

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

総合分担研究報告書

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 椛島 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マウスヘバッククロス(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、掻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)の癢痒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み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 (Moniaga CS 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、sclabra real 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