

201441007A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の
最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 椋島 健治

平成27年(2015) 3月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の
最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 椋島 健治

平成27年(2015) 3月

様式第 18

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の 委託事業による委託業務として、椛島健治 が実施した平成26年度「表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発 に関する研究 研究の総括・化合物スクリーニング・モデルマウス検討 梶島健治 京都大学医学研究科皮膚科准教授	----- 1
---	---------

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 非侵襲的採取角層サンプルのプロテオーム解析によるアトピー性皮膚炎の バリア診断に関する研究	----- 4
戸倉新樹 浜松医科大学医学部皮膚科学講座教授	
2. アトピー性皮膚炎と喘息の関連からアレルギーマーチの機序解明と制御 に関する研究	----- 7
小賀 徹 京都大学医学研究科呼吸器内科(呼吸管理睡眠時無呼吸) 准教授	
3. アトピー性皮膚炎の痒み制御のための標的分子の探索と制御 痒み関連表皮由来脂質メディエーターの産生制御に関する研究	-----12
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	
4. 化合物の免疫学的応答への影響の評価に関する研究	-----16
鬼頭昭彦 京都大学医学研究科皮膚科助教	
5. 化合物の探索とバリア機能評価に関する研究	-----18
宮地良樹 京都大学名誉教授	
大日輝記 京都大学医学研究科皮膚科講師	
谷崎英昭 京都大学医学研究科皮膚科助教	
III. 学会等発表実績	-----20
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----22

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究
研究の総括・化合物スクリーニング・モデルマウス検討
業務主任者： 梶島健治 京都大学皮膚科准教授

研究要旨

本研究の目的は、表皮の機能制御を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化と新規治療薬の開発である。さらに、経皮感作を介した喘息や食物アレルギーの発症への進展（アレルギーマーチ）を動物モデルで具現化し、表皮を標的としたアレルギー全般の制御の可能性を探る。本年度は、表皮角化細胞におけるバリア機能亢進と免疫制御化合物の *in vitro* での探索を行い、さらに候補化合物のアトピー性皮膚炎への効果の *in vivo* での検証を実施した。その結果、JAK阻害剤であるJTE-052が、外用剤としてバリア機能改善と免疫応答を制御することを *in vitro* と *in vivo* で検証した。これらの非臨床試験の結果をもとに、現在国内で第1相・臨床試験の開始に至った。

A. 研究目的

従来のアトピー性皮膚炎の治療の中心であるステロイド外用は対症療法にすぎない。皮膚バリア機能低下やかゆみによる搔破などの悪化要因が改善しなければ、皮膚炎が再発し、QOLの低下、ステロイド長期連用による副作用が避けられない。

一方、バリア破壊に伴う経皮感作はアトピー性皮膚炎のみならず、喘息や食物アレルギーの発症に繋がる可能性がある（「アレルギーマーチ」という概念）。従って、表皮バリア機能の改善は、アレルギー全般の予防につながることも期待できる。

申請者は、ライブラリーのスクリーニングにより、JTC801という化合物がフィラグリン発現の亢進を介して皮膚バリア機能を回復させ、マウスアトピー性皮膚炎モデルの発症を予防することを世界で初めて見出した。そこで、本研究では、表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の新規治療すること、そして経皮感作を阻害することにより他のアレルギーへの進展の制御の可能性を探ることが本研究の目的である。

B, C. 研究方法と結果

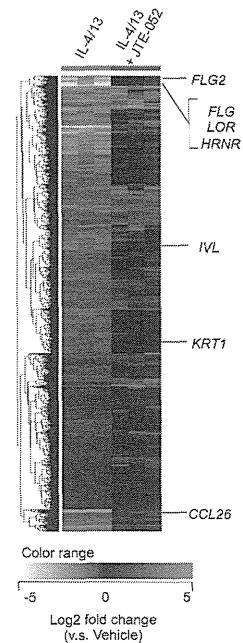
①表皮角化細胞におけるバリア機能亢進と免疫・かゆみ制御化合物の *in vitro* での探索：

申請者が確立したフィラグリンなどのレポーターアッセイにより見出された候補化合物に対するフィラグリンをはじめとするバリア機能や、

CCL26をはじめとする免疫に関わる因子への影響をヒト皮膚3次元培養法 (*in vitro*) にて評価した。JAK阻害薬であるJTE-052に両者を制御する機能が見出された。また、siRNAによる

Stat遺伝子のノックダウンにより、バリア機能がStat3、免疫機能がStat6シグナルを介することが見出された。

② 候補化合物のアトピー性皮膚炎への効果の *in vivo* での検証：

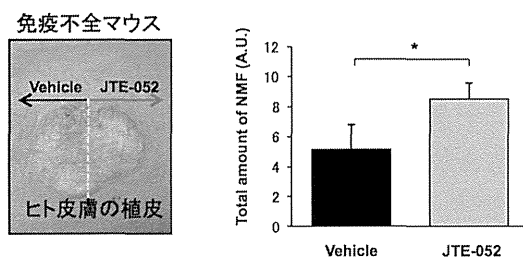


in vitro で見出された候補化合物のバリア機能への効果を in vivo で再検証した。JTE-052 にはバリア機能の回復作用があることがマウスモデルにて検証された。また、マウスアトピー性皮膚炎モデルを用いて JTE-052 が免疫応答やかゆみを抑制する事を in vivo で検証した。

さらに、ヒト余剰皮膚を免疫不全マウスに植皮したモデルを用いた上記解析を実施し、ヒトの皮膚のバリア機能の亢進も見出した。

D. E. 考察と結論

JAK阻害薬によるNMFの亢進

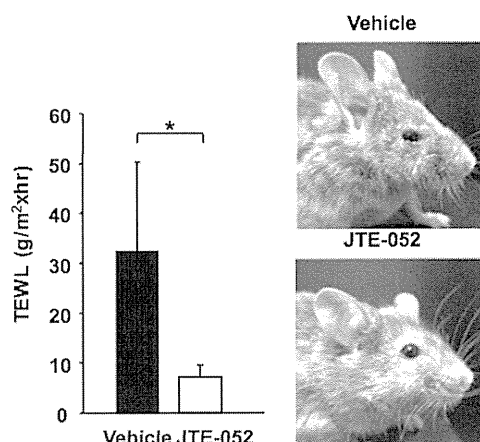


表皮を標的としたバリア機能・免疫・かゆみの三つの観点から創薬の開発を進めてきた。そして、Th2環境における皮膚バリア機能と免疫の制御がIL-4/IL-13によるJAK-Statシグナルを介していることが本研究の早期に見出された。

慢性関節リウマチの治療薬として日本たばこ産業が開発したJAK阻害であるJTE-052は、第1/2相臨床試験において経口剤としては血清中高濃度で肝障害が認められるため、開発が中止されていた。この副作用の問題は、外用剤であれば回避される点に研究代表者は着目した。そこで日本たばこ産業と共同体制を構築し、非臨床試験と第1相・臨床試験が当初の予定よりも早期に実施されるに至った。従って、皮膚バリアと免疫を制御する化合物の創薬事業は予定を前倒しして進めている状況である。

しかしながら、かゆみを制御する化合物の探索と、JTE-052による皮膚のバリア・免疫の制御が他臓器のアレルギーに及ぼす影

響は不明である。その点は、今後も引き続き研究計画を遂行する必要がある。



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Otsuka A, Kabashima K (12名中12番). Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J Allergy Clin Immunol* 133: 139-46 e10 2014
- Natsuaki Y, Otsuka A, Kitoh A, Kabashima K (24名中24番). 2014. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* 15: 1064-9
- Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Kabashima K (11名中11番). 2014. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134: 100-7
- Yoshiki R, Kabashima K (2名中12番), Tokura Y, Nakamura M. 2014. IL-23 from Langerhans cells is

- required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 134: 1912-21
5. Yasukawa S, Kabashima K (13名中22番), Hara H. 2014. An ITAM-Syk-CARD9 signalling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun* 5: 3755
 6. Shimizuhira C, Otsuka A, Kitoh A, Egawa G, Kabashima K (10名中10番). 2014. Natural killer T cells are essential for the development of contact hypersensitivity in BALB/c mice. *J Invest Dermatol* 134: 2709-18
 7. Otsuka A, Kabashima K. 2014. Mast cells and basophils in cutaneous immune responses. *Allergy*
 8. Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, Kabashima K, Tanaka S, Murakami M, Narumiya S, Sugimoto Y. 2014. Prostaglandin E2-EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J Immunol* 192: 1130-7
 9. Mizuno R, Kamioka Y, Kabashima K (3名中11番), Matsuda M. 2014. In vivo imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *J Exp Med* 211: 1123-36
 10. Liu M, Kabashima K (9名中12番), Yokomizo T. 2014. 12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J Exp Med* 211: 1063-78
 11. Kabashima K, Egawa G. 2014. Intravital multiphoton imaging of cutaneous immune responses. *J Invest Dermatol* 134: 2680-4
 12. Nakajima S, Kitoh A, Kabashima K (16名中16番). 2014. IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *J Invest Dermatol* 134(8):2122-30
 13. Kurashima Y, Kabashima K (16名中9番), Kiyono H. Regulatory Roles of Skin Fibroblasts in Immunological Homeostasis: Breakdown of Retinoic-acid-degrading Enzyme Cyp26b1-mediated Inhibition of Extracellular-ATP-induced Mast-cell Activation Leads to Severe Dermatitis. *Immunity* 2014. The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 40: 530-41
- H. 知的財産権の出願・登録状況
出願番号：2013-092378「皮膚バリア機能改善剤」、発明者：梶島健治ら、出願人：京都大学、日本たばこ産業株式会社

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究
非侵襲的採取角層サンプルのプロテオーム解析によるアトピー性皮膚炎のバリア診断

担当責任者：戸倉 新樹 浜松医科大学医学部皮膚科学講座

研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)は角層バリア異常が免疫異常を導くアレルギー性疾患である。しかし、個々の患者において角層バリアの状態は異なり均一ではない。バリアの機能は多種の角層蛋白の多寡が決定する。プロテオミクスはその生物についてゲノミクスよりも多くの情報を与えるため注目され、特に角層においてはすでに細胞が死んだ状態であるため、ゲノミクス解析が成り立たない。本研究では外因性AD、内因性AD、魚鱗癬の患者、それに健常人を加え、角層を前腕と上腕から非侵襲性のテープストリッピング法で採取し、蛋白質を抽出後、hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometerにて解析した。421の蛋白質が同定され、重要と考えられる蛋白質を、1) 炎症関連物質、2) 角層バリア構造蛋白、3) 角層バリア関連酵素、4) 抗菌ペプチド、5) 汗関連物質の5つのカテゴリーに分類した。1) 炎症関連物質では、血清アルブミンと免疫グロブリンの分解物がみられ、外因性ADで高値であった。2) 角層バリア構造蛋白では、フィラグリンの低下が外因性や魚鱗癬のみならず、内因性ADでも認められた。3) 角層バリア関連酵素では、外因性ADでカリクレイン-5、7の上昇を認め、フィラグリンモノマーのプロセッシング酵素のいくつかにも異常値を認めた。4) 抗菌ペプチドでは、dermcidinがS100蛋白に比べてSDでは顕著に低下していた。5) 汗関連物質では、GCDFP-15の低下がADで認められ、長期の発汗低下を示唆した。以上より、角層プロテオーム解析はADの病態を探る糸口になるだけでなく、ADのタイプと個人差を検討するために有用な方法と考えた。

研究協力者

坂部純一

浜松医科大学皮膚科学特任助教

神谷浩二

浜松医科大学皮膚科診療従事者

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)のバリア機構はフィラグリンを始めとする構成蛋白質によって構築され、それを分解するプロテアーゼとそのインヒビターが調節する。バリア機能を角層蛋白質の種類と量の変化で把握できれば、バリア障害の直接的原因に迫ることが可能である。この試みはすでにフィラグリン(FLG)、カリクレイン(KLK)などについて免疫組織染色やELISAを用いて、一部の蛋白質について行われている。しかしバリア状態は、

併存する炎症、発汗、抗菌ペプチド作働などと深く関わっており、それらを同時に把握する必要がある。本研究課題は、角層がある瞬間に発現しているすべての蛋白質をプロテオームにより網羅的に解析し、角層蛋白質の変動の全体像を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

非侵襲性にセロハンテープを用いて、ストリッピングで角層を採取した。前腕屈側部の皮膚に、長さ10~15 cmのセロハンテープを12本巻き付け、それを剥がすことによって付着した角層を得た。テープ付着角層から蛋白を抽出し、LC/MS/M解析を行った。プロテオームを解析するためには、通常はまずタンパク質試料を個々のタンパク質に分離することになる。ここでは、以下の方法で行った。

- 角層採取テープをトルエンに浸漬
- 溶解しないテープを除去
- 遠心とトルエン洗浄 6回
- 角層蛋白抽出, 乾燥, Tris-HCl containing 1% SDS に溶解
- 再構築 Urea and ammonium bicarbonate
- 消化 In-solution tryptic digestion and guanidination kit
- 溶解 formic acid solution
- 解析 Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer
- 物質の同定 Mascot search engine against SwissProt database
- 定量 proteome discoverer v.1.4 software

C. 研究結果

421の蛋白質が同定され、重要と考えられる蛋白質を、1) 炎症関連物質、2) 角層バリア構造蛋白、3) 角層バリア関連酵素、4) 抗菌ペプチド、5) 汗関連物質の5つのカテゴリーに分類した。1) 炎症関連物質では、血清アルブミンと免疫グロブリンの分解物がみられ、外因性ADで高値であった。2) 角層バリア構造蛋白では、フィラグリンの低下が外因性や魚鱗癬のみならず、内因性ADでも認められた。3) 角層バリア関連酵素では、外因性ADでカリクレイン-5, 7の上昇を認め、フィラグリンモノマーのプロセッシング酵素のいくつかにも異常値を認めた。4) 抗菌ペプチドでは、dermcidinがS100蛋白に比べてSDでは顕著に低下していた。5) 汗関連物質では、GCDFP-15の低下がADで認められ、長期の発汗低下を示唆した。

D. 考察

生体物質発現を網羅的に解析する方法として、ゲノミクスはアレイという形で広く行われるようになった。しかし、生体材料においてゲノミクス解析結果がそのまま直接的に蛋白質の量

に反映されている訳ではない。それを補ってプロテオミクスはゲノミクスに替わる方法として、種々の目的に利用されつつある。

角層蛋白質の種類と量の検討は、蛋白質がプロセッシングを受け易い過程を経ての材料であるため、プロテオミクスが威力を発揮する対象ではある。しかし角層という材料の特殊性があり、採取方法や抽出方法、またデータの解析方法に斬新な着想や方法論が必要である。

本研究のように、角層をテープストリッピングで得ることができ、それをプロテオーム解析に供することにより良好な解析結果を得ることができるという結果を得た。この方法は、1) 角層バリア異常がある外因性ADと異常がない内因性ADの判別、2) 外因性ADにおけるフィラグリン低下をどの程度伴うかの判定、3) プロテアーゼとインヒビターの変調の有無確認、4) 発汗程度の推量、5) 炎症状態の把握、これらを同時に判定できるシステムの開発に道を開く。さらにプロテオミクスの知見に基づき、重要な蛋白質を抽出し、それについて評価する簡便な診断方法の開発や、将来的な治療ターゲットの網羅的探索も可能である。

E. 結論

ADにおける角層バリア機能の変調を、遺伝子発現の手法を応用することができない角層において、非侵襲性検体を用いて行うことが可能となった。421の蛋白質の同定と定量は、ADにおける網羅的解析から個々の蛋白質の役割を検討する道標となる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakabe J, Kamiya K, Yamagichi 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* 34:957-60, 2014.

2) 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.

3) Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y. Leukoderma in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* (in press).

2. 学会発表

1) Tokura Y: Proteome analysis of corneum from atopic dermatitis patients. World Rendez-vous on Dermatology. 2014.3.11. Tokyo, Japan.

2) 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, United Kingdom.

3) Sakabe J, Kamiya K, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. 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
なし。

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究
アトピー性皮膚炎と喘息の関連からアレルギーマーチの機序解明と制御
担当責任者：小賀 徹 京都大学大学院医学研究科

研究要旨

喘息治療は、吸入ステロイド薬の普及により多くの患者の呼吸機能や症状を改善したが、一部に難治性やステロイド抵抗性の喘息の患者群が存在し、このフェノタイプの特徴の一つに全身性アトピーが強いことが知られている。アトピー性皮膚炎が、喘息などの他の組織のアトピー性疾患に先行して、その臨床経過に影響を及ぼすような“アレルギーマーチ”と呼ばれる現象が指摘され、この機序の解明と対策が、難治性喘息の制御に直結する可能性がある。その病態解析のためには、適切な動物モデルを作成することが必要である。皮膚のバリア機能に重要なフィラグリン蛋白に着目し、皮膚がマウスよりも人間に近いラットにおいて、フィラグリン欠損ラットを作成したところ、バリア機能の低下や外来抗原へのIgEの高応答性が認められることから、フィラグリンを皮膚と呼吸器を結ぶアレルギーマーチの重要な蛋白と仮説をたてた。その検証のためにはまず、ラットにおける喘息モデルを作成することを開始した。

卵白アルブミン(OVA)を感作抗原としてラットに皮下注射し、ラット用に今回独自に作成した吸入曝露装置を用いてラットにOVAを吸入誘発して、気管支肺胞洗浄(BAL)を実施したところ、対照群に比して、好酸球を中心とした総細胞数の増加がみられ、血清中でも総IgE値、OVA特異的IgG1値の上昇を確認し、喘息モデルに相応する好酸球優位の肺炎症が誘導されたことを証明し、ラットにおけるモデルを成立した。さらに、予備検討において、フィラグリン欠損ラットを用い、OVAを密封療法にて感作し、OVA吸入にて喘息誘発したところ、欠損ラットの方が対照群より、BAL液中の総細胞数は増加傾向で、特に好酸球数は有意に高値であり、フィラグリンがOVAの経皮感作に影響し、喘息の病態に影響する可能性を示唆する結果が得られた。

今後、より条件を洗練し、並行して、遺伝子改変ラットの繁殖をすすめて匹数をそろえて、結果を定着させるとともに、さらに遺伝子改変ラットの皮膚炎症状と喘息発症の程度まで踏み込んだ解析をしていきたい。

A. 研究目的

一般に喘息の動物モデルは、マウスで検討されることが多いが、先を見据えて、ラットの喘息モデルを確立する。さらに、アトピー性皮膚炎類似病態を自然発症するフィラグリン欠損ラットを作成して、これに喘息モデルを適用することにより、皮膚バリアの破綻と関連して喘息が悪化するアレルギーマーチの動物モデルを作成する。さらに病態解明

に加えて、将来的に薬剤の開発などにも応用して、難治性喘息をはじめとした臨床的にも治療の困難な全身性のアレルギー病態の改善に貢献していく。

B. 研究方法

(1) ラットの喘息モデルについて次のプロトコルにて作成した。抗原としてOVA、アジュバントとして、アラムと百日咳死菌

懸濁液 (FTPP) を使用した。吸入には独自に曝露装置を作成した。

感作：OVA+アラム皮下注、FTPP ip

Day0, Day7

吸入：OVA

Day13, Day14

評価：気管支肺胞洗浄 (BAL) など

Day 15

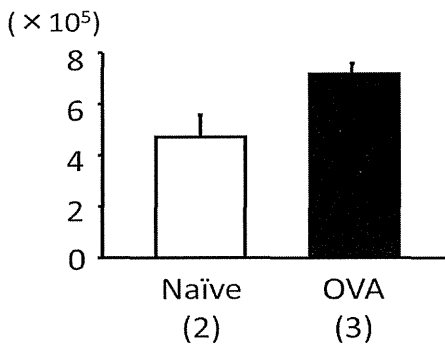
(2) 上記で作成したラットの喘息モデルを基盤に、次は、感作に関しては、OVA の皮下注ではなく、密封療法を繰り返して行い、OVA 吸入チャレンジを実施して、その後、BAL など評価し、喘息モデルを作成する。

(3) 皮膚バリアが自然障害されるフィラグリニン欠損ラットと野生型ラットに、(2) の喘息モデルを適応し、アレルギーマーチ現象がフィラグリニン欠損ラットにて見られることを確認して、アレルギーマーチの動物モデルの成立とする。

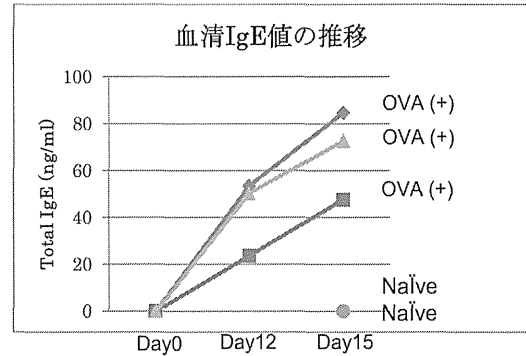
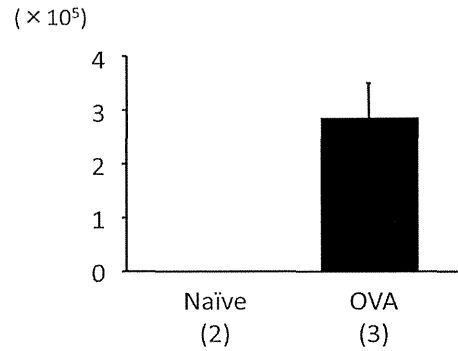
C. 研究結果

上記 (1) の喘息モデルに関して、BAL 液中の総細胞数、好酸球数は、OVA 感作-吸入群にて増加し、血清 IgE, IgG1, OVA 特異的 IgG1 値も経時的に上昇した (下記図中の数字は匹数)。

BAL 液中総細胞数



BAL 液中好酸球数

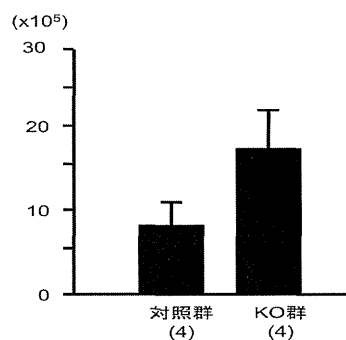


このように、BAL 液中の総細胞数、好酸球数は、増加し、アレルギー性の好酸球性炎症が OVA 処置群で誘導されたことが証明され、喘息反応に矛盾しないと思われた。

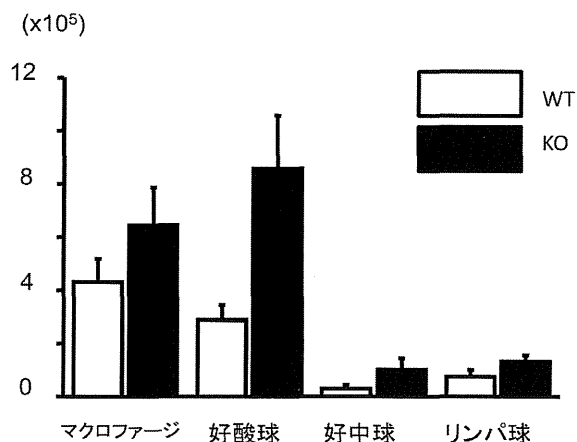
次の (2) (3) のモデル作成時には、(1) で得られた血清 IgE や IgG1 値を参考にしながら、OVA の皮膚感作の回数などの手法を探っていた。

フィラグリニン欠損ラット群と対照群を用いて、OVA 皮膚感作→OVA 吸入誘発による喘息発症のモデルを適用すると、

BAL 液中総細胞数



BAL 液中細胞分画



このように、BAL 液中の総細胞数、好酸球数ともに、フィラグリン欠損ラットの方が有意に高い結果が得られた。しかし、遺伝子欠損ラットの繁殖に時間がかかることもあり、まだ n も少なく、再現性も十分できていないので、実験を繰り返すことが必要である。

D. 考察

アトピー性皮膚炎は、喘息、アレルギー性鼻炎、食物アレルギーといった他の組織のアレルギー性炎症性疾患と深い関わりがある。アトピー性皮膚炎が、他の組織のアトピー性疾患に先行して、その臨床経過に影響を及ぼす現象は、“アレルギーマーチ”とよばれて注目されている。疾患の難治化、重症化、長期化の一因になることも指摘されており、今後アトピー疾患を、より効果的に予防・管理していくために、この現象のよりよき理解が不可欠である。病態解明と新規治療薬開発に向けて、動物モデルの確立が重要である。

我々は、京都大学大学院医学研究科皮膚科学教室で開発されたフィラグリン欠損ラットに利用し、アレルギーマーチの動物モデルの候補となりうるかを検討する研究を開始した。フィラグリンは、皮膚角質層の構造と構成のための機能を調節する重要な表皮の蛋白であり、アトピー性皮膚

炎との深い関係が報告されている。皮膚のバリア機能に重要な役割をすることに着目し、皮膚がマウスよりも人間に近いラットにおいて、フィラグリン欠損ラットを作成したところ、バリア機能の低下や外来抗原への IgE の高応答性が認められ、アトピー性皮膚炎と類似病態を再現することができた。そこで、この遺伝子改変ラットで、喘息が発症しやすい傾向があるかを、喘息モデルで検討することにより、アレルギーマーチの動物モデルとして機能するかを確かめ、その後の研究に生かしていくことを目標としている。

喘息動物モデルは、マウスで検討されることが多いが、フィラグリン欠損ラットの関連から、本研究では野生型ラットで系を確立することから開始した。一般的な喘息モデルのように、OVA を皮下注にて感作し、その後、OVA を吸入チャレンジして発症させる。吸入用の曝露装置は、独自のものを作成した。BAL 液中の細胞や肺組織の解析から、好酸球性の肺炎症が誘導された。この際、経時的に血清 IgE、IgG1 値を測定することにより、吸入前にどの程度まで上昇していれば、吸入チャレンジ後に喘息が発症しうるかの指標とした。

引き続き、感作を経皮的に実施する系を立ち上げた。単なる喘息モデルではなく、アレルギーマーチのモデルなので、皮膚バリアの破綻から経皮的に感作が行われることを前提とした。動物には、皮膚アトピー症状が自然発症するフィラグリン欠損ラットと対照ラットを用いた。アレルゲンの OVA の経皮投与を繰り返しながら、並行して血清 Ig 値をみながら、吸入チャレンジができるタイミングを探った。フィラグリン欠損ラットで、好酸球性肺炎症の誘導が強い傾向があり、皮膚バリアの破綻が、強い喘息の発症を誘導する仮説を示唆する結果が得られた。しかし、まだ匹数や、再現性が十分ではないので、より条件を検討しながら、結果を固定できるように努め

ていく。

問題点と課題、対策として、(1) 遺伝子欠損ラットの匹数がそろうのに時間を要するが、繁殖のペースは軌道にのりつつある、(2) ラットで確実に喘息を発症させるには系を確立するのがマウスよりたいへんで、特に皮膚からの経皮投与は、感作が弱く、OVA の投与量・投与回数だけではなく、今後アジュバントを効率よく併用する必要がある、(3) 再現性をしっかりとれるように実験を繰り返す。

E. 結論

ラットを用いて、通常の喘息モデルを立ち上げた。これをもとにファラグリン欠損マウスに、経皮で感作して、喘息を発症させる系を確立しつつあり、アレルギーマーチの動物モデルとして機能しうるか、今度再現性を含めて検討を重ねる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oga T, Chin K, Mishima M: Towards the next stage of novel biomarker discussion in COPD: Tekizai-Tekisho. *Eur Respir J* 2014; 43: 322-324.
2. Harada Y, Oga T, Chihara Y, Azuma M, Murase K, Toyama Y, Aihara K, Tanizawa K, Yoshimura C, Hitomi T, Handa T, Tsuboi T, Mishima M, Chin K: Differences in associations between visceral fat accumulation and obstructive sleep apnea by sex. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11: 383-391.
3. Murase K, Hitomi T, Hamada S, Azuma M, Toyama Y, Harada Y, Tanizawa K, Handa T, Yoshimura C, Oga T, Mishima M, Chin K: The additive impact of periodic limb movements during sleep on

inflammation in obstructive sleep apnea patients. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11: 375-382.

4. Nishimura K, Nishimura T, Onishi K, Oga T, Hasegawa Y, Jones PW: Changes in plasma levels of B-type natriuretic peptide with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014; 9: 155-162.
5. Kawakami Y, Hirano S, Kinoshita M, Otsuki A, Suzuki-Yamamoto T, Suzuki M, Kimoto M, Sasabe S, Fukushima M, Kishimoto K, Izumi T, Oga T, Narumiya S, Sugahara M, Miyano M, Yamamoto S, Takahashi Y: Neutralization of leukotriene C4 and D4 activity by monoclonal and single-chain antibodies. *Biochim Biophys Acta* 2014 ; 1840: 1625-1633.
6. Nishimura K, Oga T, Tsukino M, Hajiuro T, Ikeda A, Jones PW: Reanalysis of the Japanese experience using the combined COPD assessment of the 2011 GOLD classification. *Respir Invest* 2014; 52: 129-135.
7. Tachikawa R, Hamada S, Azuma M, Toyama Y, Murase K, Tanizawa K, Inouchi M, Handa T, Oga T, Mishima M, Chin K: Impact of obstructive sleep apnea on abdominal aortic diameters. *Am J Cardiol* 2014; 114: 618-623.
8. Azuma M, Chin K, Yoshimura C, Takegami M, Takahashi KI, Sumi K, Nakamura T, Nakayama-Ashida Y, Minami I, Horita S, Oka Y, Oga T, Wakamura T, Fukuhara S, Mishima M, Kadotani H: Associations among chronic obstructive pulmonary disease and sleep-disordered breathing in an urban male working population in Japan. *Respiration* 2014; 88: 234-243.

9. Harada Y, Chihara Y, Azuma M, Murase K, Toyama Y, Yoshimura C, Oga T, Nakamura H, Mishima M, Chin K: Obesity hypoventilation syndrome in Japan and independent determinants of arterial carbon dioxide levels. *Respirology* 2014; 19: 1233-1240.
10. Tsuboi T, Oga T, Sumi K, Machida K, Ohi M, Chin K: The importance of controlling PaCO₂ throughout long-term noninvasive ventilation. *Respir Care* 2014; 59: 1671-1678.
11. Oga T, Nishimura K: Longitudinal changes in dyspnea. In: Mahler D, O'Donnell DE, eds. *Dyspnea: Mechanisms, Measurement and Management*. Third

Edition. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014: 99-110.

12. 小賀徹、陳和夫：睡眠時無呼吸症候群と血小板機能-血小板に着目した睡眠の質とアンチエイジング *Anti-aging Science* 2014; 6: 43-48.

2. 学会発表

1. 小賀徹、陳和夫：栄養障害の病態と予後-SAS と肥満 第24回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会 奈良市 2014年10月24日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特記事項なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究
アトピー性皮膚炎の痒み制御のための標的分子の探索と制御
痒み関連表皮由来脂質メディエーターの産生制御

担当責任者：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

研究要旨

アトピー性皮膚炎は、難治性の瘙痒を伴う慢性瘙痒性皮膚疾患である。アトピー性皮膚炎の痒みは、痒みの第一選択薬である抗ヒスタミン薬によるコントロールは非常に難しく新規鎮痒薬の開発が望まれている。我々は、これまでに一部の抗アレルギー薬やホスホジエステラーゼ4阻害薬が自然発症アトピー性皮膚炎モデルマウスの自発的痒み反応に有用であることを見出してきた。その薬物の作用機序の1つに細胞内サイクリックAMP（cAMP）の増加が知られている。そこで、本研究では、cAMPの膜透過性であり分解抵抗性の8-bromo-cAMP（8-Br-cAMP）がマウスにおける痒み反応を抑制するかどうか検討した。ヒトのアトピー性皮膚炎やマウスのアトピー性皮膚炎様症状に由来する痒みへの関与が指摘されている受容体にプロテアーゼ活性化受容体2（PAR2）がある。そこで、PAR₂アゴニスト（SLIGRL-NH₂）誘発の痒み反応に対する8-Br-cAMPの効果を調べたところ、8-Br-cAMPはSLIGRL-NH₂誘発の痒み反応を抑制した。更に、8-Br-cAMPはSLIGRL-NH₂誘発の末梢神経活動や痒み因子のロイコトリエンB₄（LTB₄）の産生を抑制した。ケラチノサイトの初代培養細胞を用いた検討においても8-Br-cAMPはSLIGRL-NH₂誘発LTB₄産生を抑制した。これらのことから表皮ケラチノサイトにおける細胞内cAMPの増加がケラチノサイトから産生される痒み因子の産生制御に寄与することが示唆される。

A. 研究目的

痒みによる皮膚の搔破は、皮膚炎の発生や悪化、更には皮膚炎治療の妨げにもなる。しかし、このようなアトピー性皮膚炎の痒みは、痒みの第一選択薬である抗ヒスタミン薬によるコントロールは非常に難しく新規鎮痒薬の開発が望まれている。

我々は、これまでに抗アレルギー薬やcAMPの代謝に関係するホスホジエステラーゼ（PDE）のサブタイプPDE4の阻害薬が自然発症アトピー性皮膚炎モデルマウスの自発的痒み反応を抑制することを見出してきた。抗アレルギー薬の作用機序の1つに細胞内サイクリックAMP（cAMP）の増加がある。cAMP

の増加は、マスト細胞からのケミカルメディエーターの産生や遊離を抑制することが知られているが、cAMP自身の増加が痒みを抑制するかどうか不明である。そこで、本研究では、cAMPの膜透過性であり分解抵抗性の8-bromo-cAMP（8-Br-cAMP）を用い、ヒトのアトピー性皮膚炎やマウスのアトピー性皮膚炎様症状に由来する痒みへの関与が指摘されているプロテアーゼ活性化受容体2（PAR₂）を活性化させ、マスト細胞非依存性の痒み反応を誘発するPAR₂アゴニスト（SLIGRL-NH₂）による痒み反応に対する8-Br-cAMPの効果を調べた。

B. 研究方法

(実験動物)

実験には、雄性 ICR 系マウスを用いた。

(行動実験)

実験の前日に吻側背部の毛を除毛しておいたマウスを行動観察の1時間前に観察用ケージで馴化した。SLIGRL-NH₂ 投与をマウス吻側背部に皮内注射し、その後の行動を無人環境下にビデオ撮影した。撮影後、ビデオを再生し、後肢による注射部及びその近傍への1連の搔き動作回数を数えた。

(電気生理学的実験)

麻酔下マウス吻側背部皮膚を切開し、皮膚神経枝を双極電極で吊り、神経活動を記録した。

(ロイコトリエン B₄ (LTB₄) 産生測定)

マウス皮膚への SLIGRL-NH₂ 皮内注射あるいはマウスケラチノサイト初代培養への SLIGRL-NH₂ 作用後、皮膚を提出あるいは培養上清を採取した。皮膚に関しては C₁₈ カラムによる精製後、培養上清に関してはそのまま、LTB₄ 量を LTB₄ EIA キットを用いて測定した。

C. 研究結果

8-Br-cAMP は、SLIGRL-NH₂ 誘発の痒み反応 (図 1) や末梢神経活動を溶媒処置群と比べ有意に抑制した。

また、皮膚及びケラチノサイト初代培養 (図 2) における SLIGRL-NH₂ 誘発の LTB₄ 産生は、8-Br-cAMP によって抑制された。

D. 考察

PAR₂ の活性化は、近年、アトピー性皮膚炎など抗ヒスタミン薬抵抗性の痒みへの関与が示唆されている。そこで、本研究では、PAR₂ アゴニストである SLIGRL-NH₂ を用いて 8-Br-cAMP の効果を検討した。8-Br-cAMP は、膜透過性であり分解抵抗性

の cAMP の誘導体である。8-Br-cAMP の投与により SLIGRL-NH₂ 誘発の痒み反応、末梢神経活動および皮膚における LTB₄ 産生が抑制された。また、ケラチノサイト初代培養においても 8-Br-cAMP は SLIGRL-NH₂ 誘発 LTB₄ 産生を抑制した。これまでに、自然発症アトピー性皮膚炎マウス (NC マウス) の痒み反応に、特にケラチノサイトにおける PAR₂ や LTB₄ が関与することを見出してきた。最近では、PDE4 阻害薬の塗布が NC マウスの痒み反応を抑制することを示した。健常マウスでの結果ではあるが、PDE4 特に、PDE4A, C 及び D が表皮ケラチノサイトに発現していることも明らかにしてきた。以上の知見を勘案すると、ケラチノサイトでの cAMP の増加によりアトピー性皮膚炎の痒みをコントロールできる可能性が示唆される。

E. 結論

表皮において cAMP の増加に寄与する薬物が新規鎮痒薬になりうる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Andoh T, Takayama Y, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B4 in dermatophyte-related itch in mice. *Pharmacol Rep.* 66: 699-703 (2014).
- 3) 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).

- 4) 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).
- 5) 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) 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.
- 2) 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.
- 3) Andoh T. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.

H.知的財産権の出願・登録状況

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

(2014.11.6)

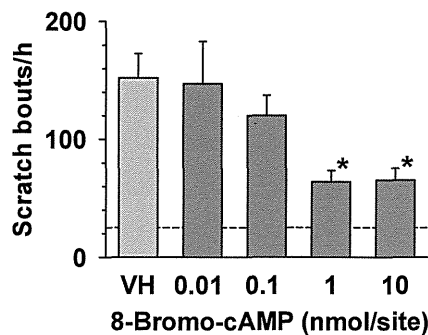


図 1. SLIGRL-NH₂ 誘発痒み反応への 8-bromo-cAMP の効果

8-Bromo-cAMP は，SLIGRL-NH₂ 皮内注射 10 分前に SLIGRL-NH₂ 投与部位に皮内注射した。 $*p < 0.05$ vs VH (溶媒)

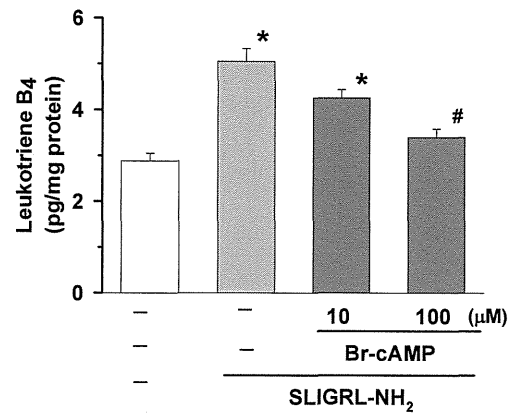


図 2. ケラチノ初代培養における SLIGRL-NH₂ 誘発 leukotriene B₄ 産生への 8-bromo-cAMP の効果

8-Bromo-cAMP は，SLIGRL-NH₂ 処置 10 分前に処置した。 $*p < 0.05$ vs SLIGRL-NH₂ (単独)

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発に関する研究
化合物の免疫学的応答への影響の評価

担当責任者： 鬼頭昭彦 京都大学皮膚科助教

研究要旨

アトピー性皮膚炎治療薬候補化合物の免疫学的応答への影響を評価するため、アトピー性皮膚炎マウスモデルにおけるIgE誘導の詳細な解析を行った。カルシポトリオール誘導アトピー性皮膚炎マウスモデルでは、外来抗原による感作なしに、表皮角化細胞が産生するサイトカインthymic stromal lymphopoietin (TSLP)依存性に高IgE血症を生じた。このIgE誘導は、抗原感作によるIgE誘導と同様にT細胞依存性であり、所属リンパ節における胚中心形成と胚中心B細胞分化を伴っていた。従って、アトピー性皮膚炎における表皮TSLP過剰産生の抑制により、皮膚炎の抑制のみならず、IgE産生も抑制できる可能性がある。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎治療薬候補化合物の免疫学的応答への影響を評価するため、平成26年度は、まず、アトピー性皮膚炎マウスモデルの免疫学的病態の詳細を明らかにすることを目的とした。特に、アレルギーマーチ（アトピー性皮膚炎に引き続く喘息やアレルギー性鼻炎の発症）への影響を評価するため、アトピー性皮膚炎モデルにおけるIgE誘導メカニズムの解明を目指した。

B. 研究方法

8～12週齢のC57BL/6マウス、thymic stromal lymphopoietin (TSLP)受容体欠損マウス、およびTCRβ欠損マウスを使用した。マウスは当施設の動物実験施設においてspecific pathogen free (SPF)環境で飼育し、「ヘルシンキ宣言」および「動物愛護管理法」に則って実験を行った。アトピー性皮膚炎モデルとして、ビタミンD3誘導体であるカルシポトリオールのマウス耳介への反復塗布モデルを使用した。カルシポトリオール (Tocris Bioscience) を

エタノールを溶媒として100μMに調製し、イソフルランで吸入麻酔した8～12週齢のマウスの両耳介に、片耳あたり20μlずつ、1日1回、14日間連続塗布した。カルシポトリオール塗布開始前と塗布開始14日目の血清を採取し、血清中総IgE濃度をMouse IgE ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories)で定量した。塗布開始14日目に頸部リンパ節細胞のフローサイトメトリー解析を行った。

C. 研究結果

カルシポトリオール誘導アトピー性皮膚炎モデルにおいて、野生型C57BL/6マウスでは血清中総IgE上昇がみられた。一方、TSLP受容体欠損マウスおよびTCRβ欠損マウスではIgEの上昇がみられなかった（未発表データ）。カルシポトリオールを耳介に塗布した野生型マウスの頸部リンパ節のフローサイトメトリー解析では、CD4陽性T細胞、B細胞が著明に増加しており、B細胞はCD38陰性GL7陽性胚中心B細胞への分化がみられた（未発表データ）。また、