

平成24年度 厚生労働科学研究補助金
(難治性疾患克服研究事業)
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
班会議

開催日：平成24年12月14日(金)

会場：東京医科歯科大学

M&Dタワー16F 小会議室2

平成24年度 厚生労働科学研究補助金

(難治性疾患克服研究事業(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班班会議

平成24年12月14日(金)(13:00-15:10) 東京医科歯科大学 M&Dタワー 16F小会議室2

座長: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

13:00-13:05

1. 班長挨拶

研究発表 (1人10分、質疑応答5分)

13:05-13:20

2. アトピー性皮膚炎の皮膚症状のアンケート調査

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

13:20-13:35

3. 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

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

13:35-13:50

4. 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

安東嗣修

富山大学大学院薬学研究部 応用薬理学

13:50-14:05

5. マウスアトピー性皮膚炎モデルの確立

椛島健治、宮地良樹

京都大学大学院医学研究科 皮膚科学

14:05-14:20

6. 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

戸倉新樹

浜松医科大学 皮膚科学

14:20-14:35

7. アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立に向けて

室田浩之、片山一朗

大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科教室

14:35-14:50

8. 痒疹モデルマウスの樹立とその解析

端本宇志、佐藤貴浩
防衛医科大学校 皮膚科
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

14:50-15:05

9. 今後の予定生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

金田安史
大阪大学大学院医学系研究科 医学系研究科遺伝子治療学講座

15:05-15:10

10. 今後の予定について

班長 横関博雄

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

研究分担者 鳥山 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学分野教授

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.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。

C.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。

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。

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准教授

A.研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性の掻痒性皮膚疾患の一つである。アトピー性皮膚炎による激しい痒みは、患者のQOLを損なうだけでなく、皮膚炎の更なる悪化に加え、皮膚炎治療の妨げにもなる。また、このような痒みは、痒みの第一選択薬であるH₁ヒスタミン受容体拮抗薬では、コントロールできない場合が多く、その対策が急務となっている。しかしながら、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序の詳細は、未だ不明である。近年、これまでその役割が殆ど理解されていなかった好塩基球が様々な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されてきた。そこで、アトピー性皮膚炎の素因の一つにアレルギーがあることから、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の役割を解明する目的で、自然発症アトピー様皮膚炎誘発マウスモデル（NCマウス）を用いて、その自発的痒み関連動作である掻き動作発生への好塩基球の関与を検討した。

B.方法

実験には、雄性NC系マウスを用いた。NCマウスは、微生物制御された環境下（SPF：specific pathogen free）で飼育すると健康状態を保っており、皮膚炎や痒み関連動作（掻き動作）はほとんど誘発されない。一方、微生物制御されていない（conventional）環境下で飼育すると、アトピー様の皮膚炎並びに自発的掻き動作を誘発するようになる。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秒間に数回後肢で掻くので、足を挙げて降ろすまでの一連の掻き動作を1回として、全身への掻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。

C.結果

健康NCマウスと比べて、アトピー様皮膚炎誘発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。皮膚炎は、特に、後肢のとどく吻側背部、顔面、及び耳に対して顕著に起こっていた。一方、尾側背部皮膚では、皮膚炎の程度は小さかった。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、健康マウスと比べて有意に好塩基球の増加が認められた。一方、尾側背部皮膚では、健康及び皮膚炎マウスに差はなかった。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。

D.考察

アトピー様皮膚炎誘発NCマウスでは、健康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。このことは、掻くことあるいはその結果生じる炎症反応により好塩基球の遊走を促進している可能性が示唆される。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。好塩基球は、histamine、IL-4などのサイトカイン、アラキドン酸代謝物、プロテアーゼ類などを痒みに関連する因子を産生・遊離する。したがって、今後検討は必要であるが、これら好塩基球由来因子が、アトピー性皮膚炎の痒み誘発や増強に加え、持続に関与しているかもしれない。

E.結論

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。

マウスアトピー性皮膚炎モデルの確立

研究分担者 宮地良樹
京都大学医学研究科皮膚科学教授
連携研究者 椛島健治
京都大学医学研究科皮膚科学准教授

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.方法

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。

C.結果

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、sclabra 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。

D.考察

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、C57BL/6 マウスをコントロールとした解析、あるいは、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を各種遺伝子改変マウスと掛け合わせるにより可能となる。

E.結論

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。

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

研究分担者 戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科学教授
研究協力者 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

A.研究目的

アトピー性皮膚炎 (AD) は外因性と内因性に分別することができる。外因性は通常型であり、IgE 高値で、AD の約 80%を占め、IgE 介在性のアレルギー機序によるタイプである。一方、内因性 AD は IgE が正常域であり、IgE に依存しない反応に基づき、AD の約 20%を占め、女性が多い。外因性 AD はフィラグリン欠乏などにより皮膚バリア機能が障害されており、内因性 AD は皮膚バリア機能が正常でフィラグリン遺伝子変異頻度が高くない。日常診療の段階で、皮疹の性状から、両者を鑑別することはほぼ困難である。我々両者の違いを臨床症状、かゆみ関連因子において明らかにし、内因性 AD の本質的事項を浮き上がらせることを試みた。

B.方法

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) 不安度：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

C.結果

内因性 AD を、「血清 IgE 値 200 IU/L 未満」または「血清 IgE 値 500 IU/L 未満かつ Df または Dp 特異的 IgE が class 0 または 1」と定義した。AD 患者は、48 人の外因性 AD (29.4±16.2 歳、M:F 36:14、VAS 53.6、血清 IgE 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、VAS 52.3、血清 IgE 136.7±151.7IU/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。さらに IgE 値を層別化すると、IgE 100 以下でのグループで Co 63%、Ni 63%、Cr 38%に陽性率を示し、IgE 500 以上のグループでのそれぞれの陽性率 (Co 13%、Ni 26%、Cr 22%) と対比された。

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。また我々の今回の調査ではフィラグリン遺伝子変異は外因性であっても 20%を超えるものではなかった。

E.結論

内因性 AD、痒疹、金属アレルギーの関連が明らかとなった。

アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

研究分担者 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

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

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎において痒みは主要な症状の1つとして知られる。既存の痒み治療に抵抗性を示す症例は多く、難治化メカニズムの解明と対策方法の立案が患者しいては社会に貢献できるものと期待される。アトピー性皮膚炎の痒み誘起因子には引用可能な報告があり、「温熱、発汗」が最大の悪化因子とされている。本研究ではこれらの悪化因子が誘導する痒みを選択的に抑制するアトピー性皮膚炎の新しい治療戦略確立を目的とする。

B. 方法

皮膚表面の刺激が中枢あるいは末梢神経の影響を受け増感されることで通常はかゆみに感じられない刺激がかゆみに感じられることがある（アロネシス）。実際にアトピー性皮膚炎では通常疼痛を感じる熱刺激がかゆみを誘発すると報告されている。私達は近年、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。

C. 結果

アーテミンがヒトのアトピー性皮膚炎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。

D. 考察

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。

E. 結論

アーテミンは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。

痒疹モデルマウスの樹立とその解析

研究分担者 佐藤貴浩
防衛医科大学校皮膚科教授
研究代表者 横関博雄
東京医科歯科大学皮膚科教授
研究協力者 端本宇志
防衛医科大学校皮膚科助教

A. 研究目的

難治性のアトピー性皮膚炎の皮膚症状の一つとして痒疹があり、その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 依存的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。本研究では、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、その病態を解析することを目的とした。

B. 方法

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。

C. 結果

TNP-OVA を耳介皮内に反復投与した 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。この状態での自発的な搔破行動を計測すると、有意な搔破回数の増加がみられた。

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 日目に角化をとまなう充実性の紅色丘疹が出現した。この反応はマウス好塩基球特異的除去抗体の投与により減弱した。

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。

病変部をホモジネートした上清を用いた ELISA では、IL-4、-13、-5、-17、-22、IFN- γ 、NGF、TGF- β 1 が上昇しており、定量的 RT-PCR では IL-31 mRNA の産生も増加していた。

この痒疹様反応は、TNP-IgE で受働免疫した B57BL/6 マウスに TNP-OVA を反復投与しても誘導された。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。

D. 考察

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 (Park K *et al*, *Eur J Dermatol*, 2011)、病変部の表皮核内に pSTAT3、pSTAT6 が局在していること (Fukushi S *et al*, *Br J Dermatol*, 2011) が報告されている。今回作成したマウスの皮膚病変は、組織学的にも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、STAT6 欠損マウスではこの反応は予想に反して増強しており、STAT6 が病態にどのように関与しているのか今後詳細な解析が必要であると考えた。

E. 結論

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病変を作成した。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。

生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

研究分担者 金田安史
大阪大学大学院医学系研究科教授

A.研究目的

HVJ-E ベクターは 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。最近では遠心を用いなくても封入でき、初代培養リンパ球にも導入できるプロトコールが完成している。すでにアレルギー性鼻炎マウスモデルでアレルゲン (卵白アルブミン) の封入 HVJ-E の鼻腔内投与による IgE 産生の抑制、STAT6 を抑制するデコイオリゴ核酸を封入して、アトピー皮膚炎のモデルマウスで治療効果が検証されている。核酸を導入できる方法は数多くある中で、何故このベクターが効果があるのか、その作用機構の解明を目指した。

B.方法

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^{-/-}TRIF^{-/-}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

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)- γ 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 のみを滴下しても脾臓細胞での IFN- γ の産生は誘導されず、また IL-4, IL-5 の産生もなかった。健常マウスの脾臓細胞に HVJ-E をかけても IFN- β , γ は産生されないが、骨髄由来の樹状細胞からは IFN- β は産生された。そこで HVJ-E 処理した樹状細胞の培養液で脾臓細胞を培養すると IFN- γ の産生が見られた。HVJ-E による樹状細胞からの IFN- β の産生機構を解析するため、Myd88^{-/-}TRIF^{-/-}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。一方、RIG-I siRNA を導入した樹状細胞では HVJ-E による IFN- β 産生は著明に抑制された。

D.考察

HVJ-E は樹状細胞から IFN- β 産生を促し、これにより脾臓細胞からの IFN- γ 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- γ 産生を促したのではないかと考えられる。また HVJ-E による樹状細胞からの IFN- β 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

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。

平成 24 年度 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 開発班 班会議

議事録(文責:井川 健)

平成 24 年 12 月 14 日(金)(13:00-15:00)

東京医科歯科大学 M&D タワー 16F 小会議室2

出席者:井川 健、烏山 一、安東嗣修、中島沙恵子、椛島健治、宮地良樹、戸倉新樹、室田浩之、片山一朗、
端本宇志、金田安史、高森建二、三橋善比古(敬称略・発表順)

1. 班長挨拶 横関博雄

本研究ではアトピー性皮膚炎の難治性病変である痒疹病変、顔面紅斑、紅皮症など病変ごとの発症頻度、
診療ガイドライン作成と病変の免疫学的炎症反応の解析、Th2型免疫の亢進によるIgE抗体産生異常等をター
ゲットとした新規治療法を樹立することを目的としております。また、アトピー性皮膚炎の病型(内因性、外因性)
と(難治性)皮膚症状の関連についてのアンケート調査を施行することも考えておりますので、活発なご検討よ
ろしく願っています。

II. 研究計画発表

1. アトピー性皮膚炎の皮膚症状のアンケート調査

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

近年、アトピー性皮膚炎を内因性、外因性と大きく分類することが提唱されており、その分類が、実際の臨床
所見、症状とリンクしている可能性があることが浜松医大の戸倉教授の検討からも推測される。

今回、このような視点からのアトピー性皮膚炎の分類と、アトピー性皮膚炎でみられる皮膚症状、特に、痒疹反
応などを含めた難治性皮膚症状との関連を、班会議にご参加くださっている全施設においてアンケート調査を
行うことにより、詳細に、また規模を大きくして検討することを提案させていただいた。

2. 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

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

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。そのことによって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。

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。

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。

3. 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

安東嗣修

富山大学大学院薬学研究部 応用薬理学

アトピー性皮膚炎による激しい痒みは、患者の QOL を損なうだけでなく、皮膚炎の更なる悪化に加え、皮膚炎治療の妨げにもなる。また、このような痒みは、痒みの第一選択薬である H₁ ヒスタミン受容体拮抗薬では、コントロールできない場合が多く、その対策が急務となっている。しかしながら、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序の詳細は、未だ不明である。近年、これまでその役割が殆ど理解されていなかった好塩基球が様々な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されてきた。本研究では、自然発症アトピー様皮膚炎誘発マウスモデル(NC マウス)を用いて、その自発的痒み関連動作である搔き動作発生への好塩基球の関与を検討した。

健常 NC マウスと比べて、アトピー様皮膚炎誘発 NC マウスでは、明らかな皮膚炎及び自発的搔き動作が誘

発した。皮膚炎は、特に、後肢のとどく吻側背部、顔面、及び耳に対して顕著に起こっていた。一方、尾側背部皮膚では、皮膚炎の程度は小さかった。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。一方、尾側背部皮膚では、健常及び皮膚炎マウスに差はなかった。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。

アトピー様皮膚炎誘発 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。このことは、掻くことあるいはその結果生じる炎症反応により好塩基球の遊走を促進している可能性が示唆される。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。好塩基球は、histamine、IL-4 などのサイトカイン、アラキドン酸代謝物、プロテアーゼ類などを痒みに関連する因子を産生・遊離する。したがって、今後検討は必要であるが、これら好塩基球由来因子が、アトピー性皮膚炎の痒み誘発や増強に加え、持続に関与しているかもしれない。これらの結果から、好塩基球が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と考えた。

4. マウスアトピー性皮膚炎モデルの確立

中島沙恵子、椛島健治、宮地良樹
京都大学大学院医学研究科 皮膚科学

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癢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。

まず、フィラグリン変異を有するマウスである flaky tail マウス(Moniaga CS et al. Am J Pathol.2010)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。今後、このマウスを用いて、そう痒に対する 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を各種遺伝子改変マウスと掛け合わせるにより検討する。

5. 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

戸倉新樹

浜松医科大学 皮膚科学

アトピー性皮膚炎(AD)は外因性と内因性に分別することができる。外因性は通常型であり、IgE 高値で、AD の約 80%を占め、IgE 介在性のアレルギー機序によるタイプである。一方、内因性 AD は IgE が正常域であり、IgE に依存しない反応に基づき、AD の約 20%を占め、女性が多い。外因性 AD はフィラグリン欠乏などにより皮膚バリア機能が障害されており、内因性 AD は皮膚バリア機能が正常でフィラグリン遺伝子変異頻度が高くない。日常診療の段階で、皮疹の性状から、両者を鑑別することはほぼ困難である。我々両者の違いを臨床症状、かゆみ関連因子において明らかにし、内因性 AD の本質的事項を浮き上がらせることを試みた。なお、内因性 AD を、「血清 IgE 値 200 IU/L 未満」または「血清 IgE 値 500 IU/L 未満かつ Df または Dp 特異的 IgE が class 0 または 1」と定義した。

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) 不安度: 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

AD 患者は、48 人の外因性 AD (29.4±16.2 歳、M:F 36:14、VAS 53.6、血清 IgE 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、VAS 52.3、血清 IgE 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であったが、20%を超えるものではなかった。また、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。さらに IgE 値を層別化すると、IgE 100 以下でのグループで Co 63%、Ni 63%、Cr 38%に陽性率を示し、IgE 500 以上のグループでのそれぞれの陽性率 (Co 13%、Ni 26%、Cr 22%) と対比された。

6. アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

室田浩之、片山一朗

大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科教室

アトピー性皮膚炎において痒みは主要な症状の1つとして知られる。既存の痒み治療に抵抗性を示す症例は多く、難治化メカニズムの解明と対策方法の立案が患者しいては社会に貢献できるものと期待される。アトピー性皮膚炎の痒み誘起因子には引用可能な報告があり、「温熱、発汗」が最大の悪化因子とされている。本研究ではこれらの悪化因子が誘導する痒みを選択的に抑制するアトピー性皮膚炎の新しい治療戦略確立を目的とする。

皮膚表面の刺激が中枢あるいは末梢神経の影響を受け増感されることで通常はかゆみに感じられない刺激がかゆみに感じられることがある(アロネシス)。実際にアトピー性皮膚炎では通常疼痛に感じる熱刺激がかゆみを誘発すると報告されている。私達は近年、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。そこで、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とともに、アーテミンの局在を実際のアトピー性皮膚炎の症例において検討した。

結果としては、アーテミンがヒトのアトピー性皮膚炎の皮膚病変部真皮に蓄積していることが確認され、また、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。

これらの結果から、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た。従って、アーテミンは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。

7. 痒疹モデルマウスの樹立とその解析

端本宇志、佐藤貴浩

防衛医科大学校 皮膚科

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

難治性のアトピー性皮膚炎の皮膚症状の一つとして痒疹があり、その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依存的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。本研究では、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、その病態を解析することを目的とした。

TNP-OVAを耳介皮内に反復投与した 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。この状態での自発的な搔破行動を計測すると、有意な搔破回数の増加がみられた。

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。この反応はマウス好塩基球特異的除去抗体の投与により減弱した。

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。

病変部をホモジネートした上清を用いた ELISA では、IL-4, -13, -5, -17, -22, IFN- γ , NGF, TGF- β 1 が上昇しており、定量的 RT-PCR では IL-31 mRNA の産生も増加していた。

この痒疹様反応は、TNP-IgE で受働免疫した B57BL/6 マウスに TNP-OVA を反復投与しても誘導された。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。

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 (Park K *et al*, Eur J Dermatol, 2011)、病変部の表皮核内に pSTAT3, pSTAT6 が局在していること (Fukushi S *et al*, Br J Dermatol, 2011) が報告されている。今回作成したマウスの皮膚病変は、組織学的にも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、STAT6 欠損マウスではこの反応は予想に反して増強しており、STAT6 が病態にどのように関与しているのか今後詳細な解析が必要であると考えた。

8. 今後の予定生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

金田安史

大阪大学大学院医学系研究科 医学系研究科遺伝子治療学講座

HVJ-E ベクターは 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。最近では遠心を用いなくても封入でき、初代培養リンパ球にも導入できるプロトコールが完成している。すでにアレルギー性鼻炎マウスモデルでアレルゲン (卵白アルブミン) の封入 HVJ-E の鼻腔内投与による IgE 産生の抑制、STAT6 を抑制するデコイオリゴ核酸を封入して、アトピー皮膚炎のモデルマウスで治療効果が検証されている。核酸を導入できる方法は数多くある中で、何故このベクターが効果があるのか、その作用機構の解明を目指した。

アレルギー性-鼻炎マウスの鼻腔内にHVJ-Eのみを滴下したところ、脾臓細胞からの interferon (IFN)- γ 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 のみを滴下しても脾臓細胞からの IFN- γ の産生は誘導されず、また IL-4, IL-5 の産生もなかった。健常マウスの脾臓細胞に HVJ-E をかけても IFN- β , γ は産生されないが、骨髄由来の樹状細胞からは IFN- β は産生された。そこで HVJ-E 処理した樹状細胞の培養液で脾臓細胞を培養すると IFN- γ の産生が見られた。HVJ-E による樹状細胞からの IFN- β の産生機構を解析するため、Myd88^{-/-}TRIF^{-/-}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。一方、RIG-I siRNA を導入した樹状細胞では HVJ-E による IFN- β 産生は著明に抑制された。

すなわち、HVJ-E は樹状細胞から IFN- β 産生を促し、これにより脾臓細胞からの IFN- γ 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- γ 産生を促したのではないかと考えられた。また HVJ-E による樹状細胞からの IFN- β 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。このように、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と考えられた。



