

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

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、どのような好塩基球エフェクター分子がアレルギー炎症の誘導・制御に寄与しているのかはよくわかっていなかった。本研究では、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) において、活性化好塩基球が分泌するプロテアーゼが炎症誘導に寄与していることを明らかにした。一方、好塩基球由来の IL-4 は、皮膚組織に浸潤した炎症性単球が作用することで、M2 マクロファージ生成を誘導して炎症を終焉に向かわせることが判明した。また、転写因子 GATA-1 が好塩基球の発生・機能に重要な役割を果たしており、好塩基球欠損マウスとして汎用されている Δ dblGATA マウスでは好酸球だけでなく好塩基球の異常も存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

私たちは、これまでの研究で、生体内で好塩基球がマスト細胞とは明らかに異なる機能を担っていることを明らかにしてきた。しかし、その機能の違いが何に起因するのかは不明であった。そこで、本研究では、マスト細胞に比べて好塩基球に選択的に発現している分子として、セリン・プロテアーゼ mMCP-8 とサイトカイン IL-4 に注目して、アレルギー炎症反応における役割を解析した。また、好塩基球とマスト細胞の発生・分化の経路分岐に関わる分子として転写因子 GATA ファミリーに注目して、解析を進めた。

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。

IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細胞の種類を Flow cytometry で解析した。ケモカイン受容体 CCR2 を欠損するマウスにおいて IgE-CAI を誘導し、炎症の程度、浸潤細胞の種類を調べた。CCR2 欠損マ

ウスに、野生型マウス由来の細胞を移入し、炎症の程度、浸潤細胞の変化を調べた。

Δ dblGATA マウスから骨髓、脾臓、末梢血を採取し、好塩基球・好塩基球前駆細胞の数ならびに機能を野生型マウスと比較検討した。

(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もなう皮膚腫脹が観察された。

IgE-CAI 皮膚病変部において IgE とアレルゲンによって活性化された好塩基球から分泌された IL-4 が、浸潤してきた炎症性単球に作用して M2 マクロファージへと分化誘導すること、この炎症性単球の M2 への分化が抗炎症作用発揮には必須であることが明らかとなった。

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好塩基球の減少がみとられ、*in vitro* での好塩基球生成も低下しており、IgE とアレルゲンの刺

激によって誘導される好塩基球の脱顆粒ならびにサイトカイン産生も低下していた。

D. 考察

好塩基球に選択的に発現している mMCP-8 が炎症惹起分子として機能している可能性が強く示唆された。

炎症性単球が末梢組織に浸潤すると炎症性の 1 型マクロファージ (M1) に分化することは、これまでよく知られていたが、本研究では好塩基球由来の IL-4 の作用によって炎症性単球が M2 マクロファージに分化するという新事実が明らかとなった。

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、 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。

E. 結論

好塩基球は、マスト細胞とは異なるエフェクター分子を使ってアレルギー炎症の誘導・制御に寄与していることが明らかとなった。これらの分子を標的とした新規アレルギー治療法開発が期待される。

F. 健康危険情報 該当せず。

G. 研究発表

- 論文発表
1. Sawaguchi, M., Tanaka, S., Nakatani, Y., Harada, Y., Mukai, K., Matsunaga, Y., Ishiwata, K., Oboki, K., Kambayashi, T., Watanabe, N., Karasuyama, H., Nakae, S., Inoue, H., and Kubo, M.: Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 188:1809-1818, 2012.
2. Ogawa, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420: 114-118, 2012.

3. Etori, M., Yonekubo, K., Sato, E., Mizukami, K., Hirahara, K., Karasuyama, H., Maeda, H., Yamashita, M.: Melanocortin Receptors 1 and 5 might mediate inhibitory effects of α -melanocyte-stimulating hormone on antigen-induced chronic allergic skin inflammation in IgE transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 132: 1925-1927, 2012.
4. Mukai, K., BenBarak, M., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I., Galli, SJ.: Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood* 120: 76-85, 2012.
5. Jin, G., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Le Huu, D., Ishii, T., Hasegawa, M., Obata, K., Karasuyama, H., Takehara, K., and Fujimoto, M.: Basophils and Mast Cells Play Critical Roles for Leukocyte Recruitment in IgE-Mediated Cutaneous Reverse Passive Arthus Reaction. *J. Dermatol. Sci.* 67: 181-189, 2012.
6. Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J-Y, Yoshikawa, S. Yamamoto, M., Kitamura, D., and Karasuyama, H.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. *Mol. Cell. Biol.* 32: 4462-4471, 2012.
7. Shiraishi, Y., Jia, Y., Domenico, J., Joetham, A., Karasuyama, H., Takeda, K., and Gelfand, E.W.: Sequential engagement of Fc ϵ RI on mast cells and basophil histamine H4 receptor and Fc ϵ RI in allergic rhinitis. *J. Immunol.* 190: 539-548, 2013.
8. Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., and Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. *Immunity* 38: 570-580, 2013.

9. Ramadan, A., Pham, Van L., Machavoine, F., Dietrich, C., Alkan, M., Karasuyama, H., Schneider, E., Dy, M., Thieblemont, N.: Activation of basophils by the double-stranded RNA poly(A:U) exacerbates allergic inflammation. *Allergy* 68: 732-738, 2013.
10. Torrero, M.N., Morris, C.P., Mitre, B.K., Hübner, M.P., Mueller, E., Karasuyama, H., and Mitre, E.: Basophils help establish protective immunity induced by irradiated larval vaccination for filariasis. *Vaccine* 31: 3675-3682, 2013.
11. Reber, L.L., Marichal, T., Mukai, K., Roers, A., Hartmann, K., Karasuyama, H., Nadeau, K.C., Tsai, M., and Galli, S.J.: Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132: 881-888, 2013.
12. Noti, M., Tait Wojno, E.D., Kim, B.S., Siracusa, M.C., Giacomini, P.R., Nair, M.G., Benitez, A.J., Ruymann, K.R., Muir, A.B., Hill, D.A., Chikwava, K.R., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q.J., Alex, A., Zhou, C., Yearley, J.H., Menard-Katcher, P., Kubo, M., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Comeau, M.R., Brown-Whitehorn, T., de Waal Malefyt, R., Sleiman, P.M., Hakonarson, H., Cianferoni, A., Falk, G.W., Wang, M-L., Spergel, J.M., and Artis, D.: TSLP-elicited basophil responses can mediate the pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Nat. Med.* 19: 1005-1013, 2013.
13. Anyan, W.K., Seki, T., Kumagai, T., Obata-Ninomiya, K., Furushima-Shimogawara, R., Kwansa-Bentum, B., Akao, N., Bosompem, K.M., Boakye, D.A., Wilson, M.D., Karasuyama, H., and Ohta, N.: Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitol. Int.* 62: 508-513, 2013.
14. Obata-Ninomiya, K., Ishiwata, K., Tsutsui, H., Nei, Y., Yoshikawa, S., Kawano, Y., Minegishi, Y., Ohta, N., Watanabe, N., Kanuka, H., and Karasuyama, H.: The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminths. *J. Exp. Med.* 210: 2583-2595, 2013.
15. Nei, Y., Obata-Ninomiya, K., Tsutsui, H., Ishiwata, K., Miyasaka, M., Matsumoto, K., Nakae, S., Kanuka, H., Inase, N., and Karasuyama, H.: GATA-1 regulates the generation and function of basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 18620-18625, 2013.
16. Leyva-Castillo, J.M., Hener, P., Michea, P., Karasuyama, H., Chan, S., Soumelis, V., and Li, M.: Skin TSLP initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat. Commun.* 4:2847, 2013.
17. Bakocevic, N., Claser, C., Yoshikawa, S., Jones, L.A., Chew, S., Goh, C.C., Malleret, B., Larbi, A., Ginhoux, F., de Lafaille, M.C., Karasuyama, H., Renia, L., Ng, L.G.: 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.
18. 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.
19. 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.

20. Karasuyama, H., and Yamanishi, Y.: Basophils have emerged as a key player in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 31: 1-7, 2014.
21. 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.
22. 江川真由美、鳥山一：「好塩基球研究のアップデート」実験医学 30(6)：905-911, 2012
23. 壹岐美紗子、鳥山一：「好塩基球研究の進展」特集「自然免疫 Update-研究最前線」医学のあゆみ 243(1): 78-83, 2012
24. 鳥山一：「免疫系における好塩基球の重要性」免疫学 Update -分子病態の解明と治療への展開 南山堂 pp46-51, 2012
25. 吉川 宗一郎、鳥山一：「好塩基球とアレルギー」アレルギー 62(7)：797-804, 2013.
26. 壹岐美紗子、鳥山一：「好塩基球による慢性アレルギー炎症の誘導機構」炎症と免疫 21 (6): 78-82, 2013.
27. 江川真由美、鳥山一：「好塩基球とマクロファージによるアレルギー炎症の鎮静化」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 2 (2): 63-68, 2013
28. 鳥山一：炎症の抑制・終焉機構「序」炎症と免疫 22 (2): 71, 2014
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. The 2012 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea. 2012.04.13.
 2. Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in protective and pathological immune responses. Innovation Summit Tokyo 2012-Chronic Inflammation and Autoimmune Diseases. Tokyo, 2012.04.18.
 3. 鳥山一：特別講演「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～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第24回アレルギー学会春季臨床大会 大阪 2012.05.12.
 4. Karasuyama, H.: The role of basophils revisited. EAACI Congress 2012. Geneva, Switzerland, 2011.06.17.
 5. 鳥山一：「皮膚のアレルギー炎症ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割」第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢 2012.07.14.
 6. 鳥山一：「アレルギー疾患ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第51回日本鼻科学学会 幕張 2012.09.27.
 7. Karasuyama, H.: Critical roles for basophils in allergy and protective immunity as revealed by the basophil-engineered mice. 29th Symposium CIA. Jeju, Korea, 2012. 10.19.
 8. 鳥山一：教育講演「アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の役割～日陰者が一気に檜舞台に」第74回日本血液学会学術集会. 2012. 10.21.
 9. 鳥山一：特別講演「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～日陰者が一気に檜舞台に」第76回小児アレルギー同好会 2012.11.10.

10. 烏山 一：教育講演「新たな脚光を浴びる好塩基球～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11.30.
 11. Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. Centennial of Hashimoto Disease International Symposium. Fukuoka, 2012. 12.04.
 12. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in immunity. EAACI-WAO Congress, Milan, Italy. 2013.06.23.
 13. 烏山 一：特別講演「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～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第34回ゲノム創薬フォーラム 東京 2013.07.25.
 14. Karasuyama, H.: Role of basophils in allergic responses and protective immunity. German-Japan Immunology Seminar. Shizuoka, Japan, 2013.12.08. 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.
 15. 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
 16. 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
 17. Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in allergy and protective immunity. Medical Research Institute 40th Anniversary Symposium. Tokyo 2014.11.28
 18. Karasuyama, H.: Non-redundant roles for basophils in allergy and protective immunity. British Society for Immunology Congress 2014. Briton, UK, 2014.11.02
 19. 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.
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 烏山 一：好塩基球研究のめざましい進展～日陰者がいっしょ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 中林 教馬 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

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 自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）を用い、自発的な痒み反応への好塩基球の関与と痒み発生機序に関して検討した。皮膚炎マウスの皮膚では、好塩基球数の増加が観察され、さらに、好塩基球除去抗体 Ba103 の投与により、皮膚炎マウスの自発的痒み反応が抑制された。これらのことから、皮膚炎マウスの自発的掻き動作に好塩基球が関与することが明らかとなった。好塩基球からは、セリンプロテアーゼの mMCP-11 が遊離されることが知られている。mMCP-11 のマウスへの皮内注射に痒み反応が生じ、この行動はプロテアーゼ活性化受容体 2（PAR₂）の中和抗体により抑制された。また、皮膚炎マウスでは、表皮の剥離に関与しているセリンプロテアーゼ kallikrein 5（KLK5）の発現と酵素活性が増加していた。KLK5 のマウスへの皮内注射により痒み反応が誘発され、さらに、PAR₂ 拮抗薬で抑制された。KLK5 の免疫活性は、表皮ケラチノサイトに加え、好塩基球にも認められた。皮膚炎マウス皮膚において、内因性 KLK5 の阻害因子 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor（LEKTI）の発現が減少していた。以上の結果より、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応には、好塩基球が一部関与しており、好塩基球より遊離されるセリンプロテアーゼ（mMCP-11 など）が PAR₂ を介して痒み反応を起こしていることが示唆される。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性の癢痒（「痒み」）を伴う慢性癢痒皮膚疾患である。本疾患における痒みには、従来痒みの第一選択薬である抗ヒスタミン薬が無効である場合が多く、有用な治療薬が無い為そのコントロールは困難を極めている。

新規鎮痒薬の開発や治療戦略を立てる上で、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序を理解する必要があるが、未だ、その発生機序の詳細は明らかにされていない。

ところで、近年、好塩基球が様々なアレルギー

疾患の発生に関与していること、また、アトピー性皮膚炎患者皮膚で増加していることが報告されてきた。そこで、本研究では、アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与と好塩基球を介した痒みの発生機序に関して、自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

1) 実験動物

実験には、雄性自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）を用いた。NC マウスは、

specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した場合は、皮膚炎の発症は認められない健全状態を維持する。一方、微生物等制御されていない 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搔き動作を示すようになる。

2) 行動実験

マウスを行動撮影ケージ (13×9×40 cm/セル) に少なくとも 1 時間放置し、馴化した。その後、無人環境下にビデオカメラでその後の行動を撮影した。行動評価は、ビデオの再生により、後肢による全身或いは一部の実験では吻側背部への搔き動作数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回搔くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を搔き動作の 1 回としてカウントした。

3) 免疫組織化学染色

マウス皮膚凍結切片を作製し、1 次抗体として TUG8 抗体 (好塩基球検出抗体)、mMCP-7 抗体 (マスト細胞検出用抗体)、及び KLK5 抗体を用い、2 次抗体として蛍光標識した抗体を用いて染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光シグナルを観察した。

4) リアルタイム PCR

除毛したマウス皮膚より TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、DNase I 処理を行った。この total RNA を用い、KLK5 に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

5) ウェスタンブロッティング

除毛した吻側背部皮膚よりタンパク質を抽出し、抗 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI) 抗体を用い、ウェスタンブロッティングを行った。

6) KLK5 の活性

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) 皮膚炎マウス皮膚におけるマスト細胞及び好塩基球数

皮膚炎マウス皮膚では、健全マウス皮膚と比べ、マスト細胞は約 3 倍、好塩基球は約 60 倍増加していた。

2) 皮膚炎マウスの自発的搔き動作に対する好塩基球除去抗体 Ba103 の効果

Ba103 及びコントロール抗体の尾静脈単回注射により、皮膚炎マウスの自発的搔き動作が減少した。Ba103 抗体処置マウス皮膚では、マスト細胞数に影響することなく好塩基球数を減少していた。

3) 健全マウスへの mMCP-11 皮内注射による搔き動作

予め除毛しておいた健全マウスへ mMCP-11 を皮内注射すると搔き動作が惹起され、熱処理した mMCP-11 の皮内注射では搔き動作は溶媒注射群と同程度であった。また、mMCP-11 誘発痒み反応は、プロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) の中和抗体の処置により抑制された。

4) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 mRNA の発現と酵素活性

KLK5mRNA の発現は、皮膚炎マウス皮膚において、健全マウス皮膚に比べ有意に増加していた。また、皮膚炎マウスの皮膚において、KLK5 の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。

5) 皮膚炎マウス皮膚における LEKTI の発現

LEKTI 発現は、皮膚炎マウス皮膚において、健

常マウス皮膚に比べ減少していた。

6) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 の発現分布

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。真皮に認められた 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

自然発症アトピー性皮膚炎マウスでは、健常マウスと比べ、皮膚でのマスト細胞数の増加に加え、好塩基球も増加していた。皮膚炎マウス皮膚での好塩基球数は、健常マウスの皮膚と比べ 60 倍多かった。さらに、皮膚炎マウスへの好塩基球除去抗体の処置により皮膚でのマスト細胞数に影響することなく、好塩基球数を減少させ、痒み反応も減少させた。これらの結果より、皮膚炎マウスの痒み反応に好塩基球が関与することが示唆される。

好塩基球からは、IL-4、IL-13 等のサイトカイン、ヒスタミン、mMCP-11 等のプロテアーゼ等が産生遊離される。今回使用したマウスは、ヒスタミンの皮内注射により痒み反応は惹起されない。また、皮膚炎マウスの自発的痒み反応においても抗ヒスタミン薬が無効である。これまでの研究から IL-4、IL-13 の皮内注射では痒み反応は認められない。そこで、皮膚炎マウスの自発的搔き動作が PAR₂ の中和抗体やセリンプロテアーゼによって抑制されることから、好塩基球から遊離される mMCP-11 に着目した。mMCP-11 の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応は PAR₂ の中和抗体によって抑制された。したがって、mMCP-11 が好塩基球を介した皮膚炎マウスの自発的痒み反応に一部関与することが示唆される。

皮膚炎マウス皮膚では、表皮のバリア破壊が認められる。皮膚の角質の剥離には、KLK5 が関与することが報告され、KLK5 のトンスジェックマウスではアトピー様の皮膚炎が惹起されることが知られている。KLK5 もセリンプロテアーゼある

ため、KLK5 が皮膚炎マウスの痒み反応に関与しているか調べた。皮膚炎マウス皮膚で KLK5 の発現や酵素活性の増加が認められ、KLK5 自身の皮内注射により痒み反応が惹起された。この行動は PAR₂ 拮抗薬で抑制された。KLK5 は、これまでに PAR₂ を活性化することが報告されている。以上のことから、KLK5 が皮膚炎マウスの痒み反応に関与し、PAR₂ を介した反応系で痒みが発生することが示唆される。ところで、KLK5 の活性は、内因性の阻害因子である LEKTI によって制御されている。皮膚炎マウス皮膚では、LEKTI の発現は、健常マウスと比べ減少していた。したがって、皮膚炎マウスの KLK5 の活性化機構の一部に LEKTI の発現減少が関係しているかもしれない。また、KLK5 は表皮での発現が知られているが、皮膚炎マウス皮膚での免疫組織学染色により、好塩基球にも KLK5 の免疫活性が認められた。今後詳細な検討は必要であるが、好塩基球も KLK5 の発生源であるかもしれない。

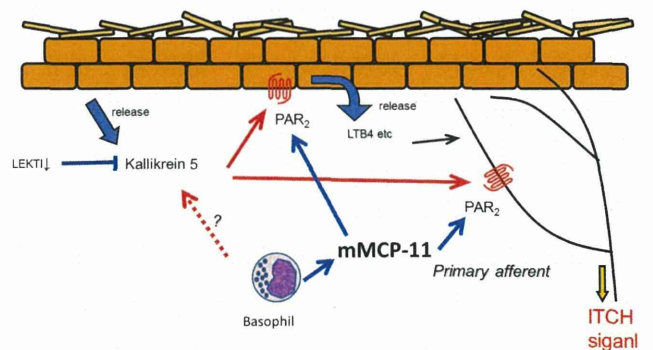


図 本研究成果から想定される好塩基球を介したアトピー性皮膚炎の痒みの発生機序

E. 結論

アトピー様皮膚炎マウスの自発的痒み反応は、好塩基球が一部関与し、好塩基球から遊離される mMCP-11 等のセリンプロテアーゼを介して痒みが発生している可能性が示唆される。したがって、セリンプロテアーゼ阻害薬或いは PAR₂ 拮抗薬が新たな痒みの治療薬になりうるかもしれない。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) **Andoh T**, Yoshida T, Lee JB, Kuraishi Y. Cathepsin E induces itch-related response through the production of endothelin-1 in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 686: 16-21, 2012.
- 2) **Andoh T**, Takayama Y, Yamakoshi T, Lee JB, Sano A., Shimizu T., Kuraishi Y. Involvement of serine protease and proteinase-activated receptor 2 in dermatophyte-associated itch in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343: 91-96, 2012.
- 3) **安東嗣修**, 倉石 泰 : 温清飲による痒みの抑制機序. *phil 漢方* 40: 26-28, 2012.
- 4) Yamakoshi T, **Andoh T**, Makino T, Kuraishi Y, Shimizu T. Clinical and histopathological features of itch in alopecia areata patients. *Acta Derma. Venereol.* 93: 575-576, 2013.
- 5) Inami Y, **Andoh T**, Kuraishi Y. Prevention of topical surfactant-induced itch-related responses by chlorogenic Acid through the inhibition of increased histamine production in the epidermis. *J. Pharmacol. Sci.* 121: 242-245, 2013.
- 6) Yamakoshi T, **Andoh T**, Makino T, Kuraishi Y, Shimizu T. Clinical and histopathological features of itch in alopecia areata patients. *Acta Derma. Venereol.* 93: 575-576, 2013.
- 7) Sasaki A, Adhikari S, **Andoh T**, Kuraishi Y. BB2 receptor-expressing spinal neurons transmit herpes-associated itch by BB2 receptor-independent signaling. *Neuroreport* 24: 652-656, 2013.
- 8) **Andoh T**, Gotoh Y, Kuraishi Y. Milnacipran inhibits itch-related responses in mice through the enhancement of noradrenergic transmission in the spinal cord. *J. Pharmacol. Sci.* 123: 199-202, 2013.
- 9) **安東嗣修** : 内因性起痒物質と発痛物質. *ペインクリニック* 34: 467-473, 2013.
- 10) 井浪義博, **安東嗣修**, 佐々木淳, 倉石泰 : 界面活性剤によって誘発される痒みとクロロゲン酸の鎮痒効果. *アレルギーの臨床* 446: 754-756, 2013.
- 11) **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.
- 12) **Andoh T**, Takayama Y, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ in dermatophyte-related itch in mice. *Pharmacol. Rep.* 66: 699-703, 2014.
- 13) 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.
- 14) **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.
- 15) **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) **安東嗣修**, 桑園 崇, 倉石泰 : マウスおけるガストリン遊離ペプチド誘発の痒みへのマスト細胞の関与. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.

- 2) 吉田哲郎, 安東嗣修, 倉石泰: マウスにおいてカテプシン E がエンドセリン-1 を介して痒み関連反応を誘発する. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- 3) 歌 大介, 後藤義一, 安東嗣修, 倉石 泰, 井本敬二, 古江秀昌: In vivo パッチクランプ記録法を用いた成熟ラット脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス伝達. 第 89 回日本生理学会大会. 2012, 3, 29-31, 長野.
- 4) 安東嗣修: どうしても止めたい「かゆみ」。でも「かゆみ」ってどうやって起こるの? 平成 24 年度富山大学 富山駅前サテライト公開講座. 2012, 5, 19, 富山.
- 5) Andoh T, Harada A, Kuraishi Y. Interleukin-31-induced pruritus: involvement of leukotriene B₄ released from epidermal keratinocytes in mice. 42nd Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, 2012, 9, 19-22, Venice, Italy.
- 6) 高山祐輔, 安東嗣修, 倉石 泰: Keratin 分解酵素 keratinase の proteinase-activated receptor-2 を介した痒み誘発機序. 第 63 回日本薬理学会北部会, 2012, 9, 14, 新潟.
- 7) 安東嗣修, 倉石 泰: ホスホジエステラーゼ 4 阻害薬 E6005 はマウスの痒み関連反応を抑制する. 第 22 回国際痒みシンポジウム, 2012, 10, 6, 東京.
- 8) 佐々木淳, アディカリスバース, 安東嗣修, 倉石泰: マウス帯状疱疹性掻痒の薬理学的特徴. 第 22 回国際痒みシンポジウム, 2012, 10, 6, 東京.
- 9) Andoh T, Kuraishi Y. Inhibitory effects of a phosphodiesterase 4 inhibitor (E6005) on itch-related behavior and cutaneous nerve activity in mice. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.
- 10) Uta D, Andoh T, Imoto K. Furue H. In vivo pruritic synaptic responses elicited by cutaneous 5-HT application in the superficial spinal dorsal horn of adult rats. The 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2012, 10, 13-17, New Orleans, USA.
- 11) 安東嗣修, 高山祐輔, 倉石 泰: 皮膚糸状菌抽出物誘発掻痒反応へのアラキドン酸代謝産物 leukotriene B₄ の関与. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 21-23, 福岡.
- 12) Bahar MA, Andoh T, Kuraishi Y. Mechanisms of Breast Cancer-Induced Itch. The 3rd International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences, 2013, 6, 18-19, Yogyakarta, Indonesia.
- 13) 歌 大介, 安東嗣修, 倉石泰, 井本敬二, 古江秀昌: 痒み求心性入力を受けるラット脊髄後角細胞の in vivo 発火パターン解析. 第 36 回日本神経科学大会, 2013, 6, 20-23, 京都.
- 14) 安東嗣修: 動物を用いた痒み研究と和漢薬. 第 18 回和漢医薬学総合研究所夏季セミナー, 2013, 8, 22, 富山.
- 15) 井浪義博, 安東嗣修, 佐々木淳, 倉石泰: アニオン性界面活性剤ラウリン酸ナトリウム誘発の急性痒み反応に対するクロロゲン酸の効果. 第 30 回和漢医薬学会学術大会, 2013, 8, 31-9, 1, 金沢.
- 16) 高橋遼平, 安東嗣修, 宮本隆行, 倉石 泰: 乾燥性皮膚掻痒症マウスの表皮ケラチノサイトにおける choline acetyltransferase の発現誘導. 第 64 回日本薬理学会北部会, 2013, 9, 13, 旭川.
- 17) 真野陽介, 安東嗣修, 二宮 (小畑) 一茂, 鳥山 一, 倉石 泰: 蚊アレルギーの痒みにおける好塩基球の関与とプロテアーゼを介した痒みの発生機序. 第 64 回日本薬理学会北部会,

- 2013, 9, 13, 旭川.
- 18) Andoh T, Suzuki K, Kuraishi Y. Pharmacological characterization of a surgically induced mouse model of cholestatic pruritus. 7th World Congress on Itch. 2013, 9, 21-23, Boston, USA.
- 19) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Involvement of keratinocyte-produced histamine in acute and chronic itch-related behaviors induced by topical application of anionic surfactants in mice. 7th World Congress on Itch. 2013, 9, 21-23, Boston, USA.
- 20) 安東嗣修, 本間あずさ, 近藤詠子, 倉石 泰 : マウスにおける眼アレルギーによる痒み反応へのマスト細胞由来セリンプロテアーゼの関与. 第 23 回国際痒みシンポジウム, 2013, 10, 26, 大阪.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan ; 2014 Mar 16-18 ; Kagoshima.
- 24) Andoh T. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.

- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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; 2014 Dec 12-14; Osaka.

国立大学法人富山大学
(登録番号)
5297389 (平 25.6.21)

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 (平成 26.11.6)

H.知的財産権の出願・登録状況

特許登録：

(発明の名称)
アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用
(発明者)
安東嗣修, 倉石 泰, 中野 祐
(出願人)

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

我々は、アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis:AD) の難治性病変の病態解明を目指し研究を遂行した。具体的には、平成 23 年度は、フィラグリン変異を有するマウスを C57BL/6 マウスへバッククロス (99.9% 以上) した。本マウス (FlakyB6 マウス) では、自然発症の皮膚炎、皮膚組織への好酸球や好塩基球および肥満細胞の浸潤、TSLP 発現の上昇、Th2 および Th17 サイトカイン発現の上昇や、血清 IgE 値の上昇を認めた。また、搔破行動を起こしていることも明らかとなり、本マウスの、マウス AD モデルとしての有用性を示した。平成 24 年度は、炎症性サイトカインの一つである IL-17A に着目し、IL-17A 欠損マウス、またこれを前年度作製した FlakyB6 マウスと交配し、フィラグリン欠損下での IL-17A の AD 病態に果たす役割についても解析を行った。その結果、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。本成果により、IL-17A の AD の新規治療ターゲットとしての可能性を示唆できた。平成 25 年度は、非侵襲的に皮膚天然保湿因子 (Natural moisturizing factor:NMF) を測定しうる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。

本研究成果を更に発展させることにより、AD 難治性病変の病態機序解明、さらには病態に基づいたピンポイントな治療が可能になると期待できる。

A. 研究目的

(平成 23 年度)

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis:AD) の瘙癢の特徴を考える際に、小動物を用いて解析し、その結果をヒトの臨床との整合性を検証するという作業が重要である。そこで、ヒトの病態に近いフィラグリン遺伝子変異によるマウスアトピー性皮膚炎モデルを開発し、そう痒の評価系を形成し、IL-31 などのそう痒誘発分子の影響を検証することを本研究の目的とする。本年度は、フィラグリン遺伝子の変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、アトピー性皮膚炎モデルとしての可能性を検証する。

(平成 24 年度)

炎症性サイトカインの一つである 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。

(平成 25 年度)

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 は皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。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

(平成 23 年度)

近年アトピーモデルとして用いられているフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウス (Moriya et al. Am J Pathol.2010) を C57BL/6 マウスでバッククロスし、本マウスの詳細な解析の施行を可能にする。本マウスの免疫学的特徴と痒みの評価を実施する。

(平成 24 年度)

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。

(平成 25 年度)

ステロイド長期使用歴のある AD 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

(平成 23 年度)

フィラグリン変異を有するマウスを C57BL/6 マウスへバッククロス (99.9%以上) した。本マウスでは、自然発症の皮膚炎、皮膚組織への好酸球や好塩基球および肥満細胞の浸潤、TSLP 発現の上昇、Th2 および Th17 サイトカイン発現の上昇や、血清 IgE 値の上昇を認めた。また、sclabareal を用いた解析により、搔破行動を起こしていることも明らかとなった。

(平成 24 年度)

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。

(平成 25 年度)

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

AD 難治性病変の病態機序解明を、小動物を用いた解析、さらには実際のヒトサンプルを用いた解析を行い、多角的に解明しようと試みた。AD モデルマウスはこれからも様々な遺伝子改変マウスを交配することにより病態解明のためのツールとして非常に有用である。また、非侵襲的に NMF を測定しうる共焦点ラマン分光装置はさらなる症例の蓄積により、ヒト AD での病態解明の一助となり得ると期待できる。

E. 結論

本研究成果を更に発展させることにより、AD 難治性病変の病態機序解明、さらには病態に基づいたピンポイントな治療、ひいては新規治療薬開発が可能になると期待できる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表 (2012.4~2015.3)

1. 論文発表

1. Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. 2012. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med* 209: 1743-52
2. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. 2012. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic

- cells. *FASEB J* 26: 211-8
3. Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. PGD2 induces eotaxin-3 via PPARgamma from sebocytes: a possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol* 129: 536-43
 4. Nakahigashi K, Otsuka A, Doi H, Tanaka S, Okajima Y, Niizeki H, Hirakiyama A, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. Prostaglandin E2 Increase in Pachydermoperiostosis without 15-hydroprostaglandin Dehydrogenase Mutations. *Acta Derm Venereol*
 5. Nakajima S, Igyarto BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K. 2012. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1048-55 e6
 6. Ono S, Otsuka A, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. No filaggrin gene mutation in a patient with a combination of atopic dermatitis, alopecia areata and food allergy. *Eur J Dermatol*
 7. Tanizaki H, Ikoma A, Fukuoka M, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. Effects of bepotastine and fexofenadine on histamine-induced flare, wheal and itch. *Int Arch Allergy Immunol* 158: 191-5
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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*. 2013 Jul

- 29;8(7):e69599.
- 13: 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.
- 14: 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.
- 15: 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.
- 16: 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.
- 17: 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.
- 18: Honda T, Kabashima K. Prostanoids in allergy. *Allergol Int*. 2015 Jan;64(1):11-16.
- 19: Nakamizo S, Egawa G, Honda T, Nakajima S, Belkaid Y, Kabashima K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. *Semin Immunopathol*. 2015 Jan;37(1):73-80.
- 20: Dainichi T, Hanakawa S, Kabashima K. Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. *J Dermatol Sci*. 2014 Nov;76(2):81-9.
- 21: Nomura T, Kabashima K, Miyachi Y. The panoply of $\alpha\beta$ T cells in the skin. *J Dermatol Sci*. 2014 Oct;76(1):3-9.
- 22: Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Nakamizo S, Arita M, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jul;134(1):100-7.
- 23: Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol*. 2014 Aug;134(8):2122-30.
2. 学会発表
1. H. Tanizaki, Kenji Kabashima Effect of topical steroid on the stratum corneum compositions by using confocal Raman Microscopy. 11th Meeting of the

German-Japanese Society of Dermatology,
June 11–14, 2014

2. Saeko Nakajima, Yoshiki Miyachi, Kenji Kabashima. New role of Promotive role of IL-17A for induction as an inducer of Th2 in murine models of atopic dermatitis. International Investigative Dermatology 2013. Edinburgh, UK May, 2013
3. Saeko Nakajima, Yoshiki Miyachi, Kenji Kabashima. Role of IL-17A for induction of Th2 in a murine model of atopic dermatitis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Okinawa, Japan December, 2012
4. Saeko Nakajima, Yoshiki Miyachi, Kenji Kabashima. Role of IL-17A for induction of antigen specific IgE in a murine model of atopic dermatitis. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kobe, Japan December, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

アトピー性皮膚炎の二大分別法とバリア異常及び金属アレルギーの関わり

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

研究要旨 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. 研究方法

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 μ 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. 研究結果

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)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。

F. 健康危険情報

なし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y: Heparin serves as a natural stimulant of the inflammasome and exacerbates the symptoms of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Dermatol Sci* 66: 82-84, 2012.
2. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe JI, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci* 67: 37-43, 2012.
3. Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T cell leukemia/lymphoma. *Cell in Cancer Res* 18: 3772-3779, 2012.
4. Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. *Allergol Int* 61: 539-544, 2012.
5. Nishida K, Tateishi C, Tsuruta D, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Contact urticaria caused by a fish-derived elastin-containing cosmetic cream. *Contact Dermatitis* 67: 171-172, 2012.
6. Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Ogasawara K, Tokura Y: Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation test in a patient with nickel allergy. *Eur J Dermatol* 22: 268-269, 2012.
7. Ohmori S, Hino R, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 51: 196-199, 2012.
8. 戸倉新樹: 皮膚バリアからみるアトピー性皮膚炎の全体像. *臨床免疫・アレルギー科* 58: 295-299, 2012.
9. 戸倉新樹: IgE値正常の内因性アトピー性皮膚炎の成因は如何に. *皮膚アレルギーフロンティア* 10: 19-23, 2012.
10. 龍野一樹, 戸倉新樹: 慢性痒疹と皮膚搔痒症の病態と治療/慢性痒疹・皮膚搔痒症の光線療法. *アレルギー・免疫* 19: 944-949, 2012.
11. Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y: CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase. *J Dermatol Sci* 69: 140-147, 2013.
12. Yamaguchi H, Tatsuno K, Sakabe J, Tokura Y: Second report of FLG R501X mutation in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 40: 498-499, 2013.
13. Sakabe J, 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.
14. 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.
15. Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe JI, 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* 72: 240-

- 245, 2013.
16. 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* 8: e69599, 2013.
 17. Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, Sakabe JI, Nakahigashi K, Kuroda E, Umetsu 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* 3: 2973, 2013.
 18. 戸倉新樹：フィラグリン異常とアレルギー疾患の進展。モダンフィジシャン 33:193-197, 2013.
 19. 坂部純一, 戸倉新樹：知っておきたい基礎用語／フィラグリンとは。日小皮会誌 32: 70-71, 2013.
 20. 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎の分別 Up-to-Date. 日本臨床皮膚科医会雑誌 30: 23-27, 2013.
 21. 戸倉新樹：コリン性蕁麻疹に伴う発汗異常とアセチルコリン受容体発現異常。発汗学20: 29-32, 2013.
 22. 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎の治療Overview. 臨床免疫・アレルギー科 60: 290-294, 2013.
 23. 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎：皮膚バリアの破綻によるアレルギー。実験医学 31: 143-149, 2013.
 24. 山口隼人, 久保利江子, 尾藤利憲, 戸倉新樹：アトピー性皮膚炎と金属アレルギー。臨床免疫・アレルギー科 60: 681-686, 2013.
 25. Fujiyama T, Kawakami C, Sugita 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* 73: 85-88, 2014.
 26. Kasuya A, Sakabe J, Tokura Y: Potential application of in vivo imaging of impaired lymphatic duct to evaluate the severity of pressure ulcer in mouse model. *Sci Rep* 4: 4173, 2014.
 27. Nakazawa S, Moriki M, Ikeya S, Sakabe J-I, Tokura Y: Atopic dermatitis presenting as generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation. *J Dermatol* 41: 230-231, 2014.
 28. Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H: Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol* 177: 110-120, 2014.
 29. Yamaguchi H, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hashizume H, Tokura Y: Psychological aspects of patients with intrinsic atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 24: 253-254, 2014.
 30. Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y, Nakamura M: IL-23 from Langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells. *J Invest Dermatol* 134: 1912-1921, 2014.
 31. Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, Ikeya S, Suzuki T, Aoshima M, Tatsuno K, Fujiyama T, Suzuki M, Yatagai T, Ito T, Ojima T, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *J Allergy Clin Immunol* 134: 957-967.e8, 2014.
 32. Ito T, Tokura Y: The role of cytokines/chemokines in T cell-mediated autoimmune inflammation: Lessons from hair loss in alopecia areata. *Exp Dermatol* 23: 787-791, 2014.
 33. Kasuya A, Tokura Y: Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76: 169-172, 2014.
 34. Tokura Y, Yagi H, Yanaguchi H, Majima Y, Kasuya A, Ito T, Maekawa M, Hashizume H: IgG4-related skin disease. *Br J Dermatol* 171: 959-967, 2014.
 35. 戸倉新樹：皮膚疾患の病態／内因性アトピー性皮膚炎。臨床皮膚科 68: 38-41, 2014.
 36. 山口隼人, 船井尚子, 坂部純一, 戸倉新樹：顕著な爪囲炎を伴ったフィラグリン遺伝子変異陽性アトピー性皮膚炎の1例。皮膚科の臨床 56: 784-785, 2014.