

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班

第1回班会議

会 場：会場：パシフィコ横浜 会議センター 415

日 時：日時：6月14日（金） 17:00～19:30

【議 題】

- 1、 班長挨拶（横関）
- 2、 アトピー性皮膚炎のアンケート調査委用紙の説明、方法説明（井川）
- 3、 アトピー性皮膚炎の病型による新規治療法の臨床研究（横関）
- 4、 各個研究各個研究（各班員5分程度で発表）

難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

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

平成25年度第1回班会議録

出席者： 佐藤貴浩、端本宇志、片山一朝、室田浩之、戸倉新樹、宮地良樹、椛島健治、谷崎英昭、横関博雄、
鳥山 一、金田安史、安東嗣修、井川 健、野老翔雲

会 場： パシフィコ横浜 会議センター 415

日 時： 6月14日（金） 17:00～19:30

① 班長挨拶（東京医科歯科大学皮膚科 横関博雄先生）

本年度の実施予定項目についての説明があった。

- 1) アンケート調査の実施。
- 2) 臨床のタイプを絞って（痒疹型）、抗 IgE 抗体による治療効果の検討を行う臨床研究の提案。
- 3) 結節性痒疹に対するヒルドイド密封療法。
- 4) iPS 細胞を利用した病態解明の試み。

② アトピー性皮膚炎アンケート調査実施について（東京医科歯科大学皮膚科 井川 健）

「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」の倫理申請が東京医科歯科大学において了承されたことと、各施設における同申請のお願い、ならびに、申請が了承され次第、調査を施行していただくことをお願いした。なお、100例を目標とさせていただくこと、フィラグリン遺伝子変異の調査は可能なところのみでも可とさせていただくこと、期限は10月末日とさせていただくことを了承していただいた。

③ 各個研究

- 1) 外因性、内因性アトピー性皮膚炎における臨床症状と痒み関連因子の比較検討（浜松医科大学皮膚科 戸倉新樹先生）
内因性、外因性でグループを分けたときに、両グループ間において臨床所見、検査所見などさまざまに違いがみられる。本年度は上記についての検討を行っていく。
- 2) アトピー性皮膚炎マウスモデルにおける IL-17A の新しい役割の検討（京都大学皮膚科 椛島健治先生）
IL-17A^{-/-}マウスならびに、flaky tail mouse と IL17A^{-/-}をかけあわせたマウスを利用して、Th2 型優位の炎症反応において IL-17A が重要な役割を果たしていることについて検討をおこなっていく。
- 3) 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（東京医科歯科大学皮膚科 井川 健）

ヒト iPS 細胞作製ならびに iPS 細胞から表皮角化細胞への分化システムを利用して、フィラグリン遺伝子の変異のみの違いで角化細胞のふるまいになにか影響がおこるのかどうかを検討していきたい。

4) 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 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野 鳥山 一教授)

【平成25年度研究計画】

1. IgE 依存性皮膚慢性アレルギー炎症のマウスモデルにおける好塩基球の皮膚病変部位への遊走メカニズムの解析

2. IgE 依存性皮膚慢性アレルギー炎症のマウスモデルにおける好塩基球由来の炎症惹起因子の解析

5) IL12 結合型 HVJ-E の開発 (大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座 金田安史教授)

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ことを昨年報告した。さらにその作用を強力にするために一本鎖 IL12 ポリペプチドをウイルス粒子表面に有する高機能型 HVJ-E の構築に成功した。今年度は IL12 結合型 HVJ-E の作用を樹状細胞やマウス脾臓細胞に作用させて解析する予定である。

6) アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与: 本年度の研究予定 (富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 安東嗣修准教授)

平成25年度は、「好塩基球から遊離される mMCP-11 の痒みへの関与とその発生機序」に関して研究を行う。

(文責: 井川 健)

平成25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26年1月10日(金)(15:00-17:00) 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

15:00-15:05

班長挨拶

研究発表 (1人10分、質疑応答5分)

15:05-15:20

1. 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

井川 健、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

15:20-15:35

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

15:35-15:50

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

15:50-16:05

4. 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

椛島健治、宮地良樹

京都大学大学院医学研究科 皮膚科学

16:05-16:20

5. 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

戸倉新樹

浜松医科大学 皮膚科学

16:20-16:35

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

16:35-16:50

7. マウス痒疹様皮膚反応におけるSTAT6シグナルの役割

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

16:50-17:05

8. 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

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

17:05-17:10

今後の予定について

班長 横関博雄

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 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師
研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科 教授

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。

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

私たちのこれまでの研究により、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) の責任細胞が、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が明らかとなった。一方、主たる浸潤細胞のひとつである好酸球の役割ならびに好塩基球との相互作用に関しては不明である。そこで本研究では、好酸球欠損マウスとして広く用いられている Δ dblGATA マウス (転写因子 GATA-1 遺伝子のプロモーターに変異を入れた遺伝子改変マウス) において IgE-CAI を誘発し、好塩基球非存在下における IgE-CAI 炎症ならびに好塩基球動態を解析した。

B. 方法

Δ dblGATA マウスを IgE で受動感作した後に耳介皮膚にアレルゲンを投与し、耳介腫脹ならびに浸潤細胞を経時的に測定した。 Δ dblGATA マウスから骨髄、脾臓、末梢血を採取し、好塩基球・好塩基球前駆細胞の数を野生型マウスと比較検討した。さらに、骨髄細胞をサイトカイン IL-3 あるいは TSLP とともに培養し、好塩基球の生成能を調べた。次に、 Δ dblGATA 好塩基球と野生型好塩基球を IgE とアレルゲンで刺激し、脱顆粒ならびにサイトカイン (IL-4, IL-6) 産生を比較した。野生型好塩基球に IL-4 遺伝子に対応する siRNA を導入し、サイトカイン産生に対する影響を調べた。

C. 結果

Δ dblGATA マウスでは、IgE-CAI における耳介腫脹が野生型マウスの 2/3 程度に減弱し、皮膚に浸潤する好塩基球数が正常マウスの 1/3-1/2 と減少していた。その原因を探るため、未処置の Δ dblGATA マウスを解析したところ、好酸球の欠損だけではなく末梢好塩基球ならびに骨髄好塩基球前駆細胞の減少がみとられ、*in vitro* での好塩基球生成も低下していた。さらに、 Δ dblGATA 好塩基球では、IgE とアレルゲンの刺激によって誘導される脱顆粒ならびにサイトカイン産生が低下していた。 Δ dblGATA 好塩基球における GATA-1 発現を調べたところ、野生型好塩基球の約 1/4 であった。さらに、野生型好塩基球に IL-4 siRNA を発現させるとサイトカイン産生の低下がみとめられた。

D. 考察

これまでの研究で、転写因子 GATA-1 が赤血球、巨核球、好酸球ならびにマスト細胞の分化・成熟に寄与していることが報告されていたが、好塩基球における役割は不明であった。本研究により、GATA-1 が好塩基球の生成ならびに活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、 Δ dblGATA マウスでは好塩基球の減少症ならびに機能低下が存在することが判明した。したがって、 Δ dblGATA マウスで認められた表現型を解釈する際には、好酸球だけでなく好塩基球の異常も考慮する必要がある。

E. 結論

好酸球欠損 Δ dblGATA マウスにみとめられた IgE-CAI 炎症の減弱は、好塩基球の異常に起因することが強く示唆された。

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
研究協力者 中林数馬 富山大学大学院医学薬学 教育部院生
倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部 教授

A. 研究目的

難治性癢痒性皮膚疾患の1つにアトピー性皮膚炎がある。アトピー性皮膚炎の主たる症状に慢性の皮膚炎に加え、非常に耐え難い激しい痒みがある。痒みは、患者の QOL を損なうことに加え、搔破による皮膚炎の悪化や皮膚炎治療の妨げにもなる。そこで、痒みの抑制は非常に重要な課題となっているが、未だその発生機序が不明であり、有用な治療薬が無いのが現状である。これまでに自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いた研究から、健常マウス皮膚に比べ、皮膚炎皮膚において好塩基球が増加していることを見出した。また、好塩基球除去抗体処置により、自発的痒み関連動作（搔き動作）が減少することも見出した。本研究では、更に、アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応への好塩基球の関与に関して検討を行った。

B. 方法

実験には、雄性の 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）で飼育すると皮膚炎や痒み関連動作（搔き動作）を示さない健常状態を保っているが、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搔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、デジタル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。一部の実験では、mMCP-11 を SPF 飼育下健常マウスに皮内注射して、注射部位への後肢による搔き動作回数をカウントした。

皮膚内の好塩基球数並びにマスト細胞数は、それぞれ好塩基球特異的抗体（TUG8）並びに mMCP-7 抗体を用いた免疫染色により行った。

C. 結果

アトピー性皮膚炎モデルマウスでは、健常マウスと比べ、明らかな皮膚炎の誘発と有意な自発的搔き動作数の増加が観察された。また、皮膚マウスモデル皮膚では、健常マウス皮膚に比べマスト細胞数は約3倍に増加したが、興味あることに好塩基球に関しては約60倍に増加していた。自発的搔き動作は、好塩基球除去抗体（Ba103）の処置によりコントロール抗体処置に比べ有意に抑制された。好塩基球から遊離される因子の1つに、mMCP-11がある。健常マウスへの mMCP-11 の皮内注射は書き動作を誘発した。一方、熱処理した mMCP-11 では、搔き動作は誘発されなかった。

D. 考察

アトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚において、好塩基球がマスト細胞に比べ明らかに増加し、好塩基球除去抗体により痒み反応が抑制された。このことは、アトピー性皮膚炎モデルマウスの痒み反応に好塩基球が関与することを示唆する。好塩基球からは、ヒスタミンやセリンプロテアーゼである mMCP-11 などが遊離される。本マウスの系統は、ヒスタミンの皮内注射では痒み反応が起らない。一方、本実験では、mMCP-11 により痒み反応が誘発された。以上の結果より、好塩基球から遊離される mMCP-11 がアトピー性皮膚炎の痒みの誘発に関与している可能性が示唆される。

E. 結論

アトピー性皮膚炎の痒みに好塩基球—mMCP-11 系が関与している可能性がある。

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 梶島健治 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幼少期に始まり、顔面などの特徴的な部位に皮疹を生じ、搔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。我々はこれまでに、アトピー性皮膚炎患者の末梢血中の 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、本研究ではアトピー性皮膚炎における IL-17A の果たす役割を検討することを目的とする。

B. 方法

マウスアトピー性皮膚炎モデルを用いて IL-17A のアトピー性皮膚炎において果たす役割を検討する。マウスアトピー性皮膚炎モデルとして、ハプテン反復塗布モデル、フィラグリン遺伝子異常を有する flaky tail マウスを用いる。

C. 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。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 (Moniaga 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、皮膚炎の軽減や血清中の IgE 産生の低下を認めた。

D. 考察

IL-17A はマウスアトピー性皮膚炎モデルにおいて、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。また、これらの部位での IL-17A の主な産生細胞は $\gamma\delta$ T 細胞であった。

E. 結論

IL-17A はマウスアトピー性皮膚炎モデルにおける Th2 誘導に促進的に作用した。アトピー性皮膚炎において IL-17A は新規治療ターゲットとなることが期待される。

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

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
研究協力者 山口隼人 浜松医科大学皮膚科 診療従事者

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. 方法

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 (IU/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. 結果

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 (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)。

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しうる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こ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。

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の皮膚局所への蓄積が全身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。38℃環境下でアーテミン投与マウスの脳の興奮状態をMRIにて観察したところ、通常ではみられない脳の興奮が確認された。

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。

マウス痒疹様皮膚反応における STAT6 シグナルの役割

研究協力者 端本宇志 防衛医科大学校 皮膚科 助教
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 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授

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。我々は、IgE 依存性慢性アレルギー性炎症 (IgE-CAI) を持続させることによりマウスに痒疹様病変を惹起することに成功し、そのモデルマウスでは、Th2 型反応が優位であることを以前に報告した。今回は、Th2 型反応に重要とされる STAT6 がどのような役割を果たしているかを解析することとした。

B. 方法

TNP 特異的 IgE で受動感作させた C57BL/6(wild-type: WT)マウスと STAT6 欠損マウスについて、耳介皮膚、あるいは背部皮内に TNP-OVA を 3 回反復投与し、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 STAT6 欠損マウスでは、耳介腫脹は WT マウスに比べて著明に増悪していた。さらに、WT マウスの耳介に STAT6 siRNA を投与すると、耳介腫脹は scramble siRNA に比べて増悪した。

次に、STAT6 欠損マウスの背部皮膚に TNP-OVA を反復投与して痒疹様病変を作成したところ、WT マウスに比べて、表皮の肥厚や好酸球、好塩基球の浸潤が極めて顕著となっていた。さらに、病変部では IL-4、IL-13 産生が著明に増加していた。

最近報告された IL-4/M2 マクロファージによる IgE-CAI の抑制機構について本マウスモデルでも検証を試みたところ、STAT6 欠損マウスの病変部には M2 マクロファージマーカーである CD163(+)細胞、CD206(+)細胞はほとんど存在しなかった。また WT マウスでみられた F4/80(+)マクロファージ、CD206(+)M2 マクロファージにおける pSTAT6 の核内移行は STAT6 欠損マウスでは確認されなかった。

D. 考察

われわれが作成したマウスの痒疹様病変は、ヒトにおける痒疹の既報告と同様に、IL-4、IL-13 産生が増加している Th2 環境にあった。このことから、STAT6 を抑制すると痒疹様反応も制御できる、と予想したが、結果は逆に増悪していた。病変内に浸潤した炎症性単球が好塩基球由来の IL-4 により M2 マクロファージに分化し、IgE-CAI を抑制すると報告されていることから、痒疹様反応においても IL-4 による STAT6 シグナルの消失が M2 マクロファージの誘導を阻害し、炎症が増悪した可能性がある。

E. 結論

マウスにおいて誘導された痒疹様反応は Th2 優位であるが、STAT6 シグナルは抑制的に作用していることが示された。

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

がん治療剤として臨床応用されている HVJ-E ベクターは Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ)を紫外線等で不活性化した粒子に 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、その作用機構を解明し、さらに適した治療剤へと改良することを目的とする。

B. 方法

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 ポリペプチドと HVJ-E を併用することにより、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。樹状細胞は C57BL/6 マウス骨髄由来である。脾臓細胞は分画せず、そのまま用いた。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。そのために HVJ の HN 蛋白質の野生型のほかに 4 種類の C 末端側欠失体を作成し、欠失させた C 末端側に IgG の Fc ドメインを付加した Fc-rHN を作成した。このキメラ蛋白質の遺伝子を細胞に導入して細胞膜での発現を調べたところ、1~160 のアミノ酸を有する ecto-100aa-HN を用いたキメラ蛋白質のみが細胞膜に Fc ドメインを発現させた。そこでこのキメラ蛋白質遺伝子を LLCMK2 細胞に遺伝子導入し安定形質転換株を得た。次に、この安定形質転換株に HN の siRNA を導入し、野生型の HVJ を感染させ、培養液中に出現する HVJ を回収した。HVJ は Fc を膜表面に発現し、HN が欠損しており、これを Fc-HVJ (HN deleted)と命名した。一方、IL12 の p35, p40 を融合させた一本鎖 IL12 遺伝子(scIL12)を作成し、これに Fc ドメインと結合できる Protein A の ZZ ドメインの遺伝子を結合させた ZZ-scIL12 遺伝子を作成した。この遺伝子を CHO-K1 細胞に導入し、分泌される ZZ-scIL12 を回収し生成した。上記の Fc-HVJ (HN deleted) を紫外線照射して不活性化し、これに ZZ-scIL12 を加え、シヨ糖密度勾配遠心法で IL12 結合型 HVJ-E を得た。この IL12 結合型 HVJ-E をマウスの樹状細胞や脾臓細胞に作用させて IFN- γ の産生を ELISA 法で測定した。

C. 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。この IFN- γ の産生が HVJ-E の膜融合能によるのかどうかを調べるため、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。ちなみに IL12 結合型 HVJ-E の Western blot より、1 粒子の HVJ-E あたり 6.83 分子の scIL12 が結合していると推定された。また IL12 結合型 HVJ-E の血中安定性を予測するため、マウス血清中で 37 度でインキュベートして IL12 や Fc-HVJ-E(HN depleted)分解速度を調べたところ、24 時間で 30%程度の scIL12 と同じく HVJ-E の残存が認められた。

D. 考察

HVJ-E と一本鎖 IL12 蛋白質の併用により脾臓細胞や樹状細胞からの IFN- γ 産生が、各々を単独で用いる時よりもはるかに強く増強されることが明らかになった。このとき HVJ-E の膜融合能は必要なかったことから、HVJ-E に含有されるウイルス RNA 断片が細胞質に導入されて RIG-I/MAVS の経路を活性化するという可能性は否定さ

れた。膜融合能のない HVJ-E で IFN- γ 産生増強がおこり、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。また脾臓細胞の中のどの分画の細胞に HVJ-E が働きかけ、またそれで産生される因子が IL12 とともにどの細胞分画に作用して IFN- γ の産生を増強させるかを明らかにすることが必要である。また IL12 結合型 HVJ-E (HN depleted) がマウス血清中でも比較的安定であったことから、血中への投与による治療剤にもなりうると思われる。

E. 結論

HVJ-E を一本鎖 IL12 蛋白質と併用すると IFN- γ が産生増強される。これを 1 つのベクターで解決したのが IL12 結合型 HVJ-E であり、この 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。

