

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して好塩基球由来の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- 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。

研究分担者

佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科 教授
片山一郎 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

椋島健治 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

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

A. 研究目的

本研究は重症型アトピー性皮膚炎（AD）におけ

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

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。脾臓細胞や骨髓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

1) 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、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。

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、scIba 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)- 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- β は産生された。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。

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- 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

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 T : 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 ϵ RI, but not Fc γ 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 AQP5 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