

## 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医歯学総合研究科皮膚科学分野 教授		
研究分担者	佐藤貴浩	防衛医科大学校皮		
	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		
	戸倉新樹	浜松医科大学皮膚科教授		
	烏山 一	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー分野教授		
	安東嗣修	富山大学大学院応用薬理学准教授		
	椛島健治	京都大学医学研究科皮膚科学准教授		
	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准教授		
	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		
研究協力者	高森 建二	順天堂大学浦安病院 院長	塩原 哲夫	杏林大学皮膚科 教授
	三橋 善比古	東京医科大学皮膚科 教授	森田 栄伸	島根大学皮膚科 教授
	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	羽座 沙都美	富山大学応用薬理学 大学院生
	倉石 泰	富山大学応用薬理学 教授	中島 沙恵子	京都大学皮膚科学 研究員
	井川 健	東京医科歯科大学皮膚科学分野 講師	野老翔雲	東京医科歯科大学皮膚科学分野 助教
	端本 宇志	防衛医科大学校皮膚科学講座 助教		

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掻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下注射して、注射部位への後肢による掻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。

6) 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。

### 7 ) 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- ( IFN- ) 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 AD 21 例 ( 男 5、女 16 )、外因性 AD 153 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 $3.48 \pm 1.27$ , 外因性ADで $2.13 \pm 2.39$ , 正常人で $0.40 \pm 0.93$ 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(桜島)。HVJ-EとIL12の組み合わせで脾臓細胞からのinterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 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なる。

#### 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では金属市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考えられた。IL12とHVJ-Eの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。

# 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

研究分担者 戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科 教授  
研究協力者 山口隼人 浜松医科大学皮膚科 診療従事者  
平澤典保 東北大学大学院生活習慣病治療薬学分野 教授

### 総括

内因性アトピー性皮膚炎の発症要因として金属の関与が推測されている。今回、内因性アトピー性皮膚炎の患者の血清中のニッケル濃度が、外因性および正常人に比べて有意に高いことを見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一日当たりの日本人のニッケル摂取量にほぼ相当する量を4日間負荷したチョコレートを用いた経口負荷試験前後では、汗および血清中のニッケル濃度の変化は、試験前後で有意な上昇は認めなかった。血清中に高濃度に存在するニッケルが、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。体液中の金属という新しい着眼で検討を続けている。

### A. 研究目的

我々は、内因性アトピー性皮膚炎を外因性アトピー性皮膚炎と比較し、臨床的特徴、免疫学的特徴を検討してきた。これまでIADのニッケル、コバルト、クロムに対する金属パッチテスト陽性率は、いずれか1つ以上の金属に陽性を示す割合は汗中のニッケル濃度がEADに比べて高いことを示した。IADの組織中で認められたTh1サイトカインの発現や高い金属パッチテスト陽性率を説明するものとして、金属やハプテンなどの小分子の関与したアレルギーはTh1に変調しやすいことから、IADの発症に金属アレルギーが何らかの形で関与していることを推測した。今回我々は、その仮説を検証するために、通常日本人の経口摂取するニッケルにほぼ相当する量を経口負荷し、その前後で血清および汗中のニッケル濃度を比較し、IADにおける金属アレルギーの関与を解明することを試みた。

### B. 方法

当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。経口金属負荷の方法として、ニッケルを高濃度で含有する食品を用いた。簡便に入手できかつニッケルの含有量が測定(470 $\mu$ g/1枚)されているLindt chocolate excellence 85% cacao® (Lindt & Sprungli, Kilchberg, Switzerland)を使用し、1日あたり1/2枚を4日間摂取させた。血清の回収は経口負荷前後に1回ずつ実施した。末梢血から血液を採取し、血清を分離した。負荷後血清の採取は、最終摂取してから約3-6時間後に実施した。採取した汗および血清中のニッケル濃度は東北大学にてICP-MS法により測定した。

### C. 結果

金属負荷前血清ニッケル濃度 (mean  $\pm$  SD, ng/ml) はIADで $3.48 \pm 1.27$ , EADで $2.13 \pm 2.39$ , HCで $0.40 \pm 0.93$ であった。IADはHCより有意に高く、約8.7倍の濃度であった。金属負荷後の血清ニッケル濃度は負荷前と同様であった。負荷前後で金属濃度の有意な上昇は認めなかった。金属負荷前汗中濃度 (mean  $\pm$  SD, ng/ml) は、IADで $62.39 \pm 13.86$ , EADで $106.05 \pm 154.88$ , HCで $142.32 \pm 136.71$ であり、3群間で有意差は認めなかった。3群とも金属負荷後の汗中ニッケル濃度に有意な増加は認めなかった。負荷試験中、経口摂取金属により全身性金属アレルギー様の症状が出現したものが2例(顔面の紅斑が増悪したIAD患者1例、手掌の異汗性湿疹が増悪したEAD患者1例)であった。

### D. 考察

本研究では、IADの患者では嗜好品としてコーヒーやナッツをよく摂取していることに着目し、趣味嗜好の程度で摂取されるであろう経口摂取量を再現し、皮疹の発生の機序を検討したが、直接的な濃度の上昇は認めなかった。しかし、IADでは、ニッケルはEADやHCよりも血清中に高濃度に存在していることが示されたことから、IADの発症機序の1つとして、金属アレルギーとの結びつきをより考えることができるであろう。高濃度に存在する金属が、血管内でより感作されやすい状況にあること、もしくは近年、ニッケルやコバルトは、樹状細胞を始めとした抗原提示細胞上にあるTLR4を直接刺激する機序を持っていることが明らかになっており、表皮内において抗原提示細胞を直接刺激し、皮疹の形成を担っていることも可能性の一つとして考えられた。

## 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 大学院医歯学総合研究科 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 が好塩基球に依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. 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とも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。

## 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

研究協力者氏名 野老 翔雲 東京医科歯科大学皮膚科助教  
宇賀神つかさ 東京医科歯科大学皮膚科助教  
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

### A．背景

アトピー性皮膚炎(AD)は様々な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。代表的には総 IgE 値により分類する方法がある。

### B．目的

AD を IgE < 200 の内因性と IgE > 200 の外因性の病型に分類し、臨床症状や検査値の相違について検討した。

### C．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。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。

### D．結果

174 例が登録された。内因性 AD 21 例 (男 5、女 16)、外因性 AD 153 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。

### 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。

## 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についての報告は多数なされているが、それらの変異が実際に角化細胞の振る舞いにおいて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、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。

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 ) 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。

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 (人工ヌクレアーゼ)。

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

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。

上記システムが稼働することの確認

上記のヒト iPS 細胞より表皮角化細胞を誘導し eGFP が発現することを確認した。

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。

### D．考察 ならびに E．結論

遺伝子の変異が本当の意味でどのような影響を与えるのか、ということヒトの系で検討する場合には、現状では、iPS 細胞を利用した本研究のようなシステムを利用するほかに方法がないと考えられる。フィラグリン遺伝子と表皮角化細胞をターゲットにした本研究であるが、対象を別にしての応用を広く求めうる研究と考えられる。

## 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

研究分担者 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准教授

### 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)。私達は近年、皮膚炎に伴う神経栄養因子アーテミンの皮膚での蓄積が中枢神経の増感を誘導する結果、全身皮膚の熱感受性を誘導することを見出した。皮膚炎が中枢神経を増感させるメカニズムについてマウスを用いたマンガン造影MRIで検討を行った。さらにこれらの反応が皮膚にアーテミン中和抗体を投与することでどのような影響を受けるかを検討した。

### C. 結果

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確認された。次にアーテミン投与群に熱刺激を加えたところ、各々の単独あるいは熱刺激単独刺激よりも視床下部、扁桃体、皮質感覚野にさらに強い造影効果が確認された。この現象は皮膚からアーテミン中和抗体の投与によって減弱した。

### 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。

アーテミンはアトピー性皮膚炎の既存治療に抵抗性を示す痒みの分子標的となりうると考えられた。

## 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

### 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、テープストリッピング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 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。同時に、皮膚 pH、経皮的水分蒸散量 (Trans-epidermal water loss: TEWL) およびセラミド含有量についても評価を行った。

### C. 結果

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。経皮的水分蒸散量および pH はステロイド長期外用により共に低下した。

### D. 考察

これまで侵襲的な方法でしか測定出来なかった皮膚 NMF 含有量を非侵襲的に測定し、ステロイド長期外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。ステロイド長期外用により NMF は低下する一方、細胞間脂質の一つであるセラミドは低下しなかった。

### E. 結論

共焦点ラマン分光装置を用いて、非侵襲的に皮膚における 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。

## 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教授

### A．研究目的

HVJ-E は Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ) を紫外線等で不活化した粒子に遺伝子や 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。この粒子と IL12 の組み合わせが、何故、免疫システムを Th1 優位にシフトできるのかを解明し、アトピー等のアレルギー疾患治療剤としての優位性を明らかにする。

### B．研究方法

マウスの一本鎖 IL12 蛋白質を CHO 細胞から精製する。膜融合能を有する、或いは欠失した HVJ-E を作成する。これらを単独或いは併用して、マウス脾臓細胞全体、さらには脾臓細胞から選別した T cell, B cell, macrophage に作用させ、Th1 関連遺伝子の発現を RT-PCR で解析する。

(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 と IL12 の組み合わせで脾臓細胞からの interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 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。この中で IL18 のみ、HVJ-E 単独で同様に高い発現を得ることができた。その発現亢進は、膜融合能には左右されず、HVJ-E の F 蛋白質に依存した。選別した免疫細胞を用いると、IL18 は macrophage において発現が増強された。macrophage では HVJ-E により Caspase 11, Caspase 1 の発現も亢進した。一方 IL12 のみで低値ながら、有意に IFN- $\gamma$  の発現が増強されるのは、T cell であったが HVJ-E を併用させても IFN- $\gamma$  の発現は増強しなかった。しかし HVJ-E を作用させた macrophage の培養上清を用いると増強され、IL18 の抗体で阻害された。そこで IL12 と組換え IL18 蛋白質を併用すると T cell からの IFN- $\gamma$  の発現が増強された。IL12 receptor, T-bet の発現は IFN- $\gamma$  が T cell に作用して増強された。

### D．考察

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- $\gamma$  が産生され、これが T cell での IL12 receptor の発現を Tbet を介して高めることで、免疫細胞間で IFN- $\gamma$  産生亢進の positive feedback loop ができると考えられる。

### E．結論

IL12 と HVJ-E nF 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。

## 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  
辻井謙一郎 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名誉教授

### A．研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性痒痒性皮膚疾患の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、その機序の一つにセリンプロテアーゼの一つある Kallikrein 5 (KLK5) の関与が知られており、さらに 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．方法

実験には、雄性の SPF (specific pathogen free) 環境下飼育健全 NC マウス及び conventional 環境下で飼育しアトピー様皮膚炎の発症した NC マウスを用いた。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秒間に数回後肢で掻くので、足を挙げて降ろすまでの一連の掻き動作を1回として、本実験では吻側背部への掻き動作回数を数えた。一部の実験では、KLK5 を SPF 飼育下健全マウスに皮内注射して、注射部位への後肢による掻き動作回数を数えた。皮膚内の KLK5 mRNA の発現は RT-PCR 法により、KLK5 の発現分布は免疫染色法により解析した。

### C．結果

健全 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、健全マウスに比べ、皮膚炎マウスで増加していた。KLK5 の活性は、セリンプロテアーゼ阻害薬の nafamostat mesilate で抑制された。皮膚において KLK5 は、主にケラチノサイトでの発現が認められ、一部好塩基球にも認められた。

### D．考察

KLK5 は角層の剥離に関係していることが知られているが、さらに本研究において痒み因子の一つであることが見出された。KLK5 誘発の痒み反応が PAR2 拮抗薬で抑制されたことから、PAR2 を介して痒み反応が起こっていると示唆される。PAR2 は、皮内では主にケラチノサイトに発現しており、KLK5 発現分布からオートクラインおよびパラクラインによりケラチノサイトの活性化を介して痒み反応が起こっ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いることから、KLK5 が一部直接一次感覚神経を活性化して痒み反応を誘発している可能性も示唆される。さらに KLK5 は好塩基球にも発現している可能性が示めされたことから、好塩基球は mMCP-11 に加え、KLK5 を産生遊離することで痒みの発生に寄与していると考えられる。

### E．結論

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。

## 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

研究分担者 西澤 綾 防衛医科大学校皮膚科  
端本宇志 防衛医科大学校皮膚科  
佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科

### A. 研究目的

痒疹は急性痒疹、亜急性痒疹、慢性痒疹に分けられる。日本皮膚科学会における診療ガイドラインでは、慢性痒疹として結節性痒疹と多形慢性痒疹の二つをあげ、その概念を定義した。しかし多形慢性痒疹の定義にはいまだあいまいな点があるため皮膚科医によってとらえ方に差を生じている。また診療の現場では結節性痒疹とも多形慢性痒疹ともつけがたい痒疹群を経験する。

### B. 方法

慢性に経過する痒疹患者26例についてその臨床病型と検査データ、原因などにつき検討した。

### C. 結果

26例の痒疹患者のうち結節性痒疹5例、多形慢性痒疹5例であり、残りの16例はどちらとも分類しがたい症状を呈していた。いずれの痒疹においても悪性腫瘍が誘因と考えられた例は極めて少なかった。分類不能な一群は、蕁麻疹様紅斑を伴って広範囲に病変をみる病型が主体であり、TARC値が他の2型に比して高く、またステロイド全身投与歴のあるものが多かった。

### D. 考察

痒疹患者では悪性腫瘍の検索が勧められているが、関連が確認される例は非常に少ないことは注目に値する。また分類不能な痒疹は病変の範囲が広いことや、紅斑性病変が目立っていることに特徴があるが、個疹の反応は多形慢性痒疹に類似している面もある。したがって多形慢性痒疹と病態は同じで、その重症型ないし悪化時の状態を見ている可能性もある。ステロイドの全身投与が表現型の修飾に関与しているかどうか検討が必要である。

### E. 結論

分類不能な痒疹の位置づけ、そして多形慢性痒疹の定義と概念については今後検討の余地がある。