位において、好塩基球の増加が認められた。また、好塩基球除去抗体により、自発的掻き動作が抑制されたことから、好塩基球が痒みに関与していることが示唆される。フィラグリン遺伝子異常を有する flaky tail マウスを C57BL/6 マウスへバッククロスすることにより各種遺伝子変異マウスの解析を行うことを可能とした。本マウスはそう痒を認めるため、今後 IL-31、artemin、semaphorin の影響を検証するのみならず、好酸球や肥満細胞などの各種因子がどのように関与しているか検討する。HVJ-E は樹状細胞から IFN- $\beta$  産生を促し、これにより脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  を産生させていると考えられる。鼻炎マウスでは、炎症部位の鼻粘膜における樹状細胞の集積があるために、鼻炎マウスでのみ HVJ-E の鼻腔内滴下で脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  産生を促したのではないか。また HVJ-E による樹状細胞からの IFN- $\beta$  産生は Toll-like receptor 非依存性で RIG-I 依存性であることが分かった。

#### E. 結論

難治性皮膚病変の痒疹と内因性 AD、金属アレルギーの関連が明らかとなった。マウスに IgE-CAI を反復して惹起させることにより、ヒトの痒疹と類似するマウスモデルを作成した。これを痒疹モデルマウスとして解析することで、病態の解析や新たな治療法の開発などが可能になると考えられる。皮膚アレルギー炎症部位に浸潤した炎症性単球が、好塩基球由来の IL-4 の働きによって、M2 マクロファージへと分化し、アレルギー炎症を終焉に向かわせることが明らかとなった。さらに好塩基球は、アトピー性皮膚炎の痒みの発生に関与する可能性がある。C57BL/6 を遺伝背景とするフィラグリン遺伝子異常を有する flaky tail マウスを作成した。本マウスは、マウスアトピー性皮膚炎モデルとして重要な役割を果たすことが期待される。その他、アーテミンもアトピー性皮

膚炎の痒みの治療標的になりうると考えられた。遺伝子導入ベクターの HVJ-E はそれ自身がサイトカイン産生に関与し Th1 シフトを起こすため、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎の治療に適したベクターである。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Okiyama N, Sugihara T, Oida T, Ohata J, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H: T lymphocytes and muscle condition act like seeds and soil in a murine polymyositis model. H.Arthritis Rheum. 2012 Nov;64(11):3741-9. .
- 2) Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H :Acrosyringeal Involvement of Palmoplantar Lesions of Eosinophilic Pustular Folliculitis..Acta Derm Venereol. 2012 Apr 16.
- 3) Sekine R, Satoh T, Takaoka A, Saeki K, Yokozeki H. :Anti pruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior. Exp Dermatol. 2012 Mar;21(3):201-4.
- 4) Kanai Y, Satoh T, Igawa K, Yokozeki H. :Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis. Acta Derm Venereol. 2012 Jul;92(4):367-71.
- 5) Ito Y, Satoh T, Takayama K, Miyagishi C, Walls AF, Yokozeki H : Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases., Allergy, 66 : 1107-1113, 2011
- 6) Ugajin T, Satoh T, Kanamori T, Aritake K, Urade Y, Yokozeki H : Fc $\epsilon$ RI, but not Fc $\gamma$ R, signals induce prostaglandin D2 and E2 production from basophils., Am J Pathol, 17 : 775-82, 2011
- 7) Okiyama N, Kitajima T, Ito Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H. Addition of the collagen binding domain of fibronectin potentiates the

biochemical availability of hepatocyte growth factor for cutaneous wound healing., J Dermatol, 61 : 215-7, 2011

- 8) Satoh T, Ito Y, Miyagishi C, Yokozeki H : Basophils infiltrate skin lesions of eosinophilic pustular folliculitis (Ofuji's disease)., Acta Derm Venereol, 91 : 371-372, 2011
- 9) Namiki T, Tanemura A, Valencia JC, Coelho SG, Passeron T, Kawaguchi M, Vieira WD, Ishikawa M, Nishijima W, Izumo T, Kaneko Y, Katayama I, Yamaguchi Y, Yin L, Polley EC, Liu H, Kawakami Y, Eishi Y, Takahashi E, Yokozeki H, Hearing VJ. AMPkinase-related kinase NUA2 affects tumor growth, migration, and clinical outcome of human melanoma., Proc Natl Acad Sci U S A, 108 : 6597-602, 2011

## 2. 学会発表

- 1) Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S: Immunolocalization and translocation of AQ5 water channel in sweat glands. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.10
- 2) Imai A, Takayama K, Satoh T, Katho T, Yokozeki H: Ingrown nail and pachyonychia of great toes cause impaired lower limb functions: Improvement of limb function by medical foot care. 22th World congress of Dermatology, Seoul, 2011.5.27
- 3) Kataoka N, Satoh T, Yokozeki H. Indomethacin-induced inhibition of eosinophil chemotaxis via CRTH2: proposal of a mechanism of action for eosinophilic pustular folliculitis. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.10
- 4) Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. L-selectin ligand synthesis by  $\alpha(1,3)$  fucosyltransferases is essential for initial recruitment of basophils and development of chronic allergic inflammation. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society

for Immunology, Makuhari, 2011.11.29

- 5) Takehara Y, Satoh T, Nakamura M, Yokozeki H : Inactivated Sendai Virus particles with and IL-2 gene exert anti-tumor effects on murine angiosarcoma. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Makuhari, 2011.11.29
- 6) Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Masuzaya M, Yokozeki H : Inactivated Sendai Virus particles with and IL-2 gene exert anti-tumor effects on murine angiosarcoma. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.9
- 7) Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H : Repeated induction of IgE-mediated chronic allergic skin inflammation induces prurigo-like reaction. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.9
- 8) Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic type of palmoplantar eczematous reaction : a variant of dyshidrotic eczema? The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011.12.9
- 9) Yamamoto Y, Satoh T, Nakamura M, Yokozeki H : Distinct roles of PGD2 receptors in chronic skin inflammation. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Makuhari, 2011.11.27

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案 なし

### III. 分担研究報告

## アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

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 アトピー性皮膚炎のマウスモデルである IgE 依存性皮膚慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) の病態解析を進めた。炎症性単球が末梢組織に浸潤すると炎症性の 1 型マクロファージ (M1) に分化することは、これまでよく知られていたが、本研究では好塩基球由来の IL-4 の作用によって炎症性単球が M2 マクロファージに分化するという新事実が明らかとなった。従来、M2 マクロファージは、アレルギー炎症を誘導あるいは悪化させるものと考えられていたが、本研究により、過剰なアレルギー反応を抑制する働きがあることが判明した。今後、M2 マクロファージによるアレルギー炎症抑制のメカニズムを解明することで、アトピー性皮膚炎の新規治療法の開発が進展するものと期待される。

### A. 研究目的

私たちは、これまでに、アトピー性皮膚炎のマウスモデルである IgE 依存性皮膚慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) の病態解析を進め、その原因細胞が、皮膚浸潤細胞のわずか 1 - 2% を占めるに過ぎない好塩基球であることをつきとめた。本研究では、好塩基球がどのようにしてアレルギー炎症をひきおこすのか、またどのようにして炎症を収束させていくのか、そのメカニズムを明らかにする。これにより新たな治療標的が同定され、アトピー性皮膚炎の新規治療法の開発が促進されるものと期待される。

### B. 研究方法

IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細胞の種類を Flow cytometry で解析した。それぞれの細胞に発現しているケモカイン受容体を解析した。ケモカイン受容体 CCR2 を欠損するマウスにおいて IgE-CAI を誘導し、炎症の程度、浸潤細胞の種類を調べた。CCR2 欠損マウスに、野生型マウス由来の細胞を移入し、炎症の程度、浸潤細胞の変化を調べた。

(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

IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細胞でもっとも多いのは単球・マクロファージであった。それらは Ly-6C ならびにケモカイン受容体 CCR2 を発現していることから、血中を循環している炎症性単球に由来することがわかった。IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している好塩基球も CCR2 を発現していることから、好塩基球と炎症性単球が CCR2 を介して皮膚病変部に遊走し、その結果アレルギー炎症が誘発されるものと推察された。そこで CCR2 欠損マウスを解析したところ、当初の予想に反して、IgE-CAI は軽減されず、むしろ増悪・遷延化することが判明した。CCR2 欠損マウスでは、予想通り炎症性単球の浸潤が阻害されていたが、好塩基球浸潤はむしろ亢進していた。次に、CCR2 欠損マウスに野生型マウス由来の炎症性単球を移入したところ、IgE-CAI の増悪・遷延化が寛解した。すなわち、IgE-CAI では、炎症性単球が抗炎症作用を発揮して、炎症を沈静化することが判明した。さらなる解析から、IgE-CAI 皮膚病変部において IgE とアレルギーによって活性化された好塩基球から分泌された IL-4 が、浸潤してきた炎症性単球に作用して 2 型マクロファージ (M2) へと分化誘導すること、この炎症性単球の M2 への分化が抗炎症作用発揮には必

須であることが明らかとなった。

#### D. 考察

炎症性単球が末梢組織に浸潤すると炎症性の1型マクロファージ(M1)に分化することは、これまでよく知られていたが、本研究では好塩基球由来のIL-4の作用によって炎症性単球がM2マクロファージに分化するという新事実が明らかとなった。従来、M2マクロファージは、アレルギー炎症を誘導あるいは悪化させるものと考えられていたが、本研究により、過剰なアレルギー反応を抑制する働きがあることが判明した。今後、M2マクロファージによるアレルギー炎症抑制のメカニズムを解明することで、アトピー性皮膚炎の新規治療法の開発が進展するものと期待される。

#### E. 結論

皮膚アレルギー炎症部位に浸潤した炎症性単球が、好塩基球由来のIL-4の働きによって、M2マクロファージへと分化し、アレルギー炎症を終焉に向かわせることが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.* 188:1809-1818, 2012.
- 2) Ogawa, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- $\alpha$  on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420: 114-118, 2012.

- 3) Etori, M., Yonekubo, K., Sato, E., Mizukami, K., Hirahara, K., Karasuyama, H., Maeda, H., Yamashita, M.: Melanocortin Receptors 1 and 5 might mediate inhibitory effects of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on antigen-induced chronic allergic skin inflammation in IgE transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 132: 1925-1927, 2012.
- 4) Mukai, K., BenBarak, M., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I., Galli, S.J.: Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood* 120: 76-85, 2012.
- 5) Jin, G., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Le Huu, D., Ishii, T., Hasegawa, M., Obata, K., Karasuyama, H., Takehara, K., and Fujimoto, M.: Basophils and Mast Cells Play Critical Roles for Leukocyte Recruitment in IgE-Mediated Cutaneous Reverse Passive Arthus Reaction. *J. Dermatol. Sci.* 67: 181-189, 2012.
- 6) Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J-Y, Yoshikawa, S., Yamamoto, M., Kitamura, D., and Karasuyama, H.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-4471, 2012.
- 7) Shiraishi, Y., Jia, Y., Domenico, J., Joetham, A., Karasuyama, H., Takeda, K., and Gelfand, E.W.: Sequential engagement of Fc $\epsilon$ RI on mast cells and basophil histamine H4 receptor and Fc $\epsilon$ RI in allergic rhinitis. *J. Immunol.* in press.
- 8) Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., and Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived IL-4. *Immunity* in press.
- 9) 江川真由美、鳥山一：「好塩基球研究のアップデート」実験医学 30(6)：905-911, 2012
- 10) 壺岐美紗子、鳥山一：「好塩基球研究の進

展」特集「自然免疫 Update-研究最前線」医学のあゆみ 243(1): 78-83, 2012

- 11) 烏山 一: 「免疫系における好塩基球の重要性」免疫学 Update -分子病態の解明と治療への展開 南山堂 pp46-51, 2012

## 2. 学会発表

- 1) Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. The 2012 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea. 2012.04.13.
- 2) Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in protective and pathological immune responses. Innovation Summit Tokyo 2012-Chronic Inflammation and Autoimmune Diseases. Tokyo, 2012.04.18.
- 3) 烏山 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-山椒は小粒でもぴりりと辛い」第24回アレルギー学会春季臨床大会 大阪 2012.05.12.
- 4) Karasuyama, H.: The role of basophils revisited. EAACI Congress 2012. Geneva, Switzerland, 2011.06.17.
- 5) 烏山 一: 「皮膚のアレルギー炎症ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割」第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢 2012.07.14.
- 6) 烏山 一: 「アレルギー疾患ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割-山椒は小粒でもぴりりと辛い」第51回日本鼻科学学会幕張 2012.09.27.
- 7) Karasuyama, H.: Critical roles for basophils in allergy and protective immunity as revealed by the basophil-engineered mice. 29<sup>th</sup> Symposium CIA. Jeju, Korea, 2012. 10.19.
- 8) 烏山 一: 教育講演「アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の役割-日陰者が一気に檜舞台に」第74回日本血液学会学術集会. 2012. 10.21.

- 9) 烏山 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-日陰者が一気に檜舞台に」第76回小児アレルギー同好会 2012.11.10.
- 10) 烏山 一: 教育講演「新たな脚光を浴びる好塩基球-山椒は小粒でもぴりりと辛い」第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11.30.
- 11) Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. Centennial of Hashimoto Disease International Symposium. Fukuoka, 2012. 12.04.

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業(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

アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究

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 羽座沙都美 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生  
倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授  
烏山 一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫アレルギー分野 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎患者の皮膚には、多くの炎症性細胞の浸潤が観察される。これら炎症性細胞は、コントロールが非常に難しい痒みの発生に重要な役割を担っていることが推測される。これまでその役割が殆ど知られていなかった好塩基球が、アレルギー反応に重要な役割を担っていることが明らかにされてきている。そこで、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与に関して検討した。自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）の炎症部位皮膚には、多数の好塩基球の浸潤が観察された。一方、皮膚炎の発症していない健常マウスでは、皮膚内に好塩基球はほとんど観察されなかった。好塩基除去抗体 Ba103 の投与は、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的掻き動作（痒み関連動作）をコントロール抗体投与群と比較して有意に抑制した。以上の結果より、アトピー性皮膚炎の痒みに好塩基球が関与している可能性が示唆される。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎などの多くの皮膚疾患の主な症状の一つとして「痒み」がある。痒みは、非常に不快な感覚であり、また、痒みによる皮膚の掻爬は、皮膚症状の更なる悪化に加え、皮膚炎治療の妨げにもなっている。アトピー性皮膚炎の痒みに対して、痒みの第一選択としての H<sub>1</sub> histamine 受容体拮抗薬が無効である場合が多く、有効な治療薬がないのが現状である。そこで、新規鎮痒薬開発には、痒みの発生機序を十分理解する必要があるが、未だその機序に関しては明らかになっていない。

好塩基球は、その役割はほとんど知られていなかったが、近年、アレルギー疾患に重要な役割を担っていることが明らかになってきている。また、アトピー性皮膚炎患者の皮膚において、好塩基球の増加が観察されている。そこで、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与を検討した。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には、雄性自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）を用いた。NC マウスは、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した場合は、皮膚炎の発症は認められない健常状態を維持する。一方、微生物等制御されていない conventional 環境下で飼育した場合は、アトピー様の皮膚炎と自発的掻き動作を示すようになる。

2) 実験試薬

好塩基球の除去は Ba103 抗体（東京医歯大・烏山教授、二宮（小畑）先生より提供）あるいは、コントロール抗体（rat IgG2b κ）を尾静脈注射した。

3) 行動実験

Ba103 抗体あるいは、コントロール抗体尾静脈注射後 3 及び 4 日目にマウスの行動を観察した。



マウスを行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に 1 時間放置し、馴化した。その後、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、後肢による全身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) 免疫組織化学染色

マウス皮膚パラフィン切片を作製し、1 次抗体として好塩基球特異的抗体 (TUG8) と、続いて 2 次抗体として horseradish peroxidase-conjugated IgG と反応させた。発色は、diaminobenzidine を用いて行い、対比染色としてヘマトキシリンを用いた。

### C. 研究結果

#### 1) NC マウス

同週齢の SPF 環境下健常マウスと比べて conventional 環境下飼育マウスでは、後肢による全身 (主に、後肢のとどく頭部並びに吻側背部) への掻き動作数の有意な増加が観察された。また、conventional 環境下飼育マウスにおいて、吻側背部皮膚では、皮膚炎の発症、表皮の肥厚、並びに炎症性細胞浸潤が観察された。

#### 2) アトピー性皮膚炎マウスモデル皮膚における好塩基球浸潤

後肢で掻くことのできる吻側背部皮膚での好塩基球数は、SPF 環境下健常マウスと比べて有意に conventional 環境下飼育皮膚炎発症マウスで増加していた (Fig. 1)。また、掻くことのできない尾側背部皮膚では、SPF 及び conventional 環境下飼育マウスで、好塩基球数は、殆ど観察されなかった。

#### 3) 皮膚炎発症マウスモデルの自発的掻き動作に対する好塩基球除去抗体 Ba103 の効果

Conventional 環境下飼育皮膚炎発症マウスは、個体間に掻き動作数にバラツキがあるため、群分けを行って実験に使用した。

Ba103 投与マウスは、コントロール抗体マウス

投与群と比べて、投与後 3 並び 4 日目での掻き動作数評価において有意に自発的掻き動作数の減少が観察された。

#### D. 考察

本研究では、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルにおいて、炎症部位皮膚において好塩基球の増加が観察された。また、好塩基球除去抗体の処置により自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的掻き動作が抑制された。本抗体による好塩基球除去に関しては、Obata らの報告 (Blood, 2007) の方法に加え、抗体濃度を約 1.7 倍に増加させたことでより確実に好塩基球を減少させたと考えられる。したがって、本モデルの痒み反応への好塩基球の関与が示唆される。

好塩基球は、IL-4 や IL-13 などのサイトカイン類やヒスタミン、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、セリンプロテアーゼ (mMCP-11、カテプシン G) などを産生・遊離する。本実験に使用した NC マウスは、ヒスタミンに対する感受性は低く、また H<sub>1</sub> histamine 受容体拮抗薬では自発的掻き動作は抑制されないため、ヒスタミンの関与は小さいと考えられる。プロスタグランジン E<sub>2</sub> は、それ自身ほとんど掻き動作を誘発しないが、痒み物質による反応を増強する増強因子として知られている。したがって、好塩基球から遊離されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> が痒みの増強に関与しているかもしれない。これまでに NC マウスの自発的掻き動作にセリンプロテアーゼと proteinase-activated receptor 2 (PAR<sub>2</sub>) が関与していることを明らかにしてきた。また、トリプターゼ、コンパウンド 8/80 並びにガストリン遊離ペプチド誘発の掻痒反応や蚊アレルギー性掻痒反応、最近ではアトピー性皮膚炎との関連性も指摘されている皮膚糸状菌誘発掻痒反応においても PAR<sub>2</sub> が関与していること (Andoh et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2012) を明らかにしてきた。好塩基球から遊離される mMCP-11 は、セリンプロテアーゼの一つであり、Arg の隣を切断する。PAR<sub>2</sub> の活性化には、受容体 N 末端の-Arg-Ser-間が切断される必要がある。したがって、mMCP-11 は、

PAR<sub>2</sub> を活性化する可能性があり、PAR<sub>2</sub> を介して痒みを誘発するかもしれないことが示唆される。更に、カテプシン G もまた、セリンプロテアーゼであり、痒みへの関与は報告されてないが PAR<sub>2</sub> を活性化することが知れていることから、PAR<sub>2</sub> を介して痒みを誘発する可能性がある。プロテアーゼによる痒み反応は、全て PAR<sub>2</sub> を介しているわけではなく、近年、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E が PAR<sub>2</sub> を介さないでエンドセリン-1 前駆体のプロセッシングを行い、エンドセリン-1 を介して痒み反応を誘発することが明らかにされた (Andoh et al., Eur. J Pharmacol., 2012)。好塩基球から遊離されるプロテアーゼ類には、PAR<sub>2</sub> 活性化以外に、痒み関連因子前駆体のプロセッシングを介して痒みを誘発する可能性が示唆される。今後、好塩基球から遊離される因子と痒みとの関係ならびに好塩基球活性化に関して検討していく予定である。

#### E. 結論

健常皮膚ではほとんど認められない好塩基球のアトピー性皮膚炎皮膚で増加が難治性の痒みの発生に関与していることが示唆される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) **Andoh T.**, Yoshida T., Lee J.B., Kuraishi Y. Cathepsin E induces itch-related response through the production of endothelin-1 in mice. Eur. J. Pharmacol. 686: 16-21, 2012.
- 2) **Andoh T.**, Takayama Y., Yamakoshi T., Lee J.B., Sano A., Shimizu T., Kuraishi Y. Involvement of serine protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 343: 91-96 (2012)
- 3) **安東嗣修**, 倉石 泰 : 温清飲による痒みの抑制機序. *phil 漢方* 40: 26-28, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) **安東嗣修**, 桑園 崇, 倉石泰 : マウスにおける

ガストリン遊離ペプチド誘発の痒みへのマスト細胞の関与. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.

- 2) 吉田哲郎, **安東嗣修**, 倉石泰 : マウスにおいてカテプシン E がエンドセリン-1 を介して痒み関連反応を誘発する. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- 3) 歌 大介, 後藤義一, **安東嗣修**, 倉石 泰, 井本敬二, 古江秀昌 : In vivo パッチクランプ記録法を用いた成熟ラット脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス伝達. 第 89 回日本生理学会大会. 2012, 3, 29-31, 長野.
- 4) **安東嗣修** : どうしても止めたい「かゆみ」。でも「かゆみ」ってどうやって起こるの? 平成 24 年度富山大学 富山駅前サテライト公開講座. 2012, 5, 19, 富山.
- 5) **Andoh T.**, Harada A., Kuraishi Y. Interleukin-31-induced pruritus: involvement of leukotriene B<sub>4</sub> released from epidermal keratinocytes in mice. 42nd Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 2012, 9, 19-22, Venice, Italy.
- 6) 高山祐輔, **安東嗣修**, 倉石 泰 : Keratin 分解酵素 keratinase の proteinase-activated receptor-2 を介した痒み誘発機序. 第 63 回日本薬理学会北部会, 2012, 9, 14, 新潟.
- 7) **安東嗣修**, 倉石 泰 : ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 E6005 はマウスの痒み関連反応を抑制する. 第 22 回国際痒みシンポジウム, 2012, 10, 6, 東京.
- 8) 佐々木淳, アディカリスバース, **安東嗣修**, 倉石泰 : マウス帯状疱疹性掻痒の薬理学的特徴. 第 22 回国際痒みシンポジウム, 2012, 10, 6, 東京.
- 9) **Andoh T.**, Kuraishi Y. Inhibitory effects of a phosphodiesterase 4 inhibitor (E6005) on itch-related behavior and cutaneous nerve activity in mice. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.

10) Uta D., **Andoh T.**, Imoto K., Furue H. In vivo puritic synaptic responses elicited by cutaneous 5-HT application in the superficial spinal dorsal horn of adult rats. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)  
なし

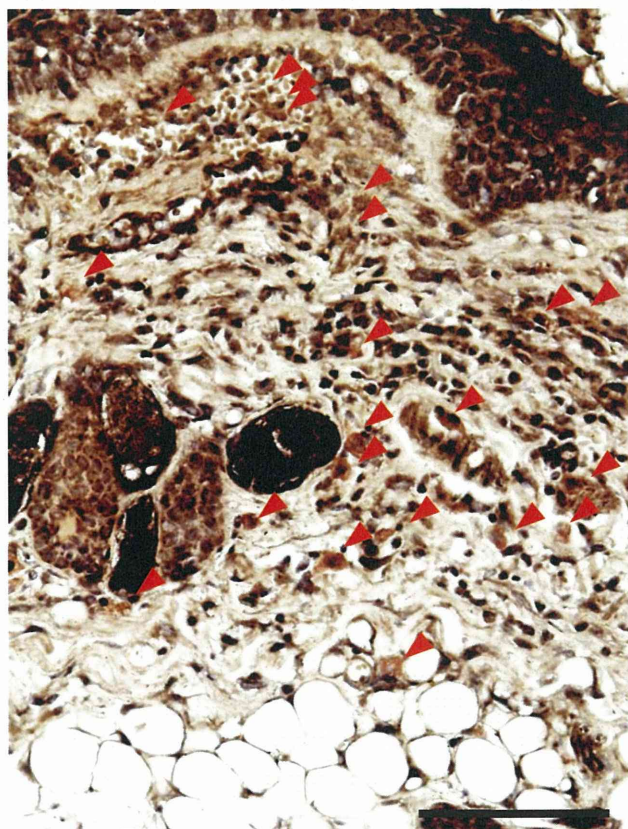


Fig. 1. 皮膚炎発症マウス皮膚における好塩基球  
皮膚炎発症マウスの炎症部位における好塩基球  
(矢頭) の分布。Scale bar: 100  $\mu$ m

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業(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

アトピー性皮膚炎モデルとかゆ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 梶島健治 京都大学医学研究科皮膚科学 准教授  
中島沙恵子 京都大学医学研究科皮膚科学 研究員

**研究要旨** アトピー性皮膚炎はそう痒を伴う慢性の湿疹である。また、近年、一部のアトピー性皮膚炎の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められ、フィラグリン発現低下によるバリア機能異常がアトピー性皮膚炎の原因と考えられるようになった。

一方、アトピー性皮膚炎のそう痒は、蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤のそう痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外のそう痒伝達物質の存在が示唆される。また、シクロスポリンがアトピー性皮膚炎のそう痒抑制に有効であることより T 細胞が産生するそう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そう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そう痒の抑制と共に IL-31 の血清中の濃度も低下することを我々は昨年示した(Otsuka A et al.Eur J Dermatol.2011)。以上の結果より、IL-31 は、アトピー性皮膚炎のそう痒誘発に関与している可能性が示唆される。

このようなアトピー性皮膚炎の瘙痒の特徴を考える際に、小動物を用いて解析し、その結果をヒトの臨床との整合性を検証するという作業が重要である。そこで、ヒトの病態に近いフィラグリン遺伝子変異によるマウスアトピー性皮膚炎モデルを開発し、そう痒の評価系を形成し、IL-31 などのそう痒誘発分子の影響を検証することを本研究の目的とする。本年度は、フィラグリン遺伝子のみの変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、アトピー性皮膚炎モデルとしての可能性を検証する。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎はそう痒を伴う慢性の湿疹である。また、近年、一部のアトピー性皮膚炎の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められ、フィラグリン発現低下によるバリア機能異常がアトピー性皮膚炎の原因と考えられるようになった。

一方、アトピー性皮膚炎のそう痒は、蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤のそう痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外のそう痒伝達物質の存在が示唆される。また、シクロスポリンがアトピー性皮膚炎のそう痒抑制に有効であることより T 細胞が産生するそう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そう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そう痒の抑制と共に IL-31 の血清中の濃度も低下することを我々は昨年示した(Otsuka A et al.Eur J Dermatol.2011)。以上の結果より、IL-31 は、アトピー性皮膚炎のそう痒誘発に関与している可能性が示唆される。

このようなアトピー性皮膚炎の瘙痒の特徴を考える際に、小動物を用いて解析し、その結果をヒトの臨床との整合性を検証するという作業が重要である。そこで、ヒトの病態に近いフィラグリン

遺伝子変異によるマウスアトピー性皮膚炎モデルを開発し、そう痒の評価系を形成し、IL-31 などのそう痒誘発分子の影響を検証することを本研究の目的とする。本年度は、フィラグリン遺伝子のみの変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、アトピー性皮膚炎モデルとしての可能性を検証する

B. 研究方法

近年アトピーモデルとして用いられているフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウス(Moniaga CS et al. Am J Pathol.2010)を C57BL/6 マウスでバッククロスし、本マウスの詳細な解析の施行を可能にする。本マウスの免疫学的特徴と痒みの評価を実施する。

(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