

アトピー性皮膚炎におけるインターロイキン 17A の果たす役割の検討

研究分担者 宮地良樹 京都大学医学研究科皮膚科学 教授
研究協力者 椛島健治 京都大学医学研究科皮膚科学 准教授
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 フィラグリン遺伝子の発見以降、アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis, AD）の病態において、バリア破壊による刺激性皮膚炎の側面が注目されている。一方で、免疫細胞によるアレルギー性皮膚炎という側面も、ADの病態を理解する上で非常に重要である。しかしながら、バリア破壊以降の詳細な起炎機序は不明であり、Th2 以外の T 細胞サブセットや皮膚樹状細胞の関与が示唆されているものの、その詳細は未だ不明である。

インターロイキン 17A（Interleukin-17A, IL-17A）は主に Th17 細胞から分泌される炎症性サイトカインの一つで、慢性関節リウマチや乾癬などの疾患の病態に関与している。我々はこれまでに、AD 患者の末梢血中の Th17 細胞のパーセンテージが疾患重症度と相関すること、また急性期病変部における IL-17A 産生細胞が慢性期病変部や健常皮膚と比較して増加していることを報告してきた（Koga et al. *JID*, 128, 2625–2630, 2008）。このことから、IL-17A は AD の病態に関与していることが示唆されるが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで、本研究では AD における IL-17A の果たす役割を検討することを目的とし、IL-17A 欠損マウス、マウス AD モデルを用いて検討を行った。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis, AD）は幼少期に始まり、顔面などの特徴的な部位に皮疹を生じ、掻痒を伴い慢性の経過をとる湿疹病変と定義される。近年バリア異常による刺激性皮膚炎の側面が強調され始めている一方、病変部での Th2 の活性化による好酸球増多・高 IgE 血症を伴うことが多く、アレルギー性炎症の性格も持ち合わせている。しかしながら、バリア破壊以降の詳細な起炎機序は不明であり、Th2 以外の T 細胞サブセットや皮膚樹状細胞の関与が示唆されているものの、その詳細は未だ不明である。

インターロイキン 17A（Interleukin-17A, IL-17A）は主に Th17 細胞から分泌される炎症性サイトカインの一つで、慢性関節リウマチや乾癬などの疾患の病態に関与している。Th17 細胞が病態の中核を成しているとされる乾癬とは異なり、AD における Th17 細胞、IL-17A 産生細胞の関与については不明であった。我々はこれまでに、AD 患者の末梢血中の Th17 細胞のパーセンテージが疾患重症度と相関すること、また急性期病変部における IL-17A 産生細胞が慢性期病変部や健常皮膚と比較して増加していることを

報告してきた（Koga et al. *JID*, 128, 2625–2630, 2008）。

このことから、IL-17A はアトピー性皮膚炎の病態に関与していることが示唆されるが、その詳細なメカニズムは不明であった。

そこで、本研究では AD における IL-17A の果たす役割を、マウス AD モデルおよび IL-17A 欠損マウスを用いて検討することを目的とする。

B. 研究方法

IL-17A 欠損マウスと野生型マウスにマウス AD モデルを適用し、IL-17A の AD 病態に果たす役割を詳細に検討する。マウス AD モデルとしてハプテン反復塗布モデル、およびフィラグリン遺伝子変異を有する Flaky tail マウスを用いる。

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験は、遺伝子組換え生物などの使用の規制による生物多様性の確保に関する法律と京都大学組換え DNA 実験安全管理規定に従って行う。マウスを使用する実験は、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管などに関する基準」に記載されている方法により、また、京都大学動物実験及び飼育

倫理審査にて承認されたプロトコール（承認番号 080150）に則り遂行する。遺伝子改変動物の取り扱いにおいては、第二種使用等拡散防止措置確認申請を行い、そのプロトコールに従って研究を遂行する。臨床検体を用いる研究では、京都大学の医の倫理委員会に申請し承認を得ており（承認番号E778番）、研究に参加していただく作業には文書および口頭で今回の研究内容についての説明を行い、承諾書（検体の取り扱い・個人情報の保護・解析結果の公表・解析後の検体の取り扱い、協力した場合の利益・不利益などに関する項目など）を得た後に研究を遂行した。

C. 研究結果

ハプテン反復塗布モデルにおいて、IL-17A 欠損マウスは野生型マウスと比較して耳介腫脹の軽減を認めた。さらに、IL-17A 欠損マウスは、組織スコアの低下、血清中の抗原特異的 IgE/IgG1 産生の低下、所属リンパ節での IL-4 産生の低下を認めた（図 1-A、B、C）。IL-17A 欠損マウスの皮膚局所では Th2 誘導に重要なケモカインである TSLP（thymic stromal lymphopoietin）や CCL17（TARC）の産生低下を認めた。IL-17A は、*in vitro* において Th2 細胞の IL-4 産生を促進した。このことから IL-17A がハプテン反復塗布モデルにおいて Th2 誘導に促進的に作用していることが示唆された。さらに、このモデルにおける IL-17A 産生細胞をフローサイトメトリーにて解析したところ、所属リンパ節では V γ 4 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞が、また皮膚では真皮 $\gamma\delta$ T 細胞がその主な産生源であった。次に、IL-17A 欠損マウスと flaky tail マウス（C57BL/6 にバッククロスしたもの）を交配し、flaky tail マウスでの IL-17A の果たす役割を検討した。Flaky tail マウスは、フィラグリン遺伝子異常を有し、皮膚炎や血清中の IgE 上昇を自然発症するマウスである（Moriya CS et al. *Am J Pathol.*2010）。IL-17A 欠損 flaky tail マウスは、flaky tail マウスと比較して、皮膚炎の軽減やクリナルスコアの低下、血清中の IgE 産生の低下を認めた（図 2-A、B）。

D. 考察

IL-17A はマウス AD モデルにおいて、病変部およ

び所属リンパ節において Th2 促進的に作用することが示された。*In vitro* においても IL-17A は Th2 細胞の IL-4 産生ならびに B 細胞の IgE 産生を促進した。また、IL-17A の主な産生細胞は $\gamma\delta$ T 細胞であった。表皮での IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は真皮 $\gamma\delta$ T 細胞であったことから、真皮 $\gamma\delta$ T 細胞が表皮に侵入し IL-17A を産生している可能性が示唆された。

E. 結論

IL-17A はマウス AD モデルにおいて Th2 誘導に促進的に作用した。IL-17A は AD の新規治療ターゲットとなり得ることが期待される。

G. 研究発表

- 1) Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, Ito T, Nakamura M, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. Influence of Th2 cells on hair cycle/growth after repeated cutaneous application of hapten. *Clin Exp Dermatol.* 2013 Nov 22.
- 2) Ono S, Nakajima S, Otsuka A, Miyachi Y, Kabashima K. Pigmented purpuric dermatitis with high expression levels of serum TARC/CCL17 and epidermal TSLP. *Eur J Dermatol.* 2013 Oct 30.
- 3) Sugita K, Ikenouchi-Sugita A, Nakayama Y, Yoshioka H, Nomura T, Sakabe J, Nakahigashi K, Kuroda E, Uematsu S, Nakamura J, Akira S, Nakamura M, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. Prostaglandin E2 is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production. *Sci Rep.* 2013 Oct 17;3:2973.
- 4) Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep 19.
- 5) Shiraiishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K. Prostaglandin E2-EP3 axis in fine-tuning excessive skin inflammation by restricting dendritic cell

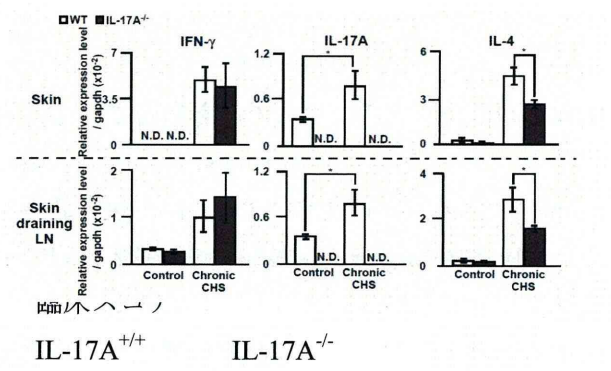
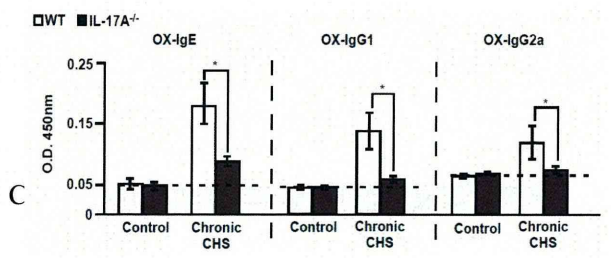
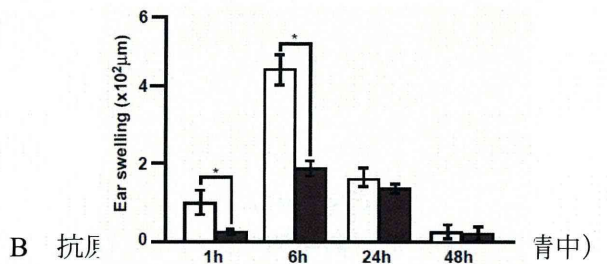
functions. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e69599.

- 6) Akagi A, Kitoh A, Moniaga CS, Fujimoto A, Fujikawa H, Shimomura Y, Miyachi Y, Kabashima K. Case of Netherton syndrome with an elevated serum thymus and activation-regulated chemokine level. *J Dermatol*. 2013 Sep;40(9):752-3.
- 7) Otsuka A, Nakajima S, Kubo M, Egawa G, Honda T, Kitoh A, Nomura T, Hanakawa S, Sagita Moniaga C, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun*. 2013;4:1739.
- 8) Nomura T, Kayama T, Okamura E, Ogino K, Uji A, Yoshimura N, Kikuchi T, Fujisawa A, Tanioka M, Miyachi Y, Kabashima K. Severe atopic dermatitis accompanied by autoimmune retinopathy. *Eur J Dermatol*. 2013 Apr 1;23(2):263-4.
- 9) Egawa G, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. Skin tape stripping and cheek swab method for a detection of filaggrin. *J Dermatol Sci*. 2013 Mar;69(3):263-5.
- 10) Moniaga CS, Jeong SK, Egawa G, Nakajima S, Hara-Chikuma M, Jeon JE, Lee SH, Hibino T, Miyachi Y, Kabashima K. Protease activity enhances production of thymic stromal lymphopoietin and basophil accumulation in flaky tail mice. *Am J Pathol*. 2013 Mar;182(3):841-51.

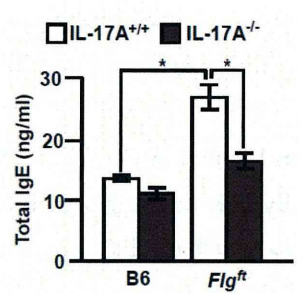
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
該当せず

図 1

A ハプテン反復塗布モデルにおける耳介腫脹の推移 (□野生型マウス、■IL-17A 欠損マウス)



B 血清総 IgE 産生量



アトピー性皮膚炎における外因性及び内因性の分別と金属アレルギー頻度の差異

分担研究者 戸倉新樹 浜松医科大学医学部 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

研究要旨 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 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。外因性と内因性の AD において、金属パッチテストを行った結果、内因性 AD（31 名）は外因性 AD（55 名）に比べ、ニッケルとコバルトに有意に高頻度で陽性を示し、クロムもその傾向があった。また、外因性 AD 患者 12 人と内因性 AD 患者 5 名の患者の汗中のニッケルイオンを測定した結果、内因性 AD の汗中ニッケル濃度は外因性 AD に比べ、有意に高いことが判明した。以上のことから、内因性 AD の病態におけるニッケルあるいはコバルトアレルギーの関与が示唆された。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（AD）は「内因性」「外因性」と大別して捉えることができる。AD 全体の約 20% を占める「内因性」AD では、表皮バリア機能は保たれており、血清 IgE は上昇せず、ダニなどの抗原特異的 IgE は有意には認められない。内因性 AD は、女性に多く、金属アレルギーを有する患者が多い。AD 全体の約 80% を占める「外因性」AD を特徴付けるのは、フィラグリンに代表される皮膚構造蛋白質の異常、かゆみによる物理的搔破により生じる表皮バリア機能の異常、それに伴う環境中のアレルゲンに対する Th2 型の免疫応答である。よって血清 IgE 高値、ダニなどの環境中の抗原特異的 IgE 高値である。内因性 AD 患者および外因性 AD 患者それぞれの末梢血単核球を分離し、PMA と Ca イオノフォアで刺激後、細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーで解析したところ、Th2 サイトカイン（IL-4, IL-5）産生細胞数に有意差は無く、Th1 サイトカイン（IFN- γ ）産生細胞割合は内因性 AD 患者で有意に高い。金属は Th1 に変調した免疫応答を引

き起こすことから、汗を通じた金属の排出が内因性 AD の発症要因として密接に関与していると考えられる。本研究では、AD を内因性と外因性に分け、金属アレルギーの陽性率を検討し、患者の汗中の金属イオン濃度を測定することで、内因性 AD と金属アレルギーの関連を解明することを目的とした。

B. 研究方法

浜松医大皮膚科通院中の戸倉が診察した 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

以上のデータをもとに、AD 患者を内因性 AD（31

名)と外因性AD(55名)の2群に分別した。分別の方法として、血清IgEと日本人のAD患者において生活上身近で重要な抗原であるヤケヒョウダニに対する特異的IgEを使用した。血清IgE 200(IU/ml)未満、あるいは血清IgE 200(IU/ml)以上400(IU/ml)未満でダニ特異的IgEがclass 0または1である群を内因性ADとした。血清IgE 400(U/ml)以上、あるいは血清IgE 200(IU/ml)以上400(IU/ml)未満でダニ特異的IgEがclass 2以上の群を外因性ADとした。各患者に、ニッケル(Ni)、コバルト(Co)、クロム(Cr)について金属パッチテストを施行し、その陽性率を比較した。また、外因性AD患者12人と内因性AD患者5名の患者の汗中のニッケルイオンを測定した。患者の前腕をビニール袋で覆い、運動により発生した汗を回収し、ニッケルイオン濃度を計測した。

C. 研究結果

内因性ADを、「血清IgE値200IU/L未満」または「血清IgE値500IU/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。

内因性AD患者は、外因性ADよりいずれの金属に関してもパッチテスト陽性率は高いが、特にNiとCoに関して、内因性ADのほうが有意差をもって陽性率が高かった(Ni陽性率は内因性16.4%に対して外因性41.9%、Co陽性率は内因性38.7%に対して外因性10.9%、Cr陽性率は内因性22.6%に対して外因性12.7%。いずれか1つ以上の金属に対して陽性を示す割合は内因性61.3%に対して外因性25.5%)。また、血清IgEの値が100以下の群と400以上の群でパッチテストの陽性率を比較したところ、特に血清IgE 100以下の内因性ADの群では、3種類の金属のいずれか1つ以上に陽性を示す割合が63.6%に及んだ。外因性ADのいずれかの金属に対する陽性率が

25%であることを考慮すると、内因性ADへの金属アレルギーへの関与が強く想定された。今回の研究ではフィラグリン遺伝子変異の有無でのパッチテスト陽性率に有意差を認めなかった。内因性AD患者の汗中のニッケル濃度の平均は333.8(ng/g)であったのに対し、外因性AD患者では89.4(ng/g)であり、有意差を認めた。

D. 考察

内因性ADの発症機序の一つの可能性として、摂取された金属が汗を通じて経皮的に排泄され、正常な表皮バリアをも通過することで、金属アレルギーを発症し、皮疹が生じていると推測した。内因性ADが女性に多い理由に、日常生活上でピアスなどの装飾品に含まれる金属に暴露される機会が男性に比べて多いことが挙げられる。表皮バリア機能正常の内因性ADにおいては、タンパク抗原は角層を通過しにくく、ハプテンや金属が反応を誘発する。汗でイオン化した金属は、表皮細胞のMHC分子のペプチド結合溝に存在するオリゴペプチドとイオン結合を生じ、ペプチドの立体構造を変化させることで抗原性を獲得することは知られていた。金属が湿疹反応を誘導する機序として、近年、Niイオンが抗原提示細胞上のToll-like receptor 4(TLR4)を直接刺激する機序が示された。TLR4により刺激された抗原提示細胞がIL-12を産生し、ナイーブT細胞をTh1産生細胞へと分化誘導し、アレルギー反応を誘導する可能性が示されている。Coも同様に直接TLR4を刺激する機序を有し、金属アレルギーを起こすことが提示されている。ニッケルの体内動態は、消化管から約1%が体内に吸収され、血中のNi濃度はNi含有食品の摂取に影響を受ける。サプリメントをはじめとした健康食品や、一般的な食品(ピーナッツ、チョコレートなど)にも金属を多く含む場合があり、個人の習慣によっては過剰摂取になることも多いと予想される。経口摂取に由来しない抗原としては、体表に直接触れる金属は汗により大量に溶出することが知られており、汗により金属アレルギーが起りやすくなっている可能性が考えられる。

E. 結論

内因性 AD の発症に、ニッケルとコバルトアレルギーが深く関与していることが示された。金属は汗を通じて排泄されることを考えると、金属を多量に含む汗により皮疹が悪化している可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y: CXCL10 produced from hair follicles induces infiltrates of Th1 and Tc1 cells in the acute phase of alopecia areata followed by sustained accumulation of Tc1 cells in the chronic phase. *J Dermatol Sci* 69: 140-147, 2013.
- 2) Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Sakabe JI, Kabashima-Kubo R, Hino R, Kobayashi M, Tokura Y: Decreased expression of acetylcholine esterase in cholinergic urticaria with hypohidrosis or anhidrosis. *J Invest Dermatol* (in press).
- 3) Mori T, Kabashima K, Fukamachi S, Kuroda E, Sakabe J, Kobayashi M, Nakajima S, Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S, Nakamura M, Tokura Y: D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci* 71: 37-44, 2013.
- 4) Sakabe JI, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y: Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 288: 17179-17189, 2013.
- 5) Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K: Prostaglandin E2-EP3 Axis in Fine-tuning Excessive Skin Inflammation by Restricting Dendritic Cell Functions. *PLoS ONE* (in press).
- 6) Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J-I, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y: High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* (in press).
- 7) Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, Sakabe JI, Nakahigashi K, Kuroda E, Uematsu U, Nakamura J, Akira S, Nakamura M, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K: Prostaglandin E2 is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production. *Sci Rep* (in press).
- 8) Sakabe J-I, Umayahara T, Hiroike M, Shimauchi T, Ito T, Tokura Y: Calcipotriol increases hCAP18 mRNA expression but inhibits extracellular LL37 peptide production in IL-17/IL-22-stimulated normal human epidermal keratinocytes. *Acta Derm Venereol* (in press).
- 9) Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Hideaki Tanizaki, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M: Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Am J Hum Genet* 93: 1-12, 2013.
- 10) Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal induction of S100A7/psoriasis associated with low frequencies of skin-infiltrating Th17 cells

in dermatophytosis-prone adult T cell leukemia/lymphoma. Clin Immunol (in press).

- 11) Ito T, Fujiyama T, Hashizume H, Tokura Y: Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CXCL10 by reducing CXCR3 expression, F-actin polymerization and calcium influx in patients with alopecia areata. J Dermatol Sci (in press).
- 12) Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, Ito T, Nakamura M, Miyachi, Tokura Y, Kabashima K: Influence of Th2 cells on the hair cycle/growth after repeated cutaneous application of hapten. Clin Exp Dermatol (in press).
- 13) Ito T, Bertolini M, Funakoshi A, Ito N, Takayama T, Biro T, Paus R, Tokura Y: Birth, life, and death of the MAGE3 hypothesis of alopecia areata pathobiology. J Dermatol Sci (in press).
- 14) Fujiyama T, Kawakami C, Suigita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Shimauchi T, Ito T, Kabashima K, Hashizume H, Tokura Y: Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions. J Dermatol Sci (in press).

総説

- 15) Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. Allergol Int 61: 539-544, 2012.
- 16) Fujiyama T, Tokura Y: Clinical and histopathological differential diagnosis of eosinophilic pustular folliculitis. J Dermatol 40: 419-423, 2013.

2. 学会発表

- 1) Tokura Y: Effects of Th17-derived cytokines on keratinocyte production of antimicrobial peptides in psoriasis and adult T cell leukemia / lymphoma. The 23rd Annual Meeting of the Korean Society for Investigative Dermatology. 2013.3.22, 2013. Seoul, Korea.

- 2) Tokura Y: Adult-cell leukaemia / Lymphoma: Impaired innate immunity of the skin. CUTANEOUS LYMPHOMAS (2nd World Congress of Cutaneous Lymphomas, 6th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphoma) 2013.2.7. Berlin, Germany.

- 3) Tokura Y: Profilaggrin processing and metal allergy: Novel aspects of atopic dermatitis. International Immunodermatology Symposium(Post-IID 2013). 2013.5.13. Heidelberg, Germany.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし

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

研究分担者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科 教授

室田浩之 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科 講師

研究要旨 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。

A. 研究目的

「温もるとかゆい」は皮膚科の日常診療でよく聞かれる訴えの一つであるとともに、経験的に制御困難な症状でもある。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、アトピー性皮膚炎患者の96%は「温熱、発汗」が誘起因子と考えており最大の誘因とされている。本研究は温熱が痒みを誘発するメカニズムに着目した。

アトピー性皮膚炎で見られる異常なかゆみ過敏が存在する。このように通常はかゆみに感じられない刺激をかゆみに感じる現象がアロネシスと表現され存在することが知られている。実際にアトピー性皮膚炎では通常疼痛に感じる熱刺激やアセチルコリン投与でかゆみが誘発されると報告されている。しかしこれまでにアロネシスが生じるメカニズムは明らかにされていない。

B. 研究方法

本研究ではアロネシスと増感因子が温もった時の痒みを誘発するという仮説をもとに、申請者らが近年見出した神経栄養因子アーテミンに焦点を当てた検討を行う。アーテミンの発現メカニズムを *in vitro* の細胞培養系で確認し、増感作用アーテミンが

熱痛覚過敏に与える影響を *in vivo* における動物実験によって確認する。またアーテミン投与と暑熱環境、熱刺激が中枢神経の興奮に与える影響を MRI によって検討した。

C. 研究結果

アーテミンはサブスタンス P 刺激によって真皮線維芽細胞から発現誘導され、*in vitro* において神経芽細胞の増殖活性を亢進させることを見出した（図1）。さらにアーテミンはアトピー性皮膚炎病変部真皮に蓄積し（図2）、末梢神経の *sprouting* を誘導することを確認しており、

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（図3）。

アーテミンは背部皮膚に投与したにも関わらずマウスは全身の熱過敏を来したことから、皮膚への限局的なアーテミンの蓄積が中枢神経の増感を介して全身の温度過敏を誘導しているのではないかと考えた（図3）。実際に背部皮膚限局的にアーテミンを投与

したマウスを室温あるいは暑熱環境下におき、脳の興奮状態を MRI にて評価した (図4)。アーテミン投与マウスは室温でも中枢神経が増感しており、その興奮程度は暑熱環境下でより顕著になった。

D. 考察

アーテミンは皮膚の温度過敏および痒みの誘発に関与すると考えられた。またアーテミンの皮膚における限局的な蓄積は中枢神経の増感を介して全身の「温もるとかゆい」を来すものと想像された。

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。

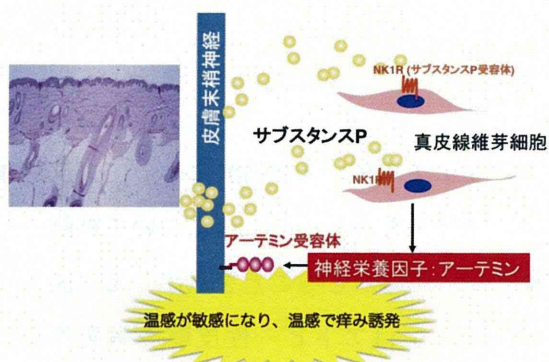


図1：真皮線維芽細胞からサブスタンス p によってアーテミンが分泌される。

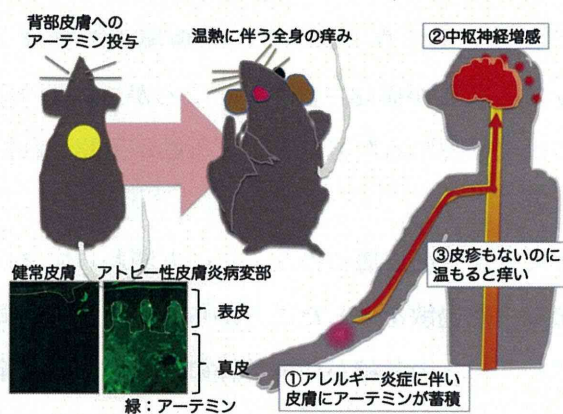


図2：アトピー性皮膚炎病変部の真皮内にアーテミンの沈着を認める。アーテミン皮膚投与マウスは全身の温度過敏をき

たすことから、アーテミンは中枢神経の増感を介して皮疹もないのに「温もると痒い」を引き起こす可能性が考えられた。

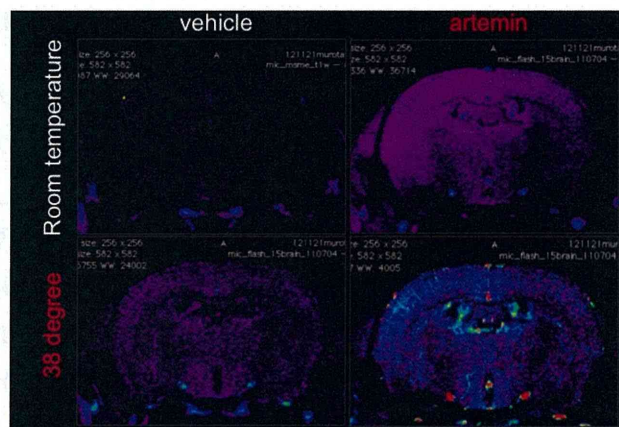


図3：マウスの中樞の興奮の程度を MRI にて評価した。興奮した領域は enhance して確認できる。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) 1: Murota H, Itoi S, Terao M, Matsui S, Kawai H, Satou Y, Suda K, Katayama I. Topical cholesterol treatment ameliorates hapten-evoked cutaneous hypersensitivity by sustaining expression of 11 β -HSD1 in epidermis. *Exp Dermatol*. 2013 Nov 13. doi: 10.1111/exd.12284
- 2) 2: Takahashi A, Murota H, Matsui S, Kijima A, Kitaba S, Lee JB, Katayama I. Decreased Sudomotor Function is Involved in the Formation of Atopic Eczema in the Cubital Fossa. *Allergol Int*. 2013 Sep 25.
- 3) 3: Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 18;440(2):265-70.
- 4) 4: Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. *Acta Derm Venereol*. 2013 Aug 8. doi: 10.2340/00015555-1678.
- 5) 5: Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang L, Lee

- JB, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Dynamic Analysis of Histamine-Mediated Attenuation of Acetylcholine-Induced Sweating via GSK3 β Activation. *J Invest Dermatol*. 2013 Jul 30. doi: 10.1038/jid.2013.323.
- 6) Murota H, El-Latif MA, Tamura T, Katayama I. Olopatadine Hydrochloride Decreases Tissue Interleukin-31 Levels in an Atopic Dermatitis Mouse Model. *Acta Derm Venereol*. 2013 Jul 1. doi: 10.2340/00015555-1648.
- 7) Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol*. 2013 Nov;133(11):2555-65.
- 8) Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jun;172(3):507-12.
- 9) Tanaka R, Fukushima S, Sasaki K, Tanaka Y, Murota H, Matsumoto T, Araki T, Yasui T. In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy. *J Biomed Opt*. 2013 Jun;18(6):61231.
- 10) Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T. In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser. *J Biomed Opt*. 2013 Mar;18(3):031108.
- 11) Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I. Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2, in human epidermal tumors and its role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol*. 2013 Feb;22(2):98-101. doi: 10.1111/exd.
- 12) Murota H, Katayama I. Reply: To PMID 22770266. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Mar;131(3):928-9.
- 13) Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T. In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser. *J Biomed Opt*. 2013 Mar;18(3):31108.
- (日本語論文)
- 1) 室田 浩之：【アトピー性皮膚炎の病態と治療】アトピー性皮膚炎の悪化因子対策. *臨床免疫・アレルギー科 臨床免疫・アレルギー科 (1881-1930)60巻3号Page302-308*
- 2) 木嶋 晶子, 室田 浩之, 熊谷 一代, 瀧原 圭子, 片山 一朗 思春期におけるアレルギー疾患に関する実態調査: CAMPUS HEALTH(1341-4313)50巻1 Page313-315(2013.03)
- 3) 室田浩之他. 【アトピー性皮膚炎治療の新たな展開】汗とアトピー性皮膚炎(解説/特集). *臨床免疫・アレルギー科(1881-1930)59巻2号 Page187-190(2013.02)*
- 4) 木嶋晶子、室田浩之、片山一朗 【総合アレルギー診療を目指して】 《アレルギー疾患の病因・病態における最近の話題》 思春期アレルギー疾患の悪化因子とその対策. *Modern Physician(0913-7963)33巻2号 Page189-192(2013.02)*
- 2.学会発表
- 1) 木嶋晶子、室田浩之、他. 思春期におけるアレルギー疾患に関する実態調査. 第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013、5
- 2) 小野慧美、室田浩之他. アトピー性皮膚炎患者を対象とした発汗に関する実態調査アンケート 第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013、5

- 3) 永田 由子, 中野 真由子, 松井 佐起, 木嶋 晶子, 高橋 彩, 室田 浩之, 片山 一朗アトピー性皮膚炎におけるネコアレルギーとイヌアレルギーの影響第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013, 5
- 4) 中野真由子、室田浩之他. アトピー性皮膚炎の診断基準から見た高齢者紅皮症の臨床的検討と問題点 日本皮膚科学会総会 2013, 5
- 5) 室田浩之 アトピー性皮膚炎の悪化因子対策汗と温度の指導箋 日本皮膚科学会総会 2014,5
- 6) 室田浩之 アトピー性皮膚炎 up-to-date アトピー性皮膚炎と汗 発汗は増悪因子か? 日本臨床皮膚科学会 2013 5

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

痒疹マウスモデル作成と病態に関する研究—Th2 型サイトカインの関与について—

研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授
研究分担者 佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科学講座 教授
研究協力者 端本宇志 防衛医科大学校皮膚科学講座 助教

研究要旨 C57BL/6 マウスを特異 IgE で繰り返し授動感作することによって IgE トランスジェニックマウスと同様に痒疹病変を誘導することに成功した。また STAT6 欠損マウスでは wild-type (C57BL/6) マウスに比して痒疹反応が増強した。反応の増強は wild-type マウスに STAT6siRNA を投与することによっても確認された。STAT6 を介した Th2 型サイトカインシグナルは病変形成に抑制的に作用していると思われる。

A. 研究目的

痒疹は代表的な難治性そう痒性皮膚疾患であり、慢性的な痒みは患者の QOL を大きく損なう。しかしその病態は全く不明である。われわれは昨年 IgE トランスジェニックマウス(IgE-Tg マウス)を用いて痒疹モデルを樹立した。今回は wild-type (WT) マウスにおいて痒疹反応の誘導を試みるとともに、痒疹病変における Th2 型サイトカインの意義について解析した。

B. 研究方法

BALB/c マウスおよび C57BL/6、さらに STAT6 欠損マウス(STAT6 (-/-))を TNP(trinitrophenyl)-特異 IgE にて繰り返し授動感作し、同時に TNP-OVA (ovalbumin)を反復皮下（耳介）または皮内（背部皮膚）投与した。

C. 研究結果

Day 0, 3, 6 に TNP-IgE を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与し、TNP-OVA を Day 1,4,7 に耳介に反復皮下投与したところ持続性の耳介腫脹反応がみられた。組織学的には表皮肥厚、単核球、好酸球、好塩基球の浸潤からなっており、痒疹反応に相当すると思われたが、反応の強さは IgE-Tg マウスに匹敵するほどではなかった。また BALB/c マウスではさらに弱い反応しか得られなかった。次に Th2 型サイトカインの

関与を検討するため、STAT6(-/-)を用いて痒疹反応を誘導したところ、意外なことに WT (C57BL/6)マウスに比してその耳介腫脹は大きく増強していた。同様の病変を背部皮膚を用いて行ったが、やはり STAT6 (-/-)マウスでは WT マウスよりもより明瞭な結節性病変が形成された。また WT マウスで誘導される痒疹病変は STAT6siRNA の局所投与によっても増強した。

D. 考察

今回の研究で、C57BL/6 マウスに特異 IgE の繰り返し投与することで、IgE-Tg マウスの場合と同様に痒疹反応を誘導することができた。痒疹反応モデルでは Th2 型優位の免疫反応が起こっていることが昨年の研究でわかっており、このことはヒト痒疹病変においても確認されている。したがって当初われわれは痒疹病変の形成に Th2 型サイトカインが重要であると予測した。しかし意外なことに STAT6(-/-)マウスや STAT6siRNA 投与時における皮膚反応は増強した。このことは STAT6 を介した Th2 型サイトカインシグナルは病変形成に対して抑制的に作用していることを示している。同時に Th2 型サイトカインを標的とした治療法は病変を悪化させるリスクがあることを示唆する結果となった。今後は Th2 型サイトカインによる炎症抑制作用の機序の詳細を検討する予定である。

E. 結論

マウス痒疹反応モデルにおいて Th2 型サイトカインは抑制的に作用していると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H. Acrosyringeal involvement of palmoplantar lesions of eosinophilic pustular folliculitis. Acta Derm Venereol 93: 99, 2013.
- 2) Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Close association between metal allergy and nail lichen planus: detection of causative metals in nail lesions. J Eur Acad Derm Venereol 27: 231-234, 2013.
- 3) Furue M, Ebata T, Ikoma A, Takeuchi S, Kataoka Y, Takamori K, Satoh T, Saeki H, Augustin M, Reich A, Szepietowski J, Fleischer A, Blome C, Phan N-Q, Weisshaar E, Yosipovitch G, Staonder S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus- a consensus statement-. Acta Derm-Venereol 93: 214-215, 2013.
- 4) Takahashi E, Yokozeki H, Satoh T. Atrophic fibrous hamartoma of infancy with epidermal and adnexal changes. J Dermatol 40: 212-214, 2013.
- 5) Kato K, Satoh T, Tanaka-Fujimoto T, Ueda N, Yokozeki H. IgG4-positive cells in skin lesions of cutaneous and systemic plasmacytosis. Eur J Dermatol 23: 255-256, 2013.
- 6) Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial prokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition. Int J Dermatol (doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05506.x.in press).
- 7) Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2: therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. Immunology 140: 78-86, 2013.
- 8) Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. J Dermatol Sci 70: 26-33, 2013.
- 9) Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. $\alpha(1,3)$ fucosyltransferases-IV and VII are essential for initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. J Invest Dermatol 133: 2161-2169, 2013.
- 10) Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. Acta Derm Venereol (doi: 10.2340/00015555-1617).
- 11) Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Masuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H. Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. Clin Immunol 149: 1-10, 2013.
- 12) 佐藤貴浩：好酸球性血管性浮腫の病態と治療 診る・わかる・治す 皮膚科臨床アセット：1 6 蕁麻疹・血管性浮腫パーフェクトマスター 総編集 古江増隆 中山書店 東京 pp280-282, 2013
- 13) 佐藤貴浩：皮膚瘙癢症 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス—鑑別と治療のポイント— 編集 横関博雄 片山一朗 医薬ジャーナル 大阪 pp12-13, 2013
- 14) 佐藤貴浩：多形慢性痒疹 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス—鑑別と治療のポイント— 編集 横関博雄 片山一朗 医薬ジャーナル 大阪 pp41-43, 2013

2. 学会発表

- 1) Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H. Inhibition of STAT6 signals exacerbates IgE-mediated, basophil-dependent prurigo-like reactions. International Investigative Dermatology 2013. Edinburgh, 11, May 2013.
- 2) Hirai A, Kataoka N, Satoh T, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2: Proposal of a mechanism of action for eosinophilic pustular folliculitis. International Investigative Dermatology 2013.

Edinburgh, 10, May 2013.

(教育講演)

- 3) 佐藤貴浩 : 好塩基球と皮膚炎症 第3回 Saitama Allergy Workshop (川越市) 7月11日, 2013
- 4) 佐藤貴浩 : Pathological etiology and therapeutic approaches for prurigo Invited lecture 国際かゆみシンポジウム 大阪市 10月26日, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒト iPS 細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響を
in vitro で詳細に検討するシステム構築

研究協力者氏名 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師
研究責任者氏名 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎は多因子性の疾患と考えられるが、その中には遺伝的要因も含まれていると考えられている。そのような遺伝的要因のひとつにフィラグリン遺伝子の変異がある。本研究においては、その変異の有無によって角化細胞にどのような変化が生じるのかを、ヒト iPS 細胞を利用して検討することを考え、その研究を行うためのシステムを構築した。

A. 研究目的

皮膚疾患の多くは多因子性の疾患であると考えられ、遺伝的要因もそれに含まれると考えられる。これまでもアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異などの報告がなされているが、それらの変異が実際の病態形成にどのような役割を果たしているのかをヒトの系で詳細に検討できるシステムはなかった。そこで、我々は、ヒト iPS 細胞を利用して、このような遺伝子変異が実際の病態形成に与える影響について詳細に検討できるシステムの構築を考え、まず、アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行うこととした。

B. 方法

目的を達成するために下記のような手順を踏むこととした。

- ① ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs (TAL Effector Nucleases) を利用するシステムを構築。
- ② ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。
- ③ 上記システムを導入したヒト iPS 細胞においてフィラグリン遺伝子に変異を導入する (TALENs)。

- ④ ③のヒト iPS 細胞を角化細胞に分化させ、検討を行う。

なお、使用するヒト iPS 細胞は研究協力者により、piggybac トランスポゾンシステムを利用して作製し、transgene-free かつ mutation-free であることが確認されたものを使用する。

C. 結果

- ① TALENs を利用するシステムの構築ならびにケラチン遺伝子発現可視化システムの構築
Voytas らにより確立しされている Golden Gate Methods を modify した方法を用いて、TALENs を作製するシステムを構築し、それを用いて、ヒト iPS 細胞において、K14 遺伝子の下流に eGFP 遺伝子をノックインすることに成功した。
- ② フィラグリン遺伝子変異挿入のための TALENs の作製
同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断する TALENs を作製した。

D. 考察 ならびに E. 結論

本研究により、フィラグリン遺伝子変異が与える影響を検討するシステムの構築が完了した。今後、分化誘導して得られた表皮角化細胞において、フィラグリン遺伝子変異の有無のみが違う状況の比較検討をすることにより、アトピー性皮膚炎においてフィ

ラグリン遺伝子変異が存在することの意味合いについて、これまでと違った面よりアプローチができると考えられる。

G. 研究発表

1: Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. Acta Derm Venereol. 2013 Aug 8.

2: Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Masuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H. Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. Clin Immunol. 2013 Oct;149(1):1-10.

3: Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferases IV and VII are essential for the initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. J Invest Dermatol. 2013 Sep;133(9):2161-9.

4: Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. Clin Exp Immunol. 2013 Jun;172(3):507-12.

5: Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2 : therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. Immunology. 2013 Sep;140(1):78-86.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

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遺伝子治療学講座 教授

研究要旨 HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は免疫細胞に作用してTh1シフトを起こすためアレルギー疾患の治療に適していると考えられる。そこで、さらにその作用を強力にするために一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-Eの開発を行い、その作用機構を解析した。

A. 研究目的

HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は免疫細胞に作用してTh1シフトを起こすためアレルギー疾患の治療に適していると考えられる。そこで、さらにその作用を強力にするために一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-Eの開発を行い、その作用機構を解析した。

B. 研究方法

一本鎖IL12ポリペプチドとHVJ-Eを併用することにより、マウス樹状細胞や脾臓細胞からのInterferon- γ (IFN- γ)の産生が亢進するかどうかを、ELISA法で測定した。次にIL12蛋白質をウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-Eの構築を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

C. 研究結果

HVJ-Eのみを樹状細胞やマウス脾臓細胞に加えてもIFN- γ の産生はほとんど認められなかった。0.1 ng/mlのscIL12ではIFN- γ の産生は検出できなかった。しかしscIL12(0.1 ng/ml)とHVJ-Eを併用すると150~200 pg/mlのIFN- γ が脾臓細胞から産生された。細胞から産生されたHVJ由来のHVJ-E(膜融合活性なし)と野生型のHVJ-E(融合活性あり)をそれぞれ別々にscIL12とともに脾臓細胞に加えると、どちらのHVJ-EでもIFN- γ の産生増強を認めた。次にscIL12とHVJ-Eを併用する代わりにIL12結合型HVJ-Eの機能について解析した。IL12結合型HVJ-E(1.5×10^7 粒子)を脾臓細胞(2×10^5 粒子)にかけると24時間後に120~150 pg/mlのIFN- γ の産生が検出された。マウス樹状細胞に加える

と24時間で40 pg/mlのIFN- γ が分泌された。IL12結合型HVJ-Eに含まれるIL12と同じ量のZZ-scIL12やscIL12ではIFN- γ はほとんど検出されなかった。著明に抑制された。

D. 考察

膜融合能のないHVJ-EでIFN- γ 産生増強がおり、HN蛋白質のないIL12結合型HVJ-Eで同じくIFN- γ の産生が増強されることから、HVJ-EのF蛋白質を認識する受容体が脾臓細胞の表面にあり、これが刺激されて起こるシグナル経路によって産生された因子がIL12と共存することによりIFN- γ の産生を活性化させることが示唆される。

E. 結論

IL12結合型HVJ-Eは強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanemura A, Kiyohara E, Katayama I, Kaneda Y.
Recent advances and developments in the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application.
Cancer Gene Ther. In press..

2. 学会発表

- 1) 金田安史：第19回日本遺伝子治療学会 理事長講演 “What will be needed for gene therapy in Japan?” 2013/07/04 岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査

研究分担者氏名 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師
研究協力者氏名 野老翔雲 東京医科歯科大学皮膚科 助教

研究要旨 アトピー性皮膚炎(AD)は様々な遺伝的・環境的要因が複雑に絡み合って発症する疾患であるが、近年いくつかの subgroup の集まりとする考え方が報告されるようになった。代表的には血中 IgE 値により分類する方法がある。今回我々はアトピー性皮膚炎を IgE の低い内因性と IgE の高い外因性の病型に分類し、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詳細に検討した。Dennie-Morgan fold、紅皮症、頸部色素沈着、結節性痒疹などの難治性皮膚症状は外因性 AD で多くみられ、今後それらの病変の発症メカニズムを検討していくことでターゲットを絞った新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎を IgE の低い内因性と IgE の高い外因性の病型に分類し、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詳細に検討する。本研究にはフィラグリン遺伝子変異の有無や皮膚でのプロテアーゼ発現の有無についても含まれる。このような検討を多施設にわたって大規模に行った例はなく、今後アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連が明らかになれば、そのような病変の発症メカニズムを検討していく上で大きな利点となり、ひいては、ターゲットを絞った新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

B. 研究方法

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎ガイドラインの診断基準を満たし、東京医科歯科大学、浜松医科大学、京都大学、大阪大学、防衛医科大学の皮膚科外来通院中の AD 患者のうち同意が得られたものを対象と

した。AD を IgE \leq 200 の内因性と IgE $>$ 200 の外因性の病型に分類し、痒疹等の難治性皮膚病変、血中 IgE 抗体値などの各種検査値や金属アレルギー (Ni、Co、Cr)、フィラグリン遺伝子変異の有無等について調査を行った。

C. 研究成果

対象は 168 例が登録された。内因性 AD19 例 (男 5、女 14)、外因性 AD149 例 (男 90、女 59)。難治性皮膚症状としては Dennie-Morgan fold、紅皮症、頸部色素沈着、結節性痒疹が外因性 AD に多くみられた。内因性 AD では金属パッチテスト陽性例が多くみられたが、逆にフィラグリン遺伝子変異例は少なかった。

D. 考察

IgE 値に基づいて内因性、外因性の病型に AD を分けたとき、臨床症状に違いがみられた。それらの違いには金属アレルギーやフィラグリン遺伝子変異に

よる皮膚バリア機能が関係している可能性が予測され、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

Dennie-Morgan fold、紅皮症、頸部色素沈着、結節性痒疹などの難治性皮膚症状は外因性 AD で多くみられた。今後それらの病変の発症メカニズムを検討していくことでターゲットを絞った新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. *Acta Derm Venereol.* 2013 Aug 8.
2. Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):507-12.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産出願・登録状況

なし。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表