

37. 坂部純一, 山口隼人, 福家辰樹, 池谷茂樹, 神谷浩二, 龍野一樹, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子変異と手掌皸亢進・尋常性魚鱗癬との関連. 日小皮会誌 33 : 27-31, 2014.
38. 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎の病態 (内因性vs外因性). Monthly Book Derma 224 : 9-17, 2014.
39. Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y: Leukoderma in patients with atopic dermatitis. J Dermatol 42 : 215-218, 2015.
40. Ito T, Tatsuno K, Fujiyama T, Sakabe J, Tokura Y: Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CCL17 in patients with atopic dermatitis. Allergol Int (in press)
41. Kamiya K, Kamiya E, Kamiya Y, Niwa M, Saito A, Natsume T, Niwa H, Tokura Y: Drug eruption to clavulanic acid with sparing of cellulitis-affecting site. Allergol Int (in press)
42. Yamaguchi H, Hirasawa N, Asakawa S, Okita K, Tokura Y: Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. Allergol Int (in press)
2. 学会発表
1. 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎治療 overview. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012.11.29. 大阪市
2. 山口隼人, 久保利江子, 尾藤俊憲, 坂部純一, 龍野一樹, 平澤典保, 小笠原康悦, 戸倉新樹: 内因性アトピーと金属アレルギー. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013.5.11-12. 横浜市
3. 山口隼人, 坂部純一, 久保利江子, 尾藤利憲, 中村元信, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎患者における金属アレルギーの有病率 (フィラグリン遺伝子解析も含めて). 第112回日本皮膚科学会総会. 2013.6.15. 横浜市
4. Tokura Y, Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J, Tatsuno K, Hirasawa N: The intrinsic type of atopic dermatitis differs from the extrinsic type in high frequencies of nickel/cobalt allergy with high levels of circulating Th1 cells. EAACI-WAO World Allergy & Asthma Congress. 2013.6.24. Milano, Italy
5. 坂部純一, 山口隼人, 福家辰樹, 龍野一樹, 平川聡史, 戸倉新樹: フィラグリン遺伝子変異に基づくアトピー性皮膚炎の特徴. 第37回日本小児皮膚科学会. 2013.7.14. 東京
6. 森木睦, 戸倉新樹: 著明な多形皮膚萎縮を伴いフィラグリン遺伝子変異 (S2889X) を有するアトピー性皮膚炎の1例. 第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2013.9.21. さいたま市
7. 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎の基礎から臨床まで/臨床例からみる皮膚バリアとアトピー性皮膚炎. 第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会. 2013.9.22. さいたま市
8. 中澤慎介, 森木睦, 池谷茂樹, 坂部純一, 戸倉新樹: ポイキロデルマを症状としフィラグリン遺伝子変異を認めたアトピー性皮膚炎. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.29. 金沢市
9. 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎の新たなステージ: 基礎と臨床の視点から/アトピー性皮膚炎のタイプからみた外用療法の考え方. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2013.11.30. 金沢市
10. Tokura Y: Proteome analysis of corneum from atopic dermatitis patients. World Rendez-vous on Dermatology. 2014.3.11. Tokyo, Japan
11. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Tokura Y: High expression of TSLP receptors in circulating CD4+ T cells in atopic dermatitis. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.9. Albuquerque, USA
12. Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. 8th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis. 2014.5.22. Nottingham, UK
13. 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎を紐解く. 第66回皮膚科学会西部支部学術大会. 2014.11.8. 高松市
14. Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y: TSLPR expressing CD4+ T cells produce enhanced IL-4 by directly responding to TSLP in atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.12. Suita, Japan
15. Sakabe J, Kamiya K, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopi

c dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan

16. Yuki T, Kusaka A, Komiya A, Tobiishi A, Ota T, Tokura Y: IL-17A weakens the tight junction (TJ) barrier in a human-skin-equivalent model: A possible mechanism of impaired TJ in atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

研究分担者 片山一朗：大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学教授

室田浩之：大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学准教授

研究要旨：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。

A. 研究目的：

「温もるとかゆい」は皮膚科の日常診療でよく聞かれる訴えの一つであるとともに、経験的に制御困難な症状でもある。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、アトピー性皮膚炎患者の96%は「温熱、発汗」が誘起因子と考えており最大の誘因とされている。本研究は温熱が痒みを誘発するメカニズムに着目した。

アトピー性皮膚炎で見られる異常なかゆみ過敏が存在する。このように通常はかゆみに感じられない刺激をかゆみに感じる現象がアロネシスと表現され存在することが知られている。実際にアトピー性皮膚炎では通常疼痛に感じる熱刺激やアセチルコリン投与でかゆみが誘発されると報告されている。しかしこれまでにアロネシスが生じるメカニズムは明らかにされていない。

本研究では温熱によるアロネシスの原因を解明し、治療に応用することを目的とする。

B. 方法：

アロネシスと増感因子が温もった時の痒みを誘発するという仮説をもとに、申請者らが近年見出した神経栄養因子アーテミンに焦点を当てた検討を行う。アーテミンの発現メカニズムを *in vitro* の細胞培養系で確認し、増感作用アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響を *in vivo* における動物実験によって確認する。またアーテミン投与と暑熱環境、熱刺激が中枢神経の興奮に与える影響を MRI によって検討した。

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：

アーテミンはサブスタンス P 刺激によって真皮線維芽細胞から発現誘導され、*in vitro* において神経芽細胞の増殖活性を亢進させることを見出した (図 1)。さらにアーテミンはアトピー性皮膚炎病変部真皮に蓄積し (図 2)、末梢神経の sprouting を誘導することを確認しており、アーテミンがヒトのアトピー性皮膚炎の皮膚病変部真皮に蓄積していることが確認された。アーテミンを皮下投与したマウスは 38 度の環境下で全身を wiping する行動が確認された。ところが 42 度の環境下では飛び跳ねるなどの異常な行動が確認された (図 3)。

アーテミンは背部皮膚に投与したにも関わらずマウスは全身の熱過敏を来したことから、皮膚への限局的なアーテミンの蓄積が中枢神経の増感を介して全身の温度過敏を誘導しているのではないかと考えた (図 3)。実際に背部皮膚限局的にアーテミンを投与したマウスを室温あるいは暑熱環境下におき、脳の興奮状態を MRI にて評価した (図 4)。アーテミン投与マウスは室温でも中枢神経が増感しており、その興奮程度は暑熱環境下でより顕著になった。

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 (図 5)。

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 (図 6)。

E 結論

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 (図 6)。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, Naka T, Murota H, Katayama I. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. **PLoS One**. 2012;7(7):e41994.
- 2: Schmitt J, Spuls P, Boers M, et al (35名中27番目). Towards global consensus on outcome measures for atopic eczema research: results of the HOME II meeting. **Allergy**. 2012 Sep;67(9):1111-7.
- 3: Kijima A, Murota H, Matsui S, Takahashi A, Kimura A, Kitaba S, Lee JB, Katayama I. Abnormal axon reflex-mediated sweating correlates with high state of anxiety in atopic dermatitis. **Allergol Int**. 2012 Sep;61(3):469-73.

- 4: Murota H, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, Matsui S, Sano S, Katayama I. Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol.** 2012 Sep;130(3):671-682.
- 5: Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, Miyoshi E. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. **Exp Dermatol.** 2012 Jul;21(7):515-9.
- 6: Kondo Y, Umegaki N, Terao M, Murota H, Kimura T, Katayama I. A case of generalized acanthosis nigricans with positive lupus erythematosus-related autoantibodies and antimicrobial antibody: autoimmune acanthosis nigricans? **Case Rep Dermatol.** 2012 Jan;4(1):85-91.
- 7: Otsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. **Exp Dermatol.** 2012 May;21(5):331-6.
- 8: Arase N, Igawa K, Senda S, Terao M, Murota H, Katayama I. Morphea on the breast after a needle biopsy. **Ann Dermatol.** 2011 Dec;23(Suppl 3):S408-10.
- 9: Hanafusa T, Azukizawa H, Nishioka M, Tanemura A, Murota H, Yoshida H, Sato E, Hashii Y, Ozono K, Koga H, Hashimoto T, Katayama I. Lichen planus-type chronic graft-versus-host disease complicated by mucous membrane pemphigoid with positive anti-BP180/230 and scleroderma-related autoantibodies followed by reduced regulatory T cell frequency. **Eur J Dermatol.** 2012 Jan-Feb;22(1):140-2.
- 10: Kotobuki Y, Tanemura A, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2012 Mar;25(2):219-30.
- 11: Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, Naka T, Kishimoto T, Katayama I. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of

- scleroderma. *Am J Pathol.* 2012 Jan;180(1):165-76.
- 12: Murota H, Itoi S, Terao M, Matsui S, Kawai H, Satou Y, Suda K, Katayama I. Topical cholesterol treatment ameliorates hapten-evoked cutaneous hypersensitivity by sustaining expression of 11 β -HSD1 in epidermis. *Exp Dermatol.* 2013 Nov 13. doi: 10.1111/exd.12284
- 13: Takahashi A, Murota H, Matsui S, Kijima A, Kitaba S, Lee JB, Katayama I. Decreased Sudomotor Function is Involved in the Formation of Atopic Eczema in the Cubital Fossa. *Allergol Int.* 2013 Sep 25.
14. Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Oct 18;440(2):265-70.
- 15: Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective Oral Psoralen Plus Ultraviolet A Therapy for Digital Ulcers with Revascularization in Systemic Sclerosis. *Acta Derm Venereol.* 2013 Aug 8. doi: 10.2340/00015555-1678.
- 16: Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang L, Lee JB, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Dynamic Analysis of Histamine-Mediated Attenuation of Acetylcholine-Induced Sweating via GSK3 β Activation. *J Invest Dermatol.* 2013 Jul 30. doi: 10.1038/jid.2013.323.
- 17: Murota H, El-Latif MA, Tamura T, Katayama I. Olopatadine Hydrochloride Decreases Tissue Interleukin-31 Levels in an Atopic Dermatitis Mouse Model. *Acta Derm Venereol.* 2013 Jul 1. doi: 10.2340/00015555-1648.
- 18: Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol.* 2013 Nov;133(11):2555-65.
- 19: Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):507-12.
- 20: Tanaka R, Fukushima S, Sasaki K, Tanaka Y, Murota H, Matsumoto T, Araki T, Yasui T. In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy. *J Biomed Opt.* 2013 Jun;18(6):61231.
- 21: Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T. In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite

- laser. *J Biomed Opt.* 2013 Mar;18(3):031108.
- 22: Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I. Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2, in human epidermal tumors and its role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol.* 2013 Feb;22(2):98-101. doi: 10.1111/exd.
- 23: Murota H, Katayama I. Reply: To PMID 22770266. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Mar;131(3):928-9.
- 24: Yasui T, Yonetsu M, Tanaka R, Tanaka Y, Fukushima S, Yamashita T, Ogura Y, Hirao T, Murota H, Araki T. In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser. *J Biomed Opt.* 2013 Mar;18(3):31108.
- 25: Lee J, Shin Y, Murota H. Oligonol Supplementation Modulates Plasma Volume and Osmolality and Sweating After Heat Load in Humans. *J Med Food.* 2015 Jan 20. PubMed PMID: 25602687.
- 26: Nakano-Tahara M, Terao M, Nishioka M, Kitaba S, Murota H, Katayama I. T Helper 2 Polarization in Senile Erythroderma with Elevated Levels of TARC and IgE. *Dermatology.* 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25572944.
- 27: Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(4):824-830.
- 28: Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Yutani M, Murota H, Nakano H, Sawamura D, Katayama I. Atopic Diathesis in Hypohidrotic/Anhidrotic Ectodermal Dysplasia. *Acta Derm Venereol.* 2014 Oct 1. doi: 10.2340/00015555-1978.
- 29: Murota H, Matsui S, Ono E, Kijima A, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms. *J Dermatol Sci.* 2015;77:3-10.
- 30: Kurata R, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K. Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin. *Cell Struct Funct.* 2014;39:101-12.
- 31: Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon.

Rheumatology (Oxford). 2015 Feb;54(2):349-58.

- 32: Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, Murota H, Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S, Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, Katoh N. Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8. *Br J Dermatol.* 2015, 172:272-5.
- 33: Yang F, Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Yang L, Nakamura A, Matsumoto S, Attia M, Murota H, Katayama I. Topical application of rapamycin ointment ameliorates *Dermatophagoides farinae* body extract-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Dermatol.* 2014, 23:568-72.
- 34: Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, Murota H, Katayama I. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation. *PLoS One.* 2014 25;9:e93051.

(日本語論文)

1. 室田 浩之 アレルギー皮膚疾患日常診療トピックス アトピー性皮膚炎における生活指導と蕁麻疹の薬物使用戦略：高崎医学(0916-121X)62：82-86,(2012.08)
2. 室田浩之【小児アトピー性皮膚炎】小児アトピー性皮膚炎の痒みの管理と指導(解説/特集)臨床免疫・アレルギー科 57:663-667, 2012.
3. 室田浩之 【慢性痒疹と皮膚そう痒症の病態と治療】慢性痒疹・皮膚そう痒症の疫学と労働生産性 アレルギー・免疫 19 920-925, 2012.
4. 片山一朗：包括的カユミ対策をスキンケアはアレルギーマーチを阻止できるか？．日本小児皮膚科学会雑誌 30 (1)：1-7,2011
5. 片山一朗：アトピー性皮膚炎の病因．日本医師会雑誌，140 (5)：978-982,2011
- 6.片山一朗：アトピー性皮膚炎の診断と治療．日本医師会雑誌，140 (5)：945-958,2011
- 7.片山一朗：アレルギー性皮膚炎と診療ガイドライン．アレルギー，40：2011
- 8.片山一朗：中毒疹・紅斑の考え方と治療の進め方．日本臨床皮膚科医会雑誌，28(5)：2011
- 9.片山一朗：中毒疹・紅斑の考え方と治療の進め方．Asahi Medical 40(11):2011
- 10.片山一朗：序～「アトピー性皮膚炎の病態と治療 アップデート」特集にあたって.アレルギー免疫,18 (10)：9.2011
- 11.片山一朗：アトピー性皮膚炎の診療ガイドライン.アレルギー免疫,18 (10)：10-20.2011
- 12.片山一朗：神経原性炎症の増幅のメカニズムとアトピー性皮膚炎,アレルギーと神経ペプチド,日本医学館,7,12,2011
- 13.片山一朗:皮膚バリア機能とアレルギー.アレルギーと神経ペプチド.日本医学館,7,28-31,2011
- 14.片山一朗：皮膚科からみた総合アレルギー医.アレルギー免疫,医薬ジャーナル社,18 (7) 34-41.2011

15. 室田 浩之:【アトピー性皮膚炎の病態と治療】
アトピー性皮膚炎の悪化因子対策. 臨床免疫・アレルギー科 臨床免疫・アレルギー科
(1881-1930)60巻3号Page302-308
- 16.木嶋 晶子, 室田 浩之, 熊谷 一代, 瀧原 圭子, 片山 一郎 思春期におけるアレルギー疾患に関する実態調査: CAMPUS HEALTH(1341-4313)50 巻 1 Page313-315(2013.03)
17. 室田浩之他. 【アトピー性皮膚炎治療の新たな展開】 汗とアトピー性皮膚炎(解説/特集). 臨床免疫・アレルギー科(1881-1930)59巻2号 Page187-190(2013.02)
18. 木嶋晶子、室田浩之、片山一郎 【総合アレルギー診療を目指して】 《アレルギー疾患の病因・病態における最近の話題》 思春期アレルギー疾患の悪化因子とその対策. Modern Physician(0913-7963)33 巻 2 号 Page189-192(2013.02)
19. 室田浩之 【アトピー性皮膚炎治療の最前線】 痒み Derma. 2014.11(224);38-44
20. 室田浩之 診療の秘訣 アトピー性皮膚炎の汗 対策 指導 Modern Physician 2014.10;34(10);1231
- 21.室田浩之 夏季のアトピー性皮膚炎悪化対策 日本医事新報 2014.09(4715);63
- 22.室田浩之 アトピー性皮膚炎悪化因子の検証 汗と温度に関する最近の知見 西日本皮膚科 2014.06;76(3);189-193
- 23.室田浩之 発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み コスメトロジー研究報告 2014.09;22;168-171
- 24.室田浩之 アトピー性皮膚炎における発汗障害 皮膚病診療 2014.08;36(8);700-705
- 25.室田浩之 新・皮膚科セミナーウム 汗 生理と病態の全て アトピー性皮膚炎における発汗障害 日本皮膚科学会雑誌 2014.06;124(7);1289-1293
26. 室田浩之 【最近のトピックス2014 Clinical Dermatology 2014】 皮膚疾患の病態 温まるとなぜかゆいのか? 臨床皮膚科 2014.04;68(5);47-50
27. 室田浩之 【痒疹の粘り強い治療】 内服・全身療法(かゆみ作働薬) Derma. 2014.02(214);41-47
2. 学会発表
- 1) 北場俊、室田浩之、高橋 彩、松井佐起、片山一郎. 乳児期早期のスキンケアによるアトピー性皮膚炎発症予防効果の検討. 第24回アレルギー学会春季臨床大会、2012, 5
- 2) 楊 伶俐、室田浩之、仲 哲治、片山一郎 リモデリングの新たな視点 アレルギー疾患と組織リモデリング ペリオスチンの新たな役割 第24回アレルギー学会春季臨床大会、2012, 5
- 3) 1) 片山一郎、生体の恒常性とアレルギー. 第24回アレルギー学会春季臨床大会、2012, 5
- 4) Murota H. Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, similar to

- warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. 38th Japanese Society of Investigative Dermatology annual meeting. 2012, 12
- 5) 木嶋晶子、室田浩之、他. 思春期におけるアレルギー疾患に関する実態調査. 第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013, 5
- 6) 小野慧美、室田浩之他. アトピー性皮膚炎患者を対象とした発汗に関する実態調査アンケート 第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013, 5
- 7) 永田 由子、中野 真由子、松井 佐起、木嶋 晶子、高橋 彩、室田 浩之、片山 一朗 アトピー性皮膚炎におけるネコアレルギーとイヌアレルギーの影響第25回アレルギー学会春季臨床大会、2013, 5
- 8) 中野真由子、室田浩之他. アトピー性皮膚炎の診断基準から見た高齢者紅皮症の臨床的検討と問題点 日本皮膚科学会総会 2013, 5
- 9) 室田浩之 アトピー性皮膚炎の悪化因子対策 汗と温度の指導箋 日本皮膚科学会総会 2014. 5
- 10) 室田浩之 アトピー性皮膚炎 up-to-date アトピー性皮膚炎と汗 発汗は増悪因子か? 日本臨床皮膚科学会 2013 5
- 11) 室田浩之 皮膚科からみた生活指導 PAD フォーラム 大阪 3/21
- 12) 室田浩之 発汗と温熱感覚の基礎研究から考えるアトピー性皮膚炎悪化因子対策 日本皮膚科学会東京支部学術大会 2/15-2/16
- 13) 室田浩之 日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー 一から考えるアトピー性皮膚炎の痒みとその対策 5/10-5/11
- 14) 室田浩之 日本皮膚科学会総会 教育講演 皮膚アレルギーの汗対策 5/30-6/1
- 15) 室田浩之 日本皮膚科学会総会 イブニングセミナー アトピー性皮膚炎(小児から成人まで) 5/30-6/1
- 16) 室田浩之 日本乾癬学会学術大会 ランチオンセミナー 乾癬のかゆみの特徴:皮膚-脳相関の視点からアトピー性皮膚炎と対比する 9/19-9/20
- 17) 室田浩之 日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会 セミナー アトピー性皮膚炎の痒みアップデート:皮膚と脳の対話 11/22-23
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 該当なし

図1：アーテミンはサブスタンス P によって線維芽細胞から誘導される皮膚の温感の感受に影響を与える因子である

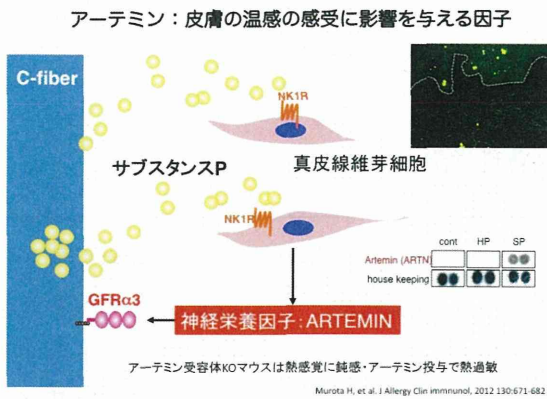


図2（下）：痒みを伴う皮膚疾患におけるアーテミンの発現パターン。アトピー性皮膚炎と貨幣状湿疹で顕著。

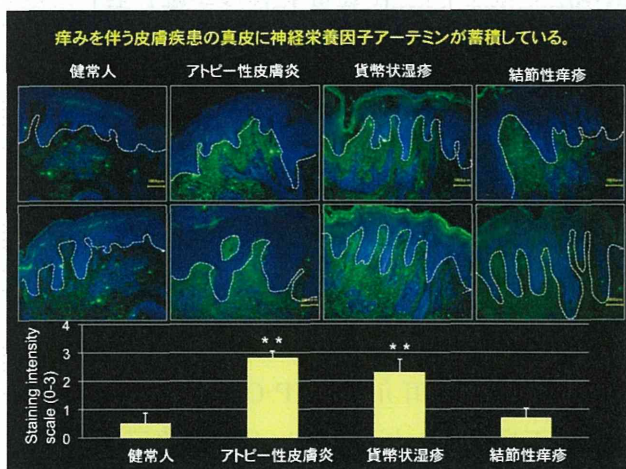


図3（下）：アーテミンを投与したマウスを38℃の環境におくと全身を搔破する動作を見せる。



図4（下）：皮膚炎局所でのアーテミン蓄積が脳を増感し、皮疹のないところも痒くなる？

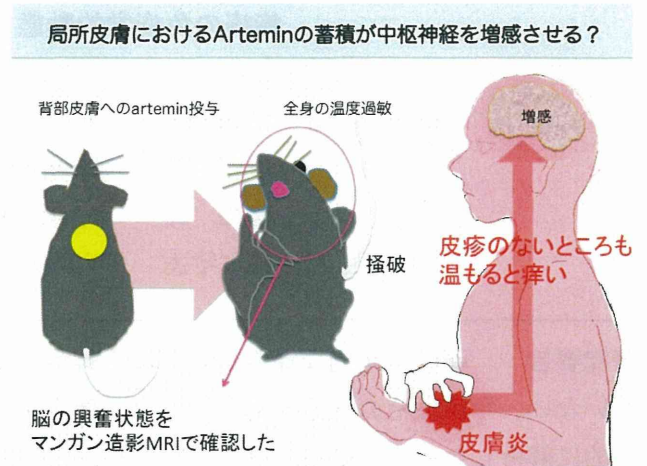


図5(下):アーテミンの中和抗体は脳の異常な興奮を抑制できる

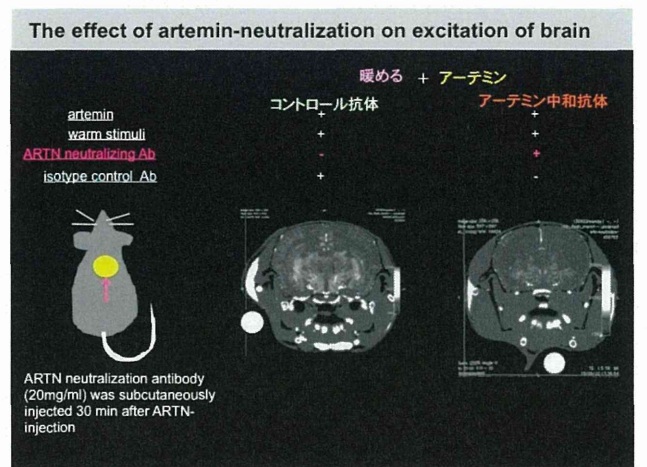
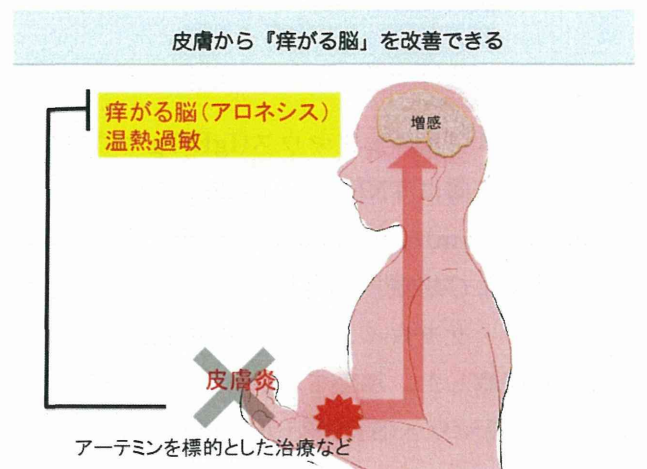


図6（下）：アーテミンの中和が痒がる脳を改善する



痒疹の免疫学的動態と臨床病型に関する研究

研究分担者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授
佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科学講座 教授
西澤 綾 防衛医科大学校皮膚科学講座 講師
端本宇志 防衛医科大学校皮膚科学講座 助教

研究要旨 痒疹は頑固な痒みをともなう難治性皮膚疾患の一つである。しかしその病態は全く分かっていない。今回はその病態を解明すべく、痒疹マウスモデルの作成に成功し、その病変成立機序を免疫学的に解析した。その結果、マウス痒疹モデルは好塩基球依存性であること、また Th2 型サイトカインはM2マクロファージを介して抑制的に作用しうることが明らかとなった。ヒト痒疹部にも好塩基球が多く浸潤しており、病変の成立に好塩基球が関与し治療の標的となりうることが考えられた。

A：研究目的

痒疹は代表的な難治性そう痒性皮膚疾患であり、慢性的な痒みは患者のQOLを大きく損なう。しかしその病態はいまだ明らかでない。痒疹は慢性腎不全をはじめとする種々の基礎疾患に関連して生じることが多いが、アトピー性皮膚炎患者にもしばしば痒疹病変が形成される。痒疹病変の特徴は痒みを伴う孤立性の丘疹である。多くは蕁麻疹様病変ではじまりやがて持続性の丘疹ないし結節性病変へと変化する。今回はこの現象に着目してIgE依存性に痒疹病変マウスモデルの作成を試み、その病態の解明を試みた。あわせてヒト痒疹の病型について検討を行った。

B：研究方法

IgEトランスジェニックマウス(IgE-Tgマウス)の耳介や背部皮膚にTNP(trinitrophenyl)-OVA(ovalbumin)を反復皮下または皮内投与し、その肉眼的および組織学的変化、さらには局所のサイトカイン・ケモカイン産生や神経分布、搔破行動などを観察した。加えてC57BL/6、さらにSTAT6欠損マウス(STAT6(-/-)マウス)を

TNP(trinitrophenyl)-特異IgEにて繰り返し授動感作することで同様の反応を誘導し、Th2型サイトカインの関与に関して検討した。

一方、ヒト痒疹に関しては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

IgE-Tgマウスの耳介にTNP-OVAをday 1,4,7に反復皮下投与したところ強い耳介腫脹反応がみられ、その反応は1か月以上持続した。Wild-typeであるBALB/cマウスでは軽度の耳介腫脹がみられたが、その反応はすみやかに収束した。次にIgE-Tgマウス背部皮膚に同様にTNP-OVAを皮内投与したところ丘疹性病変が形成された。組織学的には不規則な表皮肥厚、真皮の単核球、好酸球浸潤がみられ、またマスト細胞が増加していた。さらに真皮や表皮内にmast cell protease 8陽性好塩基球の浸潤がみられた。さらにこれらのマウスでは病変部への自発的搔破行動が確認された。病変部ではIL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-33, TSLP, CCL-11, CCL-24, TGFβなどのサイ

トカイン・ケモカイン産生が確認された。さらに Type I collagen や nerve growth factor、そして痒みサイトカインである IL-31 mRNA も増加していた。病変部周辺表皮では PGP9.5 (+)神経線維の sprouting が観察された。またこの病変の反応は好塩基球除去抗体によってすみやかに収束した。類似する痒疹反応は、day 0, 3, 6 に TNP-IgE を C57BL/6 マウスに投与後 TNP-OVA を反復皮下投与することでも誘導可能であった。そこで Th2 型サイトカインの関与を検討するため、STAT6(-/-)を用いて痒疹反応を誘導したところ、意外なことに WT (C57BL/6)マウスに比してその耳介腫脹は大きく増強していた。WT マウスで誘導される痒疹病変は STAT6siRNA の局所投与によっても増強した。STAT6(-/-)マウスの病変部では WT マウスに比して多くの好塩基球が浸潤し表皮肥厚も著明であったが、好酸球はほとんどみられなくなっていた。局所では IL-4, IL13, IL-33, TSLP 産生が WT マウスより増加していた。また STAT6(-/-)マウスでは M2 マクロファージの浸潤が減少していた。そして STAT6 (-/-)マウスに WT マウス由来の骨髄単核球を移入すると炎症増強が抑制された。このことから、STAT6 (-/-)マウスでは抑制的な機能をもつ M2 マクロファージ産生が低下することで炎症が悪化することが明らかとなった。

一方、ヒト痒疹病変においてもマウスモデルと同様に好酸球浸潤のみならず好塩基球浸潤がみられた。また臨床病型を検討したところ、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。

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。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。

D：考察

今回 IgE 依存性反応を利用してマウス皮膚に持続性のアレルギー炎症を誘導し、肉眼的に丘疹を作成することに成功した。その組織所見はヒト慢性痒疹病変に類似していた。局所のサイトカインでは IL-4, 17, 22, 31 の増加がみられた。このサイトカインプロファイルはヒト慢性痒疹のものとは一致している (Park K, et al., Eur J Dermatol, 2011)。また表皮における神経分布もヒト痒疹と類似点が多く、明らかな搔破行動も確認できたことから、われわれがマウスで誘導した反応はヒト痒疹のモデルに相当すると考えられた。

痒疹反応モデルでは IL-4, IL-5, IL-13 産生がみられることから病変の形成に Th2 型サイトカインが重要であると予測した。しかし意外なことに STAT6(-/-)マウスや STAT6siRNA 投与時における皮膚反応は増強した。その増強機序は STAT6 依存性に産生される抑制的 M2 マクロファージの産生不全によるものであることが明らかとなった。ヒト痒疹病変部にも M2 マクロファージが存在するとの報告もあるが、これらは反応を誘導するのではなく収束させるために浸潤している可能性がある。そして Th2 型サイトカインを標的とした治療法は病変を悪化させるリスクがあることを示している点で興味深い。さらに STAT6(-/-)マウスでは反応増強にもかかわらず好酸球浸潤は著減していた。炎症における好酸球の意義についてはいまだ結論をみないが、少なくともマウス痒疹反応においては炎症増強に関わっておらず、むしろ抑制的に働いている可能性のあることが示唆される。一方、病変部では好塩基球浸潤がみられ、好塩基球除去抗体で反応が収束した。すでにヒト痒疹は好塩基球浸潤を多く伴う皮膚疾患であることをわれわれは報告しており、(Ito Y, et al., Allergy 66: 1107, 2011)、今回の臨床的研究においても再確認している。このことはヒト痒疹において好塩基球が大きく関わっており、好塩基球が痒疹治療の新たな標的となりうる可能性を示唆している。

今回ヒト痒疹に関して、その臨床病型を再検討した。結節性痒疹とも多形慢性痒疹とも判断しがたい群が多いこと、そしてこれらは病変の範囲が広いことや、蕁麻疹様紅斑病変が目立っていることに特徴があった。蕁麻疹紅斑病変と丘疹性病変との混在ないし移行という観点からはやはりマウスモデルの成立過程と類似している。また分類不能な痒疹群は、個疹の反応は多形慢性痒疹に類似している面もあり、多形慢性痒疹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。一方、いずれの病型においても悪性腫瘍の合併例が極めてすくなかったことは注目に値する。

E : 結論

IgE 依存性の反応を用いて痒疹反応マウスモデルを作成した。このモデルは痒疹病態の理解と今後の治療薬の開発において有用であると考えられる。

F : 健康危険情報

なし

G : 研究発表

1 論文発表

1. Yu R, Satoh T, Wakabayashi T, Ueda N, Yokozeki H: Disseminated BCG infection in severe combined immunodeficiency. Acta Derm Venereol 92: 158-159, 2012.
2. Matsushima Y, Satoh T, Yamamoto Y, Nakamura M, Yokozeki H. Distinct roles of prostaglandin D2 receptors in chronic skin inflammation. Mol Immunol 49: 304-310, 2012.
3. Tanaka T, Satoh T, Tanaka A, Yokozeki H. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a case with preserved itch sensation to histamine and partial pain sensation. Br J Dermatol 166: 888-891, 2012.
4. Sekine R, Satoh T, Takaoka A, Saeki K, Yokozeki H. Anti-pruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior. Exp Dermatol 21: 201-204, 2012.
5. Kanai Y, Satoh T, Yokozeki H. Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis. Acta Derm Venereol 92: 367-371, 2012.
6. Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Erythrodermic psoriasis improved by panitumumab. Acta Derm Venereol 92: 360-361, 2012.
7. Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H. Acrosyringeal involvement of palmoplantar lesions of eosinophilic pustular folliculitis. Acta Derm Venereol 93: 99, 2013.
8. Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Close association between metal allergy and nail lichen planus: detection of causative metals in nail lesions. J Eur Acad Derm Venereol 27: 231-234, 2013.
9. Furue M, Ebata T, Ikoma A, Takeuchi S, Kataoka Y, Takamori K, Satoh T, Saeki H, Augustin M, Reich A, Szepietowski J, Fleischer A, Blome C, Phan N-Q, Weisshaar E, Yosipovitch G, Staonder S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus- a consensus statement-. Acta Derm Venereol 93: 214-215, 2013.
10. Takahashi E, Yokozeki H, Satoh T. Atrophic fibrous hamartoma of infancy with epidermal and adnexal changes. J Dermatol 40: 212-214, 2013.
11. Kato K, Satoh T, Tanaka-Fujimoto T, Ueda

- N, Yokozeki H. IgG4-positive cells in skin lesions of cutaneous and systemic plasmacytosis. *Eur J Dermatol* 23: 255-256, 2013.
12. Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial porokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition. *Int J Dermatol* 53(2): e94-95, 2014.
 13. 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* 140: 78-86, 2013.
 14. 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 Sci* 70: 26-33, 2013.
 15. Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. $\alpha(1,3)$ fucosyltransferases-IV and VII are essential for initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. *J Invest Dermatol* 133: 2161-2169, 2013.
 16. 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* 149: 1-10, 2013.
 17. Sakiyama M, Maeda M, Fujimoto N, Satoh T. Eruptive syringoma localized on intertriginous area. *J Dtsch Dermatol Ges* 12: 72-73, 2014.
 18. Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Diffuse disseminated lichenoid-type sarcoidosis mimicking erythroderma. *Int J Dermatol* 53: e369-370, 2014
 19. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. *Acta Derm Venereol Acta Derm Venereol* 94: 86-87, 2014.
 20. Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, Nakamura T, Takada T, Morita E, Naito M, Wakai K, Inoue H, Tatsukawa S, Sato J, Shimono K, Makino T, Satoh T, Suzuki H, Kanai Y, Hamajima N, Sakurai Y, Ichida K, Shimizu T, Shinomiya N. A common variant of leucine-rich repeat containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Human Cell* 27: 1-4, 2014.
 21. Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial porokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition. *Int J Dermatol* 53: e94-95, 2014.
 22. Fujimoto N, Iwasaki J, Satoh T. Scrotal calcinosis may arise from cyst wall apoptosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28: 128-130, 2014.
 23. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. *Acta Derm Venereol* 94: 86-87, 2014.
 24. Hashimoto T, Satoh T, Furuya A, Kataoka N, Yokozeki H. Kimura's disease with prurigo lesions treated with systemic indomethacin. *J Eur Acad Dermatol venereal* 28: 1260-1262, 2014.
 25. Shiba Y, Satoh T. Isolated benign primary cutaneous plasmacytosis. *Int J Dermatol*

- 53: e397-398, 2014.
26. Furuya A, Takahashi E, Ishii N, Hashimoto T, Satoh T. IgG/IgA pemphigus recognizing desmogleins 1 and 3 in a patient with Sjögren's syndrome. *Eur J Dermatol* 24: 512-513, 2014.
 27. Ono K, Fujimoto E, Fujimoto N, Akiyama M, Satoh T, Maeda H, Fujii N, Tajima S. In vitro amyloidogenic peptides of galectin-7: possible mechanism of amyloidogenesis of primary localized cutaneous amyloidosis. *J Biol Chem* 289: 29195-29207, 2014
 28. 佐藤貴浩: アトピー性皮膚炎 今日の小児治療指針 第15版 総編集 大関武彦 古川 漸 横田俊一郎 水口 雅 医学書院 東京 pp777-778, 2012
 29. 佐藤貴浩: 好酸球・好中球 1冊でわかる皮膚アレルギー ゲスト編集 塩原哲夫 常任編集 宮地良樹 清水宏 文光堂 東京 pp 29-31, 2012
 30. 佐藤貴浩: 結節性痒疹 今日の皮膚疾患治療指針 第4版 編集 塩原哲夫 宮地良樹 渡辺晋一 佐藤伸一 医学書院 東京 pp313-314, 2012
 31. 佐藤貴浩: 妊娠性痒疹 今日の皮膚疾患治療指針 第4版 編集 塩原哲夫 宮地良樹 渡辺晋一 佐藤伸一 医学書院 東京 pp315-316, 2012
 32. 佐藤貴浩: 好酸球性血管性浮腫の病態と治療 診る・わかる・治す 皮膚科臨床アセット: 16 蕁麻疹・血管性浮腫パーフェクトマスター 総編集 古江増隆 中山書店 東京 pp280-282, 2013
 33. 佐藤貴浩: 皮膚痒疹症 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス—鑑別と治療のポイント— 編集 横関博雄 片山一朗 医薬ジャーナル 大阪 pp12-13, 2013
 34. 佐藤貴浩: 多形慢性痒疹 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス—鑑別と治療のポイント— 編集 横関博雄 片山一朗 医薬ジャーナル 大阪 pp41-43, 2013
 35. 佐藤貴浩: 高齢者のアレルギー性皮膚疾患 IV. 多形慢性痒疹とかゆみ アレルギー・免疫 21(2): 288-291, 2014
 36. 佐藤貴浩: 痒疹の粘り強い治療 /慢性痒疹の定義と分類 *Monthly Book Derma* 214(2): 1-4, 2014
 37. 佐藤貴浩: 虫刺され、ストロフルス、痒疹 今日の治療指針—私はこうしている—2014 Vol. 56 総編集 山口徹 北原光夫 福井次矢 医学書院 東京 pp1097-1098, 2014
 38. 佐藤貴浩: 痒疹はどのようにしてできる? WHAT'S NEW IN 皮膚科学2014-2015 宮地良樹編 メディカルレビュー社 東京 pp58-59, 2014
 39. 端本宇志, 佐藤貴浩: 慢性痒疹治療の決め手—慢性痒疹の診断はついたが治療の解決法は? 苦手な外来皮膚疾患の解決法 宮地良樹編 メディカルレビュー社 東京 pp64-65, 2014
 40. 佐藤貴浩: 皮膚痒疹症. 診療ガイドライン UP-TO-DATE 監修 門脇 孝, 小室一成, 宮地良樹 メディカルレビュー社 東京 pp631-633, 2014
- 2学会発表
1. 宇賀神つかさ, 佐藤貴浩: ヒト皮膚疾患における好塩基球浸潤と活性化 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 7月14日 2012 (シンポジウム)
 2. 佐藤貴浩: 痒疹の考え方と諸問題 日本皮膚科学会岩手地方会学術大会第360回例会 盛岡 11月11日, 2012 (特別講演)
 3. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H. Inhibition of STAT6 signals exacerbates IgE-mediated, basophil-dependent

prurigo-like reactions. International
Investigative Dermatology 2013.
Edinburgh, 11, May 2013.

Invited lecture 国際かゆみシンポジウム
大阪市 10月26日, 2013

4. Hirai A, Kataoka N, Satoh T, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2: Proposal of a mechanism of action for eosinophilic pustular folliculitis. International Investigative Dermatology 2013. Edinburgh, 10, May 2013.
5. 端本宇志, 片岡直子, 佐藤貴浩, 横関博雄: インドメタシンが奏功した木村氏病, 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, 2012/7/13
6. 端本宇志, 佐藤貴浩, 横関博雄: IgE と好塩基球によって誘導されるマウス痒疹反応モデルの解析, 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012/5/13
7. 佐藤貴浩: 好塩基球と皮膚炎症 第3回 Saitama Allergy Workshop (川越) 7月11日, 2013
8. 佐藤貴浩: アトピー性皮膚炎—基礎の側面から— モーニングセミナー 第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 仙台市 23/11/2014
9. 佐藤貴浩: 好塩基球からみた痒疹の病態と治療 第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 仙台市 22/11/2014
10. Satoh T: What is prurigo? —a mysterious disease with pruritic papules of unknown etiology— The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, 14/12/2014
11. 佐藤貴浩: 皮膚アレルギー疾患の薬物療法—ステロイド外用薬の使い方— 第1回総合アレルギー講習会 横浜市 20/12/2014
12. 佐藤貴浩: Pathological etiology and therapeutic approaches for prurigo

H: 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

研究要旨 炎症性皮膚疾患は、その要因が多因子にわたり推測され、遺伝的要因もその一つと考えられる。これまで、遺伝的要因の関与が推測されている炎症性皮膚疾患においても、その遺伝子変異の保有率が有意に高い頻度で見られることや、in vitro での間接的な evidence の積み重ねのみでしか論ずることは不可能であった。KO マウスを作成することにより、より近い evidence を得ることはできるが、種の違いという厳然とした壁が存在し、この方面での直接的な evidence を得ることはこれまで不可能とあって差し支えない状況であった。この状況を打開するためにヒト iPS 細胞を利用することを考えた。これまで報告された遺伝子変異を挿入することにより、遺伝子変異を挿入しない細胞との厳密な比較が可能となり、その遺伝子変異がもつ意味を正確にとらえることが可能である。我々をこの方法をアトピー性皮膚炎でその変異が報告されているフィラグリン遺伝子に適用することとした。

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。

- ① ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs (TAL Effector Nucleases) 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。
- ② ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。
- ③ 上記システムを導入したヒト iPS 細胞においてフィラグリン遺伝子に変異を導入する（人工ヌクレアーゼ）。
- ④ ③のヒト iPS 細胞を角化細胞に分化させ、検討を行う。
なお、使用するヒト iPS 細胞は研究協力者によ

り、piggybac トランスポゾンシステムを利用して作製し、transgene-free かつ mutation-free であることが確認されたものを使用する。

C. 結果

- ① TALENs を利用するシステムの構築ならびにケラチン遺伝子発現可視化システムの構築
Voytas らにより確立しされている Golden Gate Methods を modify した方法を用いて、TALENs を作製するシステムを構築し、それを用いて、ヒト iPS 細胞において、K14 遺伝子の下流に eGFP 遺伝子をノックインすることに成功した。
- ② 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。
- ③ 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。作成した hFLG-TALENs をヒト iPS 細胞にトランスフェクトし、コロニーをランダムに pick した。これらの iPS 細胞から genomic DNA を採取し、TALENs の認識サイトを中心とした部分を PCR にて増幅し、direct sequence を施行した。その結果、hFLG-TALENs によっては変異あるいは KO されたコロニーを得ることはできなかった。
- ④ TALENs は作成が容易であるが、DNA の切断効率はせいぜい数%にとどまるとされる。今回、TALENs で変異コロニーを得ることができな

った理由はその切断効率の低さにあると考え、より新しい人工ヌクレアーゼである CRISPR/Cas9 のシステムを利用することとした。

ヒトフィラグリンをターゲットにした CRISPR/Cas9 をデザインし、作成した。

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。

F. 健康危険情報 なし

G. 論文発表

1: Shibama S, Igawa K, Munetsugu T, Fukuyama K, Nishizawa A, Takayama K, Yokozeki H. A case of sarcoidosis presenting as livedo. *Ann Dermatol*. 2014 Dec;26(6):773-4.

2: Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Diffuse disseminated lichenoid-type cutaneous sarcoidosis mimicking erythroderma. *Int J Dermatol*. 2014 Aug;53(8):e369-70.

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: Kato K, Hanafusa T, Igawa K, Tatsumi M, Takahashi Y, Yamanaka T, Katayama I. A rare case of annular pustular psoriasis associated with pemphigus foliaceus. *Ann Dermatol*. 2014 Apr;26(2):260-1.

5: Senda S, Igawa K, Nishioka M, Murota H, Katayama I. Systemic sclerosis with sarcoidosis: case report and review of the published work. *J Dermatol*. 2014 May;41(5):421-3.

6: Igawa K, Konishi M, Moriyama Y, Fukuyama K, Yokozeki H. Erythroderma as drug eruption induced by intravesical mitomycin C therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Feb 25.

7: Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, Igawa K, Tani M, Katayama I. Effective oral psoralen plus ultraviolet a therapy for digital ulcers with revascularization in systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol*. 2014 Mar;94(2):250-1.

8: Hanafusa T, Matsui S, Murota H, Tani M, Igawa K, Katayama I. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jun;172(3):507-12.

9: Hanafusa T, Igawa K, Kotobuki Y, Kitaba S, Tani M, Katayama I. Systemic lymphadenopathy with systemic sclerosis and Sjögren's syndrome: a case report. *J Dermatol*. 2013 Feb;40(2):124-5.

10: 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.

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.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

“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

研究要旨：HVJ-EのF蛋白質がマクロファージに作用してIL-18産生を誘導する。このIL18とIL12がT cellに作用して、T-bet, IL12 receptorなどのTh1関連遺伝子の発現を高め、Interferon- γ (IFN- γ)の発現を増強できることが分かった。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。

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。すでにアレルギー性鼻炎マウスモデルでアレルゲン（卵白アルブミン）の封入HVJ-Eの鼻腔内投与によるIgE産生の抑制、STAT6を抑制するデコイオリゴ核酸を封入して、アトピー皮膚炎のモデルマウスで治療効果が検証されている。この粒子とIL12の組み合わせが、免疫システムをTh1優位にシフトできるが、その分子機構を解明し、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で解析し、Interferon- γ (IFN- γ)の産生が亢進するかどうかを、ELISA法で測定した。次にIL12蛋白質をウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-Eの構築を試みた。

(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のみを樹状細胞やマウス脾臓細胞に加えてもIFN- γ の産生はほとんど認められなかった。0.1 ng/mlのscIL12ではIFN- γ の産生は検出できなかった。しかしscIL12(0.1 ng/ml)とHVJ-Eを併用すると150~200 pg/mlのIFN- γ が脾臓細胞から産生された。HVJ-EとIL12の組み合わせは脾臓細胞からのIL12 receptor, T-bet, IL18の発現もIL12単独よりも有意に亢進させた。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。IFN- γ の発現が増強されるのは、T cellであり、そのためにはmacrophageからのIL-18の産生が必要であった。次にscIL12とHVJ-Eを併用する代わりにIL12結合型HVJ-Eの機能について解析した。IL12結合型HVJ-E (1.5 x 10⁷粒子)を脾臓細胞(2 x 10⁵粒子)にかけると24時間後に120~150 pg/mlのIFN- γ の産生が検出された。マウス樹状細胞に加えると24時