

201414010A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業(免疫アレルギー疾患予防・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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横関 博雄

平成 27 年(2015 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業(免疫アレルギー疾患予防・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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横関 博雄

平成27年(2015年)3月

【目 次】

I. 平成26年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
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	3
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）	
III. 分担研究報告	
1. 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	9
鳥山 一（東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野）	
2. 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	12
安東嗣修（富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学）	
3. 共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析	16
梶島健治（京都大学医学研究科皮膚科学）	
4. アトピー性皮膚炎患者における血清中および汗中ニッケル濃度と ニッケル高濃度含有食品負荷後の変動に関する研究	18
戸倉新樹（浜松医科大学皮膚科学）	
5. 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	21
片山一朗（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室） 室田浩之（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室）	
6. 慢性に経過する痒疹26例の検討—分類不能な痒疹の位置づけについて—	25
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） 佐藤貴浩（防衛医科大学校皮膚科学講座）	
7. 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	28
井川 健（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野）	
8. 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究	30
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）	
9. 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	32
野老翔雲（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）	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
V. 班会議プログラム・議事録・抄録	43

I. 平成26年度構成員名簿

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

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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
研究分担者	片山 一朗	大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室	教授
	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
	鳥山 一	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野	教授
	佐藤 貴浩	防衛医科大学校皮膚科学講座	教授
	戸倉 新樹	浜松医科大学皮膚科学	教授
	栂島 健治	京都大学医学研究科皮膚科学	准教授
	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	准教授
室田 浩之	大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室	准教授	
研究協力者	端本 宇志	防衛医科大学校皮膚科学講座	助教
	西澤 綾	防衛医科大学校皮膚科学講座	講師
	平澤 典保	東北大学大学院生活習慣病治療薬学分野	教授
	山口 隼人	浜松医科大学皮膚科	診療従事者
	中島 沙恵子	京都大学医学研究科皮膚科学	研究員
	中林 数馬	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	大学院生
	羽座 沙都美	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	大学院生
	辻井 謙一郎	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	大学院生
	倉石 泰	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	教授
	井川 健	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	講師
	野老 翔雲	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	助教
	宇賀神つかさ	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	特任助教
	塩原 哲夫	杏林大学医学部皮膚科学教室	教授
	加藤 則人	京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学	教授
矢上 晶子	藤田保健衛生大学医学部皮膚科学講座	准教授	
足立 厚子	兵庫県立加古川医療センター皮膚科	部長	
高山 かおる	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	講師	

Ⅱ. 総括研究報告

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、手湿疹）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、異汗性湿疹様病変の発症頻度を各班員の施設にてアンケート調査した。その結果、尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑などが外因性ADに高率であった。内因性ADは全体の12%で女性に多く、臨床的には手湿疹の合併が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。内因性ADの患者の血清中のニッケル濃度が、外因性ADおよび正常人に比べて有意に高いことも見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一方、手湿疹診療ガイドライン委員会を立ち上げ診療アルゴリズム案を策定している。26例の痒疹患者を分類したところ分類しがたい症状を呈した症例が認められた。ADモデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離されるカリクレイン（KLK5）が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出されるmMCP-8が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。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。さらに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されアーテミンの中和抗体で改善が認められた。非侵襲的にNMFを測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療とNMFを中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価をした。また、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒトiPS細胞を作成し、フィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行った。前年度報告した一本鎖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(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シフトをおこすためアレルギー疾患治療に適していると考えられるが、今年度はその作用機構をさらに詳細に解析した。

A. 研究目的

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調査を施行し検討した。さらに、各病型ADの汗を解析して金属の濃度を測定する。さらに、金属負荷試験も試行した。各種のADの皮膚病変のモデルマウスを用いてADの発症機序を解析する。さらに、何故HVJ-EがADに効果があるのか、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。

また、ヒトiPS細胞を利用して、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なった。

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、フィラグリン遺伝子変異の比較検討

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。病型による臨床症状、検査値や

金属アレルギー（Ni、Co、Cr）の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。臨床症状としては Dennie-Morgan fold、魚鱗癬、palmar hyperlinearity、手湿疹、顔面難治性紅斑、紅皮症、頸部色素沈着、脱毛、Hertoghe、汗疱様発疹、亜急性痒疹、結節性痒疹の合併有無について調査を行った。浜松医科大学皮膚科アトピー性皮膚炎外来を受診した AD の患者のうち16歳以上で、かつ同意を得られた10名と健常ボランティア17名を対象に経口負荷試験前後の血清および汗中のニッケル濃度を測定した。

2) 本研究班の班員と京都府立医大皮膚科加藤則人教授、杏林大学塩原哲夫教授、藤田保健衛生大学矢上晶子准教授、兵庫県立加古川病院皮膚科足立厚子先生を加えて手湿疹氏音量ガイドライン委員会を立ち上げ2回委員会を開催、手湿疹の定義、病態、分類、診療アルゴリズムを検討した。

3) 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。

4) 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、8mm ビデオカメラでその行動を撮影し行った。本実験では吻側背部への搔き動作回数を数えた。一部の実験では、KLK5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数えた。

5) 好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

6) River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位（右示指先端指腹）および非外用部位の皮膚（左示指先端指腹）の NMF を解析し、ステロイド長期外用に伴う皮膚 NMF の変化について検討を行った。

7) 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 あるいは CRISPR/Cas9といった人工ヌクレアーゼを利用するシステムを構築。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。

8) 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

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。

C. 結果

174例が登録された。内因性 AD21例（男5、女16）、外因性 AD153例（男91、女62）。内因性 AD は全体の12%で女性に多く、喘息・鼻炎の既往歴や家族歴は少なかった。臨床的には手湿疹の合併が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。一方外因性 AD は喘息・鼻炎の既往歴や家族歴が多く、臨床的には尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向がみられた。痒疹は亜急性痒疹、結節性痒疹ともに外因性 AD との合併が多かったが、いずれも有意差はなかった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では病型にかかわらず尋常性魚鱗癬、palmar

hyperlinearity の合併が多かった(横関)。手湿疹診療ガイドラインは策定中である(横関)。金属負荷前血清ニッケル濃度 (mean±SD, ng/ml) は内因性 AD で3.48±1.27, 外因性 AD で2.13±2.39, 正常人で0.40±0.93であった(戸倉)。フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認同様に、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(井川)。皮膚へのアーテミン投与、あるいはホットプレートによる熱刺激を加えたところ、いずれもマンガン造影 MRI で視床下部、扁桃体に造影効果がみられアーテミン中和抗体の投与によって減弱することが確認された(片山、室田)。健常 NC マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応は PAR2拮抗薬により抑制された。皮膚において KLK5 mRNA の発現や KLK5 の活性が、健常マウスに比べ、皮膚炎マウスで増加していた(安東)。ステロイド長期外用後の皮膚における NMF は長期外用しなかった皮膚と比較して著明に低下していた。NMF の主要な構成成分であるピロリドンカルボン酸 (PCA) も同様の傾向を認めた。一方で、角質間脂質の一つとして知られるセラミドについてはステロイドの長期外用による影響を認めなかった(椛島)。HVJ-E と IL12 の組み合わせで脾臓細胞からの interferon- γ (IFN- γ)のみならず、IL12 receptor, T-bet, IL18 の発現も IL12 単独よりも有意に亢進することがわかった (金田)。

D. 考察

外因性 AD は重症型の発疹である紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑が多く見られた。IgE の関与する外因性 AD の方が重症 AD の傾向が示された。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。血清中に高濃度に存在するニッケルが、内因性 AD の発症に寄与している可能性が推測された。AD モデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離される KLK5 が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8 が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。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。AD 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。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。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。HVJ-E の F 蛋白質が macrophage から IL18 を産生させ、IL12 と共同で T cell に作用して IFN- γ が産生され、これが T cell での IL12 receptor の発現を T bet を介して高めることで、免疫細胞間で IFN- γ 産生亢進の positive feedback loop ができると考えられる。さらに、ヒト iPS 細胞を利用して、フィラグリンなどの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作成中である。この iPS 細胞を用いた 3 次元表皮シートモデルにより遺伝子変異が表皮全体の構築、サイトカインなどにどのような影響を与えるか明らかにできる。

ケルが、内因性 AD の発症に寄与している可能性が推測された。AD モデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離される KLK5 が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8 が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。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。AD 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。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。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。HVJ-E の F 蛋白質が macrophage から IL18 を産生させ、IL12 と共同で T cell に作用して IFN- γ が産生され、これが T cell での IL12 receptor の発現を T bet を介して高めることで、免疫細胞間で IFN- γ 産生亢進の positive feedback loop ができると考えられる。さらに、ヒト iPS 細胞を利用して、フィラグリンなどの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作成中である。この iPS 細胞を用いた 3 次元表皮シートモデルにより遺伝子変異が表皮全体の構築、サイトカインなどにどのような影響を与えるか明らかにできる。

E. 結論

今後さらに AD の病型と難治性皮膚病変の関連を明らかにすることによって、ターゲットを絞った新規治療法の開発が期待される。外因性 AD は重症が多く難治性病変である痒疹、手湿疹診療ガイドラインを作成してピンポイントに治療することは意義がある。血清中に高濃度に存在するニッケル

ルが、内因性アトピーの発症に寄与している可能性が推測された。内因性 AD では金属制限をターゲットとした治療法が可能である。AD モデルマウスを用いた研究では、痒疹反応が好塩基球の異常に起因することが強く示唆され mMCP-8 が重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、PAR2 は、本研究成果に加え、痒み反応発生に重要な役割を担っていることが明らかな為、現在、低分子の PAR2拮抗薬 の候補リード化合物の合成を進めており、薬理的にスクリーニングが必要である。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。IL12 と HVJ-E n F 蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。さらに、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J. Japanese Guideline for Occupational Allergic Diseases 2014. Committee for Japanese Guideline for Diagnosis and Management of Occupational Allergic Diseases; Japanese Society of Allergology. *Allergol Int.* 2014 Sep;63(3):421-42.
2. Yokozeki H. [The research for atopic dermatitis: up to date]. *Nihon Rinsho.* 2014 Aug;72(8):1503-9. Review. Japanese.
3. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Sep;3(9):992-1001.
4. Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H, Nishimura EK. Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during the hair cycle. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jul;27(4):540-51.
5. Yokozeki H. A nucleic acid-based medication for allergic skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2014 Aug;75(2):75-81.
6. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. *Acta Derm Venereol.* 2014 Jan;94(1):86-7.
7. Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H. Acrosyringial Involvement of Palmoplantar Lesions of Eosinophilic Pustular Folliculitis. *Acta Derm Venereol.* 10:93(1).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.* 70(1):26-33.2013.
9. 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.

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.* 2013 May 27
11. 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.
12. 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.

2. 学会発表

1. 野老翔雲、井川 健、戸倉新樹、宮地良樹、片山一朗、佐藤貴浩、横関博雄：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。第26回日本アレルギー学会春季臨床大会。2014年5月9-11日。京都市
2. 芝間さやか、宇賀神つかさ、横関博雄：当科を受診した小麦アレルギー患者のまとめ。第26回日本アレルギー学会春季臨床大会。2014年5月9-11日。京都市
3. 端本宇志、佐藤貴浩、横関博雄：好塩基球とIgEにより誘発されるマウス痒疹反応におけるそう痒と病変部表皮内神経伸長。第26回日本アレルギー学会春季臨床大会。2014年5月9-11日。京都市
4. 加藤 恒平、西澤 綾、横関 博雄、近江 雅人：アトピー性皮膚炎患者の掌蹠に生じる水疱の

検討。第113回日本皮膚科学会総会。2014年5月30日-6月1日。京都市

5. 加藤恒平、西澤 綾、横関博雄、近江雅人：異汗性湿疹と汗管・発汗機能の関連の検討。第22回日本発汗学会総会。2014年9月17-18日 長崎市
6. 西澤 綾、加藤恒平、須川佳彦、近江雅人、横関博雄：成人アトピー性皮膚炎における精神性発汗の抑制機序の3次元解析。第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市
7. 須川佳彦、福田明広、近江雅人、西澤 綾、横関博雄：OCT を用いた掌蹠多汗症患者と健常者の汗腺の3次元構造解析による比較。第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市
8. 宗次太吉、藤本智子、高山かおる、井川健、横関博雄：東京医科歯科大学皮膚科で経験した特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討。第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅲ. 分担研究報告

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 烏山 一

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 教授

研究要旨

好塩基球はアレルギー病態に関わることが知られているが、どのようなエフェクター分子を使ってアレルギー炎症を引き起こしているのかは、よくわかっていない。セリン・プロテアーゼのひとつである mMCP-8 は、好塩基球のみで発現が認められ、細胞活性化にともなって細胞外に放出される。mMCP-8 のアレルギー炎症における役割を明らかにするために、mMCP-8 リコンビナント蛋白を作製し、マウス皮内投与したところ、好中球を主とした細胞浸潤をとまなう皮膚腫脹が観察された。このことから、好塩基球由来 mMCP-8 がアレルギー炎症惹起分子として機能していることが強く示唆され、アレルギー治療の標的となる可能性が考えられた。

A. 研究目的

私たちは、これまでの研究で、マウス・マスト細胞プロテアーゼ・ファミリーに分類されるセリン・プロテアーゼのなかで、mMCP-8 と mMCP-11 がマスト細胞ではなく、好塩基球に選択的に発現していることを見いだした。それぞれの特異抗体を作製して、蛋白発現を解析したところ、いずれも好塩基球の分泌顆粒内に貯蔵されており、活性化した好塩基球の脱顆粒の際に、細胞外に放出されることが判明した。リコンビナント mMCP-11 を作製し、マウス皮内に投与したところ、血管透過性亢進と細胞浸潤を伴う皮膚腫脹が誘導された。このことから、mMCP-11 が好塩基球によって誘導される皮膚アレルギー炎症のエフェクター分子として機能していることが示唆された。一方、mMCP-8 は構造的には Granzyme B に類似しており、トリプターゼ活性を有する mMCP-11 とは異なった機能を有する可能性が考えられる。そこで今回、好塩基球由来 mMCP-8 のアレルギー炎症における役割を明らかにすることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内

に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

（倫理面への配慮）動物実験はすべて東京医科歯科大学動物実験指針に則り、実験動物委員会の承認を得ておこなった。

C. 結果

mMCP-8 を皮内投与した予備実験では、明確な血管透過性亢進は認められなかったが、好中球を主とした細胞浸潤をとまなう皮膚腫脹が観察された。

D. 考察

さらなる繰り返しの実験が必要であるが、予備実験結果からみて、mMCP-8 も好塩基球の炎症惹起分子として機能している可能性が考えられた。mMCP-11 投与の場合と比べて、血管透過性亢進作用が弱いことや浸潤細胞の種類が異なることから、mMCP-8 と mMCP-11 では標的細胞・分子が異なる可能性がある。

E. 結論

好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8 が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報
該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bakocevic, N., Claser, C., Yoshikawa, S., Jones, LA., Chew, S., Goh. CC., Malleret, B., Larbi, A., Ginhoux, F., de Lafaille, MC., Karasuyama, H., Renia, L., Ng, LG.: CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady-state and during helminth and malarial infections. *Eur. J. Immunol.* 44: 1823-1834, 2014.
2. Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H-U, and Yousefi, S.: NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J. Immunol.* 192: 5314-5323, 2014.
3. Reber, L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L.B., Robinson, W.H., Tsai, M., and Galli, S.J.: Mast cell-derived IL-1 β contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 66: 2881-2891, 2014..
4. Karasuyama, H., and Yamanishi, Y.: Basophils have emerged as a key player in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 31: 1-7, 2014.
5. Tsai, S.H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada Y., Takeda A., Yoshikawa, S., Obata-Ninomiya, K., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., Kiyono, H., Karasuyama, H., and Takeda, K.: The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity* 42: 279-293, 2015.
6. 鳥山 一：炎症の抑制・終焉機構「序」 炎症と免疫 22 (2): 71, 2014
7. 二宮 (小畑) 一茂, 筒井英充, 鳥山 一：消化管寄生虫感染防御免疫応答における好塩基球の新

たな役割 感染・炎症・免疫 44(1): 30-39, 2014

8. 鳥山 一：好塩基球の光と影「はじめに」 医学のあゆみ 250(12): 1079, 2014
 9. 太田卓哉, 吉川宗一郎, 鳥山 一：マダニ感染防御と好塩基球 医学のあゆみ 250(12): 1114-1118, 2014
 10. 三宅健介, 鳥山 一：最近明らかになってきた好塩基球の役割 臨床免疫・アレルギー科 63 (2): 164-169, 2015
2. 学会発表
1. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in immunity-a neglected minority gains new respect. The 24th Congress of Interasma Japan/North Asia. Nagoya, 2014.07.19.
 2. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. Cold Spring Harbor Asia Conference “Frontiers of Immunology in Health & Diseases” Suzhou, China, 2014.09.04
 3. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. 第24回九州大学生体防御医学研究所国際シンポジウム 福岡 2014.11.08
 4. Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in allergy and protective immunity. Medical Research Institute 40th Anniversary Symposium. Tokyo 2014.11.28
 5. Karasuyama, H.: Non-redundant roles for basophils in allergy and protective immunity. British Society for Immunology Congress 2014. Briton, UK, 2014.11.02
 6. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in Th2-type protective immunity and allergy. Cell Symposium “The multifaceted roles of type 2 immunity” Bruges, Belgium 2014.12.11.

7. 烏山 一：教育講演「アレルギーに関連する新規の免疫細胞～ILC2 細胞と好塩基球を中心として～」第 26 回アレルギー学会春季臨床大会 京都 2014.05.10
 8. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の役割 第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会 札幌 2014.06.19
 9. 烏山 一：アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 第 41 回本郷呼吸器研究会 東京 2014.06.24
 10. 烏山 一：教育講演「アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御」第 42 回日本臨床免疫学会 東京 2014.09.25
 11. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 日本眼科アレルギー研究会 東京 2014.10.04
 12. 烏山 一：生体内での好塩基球の役割解明とアレルギー治療への応用 CREST「免疫機構」第三回公開シンポジウム 東京 2014.10.08
 13. 烏山 一：アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御 第 74 回臨床アレルギー研究会 東京 2014.11.01
 14. 烏山 一：好塩基球研究のめざましい進展～日陰者がいっきに檜舞台に躍り出た！ 第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京 2015.02.21
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
無し。

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応用薬理学 准教授

研究協力者 辻井 謙一郎 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

中林 数馬 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授

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 教授

研究要旨 これまでに自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）の自発的な痒み反応に好塩基球、セリンプロテアーゼ及びプロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）が関与することを見出してきた。セリンプロテアーゼの一つである kallikrein 5（KLK5）は、角質の剥離に寄与しており皮膚バリア破壊への関与が報告されている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討した。健常マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が認められ、PAR₂拮抗薬で抑制された。健常 NC マウスと比べ、皮膚炎の発症した NC マウス皮膚において、KLK5 mRNA の発現及び酵素活性の増加が認められた。一方、内因性 KLK5 の阻害因子 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor（LEKTI）の発現は、皮膚炎マウス皮膚で減少していた。KLK5 は、主にケラチノサイトに分布し、一部、好塩基球にも発現している可能性が免疫組織化学染色により見い出された。以上の結果から、本病態の痒み反応に KLK5 一部関与することが示唆される。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性癢痒性皮膚疾患の 1 つであり、その痒みの発生機序は未だ解明されていない。これまで、我々は、アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応に好塩基球が関与すること、プロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）や好塩基球から遊離されるセリンプロテアーゼ mMCP-11 が関与していることを見出してきた。アトピー性皮膚炎の症状の一つに皮膚バリア破壊が認められるが、その機序の 1 つにセリンプロテアーゼの kallikrein 5（KLK5）の関与が知られており、さらに KLK5 は PAR₂を活性化することも知られている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討し

た。

B. 研究方法

実験には、雄性 NC 系マウス（NC マウスは、specific pathogen free（SPF）環境下で飼育した場合は健常状態を維持するが、conventional 環境下で飼育した場合は、アトピー様の皮膚炎と自発的な痒み反応（掻き動作）を示すようになる）を用いた。

行動実験は、無人環境下にマウスの行動をビデオカメラで撮影し、ビデオの再生により後肢による掻き動作回数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

皮膚内の KLK5 mRNA の発現はリアルタイム PCR 法により、KLK5 の発現分布は免疫染色法により解析した。Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI) の発現は、ウェスタンブロッティングにより解析した。また、皮膚における KLK5 の酵素活性は、特異的基質である、Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide を用い、切断され遊離した p-nitroanilide を 420nm の吸光度を測定することで評価した。

C. 研究結果

1) 健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射による掻き動作と PAR2 拮抗薬の効果

健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射により用量依存的に後肢による注射部位への掻き動作が観察された。この痒み反応は、KLK5 皮内注射後の最初の 10 分間をピークとして起こった。KLK5 誘発掻き動作は、PAR₂ 拮抗薬 FSLRLRY-NH₂ により抑制された。

2) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 mRNA の発現と酵素活性

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ KLK5 mRNA の発現は有意に増加し、また、酵素活性も増加していた。KLK5 の酵素活性は、セリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。

3) 皮膚炎マウス皮膚における LEKTI の発現

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ LEKTI の発現は減少していた。

4) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 の発現分布

皮膚炎マウス皮膚において、KLK5 の免疫活性は、主に表皮ケラチノサイトに認められ、さらに、皮膚内浸潤細胞にも求められた。KLK5 免疫活性細胞の一部が TUG8 免疫活性を示す好塩基球であった。

D. 考察

本研究では、KLK5 の皮内注射により痒み反応が誘発され、PAR₂ 拮抗薬により抑制された。また、皮膚炎マウスの皮膚で KLK5 mRNA の発現の増加並びに酵素活性の増加が認められた。KLK5 を選択的に阻害する薬物はないが、KLK5 の活性は、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応を抑制する用量のセリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。これらの知見を勘案すると、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応に KLK5 が関与することが示唆される。

皮膚における KLK5 の活性化の詳細は不明であるが、KLK5 の内因性阻害因子の LEKTI の発現の減少が一部関与している可能性が示唆される。

KLK5 の発現は、表皮に主に認められた。KLK5 の作用の 1 つとして PAR₂ を活性化することが知られている。PAR₂ は主にケラチノサイトに発現しており、KLK5 がオートクラインおよびパラクライン的にケラチノサイト上の PAR₂ に作用して leukotriene B4 などの痒み因子を産生遊離して痒みを発生していることが示唆される。また、PAR₂ は、一次感覚神経にも発現しており、皮膚炎マウス皮膚では一次感覚神経が表皮内まで伸展していることからケラチノサイトから遊離された KLK5 の一部は直接一次感覚神経に作用する可能性も考えられる。興味あることに、KLK5 は皮膚内浸潤細胞にも発現しており、今後詳細な解析が必要であるが、KLK5 免疫活性を示す細胞の一つが好塩基球である可能性を見出したことから、好塩基球から産生遊離される KLK5 も痒みの発生に関与しているかもしれない。

E. 結論

アトピー様皮膚炎マウスの自発的な痒み反応には、主にケラチノサイト（一部好塩基球）から産生される KLK5 が関与していることが示唆される。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Andoh T, Yoshida T, Kuraishi Y. Topical E6005, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates spontaneous itch-related responses in mice with chronic atopy-like dermatitis. *Exp Dermatol.* 23: 359-361, 2014.
- 2) Andoh T, Takayama Y, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B4 in dermatophyte-related itch in mice. *Pharmacol Rep.* 66: 699-703 (2014).
- 3) Inami Y, Sasaki A, Andoh T, Kuraishi Y. Surfactant-induced chronic pruritus: Role of L-histidine decarboxylase expression and histamine production in epidermis. *Acta Derm Venereol.* 94: 645-650 (2014).
- 4) Andoh T, Kuraishi Y. Antipruritic mechanisms of topical E6005, a phosphodiesterase 4 inhibitor: Inhibition of responses to proteinase-activated receptor 2 stimulation mediated by increase in intracellular cyclic AMP. *J Dermatol Sci.* 76: 206-213 (2014).
- 5) 安東嗣修. かゆみ解析の動物モデル. *MB. Derma.* 214 : 6-11 (2014)

2.学会発表

- 1) Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. The histamine release from epidermal keratinocytes is involved in α -melanocyte-stimulating hormone-induced itching in mice. The 44th Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) meeting; 2014 Sep 10-13; Copenhagen, Denmark.
- 2) Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K, Shimizu T. Efficacy of astaxanthin in a murine model of atopic dermatitis. The 44th Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) meeting; 2014 Sep 10-13; Copenhagen, Denmark.
- 3) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan ; 2014 Mar 16-18 ; Kagoshima.
- 4) Andoh T. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai.
- 5) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Involvement of epidermal histamine in itch-associated responses induced by repeated sodium dodecyl sulfate in murine skin. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai.
- 6) 井浪義博, 安東嗣修, 倉石 泰. アニオン性界面活性剤誘発の急性そう痒には水溶液のアルカリ性よりも皮膚表面 pH のアルカリ化が関与. 日本薬学会第 134 年会. 2014 Mar 27-30 ; 熊本.
- 7) 安東嗣修, 高橋遼平, 倉石 泰. マウスにおける乾皮症の痒みへの proteinase-activated receptor 2 の関与. 第 10 回加齢皮膚医学研究会; 2014 Sep 6-7; 富山.
- 8) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Electrophysiological analysis of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 37rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society; 2014 Sep

11-13; Kanagawa.

2014 Dec 12-14; Osaka.

- 9) 中村まり, 安東嗣修, 佐々木 淳, 倉石 泰.
マウスにおけるリゾホスファチジン酸の痒み関連動作誘発作用へのマスト細胞の関与.
第 65 回日本薬理学会北部会; 2014 Sep 26-27; 福島.
- 10) Andoh T, Tsujii, Kuraishi Y. Involvement of kallikrein 5 in spontaneous itch-related responses in mice with atopy-like dermatitis. The 24th International Symposium of Itch; 2014 Oct 18; Tokyo.
- 11) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. In vivo spinal excitatory synaptic responses and scratching behaviors evoked by cutaneous 5-HT application. The 24th International Symposium of Itch; 2014 Oct 18; Tokyo.
- 12) 安東嗣修. 痒みの発生機序の最近の知見と鍼治療. (公社) 全日本鍼灸学会 第 32 回中部支部学術集会; 2014 Nov 9; 富山.
- 13) 白鳥 (林) 美穂, 長谷川あゆみ, 豊永穂奈美, 安東嗣修, 倉石 泰, 井上和秀, 津田 誠. 痒み発症における一次求心性神経 P2X3 受容体の関与. 第 67 回日本薬理学会西南部会; 2014 Nov 23; 北九州.
- 14) Yoshihisa Y, Andoh T, Matsunaga K, Shimizu T. Therapeutic effect of astaxanthin on atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. The 39th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology; 2014 Dec 12-14; Osaka.
- 15) Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. The histamine release from epidermal keratinocytes is involved in α -melanocyte-stimulating hormone-induced itching in mice. The 39th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology;

H.知的財産権の出願・登録状況
特許出願

(発明の名称)

スルホニルを有するフィトスフィンゴシン誘導体
(発明者)

安東嗣修、矢倉隆之、南部寿則、藤原朋也、金田英亨

(出願人)

国立大学法人富山大学

(出願番号)

特願 2014-225684 (2014.11.6)

共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析

研究分担者 梶島 健治 京都大学 医学研究科 皮膚科学 准教授

研究協力者 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 アトピー性皮膚炎を引き起こす遺伝的素因の一つであるフィラグリンは、角層内でケラチン繊維から遊離し、アミノ酸にまで分解され、天然保湿因子（Natural Moisturising Factor：NMF）として角層内に放出される。NMFは皮膚の水分保持のみならず、皮膚 pH の維持、感染防御など皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。そこで本研究では、非侵襲的に NMF を測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療と NMF を中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価を行った。共焦点ラマン分光装置を用いて、非侵襲的に同一アトピー性皮膚炎患者のステロイド長期外用部位と非外用部位の皮膚における NMF 含有量を測定した。ステロイド長期外用により NMF は低下し、皮膚バリア機能が低下していることが明らかとなった。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。

A. 研究目的

哺乳類皮膚表皮の顆粒層特異的に発現するフィラグリンのヒトにおける欠失変異がアトピー性皮膚炎を引き起こす遺伝子素因の一つとなっていることが、2006年に McLean らにより報告された。フィラグリンは角層内でケラチン繊維から遊離し、アミノ酸にまで分解され、天然保湿因子（Natural Moisturising Factor：NMF）として角層間に放出される。NMFは皮膚の水分保持のみならず、皮膚 pH の維持、感染防御、角層内での酵素反応の制御を行い、皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。フィラグリン遺伝子変異の有無にかかわらず、多くのアトピー性皮膚炎患者の NMF は健常人と比較して低下していることが報告されており、NMF の低下がアトピー性皮膚炎のバリア機能低下の一因であることが明らかとなっている。NMF の測定はこれまで、テープstrippingによる表皮剥離や皮膚生検といった侵襲を伴う方法でしか測定することができず、同一個体・同一部位での評価や経時的な評価は困難であった。そこで本研究では、非侵襲的に NMF を測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度

や治療と NMF を中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価を目的とする。

B. 方法

アトピー性皮膚炎の標準的治療の一つであるステロイド局所外用療法は、皮膚に浸潤してきた炎症細胞に対して免疫抑制作用を発揮することにより治療効果を発揮する。一方で、ステロイドの長期的な外用により皮膚萎縮・菲薄化・毛細血管拡張といった副作用を生じることが知られているが、ステロイドの長期外用が皮膚バリア機能に及ぼす影響についての詳細は不明であった。そこで今回、ステロイド長期使用歴のあるアトピー性皮膚炎患者の皮膚と、同一患者でステロイド長期使用していない皮膚の NMF を共焦点ラマン分光装置を用いて測定し、ステロイド長期使用の皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討を行った。

具体的には、River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位（右示指先端指腹）および非外用部位の皮膚（左示指先端指腹）の