

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(椋島)。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, Tbet, 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となり、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思われた。IL12 と HVJ-EnF 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思えられる。

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. Acrosyringal 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、片山一郎、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