

血球 (AD 1-3) は MGL\_1304 添加によりヒスタミン遊離を起すが、健常人血球 (HC 1-3) は起こさなかった。

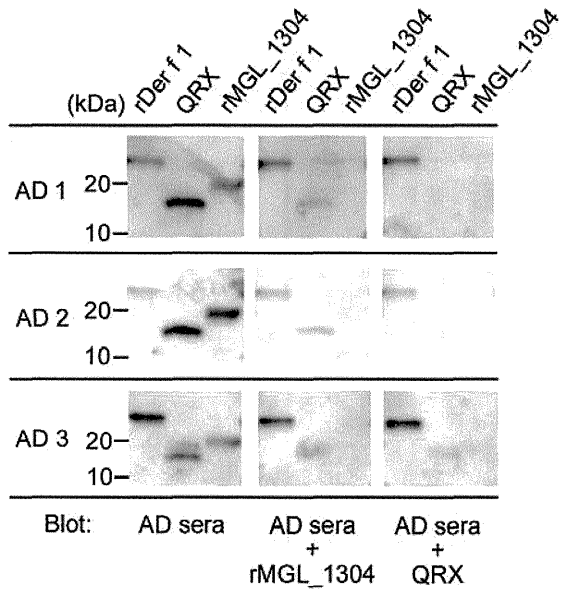


図3 組換えMGL\_1304 (rMGL\_1304) は精製汗抗原 (QRX) と交差する。  
AD患者血清をrMGL\_1304で前処理すると、QRXに対するIgEの結合が減弱し (中央)、逆にAD患者血清をQRXで前処理すると、rMGL\_1304に対するIgEの結合が消失する。

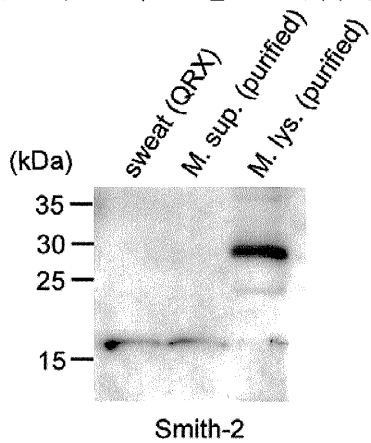


図4 汗中、*M. globosa*培養上清中、*M. globosa*菌体内のMGL\_1304を汗抗原特異的モノクローナル抗体 (Smith-2) で免疫ブロットを行った。MGL\_1304は、汗中、培養上清中では17 kDa、菌体内では29 kDaを示す。

## 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とアトピー性皮膚炎が睡眠や就労に与える影響に関する研究

分担研究者 佐伯秀久 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎(AD)は強い痒みを伴うことが特徴であり、そのために睡眠障害を来すことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中の AD 患者にアンケート調査を実施し、AD が睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。仕事の生産性および活動障害 (WPAI) に関する質問票のなかで、AD を対象としたもの (WPAI-AD) の日本語版の有用性を確認した後、慈恵医大病院皮膚科通院中の AD 患者にアンケート調査を実施した。WPAI には対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの (WPAI-PSO) が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者 213 名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度 (TWPI) は  $27.2 \pm 24.6$  %で、乾癬の重症度スコア (PASI) と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度 (TAI) は  $35.9 \pm 27.8$  %で、やはり PASI と有意な正の相関を認めた。次に、WPAI-AD の日本語版の有用性が確認され、WPAI のホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中の AD 患者 112 名に対してアンケート調査を実施した。AD 患者の TWPI は  $32.8 \pm 23.7$  %で、AD の重症度スコア (SCORAD) と有意な正の相関が認められた。AD における TAI は  $42.9 \pm 25.2$  %で、やはり SCORAD と有意な正の相関を認めた。今回の解析結果から、AD 患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。また、AD 患者の睡眠の障害度 (PSQI) は  $7.3 \pm 2.8$  で、SCORAD や皮膚疾患特異的 QOL スコア (DLQI) と有意な正の相関が認められた。以上より、AD 患者では重症なほど睡眠の質も低下することが示された。なお、Th17 細胞から産生されるサイトカインである IL-22 の遺伝子多型解析の結果、乾癬患者とは有意な相関を認めたが、AD 患者とは有意な相関を認めなかった。

## 研究協力者

石地尚興 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授  
石氏陽三 東京慈恵会医科大学皮膚科助教  
堀田健人 東京慈恵会医科大学皮膚科  
佐藤純子 東京慈恵会医科大学皮膚科  
東福有佳里 東京慈恵会医科大学皮膚科

ことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者にアンケート調査を実施し、アトピー性皮膚炎が睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。

## A. 研究目的

(1) アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析では、平成 20～22 年度において、東大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者 119 名よりサンプル採取および背景情報を取得した。平成 23～25 年度は、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者よりサンプル採取および背景情報を取得した後、理化学研究所に送付し、遺伝子解析を引き続き行うことにした。

(2) アトピー性皮膚炎は強い痒みを伴うことが特徴であり、そのために睡眠障害を来す

## B. 研究方法

(1) 東京慈恵会医科大学附属病院皮膚科を通院中のアトピー性皮膚炎患者 100 名を目標に、文書で本研究に対して同意を得た患者から血液検体、アンケート票 (「医師調査票」と ISSAC13-14 を元に作成した「患者アンケート票」) を回収し解析する。血液検体は理化学研究所に送付し、遺伝子解析を行う。

(2) 慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者 112 名を対象に、仕事の生産性および活動障害 (WPAI) に関する質問票と比

ツツバーク睡眠質問票 (PSQI) を用いた調査を実施した。

### C. 研究結果

(1) 東京慈恵会医科大学皮膚科では、平成 25 年 1 月 8 日現在、アトピー性皮膚炎患者 84 名および対照疾患としての乾癬患者 90 名よりサンプル採取および背景情報を取得し、理化学研究所に検体を送付した。また、IL-22 遺伝子多型解析で、乾癬患者とは有意な相関を認めたが、アトピー性皮膚炎患者とは有意な相関を認めなかった。

(2) WPAI には対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの (WPAI-PSO) が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者 213 名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度 (Total Work Productivity Impairment: TWPI) は  $27.2 \pm 24.6\%$  で、乾癬の重症度スコア (Psoriasis Area and Severity Index: PASI) と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度 (Total Activity Impairment: TAI) は  $35.9 \pm 27.8\%$  で、やはり PASI と有意な正の相関を認めた。また、 $PASI < 10$ ,  $10 \leq PASI \leq 20$ ,  $20 < PASI$  の 3 群で比較すると、PASI の高値群ほど TWPI, AI とともに値が高くなり、 $20 < PASI$  群とそれ以外の群の間では有意差が認められた。

次に、アトピー性皮膚炎を対象とした WPAI (WPAI-AD) の日本語版の有用性が確認され、WPAI のホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者 112 名に対してアンケート調査を実施した。アトピー性皮膚炎患者の TWPI は  $32.8 \pm 23.7\%$  で、アトピー性皮膚炎の重症度スコア (SCORing of Atopic Dermatitis: SCORAD) と有意な正の相関が認められた。アトピー性皮膚炎における TAI は  $42.9 \pm 25.2\%$  で、やはり SCORAD と有意な正の相関を認めた。また、 $SCORAD < 20$ ,  $20 \leq SCORAD < 40$ ,  $40 \leq SCORAD$  の 3 群で比較すると、SCORAD の高値群ほど TWPI, AI とともに値が高くなり、 $40 \leq SCORAD$  群とそれ以外の群の間で有意差が認められた。

アトピー性皮膚炎患者の睡眠の障害度 (PSQI) は  $7.3 \pm 2.8$  で、SCORAD や皮膚疾患特異的 QOL スコア (DLQI) と有意な正の相関が認められた (DLQI との相関の方がより強かつ

た)。また、 $SCORAD < 20$ ,  $20 \leq SCORAD < 40$ ,  $40 \leq SCORAD$  の 3 群や、 $DLQI < 5$ ,  $5 \leq DLQI < 10$ ,  $10 \leq DLQI$  の 3 群で比較すると、SCORAD や DLQI の高値群ほど PSQI の値が高くなり、有意差を認めた。さらに、PSQI の下位尺度でサブ解析をしたところ、SCORAD とは主観的な睡眠の質や入眠時間が、DLQI とは主観的な睡眠の質や入眠時間に加えて、睡眠効率、睡眠困難、日中の眠気が有意に相関した。

### D. 考察

(1) 乾癬は炎症性角化症に属する Th1/Th17 優位の皮膚疾患で、Th2 優位であるアトピー性皮膚炎の対照疾患として比較されることが多い。IL-22 は Th17 細胞から産生されるサイトカインで、乾癬の病態に重要な役割を果たすと考えられている。アトピー性皮膚炎でも Th17 細胞の関与が報告されているが、今回の解析結果からは、IL-22 は乾癬でより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) 乾癬患者では重症なほど労働生産性が低下していることが確かめられた。また、アトピー性皮膚炎患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。また、アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠の質も低下することが示された。SCORAD に比べて DLQI は PSQI とより強く相関しており、夜間の痒みや搔破行動以外に、気分の障害もアトピー性皮膚炎患者における睡眠障害に関与している可能性が示唆された。今後はアトピー性皮膚炎患者における気分の障害と睡眠障害との関連についても検討する必要がある。

### E. 結論

(1) 今回の遺伝子多型解析結果から、IL-22 はアトピー性皮膚炎よりも乾癬でより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) アトピー性皮膚炎患者では重症なほど労働生産性や睡眠の質が低下することが示された。

### F. 健康危惧情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

(1) 佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純子、東福有佳里、中川秀己：アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠の質が低下する。第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、名古屋、2013 年 11 月 2-3 日

(2) 佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純子、東福有佳里、中川秀己：アトピー性皮膚炎患者では重症なほど労働生産性や日常活動が低下する。第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2013 年 11 月 28-30 日

## 2. 論文発表

(1) Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genetic polymorphisms in the *IL22* gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci* 71: 148-50, 2013.

(2) Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiuchi Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 40: 736-9, 2013.

(3) Hayashi M, Saeki H, Ito T, Fukuchi O, Umezawa Y, Katayama H, Tanito K, Igarashi A, Eto H, Hasegawa T, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with psoriasis. *J Dermatol Sci* 72: 188-91, 2013.

(4) Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiuchi Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on sleep quality in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 72: 195-7, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 分担研究報告書

アトピー性皮膚炎のかゆみと関連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 准教授

### 研究要旨

アトピー性皮膚炎のかゆみと関連する生理活性物質を同定するため、患者の血清を採取し、ガストリン放出ペプチドと、autotaxin の濃度を測定した。アトピー性皮膚炎患者血清では GRP、ATX の値が上昇しており、両者はかゆみのスコアと有意に関連していた。これらの物質は、アトピー性皮膚炎患者におけるかゆみのメカニズムの一部を説明できる可能性があると考えられ、治療の新たなターゲットになることが期待される。

### A. 研究目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎のかゆみと関連する生理活性物質を同定し、治療に役立てることである。これまで同様にアトピー性皮膚炎患者の血清を採取し、脊髄でのかゆみ経路に重要であるとの報告があるガストリン放出ペプチド (GRP) と、胆汁うっ滞に伴うかゆみに関係するとされる autotaxin (ATX) の血清中濃度を測定することにした。

### B. 研究方法

当科アトピー外来に通院中の患者および合併症のない皮膚良性腫瘍切除目的の患者 (正常人コントロール) から血清を採取した。アトピー性皮膚炎の重症度は Physician Global Assessment (PGA) および Eczema Area and Severity Index (EASI) で評価し、痒みの程度を Numerical Rating Scale (1-10) で数値化した。血清 GRP 値は Phoenix Pharmaceuticals 社の GRP EIA kit、血清 ATX 値は R&D systems 社の Quantikine Human ENPP-2/Autotaxin ELISA kit を用いて測定した。またアトピー性皮膚炎の生検皮膚 5 検体、健常

皮膚 6 検体を Phoenix Pharmaceuticals 社の抗 human GRP 抗体及び Abcam 社の抗 PGP9.5 抗体で染色した。血清値の検定は Mann Mann-Whitney の U-test を用い、関連の検定にはスピアマンの順位相関を用いた。

(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、生検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

アトピー性皮膚炎患者の血清 GRP 値は  $3.11 \pm 0.98$  ng/ml であり、健常人コントロールの  $2.00 \pm 0.58$  ng/ml と比べて有意に高値であった ( $P < 0.001$ )。また血清 GRP 値とかゆみの Numerical Rating Scale は有意に関連していた (相関係数 =  $0.725$ ,  $P < 0.01$ )。アトピー性皮膚炎の病変皮膚、健常皮膚ともに GRP 陽性 PGP9.5 陽性の神経線維を真皮に認めたが、アトピー性皮膚炎病変部のほうが有意に多くの GRP 陽性神経線維を認めた (100 倍視野あたり  $5.0 \pm 1.2$  v. s.  $2.7 \pm 0.8$ )。

次に ATX について解析したところ、アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $74.8 \pm 12.3$  pg/ml で

あり、健常人 ( $32.9 \pm 5.9$  pg/ml) と比べて有意に高値であった ( $P < 0.01$ )。男性アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $43.1 \pm 6.9$  pg/ml で、健常人男性 ( $24.9 \pm 7.4$  pg/ml) と比べて有意に高く ( $P < 0.05$ )、女性アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $132.3 \pm 24.4$  pg/ml で、健常人女性 ( $37.3 \pm 8.1$  pg/ml) より有意に高かった ( $P < 0.01$ )。次に年齢別に解析したところ、ATX 値は年齢が上がると共に減少する傾向にあった。さらに血清 ATX 値は PGA による病勢評価で重症例ほど値が高く、EASI と有意な相関を認めた (相関係数 = 0.43、 $P < 0.05$ )。また血清 ATX 値とかゆみの Numerical Rating Scale は有意に相関していた (相関係数 = 0.44、 $P < 0.05$ )。

#### D. 考察

アトピー性皮膚炎患者の血清において、GRP、ATX の値が上昇しており、両者はかゆみのスコアと有意に相関していた。アトピー性皮膚炎のかゆみの機序は複雑であり、様々な細胞が関与していると考えられている。興味深いことに、今回測定した GRP、ATX は生理学的に多様な機能をもっていることが報告されており、特に神経系における働きが知られている。これらの物質が、アトピー性皮膚炎患者におけるかゆみのメカニズムの一部を説明できる可能性があると考えられた。

#### E. 結論

血清中のかゆみと相関する生理活性物質として、GRP と ATX が候補になりうると考えられた。これらの物質はかゆみの治療の新たなターゲットになることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kagami S, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Tsunemi Y, Sato S. Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 133: 1673-5, 2013.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Kagami S, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum visfatin levels in patients with atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 23: 629-35, 2013.

Nakao M, Sugaya M, Suga H, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum autotaxin levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* in press.

##### 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

皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトは種々の刺激に際して様々な因子を産生し、皮膚の炎症や掻痒の誘発、増強においても重要な役割を演じると推定される。したがって、表皮ケラチノサイトを標的とし、炎症あるいは掻痒の発現に関わる因子の発現を制御することは炎症の軽減、掻痒の抑制に有効であると推定される。これまでの検討において、2,4-dinitrofluorobenzene を反復塗布したマウスでは、NGF mRNA 発現が増大し、神経線維が表皮内へ多数侵入することを確認している。また、tacrolimus 投与が神経線維の表皮内侵入を抑制するとともに、搔破行動を減少させることから、表皮ケラチノサイトの NGF 発現を抑制し、神経線維の表皮内伸長を抑制することが掻痒の抑制に有効性を発揮する可能性が示唆される。一方、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。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、標的への送達に関して活発に研究が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、siRNA 外用による適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、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、NGF mRNA 発現を抑制する可能性を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度はさらに信頼性の高い成績を得ることを目標に検討を行った。

(1) マウス TNF- $\alpha$  を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。100 ~ 1,000 ng の TNF- $\alpha$  は強力に NGF mRNA 発現を誘導し、300 ng を用いた経時変化の検討では、6 時間後の NGF mRNA 発現の誘導が最も強く、安定していた。(2) これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種の効果を比較した。TNF- $\alpha$  注射による NGF mRNA 発現の抑制は、InvivoFectamine2 を 5  $\mu$ g の siRNA と混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。1  $\mu$ g の siRNA を用いた場合の抑制も 5  $\mu$ g の場合と同程度であり、強力であった。(3) NC/Nga マウスに TNF- $\alpha$  を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、InvivoFectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および InvivoFectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および InvivoFectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

本年度の検討結果から、トランスフェクション試薬としては InvivoFectamine2 が適していること、siRNA を InvivoFectamine2 と共に注射することにより、NGF mRNA 発現を抑制できることが確認された。今後は、外用による有効性を確実にするための条件の検討が必要である。

## A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎患者の最も重要な症状であり、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。表皮ケラチノサイトは皮膚表層にあって種々の刺激によってさまざまな因子を産生し、皮膚炎や掻痒の誘発、増強にも関わると推定される。これまでに、2,4-dinitrofluorobenzene 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。一方、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。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、生体内標的への送達法について

活発に検討が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、表皮ケラチノサイトを標的とする siRNA 外用によるアトピー性皮膚炎治療への適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、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およびアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試み、NGF mRNA 発現の抑制を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度は信頼性の高い成績を得ることを目標に、さらに検討を加えた。

## B. 研究方法

**TNF- $\alpha$  による NGF mRNA 発現の誘導:** 雄性 ICR マウスあるいは雌性 NC/Nga マウスの耳殻へマウス TNF- $\alpha$  溶液 20  $\mu$ l を注射して NGF mRNA 発現を誘導した。これまでの検討ではヒト TNF- $\alpha$  を用いてきたが、本検討ではマウス TNF- $\alpha$  を使用した。

**ダニ抗原反復曝露による皮膚炎:** 雌性 NC/Nga マウスの両耳殻の表裏に、培養したコナヒョウヒダニ排泄物から調製した抗原 (ダニ抗原) 溶液 (10 mg/ml) を 25  $\mu$ l ずつ、計 100  $\mu$ l を週 2 回、計 9 回塗布して皮膚炎を誘発した。

**siRNA およびトランスフェクション試薬:** siRNA はこれまでの検討で、NGF mRNA 発現抑制効果が最も強力であることが確認されている市販のものを使用した。トランスフェクション試薬はこれまで用いてきたものが販売中止になったこと、その効果が不確実であることが分かったことから、新たに 3 種の市販の試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 を購入して使用した。siRNA はトランスフェクション試薬と混和し、溶液を耳殻へ注射した。また、皮膚炎モデルの実験では siRNA およびトランスフェクション試薬をクリームに混和して耳殻へ塗布した。

**NGF mRNA の評価:** mRNA の評価には real-time RT-PCR 法を用いた。

### (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 TNF- $\alpha$  の NGF mRNA 発現誘導効果の確認: マウス TNF- $\alpha$  100 ~ 1,000 ng を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。いずれの用量の TNF- $\alpha$  によっても強力な NGF mRNA 発現が誘導された。また、300 ng の TNF- $\alpha$  を注射し、経時的に mRNA 発現を検討し、6 時間後の mRNA 発現の誘導が最も強力で、安定していた。

(2) トランスフェクション試薬の比較: これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種を用いて mRNA 発現抑制効果を比較した。300 ng TNF- $\alpha$  注射による 6 時間後の NGF mRNA 発現の抑制は、Invivofectamine2 を 5  $\mu$ g の siRNA に混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。一方、Safetrans および InvivojetPEI を用いた場合には mRNA 発現には抑制は認められなかった。また、Invivofectamine2 を用い、1  $\mu$ g および 5  $\mu$ g の siRNA の mRNA 発現抑制効果を比較した結果、いずれの用量によっても同程度の強い抑制が認められた。

(3) NC/Nga マウスを用いた検討: NC/Nga マウスに TNF- $\alpha$  を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、Invivofectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および Invivofectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

## D. 考察

本年度の検討では、以前の検討において、real-time RT-PCR によって得られる siRNA の mRNA 発現抑制効果の成績の信頼性が低いことが懸念されたことから、これまで用いてきたヒト TNF- $\alpha$  をマウス TNF- $\alpha$  に改め、また、トランスフェクション試薬を 3 種入手して有効性の高い試薬を選択した。

siRNA による RNAi の手法は確立されたものであり、多くの in vitro の研究で遺伝子発現をノックダウンする手法として繁用されている。一方、in vivo への適用に関しては、siRNA の体内での安定性、標的組織、細胞への送達などに解決すべき問題があり、生体への応用はほとんど進んでいない。したがって、トランスフェクション試薬に関しても、in vivo における使用実績が示されているものはなく、今回は、市販の 3 種の試薬について in vivo での有効性を比較した。

ヒト TNF- $\alpha$  をマウス TNF- $\alpha$  におきかえた場合でも、ICR マウス耳殻へ注射することによって、ほぼ同様の条件下、明らかな NGF mRNA 発現の誘導が確認できたため、以下の検討にはマウス TNF- $\alpha$  を使用した。また、比較検討した 3 種のトランスフェクション試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 の中では、Invivofectamine2 を使用した場合にのみ、siRNA による強い mRNA 発現抑制効果が認められたことから、以下の検討では Invivofectamine2 を使用した。検討には適切なトランスフェクション試薬を選択することも重要と思われる。また、これまでの検討では、市販の NGF 特異的 siRNA 3 種を in vitro の実験系において比較検討し、最もノックダウン効果の強い siRNA を選択して使用してきたが、siRNA の選択、さらにはトランスフェクション試薬



との組み合わせも考慮すべきと思われる。

アトピー性皮膚炎患者皮膚への適用の可能性を探るため、NCNga マウスのダニ抗原反復塗布による皮膚炎モデルを用い、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した。siRNA および Invivofectamine2 の注射は NC/Nga マウスにおいても TNF- $\alpha$  注射による NGF mRNA 発現を強く抑制するが、皮膚炎モデルにクリームに混和して塗布した場合には抑制は認められなかった。皮膚炎モデルの場合でも、siRNA および Invivofectamine2 を注射した場合には抑制効果が認められたことから、siRNA および Invivofectamine2 が標的組織へ到達すれば効果を発揮することが明らかであると考えられる。

siRNA は巨大な分子であるため、皮膚から透過させることに限界があることは考慮すべきと思われるが、蛍光標識した siRNA の皮膚透過性を検討した予備的な成績では、クリームに混和することで Invivofectamine2 が効果を示さなくなる可能性が推定されている。溶媒を変えた場合の皮膚透過性についても検討することが必要と思われる。

これまでは、耳殻全体として mRNA 発現を検討してきたが、表皮ケラチノサイトを標的とする検討であるため、表皮を分離して評価することにより、よりの確な成績が得られるものと考えられる。また、表皮ケラチノサイトは皮膚最外層に位置するため、外用した siRNA の効果が得られやすい可能性も考えられるため、表皮ケラチノサイトの mRNA 発現に対する効果を区別して確認することも必要と思われる。

#### E. 結論

本年度の検討では、siRNA をトランスフェクション試薬 Invivofectamine2 と組み合わせることにより、また、確実に組織へ注入することによって標的 mRNA 発現を強く抑制できることを確認した。アトピー性皮膚炎患者皮膚への外用を目標としているため、今後は、皮膚バリアが破綻している皮膚炎モデルマウス等を用い、溶媒を選択し、また、表皮を分離して表皮ケラチノサイトに対する効果を明らかにする検討を実施したい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamashita H, Makino T, Inagaki N, Nose M, Mizukami H: Assessment of relief from pruritus due to Kampo medicines by using murine model of atopic dermatitis. J Trad Med 30: 114-123, 2013.2.

##### 2. 学会発表

稲垣直樹: アトピーの慢性化と最新研究について。アレルギーケアフォーラム, 東京, 2013.6.13.

稲垣直樹: アトピー性皮膚炎とかゆみ. 日本薬学図書

館協議会研究集会, 名古屋, 2013.8.8.

#### 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

## 分担研究報告書

## 小児アトピー性皮膚炎に対する Proactive 治療、かゆみと QOL 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 (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
	夏目 統 同上
	近藤 麻伊 同上
	山本 貴和子 同上
	成田 雅美 同上

**研究要旨**

本研究では、①アトピー性皮膚炎(AD: atopic dermatitis)の乳児に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、②ADの乳児に、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点を明らかにするため、卵アレルギーをテーマとするランダム化二重盲検介入研究に取り組んでいる。昨年度までに、研究計画の立案、介入のための試験用食品(卵含有粉末およびプラセボ粉末)を開発した上で、研究参加者のリクルートを開始した。

本年度、リクルートを進め、研究登録目標数200名のところ、これまでに83名の登録者を得、このうち50名について、primary outcomeである加熱全卵粉末を用いた経口食物負荷試験が終了した(平成26年1月24日現在)。現時点での負荷試験の陽性率は22.0%と、研究計画の想定から大きく外れない結果となっている。また、試験用食品摂取によるアレルギー症状の誘発など、問題となる有害事象は見られていない。研究は総じて順調に進行しており、早期の研究終結を目指して、リクルートの加速を進めている。これと併せて、研究に参加した患児の皮膚のコントロール状態について検討し、proactive療法が有効かつ安全な治療法であることを、乳児における前方視データとして確認できた。

本年度はこの他、ADおよびその治療法が、患児と保護者のQOL(quality of life)に与える影響について調べた。当センターで加療されているAD患児300名を対象として、外来で質問紙による調査を実施した(回収率は77.0%)。一元配置の分散分析(Turkey HSD)を行ったところ、ステロイド使用の有無や方法と、皮膚のコントロール状態との間に一定の相関が認められたものの、患児・保護者のQOLとの間には、明確な相関は見られなかった。これは調査対象者の多くが、適切な治療を受けるようになって一定期間を経過しており、治療法によらず皮膚症状が安定していることが一因と思われた。

**A. 研究目的****1. PETIT研究**

アトピー性皮膚炎(AD: atopic dermatitis)は、慢性的に皮膚炎を繰り返し、患者のQOL(quality of life)を著しく損なう。ステロイド外用薬の長期間欠塗布(proactive療法)は、ADを寛解状態に導入・維持することが可能で、その有効性と安全性が認知されつつある。また、AD患児では高率に即時型食物アレルギー(FA: food allergy)の合併が見られるが、G. Lackらはこれを説明する二重暴露仮説を提唱している。この仮説では、炎症を有する皮膚への食物抗原の暴露が経皮感作を進める一方、経口摂取による消化管への暴露が免疫寛容を誘導するとされている。この仮説を支持するように、近年、乳児期における抗原蛋白の早期摂取開始が食物

アレルギーを減少させるとする観察研究の報告が相次いでいる。これらを背景に本研究では、①ADの乳児にproactive療法を施すことにより、卵アレルギーの発症が抑制されるか ②ADの乳児に、乳児期早期より卵抗原蛋白を摂取させることで卵アレルギーの発症が抑制されるか、の2点について検討を行っており、PETIT(Prevention of Egg allergy with Tiny amount InTake)研究と称している。

昨年度までに、PETIT研究の研究計画を立案するとともに、被験者に摂取させる試験用食品(卵含有粉末およびプラセボ粉末)の開発を行って、リクルートを開始した。本年度は、リクルートを進めるとともに、乳児ADにおけるproactive療法の有効性について前方視的に検討した。また、小児AD患者とその家族のQOLについて、ADの治療法やADのコントロール状態等との関係

を、質問紙を用いて調べた。

## B. 研究方法

### 1. PETIT 研究

図1に研究の概略を示す。特に基礎疾患のない生後6ヶ月未満のAD患児をリクルートし、1歳まで卵の完全除去を指示する。生後6ヶ月-1歳の間、卵含有粉末を連日摂取する卵タンパク群（100例）と、カボチャとブドウ糖粉末からなるプラセボ粉末を連日摂取するプラセボ群（100例）とに分け、二重盲検ランダム割り付けによる前方視介入研究を実施する。この間の湿疹の治療は、proactive療法か、湿疹憎悪時のみステロイド外用薬を使用するreactive療法かのいずれかを行う。1歳時に、卵1/2個相当の加熱全卵粉末を摂取させる経口食物負荷試験（FC: food challenge）を実施して卵アレルギーの有無を判定し、卵アレルギーの発症率と、卵の摂取開始時期や湿疹の治療法、皮膚炎のコントロール状態との関係を調べる。ADの治療方針については、患児の保護者の意向も考慮する必要があり、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にしている。介入期間中の皮膚の状態は、SCORADおよびPOEM(Patient-Oriented Eczema Measure:養育者による子どもの湿疹評価)、血清TARC値を参考に評価する。

リクルートの対象は、当センターを受診したAD乳児の他、一般病院・開業医を受診したAD乳児、東京都内の3-4ヶ月乳児健診でADの可能性を指摘された乳児などである。当センターでADと確定診断した後、症例登録を行った。

### 2. AD患児と保護者のQOL調査

当センターで加療中のAD患児300名を対象に、外来受診時に質問紙を配布し、記入後回収する形で調査を行った。調査内容は、ADの治療法（保湿のみ/reactive/proactive）の他、受診時のPOEM、患児のQOLを問う

IDQLI (Infant's Dermatitis Quality of Life Index: 4歳未満) /CDQLI (Children's Dermatitis Quality of Life Index: 4歳以上)、保護者のQOLを問う QPCAD(Quality of life in Primarycaregivers of Children with Atopic Dermatitis)とした。

## C. 研究結果

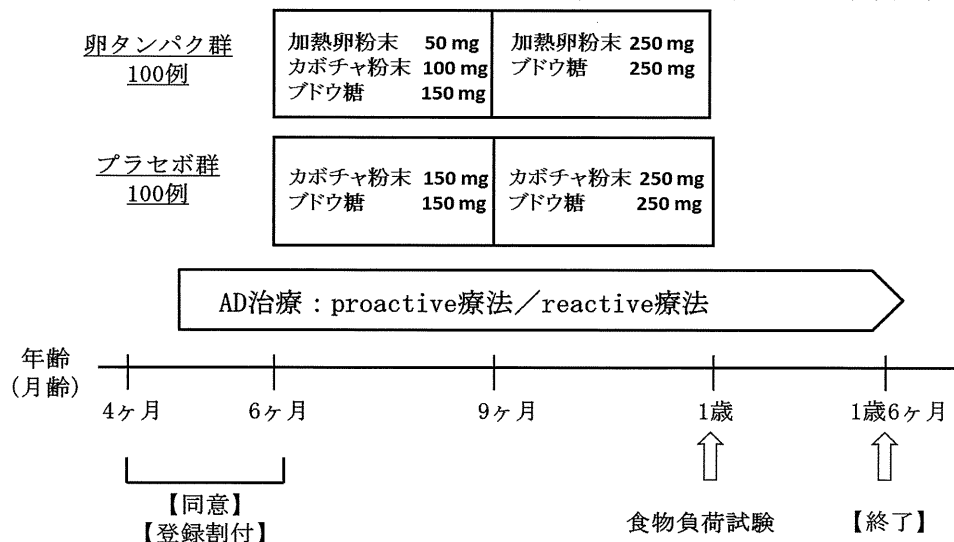
### 1. PETIT 研究

研究登録目標数200名のところ、これまでに83名の登録者を得、このうち50名について、primary outcomeである加熱全卵粉末を用いた経口食物負荷試験が終了した(平成26年1月14日現在)。現時点での1歳時FCの陽性率は22.0%である。研究計画では卵タンパク群7%、プラセボ群20%を想定しており、合わせると14%程度となる。陽性率が、これを下回るようであれば検出率が不足する懸念が生じるが、現在のところやや高めの値で、想定から大きく外れてもいない。また、試験用食品摂取によるアレルギー症状の誘発など、問題となる有害事象は見られていない。

図2は、AD未治療の状態を受診してPETIT研究に参加し、proactive療法で加療した患児27例のSCORADおよびTARCの経過を示したものである。ほとんどの例で、1歳までにADの皮膚炎が良好にコントロールされ、症状が軽快していることがわかる。図3には1歳時のステロイド外用剤の塗布頻度を示すが、全例で、皮膚の菲薄化を招く可能性が少なくなる3日に1回以上の間隔となっていた。この間、ステロイド外用薬の使用に伴う皮膚感染症などの有害事象が見られた例はない。

### 2. AD患児と保護者のQOL調査

質問紙を回収できたのは、300名中231名(回収率77.0%)であった。図4に回答を得られた患児の属性を示す。一元配置の分散分析(Turkey HSD)を行ったところ、表1に示すとおり、ステロイド使用の有無や方法と、POEMとの間に一定の相関が認められたものの、



※ 介入期間中は、卵成分を含む食物の摂取を制限

図1 PETIT研究の概要

患児・保護者の QOL との間には、明確な相関は見られなかった。

(倫理的配慮) 本研究では、FA 発症の高リスク群である乳児 AD 患者に、早期より抗原蛋白の摂取をすすめている。このため研究遂行に当たっては、初回の摂取量を少量とする、症状発現時には適切な対応ができる体制を整えて摂取させる、といった安全面の配慮をしている。PETIT 研究および AD 患児と保護者の QOL 調査の双方について、当センターの倫理委員会で承認を受け実施している。

D. 考察

最初に述べたとおり、抗原蛋白の早期摂取開始が食物アレルギーの発症を抑制するとの報告が近年なされている。例えば、Koplin らは、観察研究を行い、生後 6 ヶ月までに卵摂取を開始した群では、それ以降に摂取を開始した群と比較して卵アレルギーが有意に少ないと報告している。このような知見を、前方視的に確認しようとする取り組みが各国で進められているところである。本研究もその一つに位置づけられ、FA の発症率が非常に高い AD 乳児に着目したところに特徴がある。これまでのところ、問題となる有害事象を見ることなく、1 歳時の卵アレルギーの発症率も想定範囲内であり、研究は順調に進行している。研究の早期終結を目指して、現在リクルートを加速させている。

Proactive 療法の有効性を定量的に示したデータは意外に少ない。今回乳児 AD に対する proactive 療法の有効性と安全性を先方視データにより示すことができた。昨年度の報告で、乳児 AD に対する早期介入の重要性について述べたが、本データが示す通り、罹病期間の短い乳児の AD では治療に対する反応が良好であり、この意味でも早期より proactive 療法による治療を開始する意義は大きいと言える。

PETIT 研究では、FA の発症において最もクリティカルな時期である生後 6 ヶ月前後に注目して、AD 患児の様々なデータを収集している。例えば、マイクロアレイを用いることにより、約 20 種の抗原に対する特異抗体を血中および唾液中で測定している。これらのデータを蓄積して活用することにより、研究の主たる検討内容である卵アレルギーの発症予防以外にも、FA の発症メカニズムについて示唆に富む知見が得られることが期待される。

E. 結論

乳児 AD 患者を対象とする卵アレルギー発症予防研究 (PETIT 研究) を遂行中である。登録目標 200 名のところ既登録者が 83 名で、大きな問題なく進行中である。今後、リクルート活動に注力することで登録を加速し、早期の研究完了を目指す。また、本研究で前方視的に収集されたデータにより、proactive が乳児の AD において、有効かつ安全な治療法であることが確認された。平行して、AD 患児における患児・保護者の QOL 調査を 300

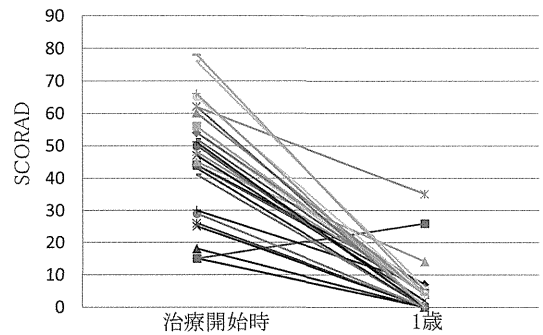


図 2(a) proactive 治療中の SCORAD の変化

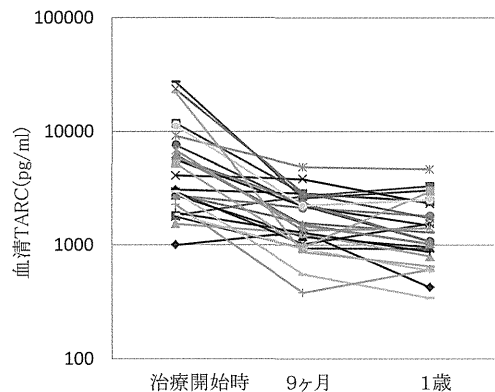


図 2(b) proactive 治療中の血清 TARC 値の変化

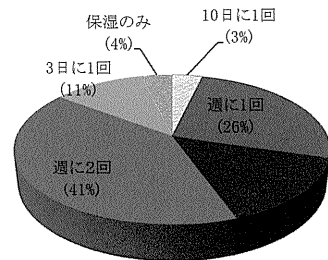


図 3 1 歳時のステロイド外用剤塗布頻度

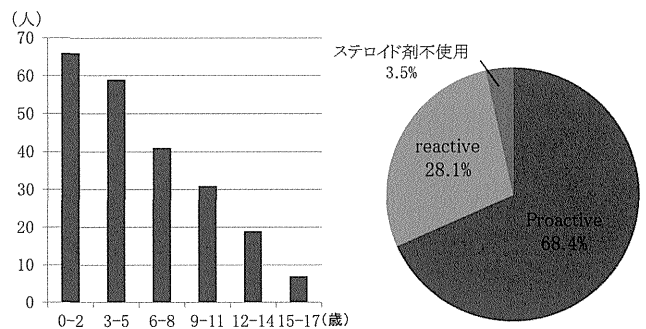


図 4 回答者の年齢分布と AD の治療法

名の患児を対象に実施した。今回の調査では、ステロイド使用の有無や方法と、重症度との関連は見られたが、QOL との関連は確認できなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (学会発表)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1(a) AD の治療法と皮膚炎・QOL の関係  
(4 歳以上)

	保湿剤のみ	リアクティブ	プロアクティブ	連日
人数	4	39	86	2
痒みのある日	週1日未満	週3-4日	週3-4日	毎日
POEM(0 - 27)	2.50*	5.41*	5.27*	17.00*
CDLQI (0 - 30)	2.25	3.79	5.01	14.00
CPCAD(0 - 27)	15.25	19.44	22.08	20.00
疲労感(0-8)	2.75	3.33	4.09	5.00
不安感(0-12)	6.25	5.79	6.10	4.00
自己効力感(0-8)	6.50*	3.13*	3.09*	3.00*
家族の協力(0-8)	4.00	4.05	3.55	6.00

表 1(b) AD の治療法と皮膚炎・QOL の関係  
(4 歳未満)

	保湿剤のみ	リアクティブ	プロアクティブ	連日
人数	4	25	68	1
痒みのある日	週1日未満	週3-4日	週1-2日	週1-2日
POEM(0 - 27)	2.25*	4.62*	3.14	5.00
CDLQI (0 - 30)	4.00	5.50	4.58	2.00
CPCAD(0 - 27)	18.75	18.00	17.81	6.00
疲労感(0-8)	1.50	1.81	1.99	0.00
不安感(0-12)	7.00	5.15	6.19	1.00
自己効力感(0-8)	2.75	2.54	3.17	6.00
家族の協力(0-8)	4.50	4.03	5.17	7.00

## 分担研究報告書

## ケラチノサイト由来の炎症性サイトカインとアトピー性皮膚炎

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 谷口 一登 佐賀大学医学部地域医療支援学 助教

## 研究要旨

我々は H23 および H24 年度の研究により、ヒケラチノサイト細胞株 KERTr では IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の刺激により IL-33 mRNA および蛋白発現が誘導されること、oxazolone を用いたマウス接触性皮膚炎モデルにおいて、ケラチノサイトは IL-33 を強く発現することを見出した。anti-IFN- $\gamma$  抗体および anti-TNF- $\alpha$  抗体はいずれも皮膚炎を軽減することを示し、接触性皮膚炎の病態には IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$ 、ケラチノサイトが産生する IL-33 が関与していることを示した。本年度は、IL-33 がどのように接触性皮膚炎に関与しているかを明らかにするために、マウス接触性皮膚炎モデルの皮膚炎局所における好酸球を検討した。顕微鏡にて、コントロールマウスの表皮に比べ皮膚炎モデルマウスのそれは有意に肥厚していた。anti-IL-33 抗体は表皮の肥厚を有意に抑制した。皮膚炎モデルマウスの真皮における好酸球浸潤はコントロールマウスに比べ有意に増加していた。anti-IL-33 抗体はこれを有意に抑制した。以上より、アレルギー性接触性皮膚炎の病態に、ケラチノサイトが産生する IL-33 は真皮への好酸球浸潤を促すことにより関与していると考えられた。

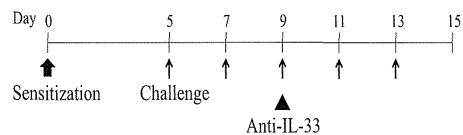
## A. 研究目的

我々はこれまでに、ヒケラチノサイトにおいて IL-17 ファミリーに属するサイトカインの一つ IL-33 が IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  により誘導されること、マウス接触性皮膚炎モデルの表皮では IL-33 が誘導されること、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 TNF- $\alpha$  抗体のみならず抗 IL-33 抗体は IL-33 発現を抑制すると同時に皮膚炎症状を軽減することを示した。以上のことは、IL-33 がアレルギー性接触性皮膚炎の病態に直接的に関与し、IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  は IL-33 を介して関与していることを示唆する。今回の目的は IL-33 がどのように皮膚炎に関与しているかを明らかにすることである。

## B. 研究方法

C57BL/6マウスを用い oxazolone (oxa.) によるアレルギー性接触性皮膚炎モデルを作成した。day 0 に 5% oxa. を腹壁に、day 5 から 2 日おきに 5 回、0.1% oxa. を耳介に反復塗布した。day 9 に抗 IL-33 抗体、またはコントロール IgG を耳介に皮下注射した (図1)。day 15 に耳介の厚さを測定後、耳介を回収、ホルマリン固定パラフィン包埋後、切片を HE 染色

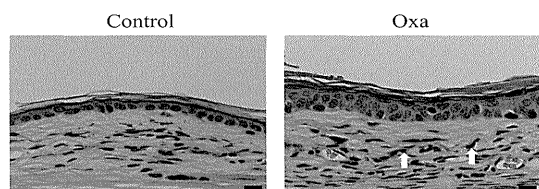
し顕微鏡下に観察した。



## C. 研究結果

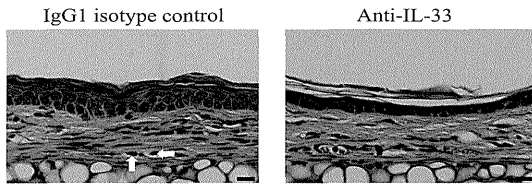
コントロールマウスの耳介と oxa. による皮膚炎モデルのそれには肉眼的な明らかな差は認めなかったが、皮膚炎モデルマウスの耳介はコントロール群のそれと比較し有意に肥厚していた。顕微鏡下でも皮膚炎モデルマウスの表皮はコントロールのそれと比較し肥厚していた (図2)。

図2



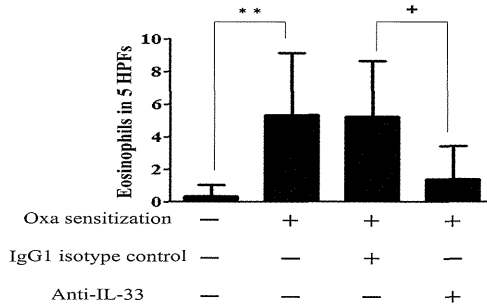
コントロールIgGを皮下注射したマウスの表皮肥厚は抑制されなかったが、抗IL-33抗体を皮下注射したマウスでは抑制された（図3）。

図3



皮膚炎モデルの真皮では有意な好酸球浸潤（白矢印）を認めた。コントロールIgGはこれを抑制しなかったが、抗IL-33抗体はこれを有意に抑制した（図4）。

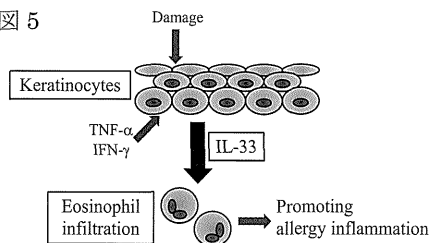
図4



#### D. 考察

oxa. による皮膚炎モデルでは真皮の好酸球数が有意に増加していることより、アレルギー性接触性皮膚炎の病態に好酸球が関与していると考えられる。抗 IL-33 抗体は耳介の肥厚を有意に抑制し、さらに真皮への好酸球浸潤も抑制した。以上より IL-33 はアレルギー性接触性皮膚炎の病態において好酸球の遊走因子として働いているように見える（図5）。しかし

図5



ながら IL-33 は好酸球に対する直接的な遊走活性はないと報告されており、線維芽細胞等で IL-33 により誘導された CCL26 等のケモインが関与している可能性が考えられる。

#### E. 結論

アレルギー性接触性皮膚炎の病態に、ケラチノサイトが産生する IL-33 は真皮への好酸球浸潤を促すことにより関与していると考えられるが、詳細な機序はさらに検討の必要がある。

#### F. 発表論文

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23(6):428-434

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Blockade of Interleukin-33 attenuates allergic contact dermatitis in model mice: possible mechanism via eosinophil infiltration. *Clin Exp Dermatol Res* 2013;4(3):1000183

## 分担研究報告書

アトピー性皮膚炎のかゆみの発症機序と治療に関する研究  
樹状細胞の病態への役割に関する研究

分担研究者 中村晃一郎 (埼玉医科大学皮膚科教授)

研究協力者 宮野恭平 (埼玉医科大学皮膚科助教)

アトピー性皮膚炎(AD)ではウイルスや細菌に対する易感染性が存在するが、この易感染性には IL-4, TARC をはじめとする Th2 サイトカインの産生異常や皮膚のバリア機能異常が関与している。皮膚には樹状細胞があり、外来抗原を認識し、TARC/CCL17 や MDC/CCL22 を産生し、Th2 細胞の浸潤、皮膚症状の悪化に変化に関与する。AD の病態における抗原による樹状細胞の TARC, MDC 産生調節を明らかにした。

## A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)は慢性に経過するアレルギー性疾患であり、乾燥症状や強いかゆみを呈する疾患である。これまでAD患者の血清中のTARC、MDC濃度は重症度と相関しており、その産生細胞として表皮ケラチノサイト、樹状細胞が存在することを報告した。またこれらの細胞は、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ によってその産生を増強した。樹状細胞の外来抗原によるTARC、MDC産生調節を明らかにする。

## B. 研究方法

同意の得られた AD 患者より末梢血を採血し、単球より GM-CSF、IL-4、TGF- $\beta$ 存在下に、樹状細胞(DC)を作成した。DC の 48 時間培養下での TARC 産生を比較検討した。

(倫理面への配慮)本研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行された。

## C. 研究結果

AD 患者由来の DC の TARC 産生は健常人由来の DC のそれと比較して有意に高値を示した

(AD: 平均 49,040pg/mL, 健常人 21,406pg/mL)。AD 患者由来の DC の MDC 産生は健常人由来の DC のそれと比較して有意に高値を示した(AD: 平均 90,993pg/mL, 健常人 52,115pg/mL)。外来抗原刺激下に DC の TARC 産生、MDC 産生の調節を検討した。Lipopolysaccharide 刺激下での TARC 産生は増加を示した。

## D. 考察

AD 患者の病態には IL-4、TARC、MDC などの Th2 サイトカインの関与が指摘されており、AD 患者の樹状細胞は有意に TARC、MDC 産生を増強することを示した。外来抗原刺激によってこれらのケモカイン産生は調節を受けた。

## E. 結論

AD の病態に関与する Th2 ケモカインは、抗原刺激によって DC 由来の TARC 産生、MDC 産生が調節を受けており、皮膚炎の増悪に関与する可能性が示された。将来的な治療の標的となる可能性が示された。



#### 参考文献

Hashimoto S, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Monocyte derived chemokine (MDC) /CCL22 reflects disease activity in patients with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 44(2), 93-9, 2006.

F.健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

①中村晃一郎. 負荷試験の実際 2013 薬物アレルギー負荷テスト. 小児内科. 45 (5), 987 - 988 , 2013 (05)

②中村晃一郎. ステロイド外用薬の薬理学・薬物動態学的視点. ステロイド外用薬の構造と薬理活性. 薬局 (64(6): 1885-1888, 2013(5)

##### 2. 学会発表

中村晃一郎. アトピー性皮膚炎と外用療法. 治療のモチベーション持続の工夫. 日本臨床皮膚科医会雑誌. 30 (2)203, 2013

#### 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 統合生命医科学研究センター  
 呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー  
 研究協力者 広田 朝光 理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
 呼吸器・アレルギー疾患研究チーム 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。本年は共同研究先であるドイツのグループを中心に行われたアトピー性皮膚炎のImmunoChip解析の検証研究を行った。また我々は本研究班で収集したサンプルを用い、日本人のアトピー性皮膚炎感受性に関連する8つのゲノム領域を同定した (Nature genetics 44:1222-1226, 2012)。これらの領域内および近傍に含まれる遺伝子群の中から、興味深い遺伝子について現在、機能解析を行っている。11p15.4に存在する*NLRP10*はヒト皮膚組織で強く発現していた。3p21.33で最も強い関連が認められたSNPはeQTL解析により*CCR4*遺伝子発現量と強い相関を認めた。

## A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は、患者の多くは遺伝的なアトピー体質を持つ。本研究はアトピー性皮膚炎の病態に関連する遺伝要因を同定し、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。本年はドイツのグループを中心に行われたアトピー性皮膚炎のImmunoChip解析の検証研究を行った。また我々は2012年に本研究班で収集したサンプルを用い、日本人のアトピー性皮膚炎感受性に関連する8つの新規のゲノム領域を同定し報告した (Nature genetics 44: 1222-1226, 2012)。これら8つの領域内および近傍に含まれる遺伝子群の中から、興味深い遺伝子について現在、機能解析を行っている。

## B. 研究方法

まずドイツのグループがアトピー性皮膚炎患者2425名、7196名のコントロールについてIllumina iSelect HD custom genotyping arrayを用いてImmunoChip解析を行い、ヨーロッパの集団で検証研究を行った。その結果、ゲノムワイド関連水準 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) を満たす4つの領域 (4q27, 11p13, 16p13.13, 17q21.32) が同定された。我々は日本人の集団 (ケース1856名、コントロール7021名) でそれらの結果の検証を行った。検証研究の疾患群はバイオバンクのサンプルを用いた。検証研究のタイピングはTaqMan法およびInvader法を用いた。

機能解析において、遺伝子の発現についてはSYBR Premix Ex Taq IIを用い、RT-PCR法により定量を行った。関連領域の転写調節への影響については、eQTL Browser (<http://eqtl.uchicago.edu>)を用いて検討を行った。

(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

ImmunoChip解析で同定されたゲノムワイド関連水準を満たす4つの領域のうち4q27領域を除く3つの領域で  $P < 0.05$  の関連を認め、アレルの方向性は一致していた。これらの3領域、11p13の近傍には*RAG1*, *RAG2*が、16p13.13の近傍には*SOCS1*が、17q21.32の近傍には*NGFR*が存在していた。これらの知見をNature genetics 45:808-812, 2013に報告した。

遺伝子発現解析により、*NLRP10*がヒト線維芽細胞および皮膚で強く発現していることが示された。

3p21.33のアトピー性皮膚炎関連領域において、eQTL解析を行い、関連の強かったSNPのゲノム領域はTARCの受容体である*CCR4*の遺伝子発現量と強い相関を示した。

## D. 考察

ImmunoChipで同定された領域のうち、4q27にはタクロリムス (FK506) のターゲット分子である*IL2*が含まれていた。今回の日本人の集団において、ヨーロッパ集団で同定された4q27のSNPとの関連は検証されなかったが、近傍のSNPについては詳細に検討していく必要がある。アトピー性皮膚炎の症状として、かゆみを伴う慢性湿疹が特徴的であるが、かゆみに関連する*NGFR*の近くに疾患感受性領域 (17q21.32) が同定された。*NLRP10*、および*CCR4*領域については引き続き検討を行っていく。

## E. 結論

ヨーロッパのImmunoChip解析の結果を日本人の集団において検証研究を行い、3つの領域 (11p13, 16p13.13, 17q21.32) でアトピー性皮膚炎との関連を認めた。こ

れまでGWASで同定された関連領域のうち、11p15.4に存在する*NLRP10*はヒト皮膚組織で強く発現していた。3p21.33で最も強い関連が認められた多型はeQTL解析により*CCR4*発現量と強い相関を認めた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.

Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin (TSLP) genotype. *Allergol Int*. 2013;62:123-130.

Himes BE, Sheppard K, Berndt A, Leme AS, Myers RA, Gignoux CR, Levin AM, Gauderman WJ, Yang JJ, Mathias RA, Romieu I, Torgerson DG, Roth LA, Huntsman S, Eng C, Klanderma B, Ziniti J, Senter-Sylvia J, Szeffler SJ, Lemanske RF Jr, Zeiger RS, Strunk RC, Martinez FD, Boushey H, Chinchilli VM, Israel E, Mauger D, Koppelman GH, Postma DS, Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Litonjua AA, Tantisira KG, Raby BA, Bleecker ER, Meyers DA, London SJ, Barnes KC, Gilliland FD, Williams LK, Burchard EG, Nicolae DL, Ober C, DeMeo DL, Silverman EK, Paigen B, Churchill G, Shapiro SD, Weiss ST. Integration of mouse and human genome-wide association data identifies *KCNIP4* as an asthma gene. *PLoS One*. 2013;8:e56179.

Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphisms in the *IL22* gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013;71:148-150.

Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hübner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel

T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nöthen MM, Fölster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Büning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A, Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45:808-812.

Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-312.

Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int*. 2013 in press

Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates *ZNF432* gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;S0091-6749(13)01486-3. in press

Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population. *PLoS One*. 2013;8:e80941.

Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiuchi Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the *TRAF3IP2* gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013;S0923-1811(13)00381-2. in press

## 英文総説

Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int.* 2013;62:21-28.

Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology.* 2013 in press.

## 日本語総説

玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患. *呼吸*, 32(3):274-279, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因論 ゲノム解析. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 病態解明から治療まで 最新医学 1072-1078, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: 日本人の遺伝的背景とアレルギー. 実験医学増刊号, 31:2872-2878, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: ゲノム解析と気管支喘息. 呼吸と循環, 61:906-913, 2013.

玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患. 第1章 病態生理に関する最新の基礎的研究別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患 Ver.6 state of arts, 61-63, 2013.

玉利真由美, 広田朝光: 遺伝的アプローチから見た小児気管支喘息. 日本小児アレルギー学会誌, 539-547, 2013.

## 2. 学会発表

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関連領域と成人喘息関連領域-, 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美

Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in Academia Sinica 2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari

ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺伝子の同定, 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演23 アトピー性皮膚炎: バリア障害による表皮と免疫のクロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第34回日本炎症・再生医学会 シンポジウム4 炎症性疾患の再生のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ池 京都. 玉利真由美

アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福岡. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013, Interface between Immune System and Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari

アレルギー疾患の遺伝的要因 ゲノムワイド関連解析を中心に, 第64回東海小児アレルギー談話会 特別講演 2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, Pleanary Lecture 1 第50回日本小児アレルギー学会 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

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  
なし