

## **厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患等克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)**

**アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究**

**平成 23 ~ 25 年度 総合研究報告書**

**平成 25 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 古江 増隆**

**平成 26 (2014) 年 3月**

## 目 次

### ・ 総合研究報告書(平成23 - 25年度)

アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究 ----- 1  
研究代表者 古江増隆

### ・ 総括研究報告書(平成25年度)

アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究 ----- 21  
研究代表者 古江増隆

### ・ 分担研究報告書(平成25年度)

バリア機能破綻に起因するアトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムの解明と制御  
知覚神経と表皮ケラチノサイトの相互作用の観点から ----- 30  
研究分担者 高森 建二  
研究協力者 富永 光俊、鎌田 弥生

アトピー性皮膚炎のかゆみに影響する各種パラメータの解析ー治療前後の比較について-- 34  
研究分担者 相馬良直  
研究協力者 川上民裕、京谷樹子

アトピー性皮膚炎における汗アレルギーの解析と有効性の高いスキンケア方法の開発----- 36  
研究分担者 秀 道広  
研究協力者 信藤 肇、平郡 隆明、平郡 真記子、石井 香

アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析とアトピー性皮膚炎が睡眠や就労に与える影響に  
関する研究----- 39  
分担研究者 佐伯秀久  
研究協力者 石地尚興、石氏陽三、堀田健人、佐藤純子、東福有佳里

アトピー性皮膚炎のかゆみと相関する生理活性物質の同定及び  
日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践 ----- 42  
研究分担者 菅谷 誠

マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築 -----	44
研究分担者 稲垣直樹	
研究協力者 田中宏幸、山下弘高	
小児アトピー性皮膚炎に対する proactive 治療、かゆみと QOL に関する研究 -----	47
研究分担者 大矢幸弘	
研究協力者 樺島重憲、夏目統、近藤麻伊、山本貴和子、成田雅美	
ケラチノサイト由来の炎症性サイトカインとアトピー性皮膚炎 -----	51
研究分担者 浜崎雄平	
研究協力者 山本修一、谷口一登	
アトピー性皮膚炎のかゆみの発症機序と治療に関する研究	
樹状細胞の病態への役割に関する研究 -----	53
研究分担者 中村晃一郎	
研究協力者 宮野恭平	
アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析 -----	55
研究分担者 玉利真由美	
研究協力者 広田朝光	
痒み・掻破行動と皮膚炎増悪メカニズムに関するアトピーモデルを用いた研究 -----	58
研究分担者 竹内 聡	
研究協力者 古江増隆、江崎仁一	
脊髄内痒み神経の同定に関する研究/石垣島コホート研究/本土・琉球クラスターにおけるアトピー関連遺伝子の探索に関する研究 -----	60
研究分担者 古江増隆	
研究協力者 竹内聡、中原剛土、蜂須賀淳一、江崎仁一、林亜矢子、林純、古庄憲浩、玉利真由美、広田朝光、天谷雅行、海老原全、工藤純、佐伯秀久	
<b>研究成果の刊行に関する一覧表 -----</b>	<b>63</b>
<b>研究成果の刊行物・別刷 -----</b>	<b>65</b>

## アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究

研究代表者 古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野教授

### 研究要旨

アトピー性皮膚炎の効果的な治療と患者QOLの改善のためには、増悪因子でもある“炎症性痒みメカニズム”の解明が重要である。我々は免疫・神経生理学的方面双方から病態の理解と制御をすすめ、かゆみ抑制検証モデルの確立や臨床応用可能なSema3A導入法やかゆみを引き起こす汗抗原と常在真菌のかかわりなど臨床応用可能な物質を同定、一部はすでに製剤化も果たしエチル。また、皮膚炎の発症原因、増悪因子に関して従来の知識に問われない遺伝学的アプローチを試み、MDCなど、8つの新たな候補遺伝子を同定し、コホート研究では卵アレルギーと重症度の関連性も認識された。本研究の最終目標としてアトピー性皮膚炎治療の標準化と普及のため、本研究結果も含め、より患者視点からの改良を行うため、患者会と協力し、一般・患者向け教育ウェブサイトのリニューアルを行った。

### 研究分担者

高森建二（順天堂大学医学部附属浦安病院）、相馬良直（聖マリアンナ医科大学皮膚科教授）、秀道広（広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学教授）、佐伯秀久（東京慈恵会医科大学皮膚科准教授）、菅谷誠（東京大学大学院医学系研究科皮膚科学准教授）、稲垣直樹（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授）、大矢幸弘（（独）国立成育医療研究センター生体防御系内科部アレルギー科医長）、浜崎雄平（佐賀大学医学部小児科学教授）、中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）、玉利真由美（理化学研究所統合生命医科学研究センター呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー）、竹内聡（九州大学病院特別教員）

### 研究協力者

富永光俊、鎌田弥生（順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所）、川上民裕（聖マリアンナ医科大学皮膚科准教授）、京谷樹子（聖マリアンナ医科大学皮膚科助教）、信藤肇、平郡隆明、平郡真記子、石井香（広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学）、石地尚興（東京慈恵会医科大学皮膚科准教授）、石氏陽三（東京慈恵会医科大学皮膚科助教）、堀田健人、佐藤純子、東福有佳里（東京慈恵会医科大学皮膚科）、田中宏幸（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室准教授）、山下弘高（岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学教室助教）、樺島重憲、夏目統、近藤麻伊、山本貴和子、成田雅美（（独）国立成育医療研究センター 生体防御系内科部アレルギー科）、山本修一（佐賀大学医学部小児科学講師）、谷口一登（佐賀大学地域医療支援学助教）、宮野恭平（埼玉医科大学皮膚科助教）、広田朝光（理化学研究所 統合生命医科学研究センター呼吸器・アレルギー

一疾患研究チーム研究員）、中原剛士（九州大学大学院医学研究院皮膚科学）、蜂須賀淳一、江崎仁一、林亜矢子（九州大学大学院医学研究院皮膚科学大学院生）、林純、古庄憲浩（九州大学大学院感染環境医学分野）、天谷雅行、海老原 全（慶應義塾大学医学部皮膚科学）、工藤 純（慶應義塾大学生命情報学センター）、認定 NPO 法人日本アレルギー友の会、小河祥子（千葉大学大学院看護学講究科）

### A. 研究目的

我々は、これまでに厚生労働省科学研究「アトピー性皮膚炎の既存治療法のEBMによる評価と有用な治療法の普及に関する研究」（平成14～16年度）の成果を「アトピー性皮膚炎 よりよい治療のための Evidence-Based Medicine と データ集」（[http://www.kyudai-derm.org/atopy\\_ebm/index.html](http://www.kyudai-derm.org/atopy_ebm/index.html)）としてウェブサイト上に公開した。また、厚生労働省科学研究「アトピー性皮膚炎の症状の制御および治療法の普及に関する研究」（平成17 - 19年度）では、ホームページ「アトピー性皮膚炎、かゆみをやっつけよう」というウェブサイト（<http://www.dermjapan.org/kayumi/index.html>）を2007年5月10日に公開した。さらに「アトピー性皮膚炎のかゆみの解明と治療の標準化に関する研究」（平成20 - 22年度）では上記EBMウェブサイト（[http://www.kyudai-derm.org/atopy\\_ebm/index.html](http://www.kyudai-derm.org/atopy_ebm/index.html)）を2010年版としてアップデートし、治療薬の明確な効能・効果をエビデンスに基づいて詳述した。これらのウェブサイトでは多くの患者を悩ましQOLの低下を招いているアトピー性皮膚炎(AD)の痒みの具体的な治療法、家庭での対策などに関して、患者の視点からよりわかりやすく解説し、開設以来、患者を中心に非常に多くのアクセスを記録している。本研究では、

(1) ADの発症に関与する諸因子をコホート研究にて明らかにするとともに、(2)ADの重要な症状である痒みと炎症の機序を生物学的ならびに遺伝学的に解明し、(3)これらの研究成果を踏まえ、標準治療とその工夫・治療効果を分かりやすく具体的に国民に普及させることを目的とする。

## B. 研究方法

(1)痒みの機序と抑制に関する基礎的研究(稲垣、高森、竹内、浜崎、古江)基礎的な研究では、マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築(稲垣)バリア機能破綻に起因するADの痒みのメカニズムの解明(知覚神経と表皮ケラチノサイトの相互作用)(高森)痒み・掻破行動と皮膚炎増悪メカニズムに関するアトピーモデルを用いた検証(竹内)セロトニン感受性痒み伝達神経の起痒物質感受性の探索(古江)表皮ケラチノサイトに関連するADの痒み関連因子の検討(浜崎)を行う。

(2)ADの発症に寄与する諸因子の解明(古江、竹内、玉利)2001年から我々が樹立した石垣島児童検診コホート(KIDS)では、毎年600~800名の0-6歳児童の検診、アンケート、採血を行っている。本研究では、平成23年度に卵アレルギーとAD発症の疫学調査、平成24年度に小児のIgE産生の疫学、平成25年度に血中monocyte-derived chemokine(MDC)値の推移とADの発症に関する疫学、MDC値と予後ならびに皮膚感染症の合併に関する疫学調査を行う。加えてフィラグリン遺伝子多型を有してはいるもののADを発症していない児の背景因子を調査したい(古江、竹内)。また遺伝学的研究では平成20-22年度に集積したAD患者919例、健常人1032例の遺伝子サンプルを含むAD患者1472名、非ADコントロール7971名を対象にして、遺伝子多型とAD発症の関連性を3年間にわたり順次明らかにしたい(玉利)。

(3)痒みの機序と抑制に関する臨床的研究(佐伯、菅谷、中村、相馬、秀、大矢)臨床的な研究では、ADが睡眠や就労に与える影響に関する研究(佐伯)ADのかゆみと相関する生理活性物質の同定及び日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践(菅谷)(IL-31など)ADのかゆみの理解とその対策に関する包括的研究(相馬)ADにおける汗アレルギーの解析とスキンケアの方法の開発(秀)ADのかゆみにおける樹状細胞の役割に関する研究(中村)小児ADに対するproactive治療に関する研究(大矢)を行う。

(4)標準的治療を普及させるウェブサイトのリニューアルと公開(古江、大矢、浜崎、患者の会)開設以来多くのアクセスを得ている「アトピー性皮膚炎についていっしょに考えましょう」というウェブサイト、標準治療とその工夫・治療効果を中心に患者の立場に立ってリニューアルするべく検討を開始した(古江、患者の会)。本研究で明らかとなった痒みのメ

カニズム、質的違い、遺伝背景などの研究成果も踏まえながら、患者の会とも協力してこれらのウェブサイトのリニューアルをすすめていく。また、作成されたウェブサイトに対する保護者のアクセス行動に関する調査研究も行う(浜崎)。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる臨床試験、動物実験、ゲノム・遺伝実験はすべて施行施設での倫理委員会の承認を受けており、ヒト関連研究では同意の上で施行されている。

## C. 研究結果

(1)痒みの機序と抑制に関する基礎的研究(稲垣、高森、竹内、浜崎、古江)ICRマウスNC/NgaマウスのTNF-誘導性の起痒物質NGFがsiRNA+invivofectamine2の局所注射で強く抑制されることを示した。現在効率の良い経皮的な投与経路の開発中である(稲垣)。アトピーマウスモデルで皮膚炎および掻破抑制に有効なSema3Aを効率よく発現させるプロモーター領域としてROR領域を同定し、同作動薬によるSema3A発現誘導が確認された(高森)。アトピーマウスでFK506の抗かゆみ効果が、ハプテン再チャレンジに対して外用中止後3日までは効果が持続し、その後4-6日目で徐々に消失することを確認した。臨床的なADでの外用中止後のかゆみ再発の中央値(3日目)と一致し(既報告)興味深い(竹内)。セロトニン感受性かゆみ伝達神経は、脊髄後索の浅層に入力し、機械刺激にも応答する多様式ニューロンであることが確認された(古江)。また、アレルギー性接触皮膚炎モデルマウスでは、抗IL-33抗体治療がAD様皮膚炎(表皮肥厚、好酸球浸潤)を抑制することがわかった。

(2)アトピー性皮膚炎の発症に寄与する諸因子の解明(古江、竹内、玉利)石垣島コホートでのべ7856人の保育園児調査の結果、平均有病率は6.3%、本人の気管支喘息と卵アレルギー、父親や同胞のADが罹患危険因子であり、卵アレルギーを合併するAD園児は、非合併のD園児より重症であることが分かった。一方でミルクや小麦など他の3大食物アレルギーやダニアレルギーの有無ではそのような差は見られなかった。また、AD園児でのTh2ケモカインMDC値は健常群より高いことも分かった。また、石垣島コホートにおいて、フィラグリン遺伝子変異の有無がアトピー性皮膚炎の発症に必ずしも寄与しないことを見出した(古江、竹内、天谷)。AD集団のimmunochip解析、遺伝子発現解析、eQTL解析にて、あらたにRAG1,2、SOCS1,NGFR、NLRP10.CCR4の関与が示された(玉利)。

(3)痒みの機序と抑制に関する臨床的研究(佐伯、菅谷、中村、相馬、秀、大矢)AD患者の労働生産性の障害度(TWPI)は32.8±23.7%で重症度スコアや皮膚疾患QOLスコア(DLQI)と相関した。また、睡眠の質障害度(PSQI)も同様にこれらと相関した。(佐伯)。東京大学皮膚科アトピー外来に通院中の患者では、か

ゆみ関連物質 GRP と autotaxin がいずれも健常群より上昇していることが分かった(菅谷)。AD 患者由来の樹状細胞は健常人に比して有意に高い Th2 ケモカイン MDC の産生能を示すことがわかった(中村)。外来の AD 患者の血液検査で、重症度マーカー TARC が SCORAD、掻痒 VAS、好酸球数、LDH と関連することを確認した。IL-31 と LDH に相関がみられた(相馬)。AD 患者での発汗によるかゆみの原因物質として、常在真菌であるマラセチア (*Malassezia globosa*) の分泌タンパク MGL1304 を同定した(秀)。生後 6 ヶ月で湿疹あり児では湿疹なし児と比較して、食物アレルギー発症が高く(既報)、また近年では食物の早期摂取が食物アレルギーの発症を抑制するという報告がある。そこで、AD 乳幼児において、生後 6 ヶ月から 1 歳まで粉末化加熱卵タンパクの連日摂取をする群とプラセボを摂取する対照群に分け、両群とも、1 歳まで卵を含む食品の摂取を制限する。また、この間の湿疹治療においては保護者の希望に応じて、ステロイド外用薬を用いた proactive 療法を行うか、スキンケアのみ実施する 2 群に分ける。現在 83 名の登録があり、50 名の負荷試験が終了しており、登録も継続中である(大矢)。

(4) 標準的治療を普及させるウェブサイトのリニューアルと公開(古江、患者の会)開設以来、多くのアクセスを得ている「アトピー性皮膚炎についていっしょに考えましょう」というウェブサイトを、標準治療とその工夫・治療効果を具体的に患者の立場で解説する仕様にリニューアルした(古江、患者の会)。本研究で明らかとなった痒みのメカニズム、質的違い、遺伝背景などの研究成果も踏まえながら、患者の会とも協力してさらに完成度を高めたい。

#### D. 考察

基礎研究では NGF siRNA の in vivo での治療の可能性を示し、至適条件を検討して臨床応用が期待される。タクロリムス(FK)の抗かゆみ効果は外用中止後 3 日目までは効果が持続し、臨床結果とも一致した。AD のプロアクティブ療法の外用間隔の調整を考えるうえで重要な知見である。また、プロモーター領域制御による抗炎症・かゆみ物質 Sema3A の発現調節技術は低コストの新薬開発につながる可能性ある。最近報告された AD と関連する IL-33 抗体治療が、マウスでの慢性皮膚病変部を改善しており、病態への関連が示唆される。5-HT (マウスでの主要な起痒物質)誘発によるかゆみ特異的神経の同定と上位伝達ニューロン分布の決定は、かゆみ知覚の受容の観点から脳 MRI 解析など中枢での痒み知覚研究の推進に寄与すると思われる。

石垣島コホートおよび遺伝子解析では新規の AD 患児の罹患危険因子の同定や卵アレルギーと AD 罹患および重症度との関わりが示唆され昨年報告した Th2 ケモカイン MDC (CCL-22)など 8 領域に加え RAG1,2、

SOCS1,NGFR、NLRP10.CCR4 の関与が示唆された。AD の主要な遺伝的罹患危険因子である天然保湿因子フィラグリンは、Th2 環境下でその発現が低下するため、日本人では約 7 割に達するフィラグリン遺伝子変異のない AD 患者での発症メカニズムの観点からもこの Th2 ケモカイン MDC との関連は注目に値し、またかゆみと関連の深い NGF の受容体 NGFR があらたに同定されたことも興味深い。

臨床的研究では AD 患者の労働生産性障害や睡眠障害度は重症度 SCORAD や QOL スコアと有意な正の相関が認められ、重症であるほどかゆみが強く、生産活動性、患者 QOL が落ちることに他ならない。またかゆみと関連する血清中の生理活性物質としてあらたに GRP と autotaxin が同定された。適正治療による病状や起痒物質のコントロールの重要性が示唆される。また、AD 患者末梢血由来の樹状細胞からは前述の遺伝子解析でも指摘された Th2 ケモカインの MDC に有意な上昇がみられることを確認した。重症度マーカー TARC が SCORAD、掻痒 VAS、好酸球数、LDH と関連することを確認した。また、かゆみの悪化因子である汗抗原として常在真菌である *Malassezia globosa* の分泌タンパク MGL1304 を同定した。真菌と AD の関連を示すものとして臨床的に注目される。さらに乳幼児 AD へのプロアクティブ療法介入が食物アレルギーの合併率に与える影響をしらべる前向き研究では現在 83 名と登録が進み、50 名で負荷試験が終了している。引き続き研究を進め、食物アレルギーを含めたアレルギー疾患全般のコントロールからみた皮膚局所の AD 治療の意義を問いたい。

#### E. 結論

平成25年度の本研究によって基礎的、臨床的に多くの新知見が得られ、また現在も成果を得るべく継続中である。患者教育ウェブサイトは患者会の協力のもの、患者側からの視点でも再構成した。本研究の新知見も踏まえながら、成果を整理し、科学論文や患者教育ウェブサイトの充実を通してアトピー性皮膚炎の正しい治療の普及を図りたい。

#### F. 健康危険情報：特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing Extremes of the Visual Analogue Scale for Pruritus: A Consensus Statement. Acta Derm Venereol. 2013 Mar 27;93(2):214-5.

Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara

- J, Hirata T, Furue M. Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands. *J Dermatol Sci*. 2013 Oct;72(1):9-15.
- Chiba T, Tatematsu S, Nakao M, Furue M. Urinary biopyrrin: a potential inflammatory marker of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014 Feb;112(2):182-3. doi: 10.1016/j.anai.2013.12.011.
- 川島 眞、古江増隆、秀 道広、佐藤伸一、宮地良樹、慢性蕁麻疹における標準治療不応例に対するベポタスチンベシル酸塩増量の有油性の検討(UPDATE trial)、*臨床医薬* 29:1057-1070, 2013
- Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.
- Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin (TSLP) genotype. *Allergol Int*. 2013;62:123-130.
- Himes BE, Sheppard K, Berndt A, Leme AS, Myers RA, Gignoux CR, Levin AM, Gauderman WJ, Yang JJ, Mathias RA, Romieu I, Torgerson DG, Roth LA, Huntsman S, Eng C, Klanderma B, Ziniti J, Senter-Sylvia J, Szeffler SJ, Lemanske RF Jr, Zeiger RS, Strunk RC, Martinez FD, Boushey H, Chinchilli VM, Israel E, Mauger D, Koppelman GH, Postma DS, Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Litonjua AA, Tantisira KG, Raby BA, Bleecker ER, Meyers DA, London SJ, Barnes KC, Gilliland FD, Williams LK, Burchard EG, Nicolae DL, Ober C, DeMeo DL, Silverman EK, Paigen B, Churchill G, Shapiro SD, Weiss ST. Integration of mouse and human genome-wide association data identifies KCNIP4 as an asthma gene. *PLoS One*. 2013;8:e56179.
- Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hübner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nöthen MM, Fölster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Büning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A, Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45:808-812.
- Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-312.
- Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int*. 2013 in press
- Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2013:S0091-6749(13)01486-3. in press
- Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population. *PLoS One*. 2013;8:e80941.
- Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiujii Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2 gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013: S0923-1811(13)00381-2. in press
- 英文総説  
Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide

- association studies of allergic diseases. *Allergol Int.* 2013;62;21-28.
- Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology.* 2013 in press.
- 日本語総説  
玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患. *呼吸*, 32(3):274-279, 2013.
- 広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因論 ゲノム解析. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 病態解明から治療まで 最新医学 1072-1078, 2013.
- 広田朝光, 玉利真由美: 日本人の遺伝的背景とアレルギー. *実験医学増刊号*, 31:2872-2878, 2013.
- 広田朝光, 玉利真由美: ゲノム解析と気管支喘息. *呼吸と循環*, 61:906-913, 2013.
- 玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患. 第1章 病態生理に関する最新の基礎的研究別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患 Ver.6 state of arts, 61-63, 2013.
- 玉利真由美, 広田朝光: 遺伝的アプローチから見た小児気管支喘息. *日本小児アレルギー学会誌*, 539-547, 2013.
- 中村晃一郎. 負荷試験の実際 2013 薬物アレルギー負荷テスト. *小児内科*. 45 (5), 987 - 988 , 2013 (05)
- 中村晃一郎. ステロイド外用薬の薬理学・薬物動態学的視点. ステロイド外用薬の構造と薬理活性. *薬局* (64(6)): 1885-1888, 2013(5)
- Yamashita H, Makino T, Inagaki N, Nose M, Mizukami H: Assessment of relief from pruritus due to Kampo medicines by using murine model of atopic dermatitis. *J Trad Med* 30: 114-123, 2013.2.
- Kagami S, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Tsunemi Y, Sato S. Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 133: 1673-5, 2013.
- Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Kagami S, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum visfatin levels in patients with atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 23: 629-35, 2013.
- Nakao M, Sugaya M, Suga H, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum autotaxin levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* in press.
- Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci* 71: 148-50, 2013.
- Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiujji Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 40: 736-9, 2013.
- Hayashi M, Saeki H, Ito T, Fukuchi O, Umezawa Y, Katayama H, Tanito K, Igarashi A, Etoh T, Hasegawa T, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with psoriasis. *J Dermatol Sci* 72: 188-91, 2013.
- Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiujji Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on sleep quality in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 72: 195-7, 2013.
- Hiragun T, et al. Fungal protein MGL\_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 132: 608-615, 2013.
- Hiragun M, et al. Elevated serum IgE against MGL\_1304 in patients with atopic dermatitis and cholinergic urticaria. *Allergol Int*, in press.
- Kamo A, Negi O, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Histamine H4 Receptor Antagonists Ineffective against Itch and Skin Inflammation in Atopic Dermatitis Mouse Model. *J Invest Dermatol*. 2013, in press.
- Tominaga M, Takamori K. An update on peripheral mechanisms and treatments of itch. *Biol Pharm Bull.* ,



36(8): 1241-7, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clin Exp Dermatol.* 38(6): 665-8, 2013.

Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain*, 2013, in press.

Shibata A, Sugiura K, Kimura U, Takamori K, Akiyama M. A novel ATP2C1 early truncation mutation suggests haploinsufficiency as a pathogenic mechanism in a patient with Hailey-Hailey disease. *Acta Derm Venereol.*, 93(6): 719-20, 2013.

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 NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus: a consensus statement. *Acta Derm Venereol.* 93(2): 214-5, 2013.

Yanagida M, Kawasaki M, Fujishiro M, Miura M, Ikeda K, Nozawa K, Kaneko H, Morimoto S, Takasaki Y, Ogawa H, Takamori K, Sekigawa I. Serum proteome analysis in patients with rheumatoid arthritis receiving therapy with tocilizumab: an anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biomed Res Int.* 2013: 607137, 2013.

Araki Y, Nonaka D, Hamamura K, Yanagida M, Ishikawa H, Banzai M, Maruyama M, Endo S, Tajima A, Lee LJ, Nojima M, Takamori K, Yoshida K, Takeda S, Tanaka K. Clinical peptidomic analysis by a one-step direct transfer technology: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in female reproductive system disorders. *J Obstet Gynaecol Res.*, 39(10): 1440-8, 2013.

Nakayama H, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. GSL-enriched membrane microdomains in innate immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*, 61(3): 217-28, 2013.

Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Yamaguchi A, Ikeda K, Morimoto S, Iwabuchi K, Yanagida M,

Ichinose S, Morioka M, Ogawa H, Takamori K, Takasaki Y, Sekigawa I. Inhibition of connective tissue growth factor ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 65(6):1477-86, 2013.

Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Suzuki F, Takamori K, Ogawa H, Takasaki Y, Sekigawa I. CC motif chemokine ligand 13 is associated with rheumatoid arthritis pathogenesis. *Mod Rheumatol.*, 23(5): 856-63, 2013.

(和文原著、総説、著書)

高森建二. 全身性皮膚癢痒症. *JIM.* Vol.23, No.2, 132-134, 2013.

高森建二, 富永光俊. アトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムと新たな治療戦略. *臨床免疫・アレルギー科*, 59(2), 191-197, 2013.

高森建二. STIとかゆみ. *日本性感染症学会誌*, Vol.24, No.1, 28-34, 2013.

根木 治, 須賀 康, 高森建二, 高原久嗣, 林野久紀, 鈴木敏江, 矢萩理恵. 透析患者のかゆみに対するツバキ油スプレーの有用性および安全性の検討. *皮膚の科学*, Vol.11, No 6, 538-547, 2012.

富永光俊, 高森建二. バリア機能の痒み. *アレルギーの臨床*, No440, 39-43, 2013.

根木 治, 富永光俊, 高森建二. かゆみとスキンケア. *Monthly Book Derma.* No. 210, 23-30, 2013.

富永光俊, 加茂敦子, 高森建二. 老人性乾皮症の痒み発生機序の解明と治療法開発. *加齢皮膚医学セミナー*. Vol. 8, 23-28, 2013.

富永光俊, 高森建二. バリア機能と痒み. *アレルギーの臨床*. Vol. 33, No. 2, 39-43, 2013.

大泉亜美, 春名邦隆, 寒竹正人, 大日方薫, 高森建二, 須賀 康. 単純型先天性表皮水疱症の2例の臨床経験. *日本小児皮膚科学会雑誌* Vol.32, No.1, 35-40, 2013.

木下綾子, 高森建二, 須賀 康. 順天堂大学浦安病院を受診した新規HIV感染者における皮膚症状の検討. *日本性感染症学会誌*, Vol. 24, No.1, 140-147, 2013.

木村有太子, 竹内かおり, 木下綾子, 高森建二, 比留間政太郎, 須賀 康. 爪白癬に対するロングパルスNd:

YAGレーザー治療 . 日本美容皮膚科学会雑誌Vol.23  
No.4 , 280-288 , 25 , Dec , 2013

川上民裕:皮脂欠乏症の病態と保湿の意義 日経メ  
ディカル Clinical Lecture 2013 No.3 71-75

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama  
Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Interleukin 33 is induced  
by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma  
in keratinocytes and contributes to allergic  
contact dermatitis. J Invest Allergol Clin  
Immunol 2013;23(6):428-434

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Sugioka  
T, Hamasaki Y. Blockade of Interleukin-33  
attenuates allergic contact dermatitis in model  
mice: possible mechanism via eosinophil  
infiltration. Clin Exp Dermatol Res  
2013;4(3):1000183

Takeuchi S, Esaki H, Furue M. Epidemiology of atopic  
dermatitis in Japan. (Review) J Dermatol. 2013  
accepted for publication.

Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiuj  
Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya  
M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi  
E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue  
M, Tamari M. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2  
gene is associated with psoriasis vulgaris in a  
Japanese population. J Dermatol Sci. 2013 Dec 10.  
pii: S0923-1811(13)00381-2. doi:  
10.1016/j.jdermsci.2013.11.012. [Epub ahead of  
print]

竹内聡 アトピー性皮膚炎 -ステロイド外用剤に抵  
抗性のかゆみ- Dermatology Today, 2014 (in press)  
(総説)

## 2. 学会発表

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関  
連領域と成人喘息関連領域-, 第53回日本呼吸器学会学  
術講演会 シンポジウム 閉塞性肺疾患の多様性とフ  
ェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美

Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan  
Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in  
Academia Sinica 2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari

ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺  
伝子の同定, 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演23

アトピー性皮膚炎:バリア障害による表皮と免疫のク  
ロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World  
Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European  
Academy of Allergy and Clinical Immunology & World  
Allergy Organization World Allergy & Asthma  
Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第34回日本  
炎症・再生医学会 シンポジウム4 炎症性疾患の再生  
のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ  
池 京都. 玉利真由美

アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九  
州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福  
岡. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases,  
8th RCI-JSI International Symposium on Immunology  
2013, Interface between Immune System and  
Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari

アレルギー疾患の遺伝的要因 ゲノムワイド関連解析を  
中心に, 第64回東海小児アレルギー談話会 特別講演  
2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases,  
Pleary Lecture 1 第50回日本小児アレルギー学会  
2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

中村晃一郎. アトピー性皮膚炎と外用療法. 治療のモ  
チベーション持続の工夫. 日本臨床皮膚科医会雑誌 .  
30 (2)203, 2013

稲垣直樹: アトピーの慢性化と最新研究について. ア  
レルギーケアフォーラム, 東京, 2013.6.13.

稲垣直樹: アトピー性皮膚炎とかゆみ. 日本薬学図書  
館協議会研究集会, 名古屋, 2013.8.8.

佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純  
子、東福有佳里、中川秀己: アトピー性皮膚炎患者で  
は重症なほど睡眠の質が低下する. 第 64 回日本皮膚科  
学会中部支部学術大会、名古屋、2013 年 11 月 2-3 日

佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純  
子、東福有佳里、中川秀己: アトピー性皮膚炎患者で  
は重症なほど労働生産性や日常活動が低下する. 第 63  
回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2013 年 11

月 28-30 日

Hiragun M, et al. Establishment of a method to quantify the specific IgE against sweat antigen in sera of patients with atopic dermatitis. 第37回日本研究皮膚科学会 2012年12月7-9日 那覇市

Hiragun M, et al. The specific IgE against sweat antigen in sera of patients with allergic diseases. International Investigative Dermatology 2013, May 8-11, 2013, Edinburgh, UK.

平郡真記子ほか．精製汗抗原特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第112回日本皮膚科学会総会 2013年6月14-16日 横浜市

平郡隆明．アトピー性皮膚炎における汗抗原の同定とその解析．第10回広島免疫アレルギー研究会 2013年6月28日 広島市

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原の同定とその解析．第3回汗と皮膚の研究会 2013年8月10日 東京都

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原の同定とその解析．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

平郡真記子ほか．MGL\_1304特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

Takamori K: Mechanism of itch in Atopic Dermatitis, The first Annual Scientific Meeting of Cambodia Dermatological Society (1st ASMCDS), Cambodia, Jan11, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Eximer lamp induces directly cutaneous nerve degeneration in animal models for pruritus. 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Istanbul, Turkey, October 2-6, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Noguchi A, Kimura U, Osamu N, Taneda K, Takamori K. Anti-pruritic effects of Neurotrophin in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Kamo A, Takamori K. Transcriptional regulation of human semaphorin

3A gene in normal epidermal keratinocytes: implication of application to intractable itch in atopic dermatitis. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Osamu N, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists ineffective against itch and skin inflammation in atopic dermatitis mouse model. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Excimer lamp irradiation induces reduction of intraepidermal nerve fibre: implications for possible application to intractable pruritus International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Kamo A, Takamori K. Molecular mechanisms of Semaphorin 3A gene regulation in human epidermal keratinocytes. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Negi O, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists exhibit insufficient anti-pruritic and anti-inflammatory effects on mite extract ointment-induced mouse model of atopic dermatitis. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

高森建二．透析に伴うかゆみをコントロールする，第4回沖縄県腎不全看護研究会withかゆみフォーラム，沖縄，2013年2月．

高森建二．透析そう痒症の病態と治療，滋賀県皮膚科医会学術講演会，草津，2013年4月．

高森建二．かゆみのメカニズムと制御 保湿剤の有効性，第112回日本皮膚科学会総会教育講演30，横浜，2013年6月．

高森建二．皮膚研究の最前線～皮膚のバリア機能の解明は皮膚所見の見方をどう変えたか～，日本透析学会，福岡，2013年6月．

高森建二．透析そう痒症はなぜ痒い，透析患者のかゆみを考える夕べ，山形，2013年7月．

高森建二. 透析のかゆみを科学する メカニズムと対策 , 練馬区皮膚科医会講演会, 東京, 2013年7月.

高森建二. 小児アトピー性皮膚炎における積極的な治療介入の有用性, 第37回日本小児皮膚科学会学術大会 モーニングセミナー, 東京, 2013年7月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について , 第63回関東耳鼻咽喉科アレルギー懇話会, 東京, 2013年9月.

高森建二. 透析そう痒症はなぜ痒い メカニズムと対策 , 青森レミッチ講演会, 青森, 2013年9月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について , 日本臓器製薬東京第一・横浜支店社内研修会, 千代田区, 2013年10月.

富永光俊. かゆみと皮膚 セマフォリン他について . 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 高森建二. 乾燥皮膚で誘発される表皮内神経の増生に対する保湿性オリゴマーエステルD/DCの影響. 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 野口篤, 木村有太子, 根木 治, 種田研一, 高森建二. 皮膚の乾燥を伴う痒みに対するノイロトロピンの有効性の検討. 第9回 加齢皮膚医学研究会, 山口, 2013年7月.

飯泉恭一, 富永光俊, 川崎広明, 重永綾子, 加茂敦子, 鎌田弥生, 高森建二, 山倉文幸. 6-ニトロトリプトフ

ァンはアトピー性皮膚炎患者の血漿バイオマーカーとなり得るか? 第35回日本トリプトファン研究会, 京都, 2013年9月.

鎌田弥生, 富永光俊, 梅原芳恵, 加茂敦子, 高森建二. 正常ヒト表皮角化細胞におけるセマフォリン3Aの発現制御機構. 第23回国際かゆみシンポジウム, 大阪, 2013年10月.

富永光俊. アトピー性皮膚炎 かゆみのメカニズム . 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会ランチョンセミナー, 金沢, 2013年12月.

川上民裕: プロアクティブ療法(アトピー性皮膚炎の新治療戦略)と食物アレルギー・アレルギーマーチを結ぶ点と線 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月29日 東京 教育セミナー アレルギー 62巻(9, 10号) Page 1240, 2013

竹内聡. 基礎・臨床データから見た痒みのマネジメント タクロリムス軟膏の有用性 第29回日本臨床皮膚科医会総会 平成25年4月7日 ウェスティンナゴヤキャッスル 星雲の間西(第4会場)(名古屋市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得:

セマフォリン 3A の発現調節方法(平成 25 年 5 月 2 日出願)特願 2013-097100, 鎌田弥生, 富永光俊, 高森建二(順天堂大学)

##### 2. 実用新案登録: なし。

##### 3. その他: なし。

## バリア機能破綻に起因するアトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムの解明と制御 知覚神経と表皮ケラチノサイトの相互作用の観点から

研究分担者 高森 建二 (順天堂大学医学部附属浦安病院)

研究協力者 富永 光俊 (順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所)  
鎌田 弥生 (順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所)

### 研究要旨

アトピー性皮膚炎の難治性の痒みは、不眠や就労障害の原因となり、患者のquality of lifeを著しく障害する。AD病変部では神経反発因子の発現減少に伴う表皮内神経の稠密化により、起痒刺激の受容増加が認められ、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性の痒みを発症する。本研究は、神経反発因子セマフォリン3A (Sema3A) に着眼し、正常ヒト表皮角化細胞における内在性Sema3Aの発現制御機構の解明を目指した。その結果、内在性Sema3Aの発現調節に重要な役割を果たす転写因子として、レチノイド関連オープン受容体 (ROR) が同定された。そこで、ROR 作動薬であるSR1078やコレステロール硫酸などを含む条件で正常ヒト表皮角化細胞を培養した結果、いずれのROR 作動薬でもSema3A発現が促進されることが明らかとなった。一方、ROR 逆作動薬SR1001は有意にSema3A発現を抑制した。したがって、ROR を標的とした内在性Sema3Aの発現促進剤はADの新規止痒薬に応用できる可能性が示唆された。

### A . 研究目的

既存治療が無効な難治性の痒みは、患者のQOL (quality of life) を低下させる深刻な問題である。皮膚バリア機能の破綻を伴うアトピー性皮膚炎 (AD) 患者では表皮内神経線維が稠密化し、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性の痒みを発症する。バリア機能の破綻は神経線維の伸長と退縮に関わる分子の発現バランスを乱すが、その発現制御機構は全く不明である。本研究は痒みの難治化の鍵となる神経反発因子セマフォリン3A (Sema3A) に着眼し、表皮角化細胞におけるSema3Aの発現制御機構を分子レベルで解明することで、内在性Sema3Aの発現を誘導するADの新規止痒薬の開発を目指した。

### B . 研究方法

ヒトSema3A遺伝子の発現制御に関わる領域 (以後、プロモーター領域とする) をクローニング後、PCR法で5'末端欠失変異体を作成し、ルシフェラーゼ発現ベクターに挿入して、簡易的にSema3A転写量を評価可能なプロモーターアッセイ系を構築した。構築したベクターは正常ヒト表皮角化細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイで遺伝子発現に重要な領域を同定した。転写因子結合配列は、塩基配列解析後にBIODASE P-Match publicで検索した。Sema3A遺伝子発現量は定量的RT-PCR法で解析した。

### C . 研究結果

ヒトSema3Aプロモーター領域を5'末端側から数百塩基ずつ欠失させた変異体のルシフェラーゼアッセイにより、Sema3A発現の促進に関わるPositive領域を同定した。データベース検索の結果、Positive領域 (-134~-44) にはレチノイド関連オープン受容体 (ROR)、Sox、GA結合タンパク質 (GABP) 等の転写因子結合配列が存在した。候補転写因子の遺伝子発現をRNA干渉 (siRNA) によって抑制した結果、いずれの候補転写因子の発現を抑制した際にも、Sema3A発現が50%以下まで減少した。さらに、候補転写因子の結合配列を部位特異的に欠失させた変異体を用いてプロモーターアッセイを行ったところ、ROR結合部位を欠失させた変異体でSema3Aの転写活性が劇的に減少した。そこで、ROR作動薬であるSR1078やコレステロール硫酸を含む条件で正常ヒト表皮角化細胞を培養した結果、いずれのROR作動薬でも有意にSema3A発現が促進された。一方、ROR逆作動薬SR1001は有意にSema3A発現を抑制した。

### D . 考察・結論

内在性Sema3Aの発現に重要な役割を果たす転写因子としてRORを同定した。このことから、RORを標的とした内在性Sema3Aの発現促進剤は新規止痒薬の開発に繋がることが示唆された。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(英文原著、総説)

Kamo A, Negi O, Tenggara S, Kamata Y, Noguchi A, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Histamine H4 Receptor Antagonists Ineffective against Itch and Skin Inflammation in Atopic Dermatitis Mouse Model. *J Invest Dermatol*. 2013, in press.

Tominaga M, Takamori K. An update on peripheral mechanisms and treatments of itch. *Biol Pharm Bull.* , 36(8): 1241-7, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clin Exp Dermatol*. 38(6): 665-8, 2013.

Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain*, 2013, in press.

Shibata A, Sugiura K, Kimura U, Takamori K, Akiyama M. A novel ATP2C1 early truncation mutation suggests haploinsufficiency as a pathogenic mechanism in a patient with Hailey-Hailey disease. *Acta Derm Venereol.*, 93(6): 719-20, 2013.

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 NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus: a consensus statement. *Acta Derm Venereol*. 93(2): 214-5, 2013.

Yanagida M, Kawasaki M, Fujishiro M, Miura M, Ikeda K, Nozawa K, Kaneko H, Morimoto S, Takasaki Y, Ogawa H, Takamori K, Sekigawa I. Serum proteome analysis in patients with rheumatoid arthritis receiving therapy with tocilizumab: an anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biomed Res*

*Int*. 2013: 607137, 2013.

Araki Y, Nonaka D, Hamamura K, Yanagida M, Ishikawa H, Banzai M, Maruyama M, Endo S, Tajima A, Lee LJ, Nojima M, Takamori K, Yoshida K, Takeda S, Tanaka K. Clinical peptidomic analysis by a one-step direct transfer technology: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in female reproductive system disorders. *J Obstet Gynaecol Res.* , 39(10): 1440-8, 2013.

Nakayama H, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. GSL-enriched membrane microdomains in innate immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* , 61(3): 217-28, 2013.

Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Yamaguchi A, Ikeda K, Morimoto S, Iwabuchi K, Yanagida M, Ichinose S, Morioka M, Ogawa H, Takamori K, Takasaki Y, Sekigawa I. Inhibition of connective tissue growth factor ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* , 65(6):1477-86, 2013.

Yamaguchi A, Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Suzuki F, Takamori K, Ogawa H, Takasaki Y, Sekigawa I. CC motif chemokine ligand 13 is associated with rheumatoid arthritis pathogenesis. *Mod Rheumatol.* , 23(5): 856-63, 2013.

(和文原著、総説、著書)

高森建二. 全身性皮膚痒症. *JIM*. Vol.23, No.2 , 132-134 , 2013.

高森建二, 富永光俊. アトピー性皮膚炎の痒みのメカニズムと新たなる治療戦略. *臨床免疫・アレルギー科*, 59(2), 191-197, 2013.

高森建二. STIとかゆみ. *日本性感染症学会誌*, Vol.24, No.1, 28-34, 2013.

根木 治, 須賀 康, 高森建二, 高原久嗣, 林野久紀, 鈴木敏江, 矢萩理恵. 透析患者のかゆみに対するツバキ油スプレーの有用性および安全性の検討. *皮膚の科学*, Vol.11, No 6, 538-547, 2012.

富永光俊, 高森建二. バリア機能の痒み. *アレルギーの臨床*, No440, 39-43, 2013.

根木 治, 富永光俊, 高森建二. かゆみとスキンケア. Monthly Book Derma. No. 210, 23-30, 2013.

富永光俊, 加茂敦子, 高森建二. 老人性乾皮症の痒み発生機序の解明と治療法開発. 加齢皮膚医学セミナー. Vol. 8, 23-28, 2013.

富永光俊, 高森建二. バリア機能と痒み. アレルギーの臨床. Vol. 33, No. 2, 39-43, 2013.

大泉亜美, 春名邦隆, 寒竹正人, 大日方薫, 高森建二, 須賀 康. 単純型先天性表皮水疱症の2例の臨床経験. 日本小児皮膚科学会雑誌Vol.32, No.1, 35-40, 2013.

木下綾子, 高森建二, 須賀 康. 順天堂大学浦安病院を受診した新規HIV感染者における皮膚症状の検討. 日本性感染症学会誌, Vol. 24, No.1, 140-147, 2013.

木村有太子, 竹内かおり, 木下綾子, 高森建二, 比留間政太郎, 須賀 康. 爪白癬に対するロングパルスNd:YAGレーザー治療. 日本美容皮膚科学会雑誌Vol.23 No.4, 280-288, 25, Dec, 2013

## 2. 学会発表 (国際学会)

Takamori K: Mechanism of itch in Atopic Dermatitis, The first Annual Scientific Meeting of Cambodia Dermatological Society (1st ASMCDS), Cambodia, Jan11, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Excimer lamp induces directly cutaneous nerve degeneration in animal models for pruritus. 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), Istanbul, Turkey, October 2-6, 2013.

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Noguchi A, Kimura U, Osamu N, Taneda K, Takamori K. Anti-pruritic effects of Neurotrophin in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Umehara Y, Kamo A, Takamori K. Transcriptional regulation of human semaphorin 3A gene in normal epidermal keratinocytes: implication of application to intractable itch in

atopic dermatitis. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Osamu N, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists ineffective against itch and skin inflammation in atopic dermatitis mouse model. 7th World Congress on Itch, Boston, USA, September 21-23, 2013

Kamo A, Tominaga M, Kamata Y, Takamori K. Excimer lamp irradiation induces reduction of intraepidermal nerve fibre: implications for possible application to intractable pruritus International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Kamata Y, Tominaga M, Kamo A, Takamori K. Molecular mechanisms of Sema3A gene regulation in human epidermal keratinocytes. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

Tominaga M, Kamo A, Negi O, Tengara S, Kamata Y, Noguchi A, Takamori K. Histamine H4 receptor antagonists exhibit insufficient anti-pruritic and anti-inflammatory effects on mite extract ointment-induced mouse model of atopic dermatitis. International Investigative Dermatology (IID) 2013, Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

## (国内学会)

高森建二. 透析に伴うかゆみをコントロールする, 第4回沖縄県腎不全看護研究会 with かゆみフォーラム, 沖縄, 2013年2月.

高森建二. 透析そう痒症の病態と治療, 滋賀県皮膚科医会学術講演会, 草津, 2013年4月.

高森建二. かゆみのメカニズムと制御 保湿剤の有効性, 第112回日本皮膚科学会総会教育講演30, 横浜, 2013年6月.

高森建二. 皮膚研究の最前線~皮膚のバリア機能の解明は皮膚所見の見方をどう変えたか~, 日本透析学会, 福岡, 2013年6月.

高森建二. 透析そう痒症はなぜ痒い, 透析患者のかゆみを考える夕べ, 山形, 2013年7月.

高森建二. 透析のかゆみを科学する メカニズムと対策, 練馬区皮膚科医会講演会, 東京, 2013年7月.

高森建二. 小児アトピー性皮膚炎における積極的な治療介入の有用性, 第37回日本小児皮膚科学会学術大会モーニングセミナー, 東京, 2013年7月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について, 第63回関東耳鼻咽喉科アレルギー懇話会, 東京, 2013年9月.

高森建二. 透析そう痒症はなぜ痒い メカニズムと対策, 青森レミッチ講演会, 青森, 2013年9月.

高森建二. かゆみの病態と治療の最近の話題 特にアトピー性皮膚炎のかゆみのメカニズムと対策について, 日本臓器製薬東京第一・横浜支店社内研修会, 千代田区, 2013年10月.

富永光俊. かゆみと皮膚 セマフォリン他について, 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 高森建二. 乾燥皮膚で誘発される表皮内神経の増生に対する保湿性オリゴマーエステルD/DCの影響. 第112回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013年6月.

加茂敦子, 富永光俊, 鎌田弥生, 野口篤, 木村有太子, 根木 治, 種田研一, 高森建二. 皮膚の乾燥を伴う痒みに対するノイロトロピンの有効性の検討. 第9回加齢皮膚医学研究会, 山口, 2013年7月.

飯泉恭一, 富永光俊, 川崎広明, 重永綾子, 加茂敦子, 鎌田弥生, 高森建二, 山倉文幸. 6-ニトロトリプトファンはアトピー性皮膚炎患者の血漿バイオマーカーとなり得るか? 第35回日本トリプトファン研究会, 京都, 2013年9月.

鎌田弥生, 富永光俊, 梅原芳恵, 加茂敦子, 高森建二. 正常ヒト表皮角化細胞におけるセマフォリン3Aの発現制御機構. 第23回国際かゆみシンポジウム, 大阪, 2013年10月.

富永光俊. アトピー性皮膚炎 かゆみのメカニズム. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会ラUNCHONセミナー, 金沢, 2013年12月.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

セマフォリン3Aの発現調節方法(平成25年5月2日出願)特願2013-097100, 鎌田弥生, 富永光俊, 高森建二(順天堂大学)

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし



## 分担研究報告書

### アトピー性皮膚炎のかゆみに影響する各種パラメータの解析—治療前後の比較について

研究協力者氏名 川上民裕（聖マリアンナ医科大学皮膚科准教授）  
京谷樹子（聖マリアンナ医科大学皮膚科助教）  
分担研究者氏名 相馬良直（聖マリアンナ医科大学皮膚科教授）

#### 研究要旨

成人アトピー性皮膚炎、特にその痒痒における、Interleukin-31(IL-31)やヘキサノイルリジン、TARC、IgE、好酸球、ヒスタミン、トリプターゼとの関連を検討した。対象は、当大学病院を受診した12人（男性8人、女性4人、平均年齢33.1歳）で、2週間以上未治療のアトピー性皮膚炎の患者である。エントリー時と比較して、治療2週後、4週後のSCORAD、痒痒VASは、有意差を持って低下した。エントリー時と比較して、治療2週後は、血中好酸球数、血中LDH値、血中TARC値、血中トリプターゼ値、血中ヘキサノイルリジン値が有意に減少した。トリプターゼ値、ヒスタミン値、好酸球数の3者はお互いに正の相関を示した。IL-31値は、LDH値と正の相関を示した。血中IL-31値は、LDH値が高いアトピー性皮膚炎患者での関与が示唆された。酸化ストレスがアトピー性皮膚炎の痒痒に関係し、ヘキサノイルリジンはその評価マーカーになる可能性が示された。こうした結果は、アトピー性皮膚炎の病態解明に繋がると考えた。

#### A．研究目的

成人アトピー性皮膚炎患者の痒痒において重要な役割を果たすとして最近、注目されているInterleukin-31(IL-31)、ヘキサノイルリジンに焦点をあて、併せてすでに一定の評価がなされているTARC(Thymus and activation-regulated chemokine)、IgE、好酸球、ヒスタミン、トリプターゼの血中濃度を、未治療アトピー性皮膚炎患者の治療前後で測定し、これらのパラメータがアトピー性皮膚炎の症状、特に痒痒の推移とどう関与するかを検討する。

こうした値の変動が、アトピー性皮膚炎の病勢、特に痒痒の原因に反映することがわかれば、病状の把握に繋がる。さらに、健常人との比較から今後のアトピー性皮膚炎を含めた治療法の確立へとつながる可能性がある。

#### B．研究方法

対象は、聖マリアンナ医科大学病院を受診した20歳以上、2週間以上未治療のアトピー性皮膚炎の患者である。アトピー性皮膚炎の診断は、Hanifin & Rajkaの診断基準を用い、皮膚科専門医が行う。重篤な合併症をもつ患者は、除外する。治療は、通常のアトピー性皮膚炎治療に順じ、担当医の判断で処方された抗ヒスタミン薬・抗アレルギー薬と副腎皮質ステロイド外用薬のみであり、ステロイド内服薬および注射薬、免疫抑制薬の併用はしない。保湿外用薬については、必要に応じて併用可とする。ただし、試験期間中は原則としてその薬剤の変更および用量の変更は、不可とする。

アトピー性皮膚炎の病状の評価は、医師サイドからのSCORAD(Severity Scoring of Atopic Dermatitis)と患者サイドからの痒痒のVAS(Visual Analogue Scale)を使用した。一方、エントリー時(治療前)と治療2週後、4週後に採血し、IL-31、ヘキサノイルリジン、好酸球、TARC、IgE、トリプターゼ、ヒスタミンを測定した。

#### (倫理面への配慮)

本試験においてプロトコールを作成し、院内倫理委員会に申請し、承認を得た。本試験では、患者のプライバシー保護のため、患者の全てのデータは症例登録番号、イニシャル、カルテ番号、生年月日で識別、同定、照会される。また、試験成績の公表などに関しても、患者のプライバシー保護に十分配慮する。データの二次利用は行わない。被験者のデータ等を病院外に出す場合は、個人情報管理者を置く。

#### C．研究結果

条件を満たし、治験を完了した対象患者は、12人(男性8人、女性4人、平均年齢33.1歳(20歳~59歳))で、臨床研究中の治療薬は、内服薬がオロパタジン6人、フェキソフェナジン4人、クロルフェニラミンマレイン酸塩3人、ヒドロキシジン3人、外用薬が副腎皮質ステロイド全例12人、保湿外用薬全例12人、タクロリムス2人であった。

エントリー時と比較して、治療2週後、4週後のSCORAD、痒痒VASは、有意差を持って低下した。エントリー時と比較して、治療2週後は、血中好酸球数、血中LDH値、

血中TARC値、血中トリプターゼ値、血中ヘキサノイルリジン値が有意に減少した。好酸球数、LDH値は治療4週後も有意な減少を継続した。log<sub>10</sub>TARC値を計測すると、エントリー時と比較して、治療2週後・4週後は有意な低下を示した。

全体の統計では、TARC値は、SCORAD、痒痒VAS、好酸球数、LDH値と正の相関を示した。トリプターゼ値、ヒスタミン値、好酸球数の3者はお互いに正の相関を示した。IL-31値は、LDH値と正の相関を示した。

#### D．考察

われわれは以前、本研究と同様の形式で、治療前後のヒスタミン値、トリプターゼ値を測定し、これらがアトピー性皮膚炎患者の痒痒と関連し治療で低下すること (Imaizumi A, et al. J Dermatol Sci. 2003) やトリプターゼ値の抑制に成功したアトピー性皮膚炎患者ほど治療効果が良い (Kawakami T, et al. J Dermatol Sci. 2006) 等の有意なデータをだしてきた。

IL-31は、Th2型のCD4陽性T細胞から産生されるサイトカインとして発見され、最近、起痒作用の発現に関与することが明らかにされつつある。

活性酸素種による脂質の過酸化は、酸化ストレスとして生体機能の障害、疾病、老化に深くかかわる。その初期段階を捉える安定な物質としてヘキサノイルリジンが注目されている。

今回の臨床研究では、エントリー時と治療2週後、4週後のSCORAD、痒痒VASに有意差を認め、臨床研究の対象として理想的な母集団を得ることができた。アトピー性皮膚炎治療で痒痒を含む症状の改善に成功した患者では、ヘキサノイルリジンが有意に低下したことから、酸化ストレスから解放されたことが推測できる。すなわち、酸化ストレスがアトピー性皮膚炎の特に痒痒に深い関係があり、ヘキサノイルリジンは、その評価マーカーになりうる可能性がある。また、IL-31値は、LDH値が高いアトピー性皮膚炎患者での関与がより強いことが考えられた。対して、トリプターゼ値は好酸

球数と関連して痒痒を起こしている可能性が示唆された。一方、TARC値は、アトピー性皮膚炎病勢と痒痒に関する幅広い範囲で作用・関与している可能性が推察された。TARCは樹状細胞や免疫系細胞等の、より根本の病因と関連しているのかもしれない。

#### E．結論

血中IL-31値は、LDH値が高いアトピー性皮膚炎患者での関与が示唆された。酸化ストレスがアトピー性皮膚炎の痒痒に関係し、ヘキサノイルリジンはその評価マーカーになりうる。

こうした各種パラメータの測定により、アトピー性皮膚炎の病勢や痒痒の現状を数値化でき、アトピー性皮膚炎の病態理解につながることを期待できる。

#### F．健康危険情報

なし

#### G．研究発表

##### 1. 論文発表

川上民裕: 皮脂欠乏症の病態と保湿の意義 日経メディカル Clinical Lecture 2013 No.3 71-75

##### 2. 学会発表

川上民裕: プロアクティブ療法(アトピー性皮膚炎の新治療戦略)と食物アレルギー・アレルギーマーチを結ぶ点と線 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月29日 東京 教育セミナー アレルギー 62巻(9, 10号) Page 1240, 2013

#### H．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

現在のところなし。

## 分担研究報告書

### アトピー性皮膚炎における汗アレルギーの解析と有効性の高いスキンケア方法の開発

研究分担者	秀 道広	広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
研究協力者	信藤 肇	広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
	平郡 隆明	広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
	平郡 真記子	広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学
	石井 香	広島大学大学院医歯薬保健学研究院皮膚科学

#### 研究要旨

アトピー性皮膚炎(AD)において汗は主要な悪化因子の一つである。我々は、これまでヒト汗に含まれ、AD患者好塩基球からヒスタミン遊離を起こす物質を精製し(精製汗抗原)その特性について報告してきたが、今回、精製汗抗原をさらに2種類の逆相クロマトグラフィーにより精製し、ヒスタミン遊離活性と一致する単一のUV吸収ピークを得た。質量分析の結果、そのアミノ酸配列は*Malassezia globosa*の産生するMGL\_1304と一致した。大腸菌および動物細胞で作製した組換えMGL\_1304蛋白は、AD患者好塩基球にヒスタミン遊離を起こし、免疫プロットやマスト細胞の脱顆粒において精製汗抗原とほぼ完全な交差性を示した。ヒト汗中に含まれるMGL\_1304は高いヒスタミン遊離活性を持ち、ADにおける重要な悪化因子と考えられた。

#### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)において汗は主要な悪化因子の一つであり、AD患者は自己汗に対する即時型アレルギー反応を高率に示すことが知られている。我々はこれまでに、ヒト汗からヒスタミン遊離活性を指標に精製した抗原(精製汗抗原)について検討をしてきたが、物質としての同定ができていなかった。今回はドイツのKiel大学の協力により更に精製を加え、汗抗原の物質としての同定と解析を行った。

#### B. 研究方法

精製汗抗原に対してさらに2種類の逆相クロマトグラフィーによる精製を追加し、AD患者好塩基球を用いたヒスタミン遊離と一致する蛋白ピークを質量分析にて解析した。得られたアミノ酸配列と一致する物質の遺伝子配列を元に、発現ベクターを作製し、大腸菌(JM109)および動物細胞(COS7)を用いて組換え蛋白質を作製した。ヒト好塩基球によるヒスタミン遊離試験、AD患者血清での免疫プロット、ヒト高親和性IgE受容体を発現するRBL-48細胞を用いた脱顆粒実験などにより、組換え蛋白の解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト血清、血球を用いた実験については広島大学医学部倫理委員会に承認済み。

#### C. 研究結果

質量分析で検出された汗抗原の部分的なアミノ酸配列(HKMSVGDSESPGNMRSFCTKPYSSK)は*Malassezia globosa*由来の分泌蛋白であるMGL\_1304と一致した。大腸菌を用いて作製した組換えMGL\_1304には、AD患者血清IgEが結合した(図1)。また、組換えMGL\_1304はAD患者好塩基球にヒスタミン遊離を起こしたが、健常人好塩基球からはヒスタミン遊離を起こさなかった(図2)。AD患者血清を用いた免疫プロットでは、AD患者血清を組換えMGL\_1304で前処理すると、精製汗抗原に対するIgEの結合が阻害され、逆に血清を精製汗抗原で前処理すると、組換えMGL\_1304に対するIgEの結合が阻害された(図3)。同様に、RBL-48細胞を用いた脱顆粒実験においても、組換えMGL\_1304で前処理した血清で細胞を感作すると、精製汗抗原に対する脱顆粒反応が消失した。このように、組換えMGL\_1304は、我々がこれまで報告してきた精製汗抗原とほぼ完全な交差性を示した。MGL\_1304は汗中、またはマラセチア培養上清中では17 kDaの蛋白として存在するが、マラセチア菌体内では29 kDaであり、菌体外に分泌される際に一部が切断されていると考えられた(図4)。またマラセチアの上清や菌体破砕物をcrudeの状態免疫プロットを行うと、MGL\_1304は他の多くのIgE結合蛋白に隠れてしまい、検出できなかった。

#### D. 考察

これまでAD患者における*Malassezia globosa*の主要

抗原は42 kDaの蛋白と言われていたが、我々の検討では汗中のヒスタミン遊離活性はその分子量の範囲には存在しない。またMGL\_1304に対するヒスタミン遊離活性とマラセチア特異的IgE抗体価の相関は弱いことから、MGL\_1304に対する過敏性は、単なるマラセチアアレルギーとは異なる。

E. 結論

ヒト汗中に含まれるMGL\_1304は高いヒスタミン遊離活性を持ち、ADにおける重要な悪化因子と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiragun T, et al. Fungal protein MGL\_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 132: 608-615, 2013.

Hiragun M, et al. Elevated serum IgE against MGL\_1304 in patients with atopic dermatitis and cholinergic urticaria. *Allergol Int*, *in press*.

2. 学会発表

Hiragun M, et al. Establishment of a method to quantify the specific IgE against sweat antigen in sera of patients with atopic dermatitis. 第37回日本研究皮膚科学会 2012年12月7-9日 那覇市

Hiragun M, et al. The specific IgE against sweat antigen in sera of patients with allergic diseases. *International Investigative Dermatology* 2013, May 8-11, 2013, Edinburgh, UK.

平郡真記子ほか．精製汗抗原特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第112回日本皮膚科学会総会 2013年6月14-16日 横浜市

平郡隆明．アトピー性皮膚炎における汗抗原の同定とその解析．第10回広島免疫アレルギー研究会 2013年6月28日 広島市

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原の同定とその解析．第3回汗と皮膚の研究会 2013年8月10日 東京都

平郡隆明ほか．アトピー性皮膚炎患者における汗抗原

の同定とその解析．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

平郡真記子ほか．MGL\_1304特異的IgEのELISA法の確立とその臨床的意義の検討．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013年11月28-30日 東京都

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

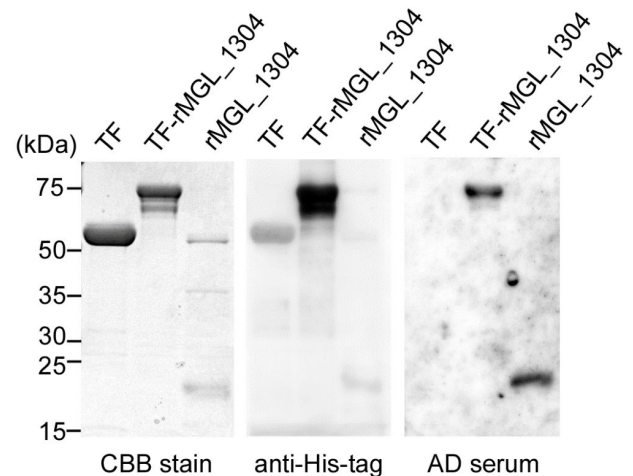


図1 組換え蛋白のクマシー染色、Hisタグ抗体、AD患者血清でのウエスタンブロット。AD患者血清のIgEはMGL\_1304に結合した(右)。

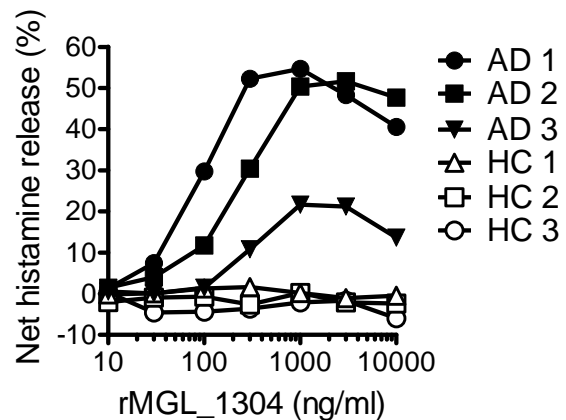


図2 組換えMGL\_1304によるAD患者および健常人(HC)末梢血好塩基球を用いたヒスタミン遊離試験。AD患者

血球 (AD 1-3) はMGL\_1304添加によりヒスタミン遊離を起すが、健康人血球 (HC 1-3) は起こさなかった。

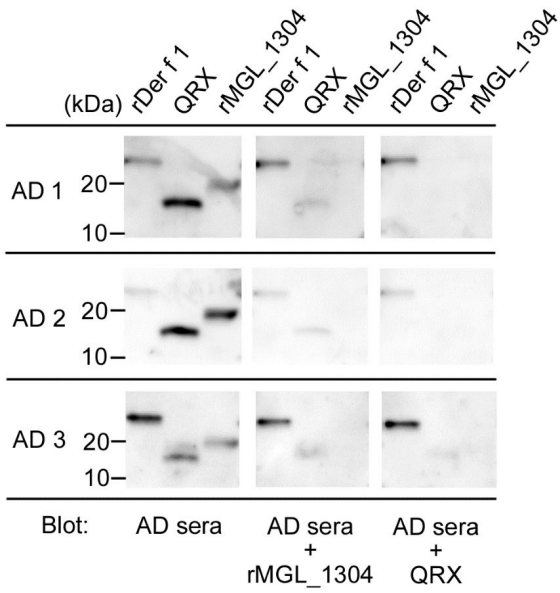


図3 組換えMGL\_1304 (rMGL\_1304)は精製汗抗原(QRX)と交差する。

AD患者血清をrMGL\_1304で前処理すると、QRXに対するIgEの結合が減弱し(中央)、逆にAD患者血清をQRXで前処理すると、rMGL\_1304に対するIgEの結合が消失する。

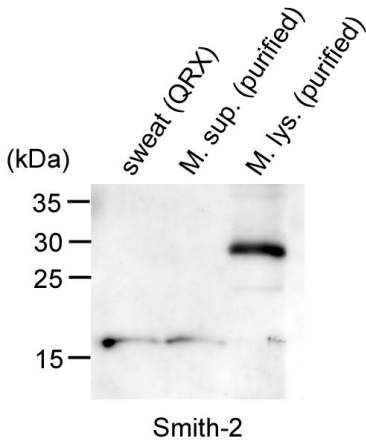


図4 汗中、*M. globosa*培養上清中、*M. globosa*菌体内のMGL\_1304を汗抗原特異的モノクローナル抗体(Smith-2)で免疫プロットを行った。MGL\_1304は、汗中、培養上清中では17 kDa、菌体内では29 kDaを示す。

## アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析とアトピー性皮膚炎が睡眠や就労に与える影響に関する研究

分担研究者 佐伯秀久 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎(AD)は強い痒みを伴うことが特徴であり、そのために睡眠障害を来すことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中のAD患者にアンケート調査を実施し、ADが睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。仕事の生産性および活動障害(WPAI)に関する質問票のなかで、ADを対象としたもの(WPAI-AD)の日本語版の有用性を確認した後、慈恵医大病院皮膚科通院中のAD患者にアンケート調査を実施した。WPAIには対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの(WPAI-PSO)が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者213名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度(TWPI)は $27.2 \pm 24.6\%$ で、乾癬の重症度スコア(PASI)と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度(TAI)は $35.9 \pm 27.8\%$ で、やはりPASIと有意な正の相関を認めた。次に、WPAI-ADの日本語版の有用性が確認され、WPAIのホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中のAD患者112名に対してアンケート調査を実施した。AD患者のTWPIは $32.8 \pm 23.7\%$ で、ADの重症度スコア(SCORAD)と有意な正の相関が認められた。ADにおけるTAIは $42.9 \pm 25.2\%$ で、やはりSCORADと有意な正の相関を認めた。今回の解析結果から、AD患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。また、AD患者の睡眠の障害度(PSQI)は $7.3 \pm 2.8$ で、SCORADや皮膚疾患特異的QOLスコア(DLQI)と有意な正の相関が認められた。以上より、AD患者では重症なほど睡眠の質も低下することが示された。なお、Th17細胞から産生されるサイトカインであるIL-22の遺伝子多型解析の結果、乾癬患者とは有意な相関を認めたが、AD患者とは有意な相関を認めなかった。

### 研究協力者

石地尚興 東京慈恵会医科大学皮膚科准教授  
石氏陽三 東京慈恵会医科大学皮膚科助教  
堀田健人 東京慈恵会医科大学皮膚科  
佐藤純子 東京慈恵会医科大学皮膚科  
東福有佳里 東京慈恵会医科大学皮膚科

ことがしばしばある。さらに、痒みと睡眠障害により仕事に影響が出る事例も稀ならず見受けられる。そこで、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者にアンケート調査を実施し、アトピー性皮膚炎が睡眠の質や就労に与える影響を詳細に検討することにした。

### A. 研究目的

(1) アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析では、平成20~22年度において、東大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者119名よりサンプル採取および背景情報を取得した。平成23~25年度は、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者よりサンプル採取および背景情報を取得した後、理化学研究所に送付し、遺伝子解析を引き続き行うことにした。

(2) アトピー性皮膚炎は強い痒みを伴うことが特徴であり、そのために睡眠障害を来す

### B. 研究方法

(1) 東京慈恵会医科大学附属病院皮膚科を通院中のアトピー性皮膚炎患者100名を目標に、文書で本研究に対して同意を得た患者から血液検体、アンケート票(「医師調査票」とISSAC13-14を元に作成した「患者アンケート票」)を回収し解析する。血液検体は理化学研究所に送付し、遺伝子解析を行う。

(2) 慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者112名を対象に、仕事の生産性および活動障害(WPAI)に関する質問票とピ

ツツバーク睡眠質問票 (PSQI) を用いた調査を実施した。

### C. 研究結果

(1) 東京慈恵会医科大学皮膚科では、平成25年1月8日現在、アトピー性皮膚炎患者84名および対照疾患としての乾癬患者90名よりサンプル採取および背景情報を取得し、理化学研究所に検体を送付した。また、IL-22 遺伝子多型解析で、乾癬患者とは有意な相関を認めしたが、アトピー性皮膚炎患者とは有意な相関を認めなかった。

(2) WPAI には対照疾患としての乾癬患者を対象としたもの (WPAI-PSO) が既にあるので、本研究に先立ち、乾癬患者213名を対象に同様のアンケート調査を実施した。乾癬患者の総合的な労働生産性の障害度 (Total Work Productivity Impairment: TWPI) は  $27.2 \pm 24.6\%$  で、乾癬の重症度スコア (Psoriasis Area and Severity Index: PASI) と有意な正の相関が認められた。乾癬患者における日常の諸活動の障害度 (Total Activity Impairment: TAI) は  $35.9 \pm 27.8\%$  で、やはり PASI と有意な正の相関を認めた。また、 $PASI < 10$ ,  $10 \leq PASI \leq 20$ ,  $20 < PASI$  の3群で比較すると、PASI の高値群ほど TWPI, AI とともに値が高くなり、 $20 < PASI$  群とそれ以外の群の間では有意差が認められた。

次に、アトピー性皮膚炎を対象とした WPAI (WPAI-AD) の日本語版の有用性が確認され、WPAI のホームページにも掲載されたので、慈恵医大病院皮膚科通院中のアトピー性皮膚炎患者112名に対してアンケート調査を実施した。アトピー性皮膚炎患者の TWPI は  $32.8 \pm 23.7\%$  で、アトピー性皮膚炎の重症度スコア (SCORing of Atopic Dermatitis: SCORAD) と有意な正の相関が認められた。アトピー性皮膚炎における TAI は  $42.9 \pm 25.2\%$  で、やはり SCORAD と有意な正の相関を認めた。また、 $SCORAD < 20$ ,  $20 \leq SCORAD < 40$ ,  $40 \leq SCORAD$  の3群で比較すると、SCORAD の高値群ほど TWPI, AI とともに値が高くなり、 $40 \leq SCORAD$  群とそれ以外の群の間で有意差が認められた。

アトピー性皮膚炎患者の睡眠の障害度 (PSQI) は  $7.3 \pm 2.8$  で、SCORAD や皮膚疾患特異的 QOL スコア (DLQI) と有意な正の相関が認められた (DLQI との相関の方がより強かつ

た)。また、 $SCORAD < 20$ ,  $20 \leq SCORAD < 40$ ,  $40 \leq SCORAD$  の3群や、 $DLQI < 5$ ,  $5 \leq DLQI < 10$ ,  $10 \leq DLQI$  の3群で比較すると、SCORAD や DLQI の高値群ほど PSQI の値が高くなり、有意差を認めた。さらに、PSQI の下位尺度でサブ解析をしたところ、SCORAD とは主観的な睡眠の質や入眠時間が、DLQI とは主観的な睡眠の質や入眠時間に加えて、睡眠効率、睡眠困難、日中の眠気が有意に相関した。

### D. 考察

(1) 乾癬は炎症性角化症に属する Th1/Th17 優位の皮膚疾患で、Th2 優位であるアトピー性皮膚炎の対照疾患として比較されることが多い。IL-22 は Th17 細胞から産生されるサイトカインで、乾癬の病態に重要な役割を果たすと考えられている。アトピー性皮膚炎でも Th17 細胞の関与が報告されているが、今回の解析結果からは、IL-22 は乾癬でより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) 乾癬患者では重症なほど労働生産性が低下していることが確かめられた。また、アトピー性皮膚炎患者においても、労働生産性は乾癬患者と同等もしくは若干強く障害されており、やはり重症なほど労働生産性の低下が強いことが明らかとなった。また、アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠の質も低下することが示された。SCORAD に比べて DLQI は PSQI とより強く相関しており、夜間の痒みや搔破行動以外に、気分の障害もアトピー性皮膚炎患者における睡眠障害に関与している可能性が示唆された。今後はアトピー性皮膚炎患者における気分の障害と睡眠障害との関連についても検討する必要がある。

### E. 結論

(1) 今回の遺伝子多型解析結果から、IL-22 はアトピー性皮膚炎よりも乾癬でより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) アトピー性皮膚炎患者では重症なほど労働生産性や睡眠の質が低下することが示された。

### F. 健康危惧情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

(1) 佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純子、東福有佳里、中川秀己：アトピー性皮膚炎患者では重症なほど睡眠の質が低下する .第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会、名古屋、2013 年 11 月 2-3 日

(2) 佐伯秀久、谷野千鶴子、石地尚興、石氏陽三、佐藤純子、東福有佳里、中川秀己：アトピー性皮膚炎患者では重症なほど労働生産性や日常活動が低下する .第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2013 年 11 月 28-30 日

## 2. 論文発表

(1) Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genetic polymorphisms in the *IL22* gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. J Dermatol Sci 71: 148-50, 2013.

(2)Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiujji Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with atopic dermatitis. J Dermatol 40: 736-9, 2013.

(3) Hayashi M, Saeki H, Ito T, Fukuchi O, Umezawa Y, Katayama H, Tanito K, Igarashi A, Etoh T, Hasegawa T, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with psoriasis. J Dermatol Sci 72: 188-91, 2013.

(4)Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiujji Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on sleep quality in Japanese patients with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 72: 195-7, 2013.

H . 知的財産権の出願・登録状況 なし



## 分担研究報告書

### アトピー性皮膚炎のかゆみと関連する生理活性物質の同定及び日常生活におけるかゆみ対策の気づきと実践

研究分担者 菅谷 誠 東京大学大学院医学系研究科 皮膚科学 准教授

#### 研究要旨

アトピー性皮膚炎のかゆみと関連する生理活性物質を同定するため、患者の血清を採取し、ガストリン放出ペプチドと、autotaxinの濃度を測定した。アトピー性皮膚炎患者血清ではGRP、ATXの値が上昇しており、両者はかゆみのスコアと有意に相関していた。これらの物質は、アトピー性皮膚炎患者におけるかゆみのメカニズムの一部を説明できる可能性があると考えられ、治療の新たなターゲットになることが期待される。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、アトピー性皮膚炎のかゆみと関連する生理活性物質を同定し、治療に役立てることである。これまで同様にアトピー性皮膚炎患者の血清を採取し、脊髄でのかゆみ経路に重要であるとの報告があるガストリン放出ペプチド (GRP) と、胆汁うっ滞に伴うかゆみに関係するとされる autotaxin (ATX) の血清中濃度を測定することにした。

#### B. 研究方法

当科アトピー外来に通院中の患者および合併症のない皮膚良性腫瘍切除目的の患者 (正常人コントロール) から血清を採取した。アトピー性皮膚炎の重症度は Physician Global Assessment (PGA) および Eczema Area and Severity Index (EASI) で評価し、痒みの程度を Numerical Rating Scale (1-10) で数値化した。血清GRP値は Phoenix Pharmaceuticals社のGRP EIA kit、血清ATX

値は R&D systems社の Quantikine Human ENPP-2/Autotaxin ELISA kit を用いて測定した。またアトピー性皮膚炎の生検皮膚5検体、健常

皮膚6検体を Phoenix Pharmaceuticals社の抗 human GRP抗体及び Abcam社の抗 PGP9.5抗体で染色した。血清値の検定は Mann-Whitneyの U-test を用い、相関の検定にはスピアマンの順位相関を用いた。

(倫理面への配慮)

患者血清を用いる本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得ている。人権擁護には十分配慮し、採血、生検時には患者より書面にてインフォームド・コンセントを得ている。

#### C. 研究結果

アトピー性皮膚炎患者の血清 GRP 値は  $3.11 \pm 0.98$  ng/ml であり、健常人コントロールの  $2.00 \pm 0.58$  ng/ml と比べて有意に高値であった ( $P < 0.001$ )。また血清 GRP 値とかゆみの Numerical Rating Scale は有意に相関していた (相関係数 =  $0.725$ ,  $P < 0.01$ )。アトピー性皮膚炎の病変皮膚、健常皮膚ともに GRP 陽性 PGP9.5 陽性の神経線維を真皮に認めたが、アトピー性皮膚炎病変部のほうが有意に多くの GRP 陽性神経線維を認めた (100倍視野あたり  $5.0 \pm 1.2$  v.s.  $2.7 \pm 0.8$ )。

次に ATX について解析したところ、アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $74.8 \pm 12.3$  pg/ml で

あり、健常人 ( $32.9 \pm 5.9$  pg/ml) と比べて有意に高値であった ( $P < 0.01$ )。男性アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $43.1 \pm 6.9$  pg/ml で、健常人男性 ( $24.9 \pm 7.4$  pg/ml) と比べて有意に高く ( $P < 0.05$ )。女性アトピー性皮膚炎患者の血清 ATX 値は  $132.3 \pm 24.4$  pg/ml で、健常人女性 ( $37.3 \pm 8.1$  pg/ml) より有意に高かった ( $P < 0.01$ )。次に年齢別に解析したところ、ATX 値は年齢が上がると共に減少する傾向にあった。さらに血清 ATX 値は PGA による病勢評価で重症例ほど値が高く、EASI と有意な相関を認めた (相関係数 = 0.43、 $P < 0.05$ )。また血清 ATX 値とかゆみの Numerical Rating Scale は有意に相関していた (相関係数 = 0.44、 $P < 0.05$ )。

#### D . 考察

アトピー性皮膚炎患者の血清において、GRP、ATX の値が上昇しており、両者はかゆみのスコアと有意に相関していた。アトピー性皮膚炎のかゆみの機序は複雑であり、様々な細胞が関与していると考えられている。興味深いことに、今回測定した GRP、ATX は生理学的に多様な機能をもっていることが報告されており、特に神経系における働きが知られている。これらの物質が、アトピー性皮膚炎患者におけるかゆみのメカニズムの一部を説明できる可能性があると考えられた。

#### E . 結論

血清中のかゆみと相関する生理活性物質として、GRP と ATX が候補になりうると考えられた。これらの物質はかゆみの治療の新たなターゲットになることが期待される。

#### F . 健康危険情報

特になし。

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

Kagami S, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Tsunemi Y, Sato S. Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 133: 1673-5, 2013.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Kagami S, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum visfatin levels in patients with atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 23: 629-35, 2013.

Nakao M, Sugaya M, Suga H, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum autotaxin levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* in press.

##### 2. 学会発表

特になし

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。

## 分担研究報告書

### マウスモデルを用いた掻痒発現機序の解析と治療戦略の構築

研究分担者 稲垣 直樹 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 教授

研究協力者 田中 宏幸 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 准教授

研究協力者 山下 弘高 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 助教

#### 研究要旨

皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトは種々の刺激に際して様々な因子を産生し、皮膚の炎症や掻痒の誘発、増強においても重要な役割を演じると推定される。したがって、表皮ケラチノサイトを標的とし、炎症あるいは掻痒の発現に関わる因子の発現を制御することは炎症の軽減、掻痒の抑制に有効であると推定される。これまでの検討において、2,4-dinitrofluorobenzene を反復塗布したマウスでは、NGF mRNA 発現が増大し、神経線維が表皮内へ多数侵入することを確認している。また、tacrolimus 投与が神経線維の表皮内侵入を抑制するとともに、掻破行動を減少させることから、表皮ケラチノサイトの NGF 発現を抑制し、神経線維の表皮内伸長を抑制することが掻痒の抑制に有効性を発揮する可能性が示唆される。一方、siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対の二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊する。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、標的への送達に関して活発に研究が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、siRNA 外用による適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、NGF 特異的な siRNA を用い、NGF の遺伝子発現を制御することによる掻痒の制御戦略、さらにはアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試み、NGF mRNA 発現を抑制する可能性を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度はさらに信頼性の高い成績を得ることを目標に検討を行った。

(1) マウス TNF- $\alpha$  を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。100 ~ 1,000 ng の TNF- $\alpha$  は強力に NGF mRNA 発現を誘導し、300 ng を用いた経時変化の検討では、6 時間後の NGF mRNA 発現の誘導が最も強く、安定していた。(2) これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種の効果を比較した。TNF- $\alpha$  注射による NGF mRNA 発現の抑制は、InvivoFectamine2 を 5  $\mu$ g の siRNA と混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。1  $\mu$ g の siRNA を用いた場合の抑制も 5  $\mu$ g の場合と同程度であり、強力であった。(3) NC/Nga マウスに TNF- $\alpha$  を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、InvivoFectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および InvivoFectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および InvivoFectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

本年度の検討結果から、トランスフェクション試薬としては InvivoFectamine2 が適していること、siRNA を InvivoFectamine2 と共に注射することにより、NGF mRNA 発現を抑制できることが確認された。今後は、外用による有効性を確実にするための条件の検討が必要である。

#### A. 研究目的

掻痒はアトピー性皮膚炎患者の最も重要な症状であり、誘発される掻破行動は皮膚症状を増悪する重要な因子である。表皮ケラチノサイトは皮膚表層にあって種々の刺激によってさまざまな因子を産生し、皮膚炎や掻痒の誘発、増強にも関わると推定される。これまでに、2,4-dinitrofluorobenzene を反復暴露するこ

とにより、高頻度の掻破行動を伴うマウス皮膚炎モデルを確立し、tacrolimus が表皮ケラチノサイトの神経成長因子 (NGF) 産生抑制を介して掻破行動を抑制する可能性を示した。一方、siRNA (small interfering RNA) は 21-23 塩基対の二本鎖 RNA であり、塩基配列特異的に mRNA を破壊する。生体への siRNA の適用は難しいとされており、安定性、生体内標的への送達法について

活発に検討が進められているが、皮膚表層に存在する表皮ケラチノサイトを標的とすること、患者皮膚ではバリアの機能が脆弱であると考えられることから、表皮ケラチノサイトを標的とする siRNA 外用によるアトピー性皮膚炎治療への適用の可能性が期待される。一昨年の検討では、NGF 特異的な siRNA を用い、NGF の遺伝子発現を制御することによる掻痒およびアトピー性皮膚炎の治療戦略の構築を試み、NGF mRNA 発現の抑制を示唆する成績を得たが、抑制の強度、信頼性に問題があることが判明した。そこで、本年度は信頼性の高い成績を得ることを目標に、さらに検討を加えた。

## B. 研究方法

TNF- $\alpha$  による NGF mRNA 発現の誘導: 雄性 ICR マウスあるいは雌性 NC/Nga マウスの耳殻へマウス TNF- $\alpha$  溶液 20  $\mu$ l を注射して NGF mRNA 発現を誘導した。これまでの検討ではヒト TNF- $\alpha$  を用いてきたが、本検討ではマウス TNF- $\alpha$  を使用した。

ダニ抗原反復曝露による皮膚炎: 雌性 NC/Nga マウスの両耳殻の表裏に、培養したコナヒョウヒダニ排泄物から調製した抗原 (ダニ抗原) 溶液 (10 mg/ml) を 25  $\mu$ l ずつ、計 100  $\mu$ l を週 2 回、計 9 回塗布して皮膚炎を誘発した。

siRNA およびトランスフェクション試薬: siRNA はこれまでの検討で、NGF mRNA 発現抑制効果が最も強力であることが確認されている市販のものを使用した。トランスフェクション試薬はこれまで用いてきたものが販売中止になったこと、その効果が不確かであることが分かったことから、新たに 3 種の市販の試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 を購入して使用した。siRNA はトランスフェクション試薬と混和し、溶液を耳殻へ注射した。また、皮膚炎モデルの実験では siRNA およびトランスフェクション試薬をクリームに混和して耳殻へ塗布した。

NGF mRNA の評価: mRNA の評価には real-time RT-PCR 法を用いた。

## (倫理面への配慮)

動物を使用する実験はすべて岐阜薬科大学における動物実験の実施に関する規程にしたがい、実験計画を委員会に提出して審査、承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

(1) マウス TNF- $\alpha$  の NGF mRNA 発現誘導効果の確認: マウス TNF- $\alpha$  100 ~ 1,000 ng を ICR マウスの耳殻へ注射し、6 時間後の NGF mRNA 発現を検討した。いずれの用量の TNF- $\alpha$  によっても強力な NGF mRNA 発現が誘導された。また、300 ng の TNF- $\alpha$  を注射し、経時的に mRNA 発現を検討し、6 時間後の mRNA 発現の誘導が最も強力で、安定していた。

(2) トランスフェクション試薬の比較: これまでの検討から、有効性が確認されている NGF 特異的 siRNA を用い、トランスフェクション試薬 3 種を用いて mRNA 発現抑制効果を比較した。300 ng TNF- $\alpha$  注射による 6 時間後の NGF mRNA 発現の抑制は、Invivofectamine2 を 5  $\mu$ g の siRNA に混和して注射した場合に認められ、抑制は強力であった。一方、Safetrans および InvivojetPEI を用いた場合には mRNA 発現には抑制は認められなかった。また、Invivofectamine2 を用い、1  $\mu$ g および 5  $\mu$ g の siRNA の mRNA 発現抑制効果を比較した結果、いずれの用量によっても同程度の強い抑制が認められた。

(3) NC/Nga マウスを用いた検討: NC/Nga マウスに TNF- $\alpha$  を注射して誘発する NGF mRNA 発現も、Invivofectamine2 に混和した siRNA の注射によって強く抑制された。一方、NC/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布して誘発する皮膚炎においても NGF mRNA 発現の増大が認められるが、NGF mRNA 発現は、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した場合には抑制されなかった。siRNA および Invivofectamine2 を混和して注射した場合には抑制が認められた。

## D. 考察

本年度の検討では、以前の検討において、real-time RT-PCR によって得られる siRNA の mRNA 発現抑制効果の成績の信頼性が低いことが懸念されたことから、これまで用いてきたヒト TNF- $\alpha$  をマウス TNF- $\alpha$  に改め、また、トランスフェクション試薬を 3 種入手して有効性の高い試薬を選択した。

siRNA による RNAi の手法は確立されたものであり、多くの in vitro の研究で遺伝子発現をノックダウンする手法として繁用されている。一方、in vivo への適用に関しては、siRNA の体内での安定性、標的組織、細胞への送達、などに解決すべき問題があり、生体への応用はほとんど進んでいない。したがって、トランスフェクション試薬に関しても、in vivo における使用実績が示されているものはなく、今回は、市販の 3 種の試薬について in vivo での有効性を比較した。

ヒト TNF- $\alpha$  をマウス TNF- $\alpha$  におきかえた場合でも、ICR マウス耳殻へ注射することによって、ほぼ同様の条件下、明らかな NGF mRNA 発現の誘導が確認できたため、以下の検討にはマウス TNF- $\alpha$  を使用した。また、比較検討した 3 種のトランスフェクション試薬、Safetrans、InvivojetPEI および Invivofectamine2 の中では、Invivofectamine2 を使用した場合にのみ、siRNA による強い mRNA 発現抑制効果が認められたことから、以下の検討では Invivofectamine2 を使用した。検討には適切なトランスフェクション試薬を選択することも重要と思われる。また、これまでの検討では、市販の NGF 特異的 siRNA 3 種を in vitro の実験系において比較検討し、最もノックダウン効果の強い siRNA を選択して使用してきたが、siRNA の選択、さらにはトランスフェクション試薬

との組み合わせも考慮すべきと思われる。

アトピー性皮膚炎患者皮膚への適用の可能性を探るため、NC/Nga マウスのダニ抗原反復塗布による皮膚炎モデルを用い、siRNA および Invivofectamine2 をクリームに混和して塗布した。siRNA および Invivofectamine2 の注射は NC/Nga マウスにおいても TNF- $\alpha$  注射による NGF mRNA 発現を強く抑制するが、皮膚炎モデルにクリームに混和して塗布した場合には抑制は認められなかった。皮膚炎モデルの場合でも、siRNA および Invivofectamine2 を注射した場合には抑制効果が認められたことから、siRNA および Invivofectamine2 が標的組織へ到達すれば効果を発揮することが明らかであると考えられる。

siRNA は巨大な分子であるため、皮膚から透過させることに限界があることは考慮すべきと思われるが、蛍光標識した siRNA の皮膚透過性を検討した予備的な成績では、クリームに混和することで Invivofectamine2 が効果を示さなくなる可能性が推定されている。溶媒を変えた場合の皮膚透過性についても検討することが必要と思われる。

これまでは、耳殻全体として mRNA 発現を検討してきたが、表皮ケラチノサイトを標的とする検討であるため、表皮を分離して評価することにより、よりの確な成績が得られるものと考えられる。また、表皮ケラチノサイトは皮膚最外層に位置するため、外用した siRNA の効果が得られやすい可能性も考えられるため、表皮ケラチノサイトの mRNA 発現に対する効果を区別して確認することも必要と思われる。

## E. 結論

本年度の検討では、siRNA をトランスフェクション試薬 Invivofectamine2 と組み合わせることにより、また、確実に組織へ注入することによって標的 mRNA 発現を強く抑制できることを確認した。アトピー性皮膚炎患者皮膚への外用を目標としているため、今後は、皮膚バリアが破綻している皮膚炎モデルマウス等を用い、溶媒を選択し、また、表皮を分離して表皮ケラチノサイトに対する効果を明らかにする検討を実施したい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamashita H, Makino T, Inagaki N, Nose M, Mizukami H: Assessment of relief from pruritus due to Kambo medicines by using murine model of atopic dermatitis. J Trad Med 30: 114-123, 2013.2.

### 2. 学会発表

稲垣直樹: アトピーの慢性化と最新研究について. アレルギーケアフォーラム, 東京, 2013.6.13.

稲垣直樹: アトピー性皮膚炎とかゆみ. 日本薬学図書

館協議会研究集会, 名古屋, 2013.8.8.

## 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

特になし

## 分担研究報告書

### 小児アトピー性皮膚炎に対する Proactive 治療、かゆみと QOL に関する研究

研究分担者	大矢 幸弘 (独)国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科医長
研究協力者	樺島 重憲 (独)国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 アレルギー科
	夏目 統 同上
	近藤 麻伊 同上
	山本 貴和子 同上
	成田 雅美 同上

#### 研究要旨

本研究では、アトピー性皮膚炎(AD: atopic dermatitis)の乳児にproactive療法を施すことにより、食物アレルギーの発症が抑制されるか、ADの乳児に、乳児期早期より抗原蛋白を摂取させることで食物アレルギーの発症が抑制されるかの2点を明らかにするため、卵アレルギーをテーマとするランダム化二重盲検介入研究に取り組んでいる。昨年度までに、研究計画の立案、介入のための試験用食品(卵含有粉末およびプラセボ粉末)を開発した上で、研究参加者のリクルートを開始した。

本年度、リクルートを進め、研究登録目標数200名のところ、これまでに83名の登録者を得、このうち50名について、primary outcomeである加熱全卵粉末を用いた経口食物負荷試験が終了した(平成26年1月24日現在)。現時点での負荷試験の陽性率は22.0%と、研究計画の想定から大きく外れない結果となっている。また、試験用食品摂取によるアレルギー症状の誘発など、問題となる有害事象は見られていない。研究は総じて順調に進行しており、早期の研究終結を目指して、リクルートの加速を進めている。これと併せて、研究に参加した患児の皮膚のコントロール状態について検討し、proactive療法が有効かつ安全な治療法であることを、乳児における前方視データとして確認できた。

本年度はこの他、ADおよびその治療法が、患児と保護者のQOL(quality of life)に与える影響について調べた。当センターで加療されているAD患児300名を対象として、外来で質問紙による調査を実施した(回収率は77.0%)。一元配置の分散分析(Turkey HSD)を行ったところ、ステロイド使用の有無や方法と、皮膚のコントロール状態との間に一定の相関が認められたものの、患児・保護者のQOLの間には、明確な相関は見られなかった。これは調査対象者の多くが、適切な治療を受けるようになって一定期間を経過しており、治療によらず皮膚症状が安定していることが一因と思われた。

#### A. 研究目的

##### 1. PETIT研究

アトピー性皮膚炎(AD: atopic dermatitis)は、慢性的に皮膚炎を繰り返し、患者のQOL(quality of life)を著しく損なう。ステロイド外用薬の長期間欠塗布(proactive療法)は、ADを寛解状態に導入・維持することが可能で、その有効性と安全性が認知されつつある。また、AD患児では高率に即時型食物アレルギー(FA: food allergy)の合併が見られるが、G. Lackらはこれを説明する二重暴露仮説を提唱している。この仮説では、炎症を有する皮膚への食物抗原の暴露が経皮感作を進める一方、経口摂取による消化管への暴露が免疫寛容を誘導するとされている。この仮説を支持するように、近年、乳児期における抗原蛋白の早期摂取開始が食物

アレルギーを減少させるとする観察研究の報告が相次いでいる。これらを背景に本研究では、ADの乳児にproactive療法を施すことにより、卵アレルギーの発症が抑制されるかADの乳児に、乳児期早期より卵抗原蛋白を摂取させることで卵アレルギーの発症が抑制されるか、の2点について検討を行っており、PETIT(Prevention of Egg allergy with Tiny amount InTake)研究と称している。

昨年度までに、PETIT研究の研究計画を立案するとともに、被験者に摂取させる試験用食品(卵含有粉末およびプラセボ粉末)の開発を行って、リクルートを開始した。本年度は、リクルートを進めるとともに、乳児ADにおけるproactive療法の有効性について前方視的に検討した。また、小児AD患者とその家族のQOLについて、ADの治療法やADのコントロール状態等との関係

を、質問紙を用いて調べた。

## B. 研究方法

### 1. PETIT 研究

図1に研究の概略を示す。特に基礎疾患のない生後6ヶ月未満のAD患児をリクルートし、1歳まで卵の完全除去を指示する。生後6ヶ月-1歳の間、卵含有粉末を連日摂取する卵タンパク群(100例)と、カボチャとブドウ糖粉末からなるプラセボ粉末を連日摂取するプラセボ群(100例)とに分け、二重盲検ランダム割り付けによる前方視介入研究を実施する。この間の湿疹の治療は、proactive療法か、湿疹憎悪時のみステロイド外用薬を使用するreactive療法かのいずれかを行う。1歳時に、卵1/2個相当の加熱全卵粉末を摂取させる経口食物負荷試験(FC: food challenge)を実施して卵アレルギーの有無を判定し、卵アレルギーの発症率と、卵の摂取開始時期や湿疹の治療法、皮膚炎のコントロール状態との関係を調べる。ADの治療方針については、患児の保護者の意向も考慮する必要があり、ランダム割り付けが困難であるため、サブグループ解析を行って、その影響を調べることにしている。介入期間中の皮膚の状態は、SCORADおよびPOEM(Patient-Oriented Eczema Measure: 養育者による子どもの湿疹評価)、血清TARC値を参考に評価する。

リクルートの対象は、当センターを受診したAD乳児の他、一般病院・開業医を受診したAD乳児、東京都内の3-4ヶ月乳児健診でADの可能性を指摘された乳児などである。当センターでADと確定診断した後、症例登録を行った。

### 2. AD患児と保護者のQOL調査

当センターで加療中のAD患児300名を対象に、外来受診時に質問紙を配布し、記入後回収する形で調査を行った。調査内容は、ADの治療法(保湿のみ/reactive/proactive)の他、受診時のPOEM、患児のQOLを問う

IDQLI (Infant's Dermatitis Quality of Life Index: 4歳未満) / CDQLI (Children's Dermatitis Quality of Life Index: 4歳以上)、保護者のQOLを問う QPCAD(Quality of life in Primarycaregivers of Children with Atopic Dermatitis)とした。

## C. 研究結果

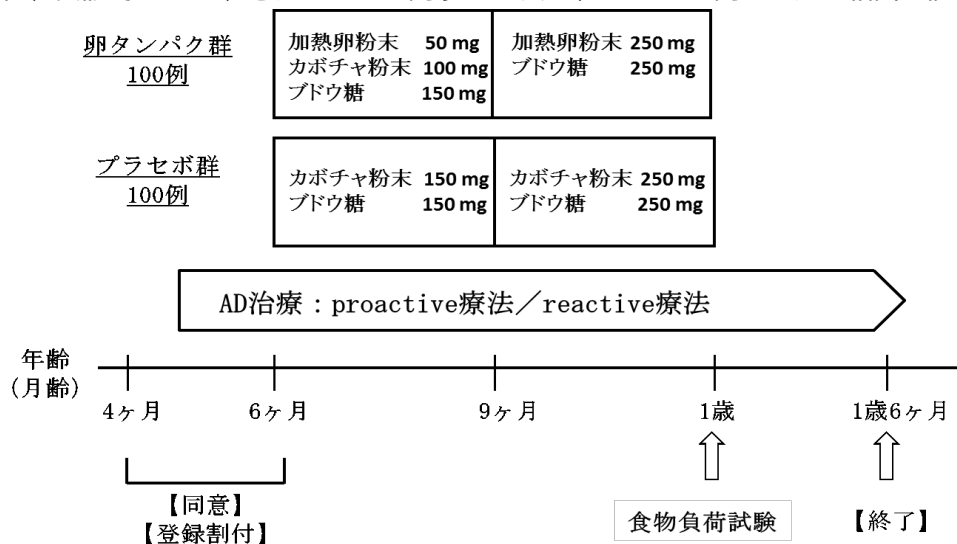
### 1. PETIT 研究

研究登録目標数200名のところ、これまでに83名の登録者を得、このうち50名について、primary outcomeである加熱全卵粉末を用いた経口食物負荷試験が終了した(平成26年1月14日現在)。現時点での1歳時FCの陽性率は22.0%である。研究計画では卵タンパク群7%、プラセボ群20%を想定しており、合わせると14%程度となる。陽性率が、これを下回るようであれば検出率が不足する懸念が生じるが、現在のところやや高めの数値で、想定から大きく外れてもいない。また、試験用食品摂取によるアレルギー症状の誘発など、問題となる有害事象は見られていない。

図2は、AD未治療の状態を受診してPETIT研究に参加し、proactive療法で加療した患児27例のSCORADおよびTARCの経過を示したものである。ほとんどの例で、1歳までにADの皮膚炎が良好にコントロールされ、症状が軽快していることがわかる。図3には1歳時のステロイド外用剤の塗布頻度を示すが、全例で、皮膚の菲薄化を招く可能性が少なくなる3日に1回以上の間隔となっていた。この間、ステロイド外用薬の使用に伴う皮膚感染症などの有害事象が見られた例はない。

### 2. AD患児と保護者のQOL調査

質問紙を回収できたのは、300名中231名(回収率77.0%)であった。図4に回答を得られた患児の属性を示す。一元配置の分散分析(Turkey HSD)を行ったところ、表1に示すとおり、ステロイド使用の有無や方法と、POEMとの間に一定の相関が認められたものの、



※ 介入期間中は、卵成分を含む食物の摂取を制限

図1 PETIT研究の概要

患児・保護者の QOL との間には、明確な相関は見られなかった。

(倫理的配慮) 本研究では、FA 発症の高リスク群である乳児 AD 患者に、早期より抗原蛋白の摂取をすすめている。このため研究遂行に当たっては、初回の摂取量を少量とする、症状発現時には適切な対応ができる体制を整えて摂取させる、といった安全面の配慮をしている。PETIT 研究および AD 患児と保護者の QOL 調査の双方について、当センターの倫理委員会で承認を受け実施している。

#### D. 考察

最初に述べたとおり、抗原蛋白の早期摂取開始が食物アレルギーの発症を抑制するとの報告が近年なされている。例えば、Koplin らは、観察研究を行い、生後 6 ヶ月までに卵摂取を開始した群では、それ以降に摂取を開始した群と比較して卵アレルギーが有意に少ないと報告している。このような知見を、前方視的に確認しようとする取り組みが各国で進められているところである。本研究もその一つに位置づけられ、FA の発症率が非常に高い AD 乳児に着目したところに特徴がある。これまでのところ、問題となる有害事象を見ることなく、1 歳時の卵アレルギーの発症率も想定範囲内であり、研究は順調に進行している。研究の早期終了を目指して、現在リクルートを加速させている。

Proactive 療法の有効性を定量的に示したデータは意外に少ない。今回乳児 AD に対する proactive 療法の有効性と安全性を先方視データにより示すことができた。昨年度の報告で、乳児 AD に対する早期介入の重要性について述べたが、本データが示す通り、罹病期間の短い乳児の AD では治療に対する反応が良好であり、この意味でも早期より proactive 療法による治療を開始する意義は大きいと言える。

PETIT 研究では、FA の発症において最もクリティカルな時期である生後 6 ヶ月前後に注目して、AD 患児の様々なデータを収集している。例えば、マイクロアレイを用いることにより、約 20 種の抗原に対する特異抗体を血中および唾液中で測定している。これらのデータを蓄積して活用することにより、研究の主たる検討内容である卵アレルギーの発症予防以外にも、FA の発症メカニズムについて示唆に富む知見が得られることが期待される。

#### E. 結論

乳児 AD 患者を対象とする卵アレルギー発症予防研究 (PETIT 研究) を遂行中である。登録目標 200 名のところ既登録者が 83 名で、大きな問題なく進行中である。今後、リクルート活動に注力することで登録を加速し、早期の研究完了を目指す。また、本研究で前方視的に収集されたデータにより、proactive が乳児の AD において、有効かつ安全な治療法であることが確認された。平行して、AD 患児における患児・保護者の QOL 調査を 300

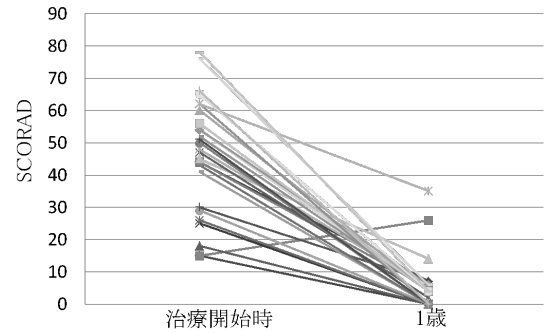


図 2(a) proactive 治療中の SCORAD の変化

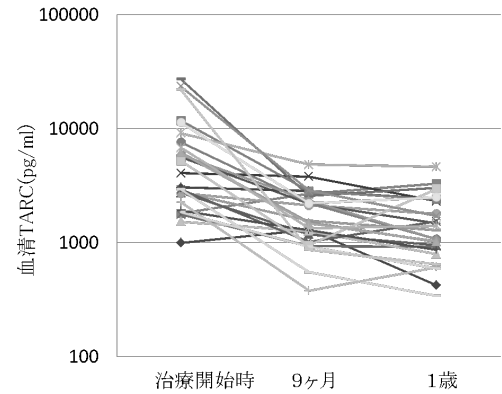


図 2(b) proactive 治療中の血清 TARC 値の変化

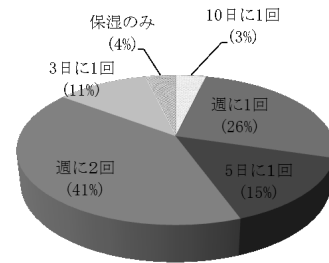


図 3 1 歳時のステロイド外用剤塗布頻度

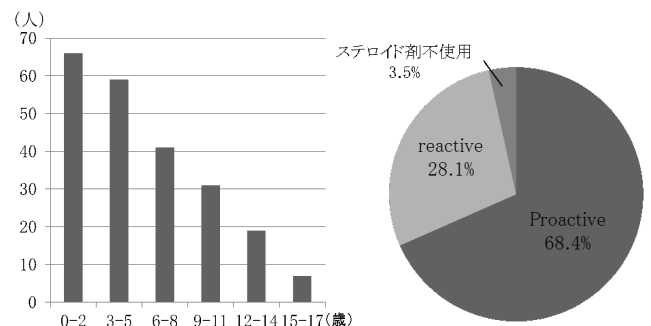


図 4 回答者の年齢分布と AD の治療法

名の患児を対象に実施した。今回の調査では、ステロイド使用の有無や方法と、重症度との関連は見られたが、QOL との関連は確認できなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表(学会発表)

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表 1(a) AD の治療法と皮膚炎・QOL の関係  
(4 歳以上)

	保湿剤のみ	リアクティブ	プロアクティブ	連日
人数	4	39	86	2
痒みのある日	週1日未満	週3-4日	週3-4日	毎日
POEM(0 - 27)	2.50*	5.41*	5.27*	17.00*
CDLQI (0 - 30)	2.25	3.79	5.01	14.00
CPCAD(0 - 27)	15.25	19.44	22.08	20.00
疲労感(0-8)	2.75	3.33	4.09	5.00
不安感(0-12)	6.25	5.79	6.10	4.00
自己効力感(0-8)	6.50*	3.13*	3.09*	3.00*
家族の協力(0-8)	4.00	4.05	3.55	6.00

表 1(b) AD の治療法と皮膚炎・QOL の関係  
(4 歳未満)

	保湿剤のみ	リアクティブ	プロアクティブ	連日
人数	4	25	68	1
痒みのある日	週1日未満	週3-4日	週1-2日	週1-2日
POEM(0 - 27)	2.25*	4.62*	3.14	5.00
CDLQI (0 - 30)	4.00	5.50	4.58	2.00
CPCAD(0 - 27)	18.75	18.00	17.81	6.00
疲労感(0-8)	1.50	1.81	1.99	0.00
不安感(0-12)	7.00	5.15	6.19	1.00
自己効力感(0-8)	2.75	2.54	3.17	6.00
家族の協力(0-8)	4.50	4.03	5.17	7.00

## 分担研究報告書

### ケラチノサイト由来の炎症性サイトカインとアトピー性皮膚炎

研究分担者 浜崎 雄平 佐賀大学医学部小児科学 教授  
研究協力者 山本 修一 佐賀大学医学部小児科学 講師  
研究協力者 谷口 一登 佐賀大学医学部地域医療支援学 助教

#### 研究要旨

我々は H23 および H24 年度の研究により、ヒトケラチノサイト細胞株 KERTr では IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  の刺激により IL-33 mRNA および蛋白発現が誘導されること、oxazolone を用いたマウス接触性皮膚炎モデルにおいて、ケラチノサイトは IL-33 を強く発現することを見出した。anti-IFN- $\gamma$  抗体および anti-TNF- $\alpha$  抗体はいずれも皮膚炎を軽減することを示し、接触性皮膚炎の病態には IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$ 、ケラチノサイトが産生する IL-33 が関与していることを示した。本年度は、IL-33 がどのように接触性皮膚炎に関与しているかを明らかにするために、マウス接触性皮膚炎モデルの皮膚炎局所における好酸球を検討した。顕微鏡にて、コントロールマウスの表皮に比べ皮膚炎マウスのそれは有意に肥厚していた。anti-IL-33 抗体は表皮の肥厚を有意に抑制した。皮膚炎マウスの真皮における好酸球浸潤はコントロールマウスに比べ有意に増加していた。anti-IL-33 抗体はこれを有意に抑制した。以上より、アレルギー性接触性皮膚炎の病態に、ケラチノサイトが産生する IL-33 は真皮への好酸球浸潤を促すことにより関与していると考えられた。

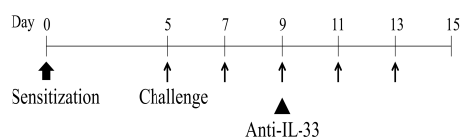
#### A．研究目的

我々はこれまでに、ヒトケラチノサイトにおいて IL-1ファミリーに属するサイトカインの一つ IL-33 が IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  により誘導されること、マウス接触性皮膚炎モデルの表皮では IL-33 が誘導されること、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 TNF- $\alpha$  抗体のみならず抗 IL-33 抗体は IL-33 発現を抑制すると同時に皮膚炎症状を軽減することを示した。以上のことは、IL-33 がアレルギー性接触性皮膚炎の病態に直接的に関与し、IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  は IL-33 を介して関与していることを示唆する。今回の目的は IL-33 がどのように皮膚炎に関与しているかを明らかにすることである。

#### B．研究方法

C57BL/6マウスを用い oxazolone (oxa.) によるアレルギー性接触性皮膚炎モデルを作成した。day 0 に 5% oxa. を腹壁に、day 5 から 2 日おきに 5 回、0.1% oxa. を耳介に反復塗布した。day 9 に抗 IL-33 抗体、またはコントロール IgG を耳介に皮下注射した (図1)。day 15 に耳介の厚さを測定後、耳介を回収、ホルマリン固定パラフィン包埋後、切片を HE 染色

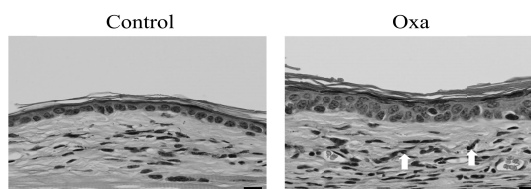
し顕微鏡下に観察した。



#### C．研究結果

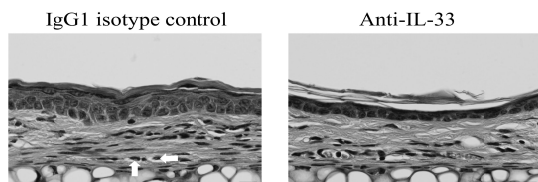
コントロールマウスの耳介と oxa. による皮膚炎モデルのそれには肉眼的な明らかな差は認めなかったが、皮膚炎モデルマウスの耳介はコントロール群のそれと比較し有意に肥厚していた。顕微鏡下でも皮膚炎モデルマウスの表皮はコントロールのそれと比較し肥厚していた (図2)。

図2



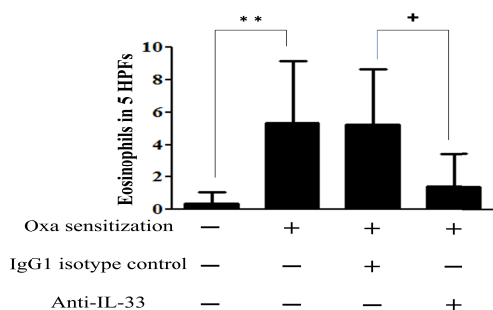
コントロールIgGを皮下注射したマウスの表皮肥厚は抑制されなかったが、抗IL-33抗体を皮下注射したマウスでは抑制された(図3)。

図3



皮膚炎モデルの真皮では有意な好酸球浸潤(白矢印)を認めた。コントロールIgGはこれを抑制しなかったが、抗IL-33抗体はこれを有意に抑制した(図4)。

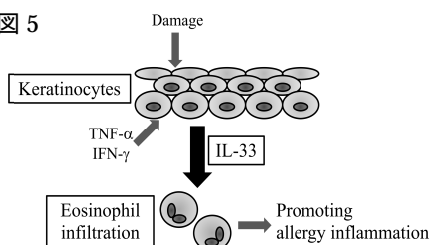
図4



#### D. 考察

oxa. による皮膚炎モデルでは真皮の好酸球数が有意に増加していることより、アレルギー性接触性皮膚炎の病態に好酸球が関与していると考えられる。抗IL-33抗体は耳介の肥厚を有意に抑制し、さらに真皮への好酸球浸潤も抑制した。以上よりIL-33はアレルギー性接触性皮膚炎の病態において好酸球の遊走因子として働いているように見える(図5)。しかし

図5



ながらIL-33は好酸球に対する直接的な遊走活性はないと報告されており、線維芽細胞等でIL-33により誘導されたCCL26等のケモカインが関与している可能性が考えられる。

#### E. 結論

アレルギー性接触性皮膚炎の病態に、ケラチサイトが産生するIL-33は真皮への好酸球浸潤を促すことにより関与していると考えられるが、詳細な機序はさらに検討の必要がある。

#### F. 発表論文

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2013;23(6):428-434

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Blockade of Interleukin-33 attenuates allergic contact dermatitis in model mice: possible mechanism via eosinophil infiltration. *Clin Exp Dermatol Res* 2013;4(3):1000183

**アトピー性皮膚炎のかゆみの発症機序と治療に関する研究**  
**樹状細胞の病態への役割に関する研究**

分担研究者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）

研究協力者 宮野恭平（埼玉医科大学皮膚科助教）

アトピー性皮膚炎(AD)ではウイルスや細菌に対する易感染性が存在するが、この易感染性には IL-4, TARC をはじめとする Th2 サイトカインの産生異常や皮膚のバリア機能異常が関与している。皮膚には樹状細胞があり、外来抗原を認識し、TARC/CCL17 や MDC/CCL22 を産生し、Th2 細胞の浸潤、皮膚症状の悪化に変化に関与する。AD の病態における抗原による樹状細胞の TARC, MDC 産生調節を明らかにした。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)は慢性に経過するアレルギー性疾患であり、乾燥症状や強いかゆみを呈する疾患である。これまでAD患者の血清中のTARC、MDC濃度は重症度と相関しており、その産生細胞として表皮ケラチノサイト、樹状細胞が存在することを報告した。またこれらの細胞は、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ によってその産生を増強した。樹状細胞の外来抗原によるTARC、MDC産生調節を明らかにする。

B. 研究方法

同意の得られたAD患者より末梢血を採血し、単球よりGM-CSF、IL-4、TGF- $\beta$ 存在下に、樹状細胞(DC)を作成した。DCの48時間培養下でのTARC産生を比較検討した。

(倫理面への配慮)本研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行された。

C. 研究結果

AD患者由来のDCのTARC産生は健常人由来のDCのそれと比較して有意に高値を示した

(AD: 平均 49,040pg/mL, 健常人 21,406pg/mL)。AD患者由来のDCのMDC産生は健常人由来のDCのそれと比較して有意に高値を示した(AD: 平均 90,993pg/mL, 健常人 52,115pg/mL)。外来抗原刺激下にDCのTARC産生、MDC産生の調節を検討した。Lipopolysaccharide刺激下でのTARC産生は増加を示した。

D. 考察

AD患者の病態にはIL-4、TARC、MDCなどのTh2サイトカインの関与が指摘されており、AD患者の樹状細胞は有意にTARC、MDC産生を増強することを示した。外来抗原刺激によってこれらのケモカイン産生は調節を受けた。

E. 結論

ADの病態に関与するTh2ケモカインは、抗原刺激によってDC由来のTARC産生、MDC産生が調節を受けており、皮膚炎の増悪に関与する可能性が示された。将来的な治療の標的となる可能性が示された。

## 参考文献

Hashimoto S, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Tsunemi Y, Saeki H, Tamaki K. Monocyte derived chemokine (MDC) /CCL22 reflects disease activity in patients with atopic dermatitis. J Dermatol Sci 44(2), 93-9, 2006.

## F.健康危険情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

中村晃一郎 . 負荷試験の実際 2013 薬物アレルギー負荷テスト . 小児内科 . 45 (5), 987 - 988 , 2013 (05)

中村晃一郎 . ステロイド外用薬の薬理学・薬物動態学的視点 . ステロイド外用薬の構造と薬理活性 . 薬局 (64(6): 1885-1888, 2013(5)

### 2. 学会発表

中村晃一郎 . アトピー性皮膚炎と外用療法 . 治療のモチベーション持続の工夫 . 日本臨床皮膚科医会雑誌 . 30 (2)203, 2013

## H.知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

## アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー  
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所 統合生命医科学研究センター  
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム 研究員

### 研究要旨

本研究は遺伝子多型解析を用いてアトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。本年は共同研究先であるドイツのグループを中心に行われたアトピー性皮膚炎のImmunoChip解析の検証研究を行った。また我々は本研究班で収集したサンプルを用い、日本人のアトピー性皮膚炎感受性に関連する8つのゲノム領域を同定した(Nature genetics 44:1222-1226,2012)。これらの領域内および近傍に含まれる遺伝子群の中から、興味深い遺伝子について現在、機能解析を行っている。11p15.4に存在する*NLRP10*はヒト皮膚組織で強く発現していた。3p21.33で最も強い関連が認められたSNPはeQTL解析により*CCR4*遺伝子発現量と強い相関を認めた。

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎は、患者の多くは遺伝的なアトピー体質を持つ。本研究はアトピー性皮膚炎の病態に関連する遺伝要因を同定し、痒みとアレルギー炎症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。本年はドイツのグループを中心に行われたアトピー性皮膚炎のImmunoChip解析の検証研究を行った。また我々は2012年に本研究班で収集したサンプルを用い、日本人のアトピー性皮膚炎感受性に関連する8つの新規のゲノム領域を同定し報告した(Nature genetics 44: 1222-1226, 2012)。これら8つの領域内および近傍に含まれる遺伝子群の中から、興味深い遺伝子について現在、機能解析を行っている。

### B. 研究方法

まずドイツのグループがアトピー性皮膚炎患者2425名、7196名のコントロールについてIllumina iSelect HD custom genotyping arrayを用いてImmunoChip解析を行い、ヨーロッパの集団で検証研究を行った。その結果、ゲノムワイド関連水準( $P < 5 \times 10^{-8}$ )を満たす4つの領域(4q27, 11p13, 16p13.13, 17q21.32)が同定された。我々は日本人の集団(ケース1856名、コントロール7021名)でそれらの結果の検証を行った。検証研究の疾患群はバイオバンクのサンプルを用いた。検証研究のタイピングはTaqMan法およびInvader法を用いた。機能解析において、遺伝子の発現についてはSYBR Premix Ex Taq IIを用い、RT-PCR法により定量を行った。関連領域の転写調節への影響については、eQTL Browser (<http://eqtl.uchicago.edu>)を用いて検討を行った。(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

### C. 研究結果

ImmunoChip解析で同定されたゲノムワイド関連水準を満たす4つの領域のうち4q27領域を除く3つの領域で $P < 0.05$ の関連を認め、アレルの方向性は一致していた。これらの3領域、11p13の近傍には*RAG1*, *RAG2*が、16p13.13の近傍には*SOCS1*が、17q21.32の近傍には*NGFR*が存在していた。これらの知見をNature genetics 45:808-812, 2013に報告した。遺伝子発現解析により、*NLRP10*がヒト線維芽細胞および皮膚で強く発現していることが示された。3p21.33のアトピー性皮膚炎関連領域において、eQTL解析を行い、関連の強かったSNPのゲノム領域はTARCの受容体である*CCR4*の遺伝子発現量と強い相関を示した。

### D. 考察

ImmunoChipで同定された領域のうち、4q27にはタクロリムス(FK506)のターゲット分子である*IL2*が含まれていた。今回の日本人の集団において、ヨーロッパ集団で同定された4q27のSNPとの関連は検証されなかったが、近傍のSNPについては詳細に検討していく必要がある。アトピー性皮膚炎の症状として、かゆみを伴う慢性湿疹が特徴的であるが、かゆみに関連する*NGFR*の近くに疾患感受性領域(17q21.32)が同定された。*NLRP10*、および*CCR4*領域については引き続き検討を行っていく。

### E. 結論

ヨーロッパのImmunoChip解析の結果を日本人の集団において検証研究を行い、3つの領域(11p13, 16p13.13, 17q21.32)でアトピー性皮膚炎との関連を認めた。こ

れまでGWASで同定された関連領域のうち、11p15.4に存在する*NLRP10*はヒト皮膚組織で強く発現していた。3p21.33で最も強い関連が認められた多型はeQTL解析により*CCR4*発現量と強い相関を認めた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.

Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphopoietin (TSLP) genotype. *Allergol Int*. 2013;62:123-130.

Himes BE, Sheppard K, Berndt A, Leme AS, Myers RA, Gignoux CR, Levin AM, Gauderman WJ, Yang JJ, Mathias RA, Romieu I, Torgerson DG, Roth LA, Huntsman S, Eng C, Klanderma B, Ziniti J, Senter-Sylvia J, Szeffler SJ, Lemanske RF Jr, Zeiger RS, Strunk RC, Martinez FD, Boushey H, Chinchilli VM, Israel E, Mauger D, Koppelman GH, Postma DS, Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Lima JJ, Irvin CG, Peters SP, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Litonjua AA, Tantisira KG, Raby BA, Bleecker ER, Meyers DA, London SJ, Barnes KC, Gilliland FD, Williams LK, Burchard EG, Nicolae DL, Ober C, DeMeo DL, Silverman EK, Paigen B, Churchill G, Shapiro SD, Weiss ST. Integration of mouse and human genome-wide association data identifies *KCNIP4* as an asthma gene. *PLoS One*. 2013;8:e56179.

Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphisms in the *IL22* gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013;71:148-150.

Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hübner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel

T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nöthen MM, Fölster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Büning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A, Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45:808-812.

Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-312.

Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int*. 2013 in press

Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates *ZNF432* gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;S0091-6749(13)01486-3. in press

Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population. *PLoS One*. 2013;8:e80941.

Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiujii Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the *TRAF3IP2* gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013;S0923-1811(13)00381-2. in press

## 英文総説

Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome-wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int.* 2013;62;21-28.

Tamari M, Hirota T. Genome-wide association studies of atopic dermatitis. *J Dermatology.* 2013 in press.

## 日本語総説

玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患. *呼吸*, 32(3):274-279, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因論 ゲノム解析. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 病態解明から治療まで 最新医学 1072-1078, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: 日本人の遺伝的背景とアレルギー. *実験医学増刊号*, 31:2872-2878, 2013.

広田朝光, 玉利真由美: ゲノム解析と気管支喘息. *呼吸と循環*, 61:906-913, 2013.

玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患. 第1章 病態生理に関する最新の基礎的研究別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患 Ver.6 state of arts, 61-63, 2013.

玉利真由美, 広田朝光: 遺伝的アプローチから見た小児気管支喘息. *日本小児アレルギー学会誌*, 539-547, 2013.

## 2. 学会発表

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関連領域と成人喘息関連領域-, 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美

Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in Academia Sinica 2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari

ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺伝子の同定, 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演23 アトピー性皮膚炎: バリア障害による表皮と免疫のクロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari

アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第34回日本炎症・再生医学会 シンポジウム4 炎症性疾患の再生のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ池 京都. 玉利真由美

アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福岡. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013, Interface between Immune System and Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari

アレルギー疾患の遺伝的要因 ゲノムワイド関連解析を中心に, 第64回東海小児アレルギー談話会 特別講演 2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美

Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, Plenary Lecture 1 第50回日本小児アレルギー学会 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

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



**アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究  
副題) 痒み・掻破行動と皮膚炎増悪メカニズムに関するアトピーモデルを用いた研究**

研究分担者 竹内聡 九州大学皮膚科特別教員  
研究協力者 古江増隆(九州大学大学院医学研究院皮膚科学 教授)  
江崎仁一(同大学院生)

**研究要旨**

タクロリムス(FK)は本邦で開発され、アトピー性皮膚炎治療に用いられているが、その抗かゆみメカニズムはまだ明らかでない。我々はステロイド他薬剤の比較実験から、FKの抗かゆみ効果が血清IgEや局所IL-17A産生とかかわりを持つことをしめした。また、そのようなFKの抗かゆみ効果は外用終了3日程度持続し、その後次第に効果が薄れて、6日目には効果がなくなることを示した。これは我々のアトピー性皮膚炎におけるプロトピック軟膏を用いた抗かゆみ効果の実験結果と合致し、プロアクティブ療法の外用間隔を考えるうえで重要であると思われる。

**A. 研究目的**

アトピー性皮膚炎(AD)の慢性皮膚病変部においては、表皮内知覚神経侵入・伸長とその執拗な痒みとの関連が指摘されている。マウスのTh2型慢性皮膚炎モデルにおいてもAD治療外用薬であるタクロリムス(FK506; FK)は表皮内神経伸長を抑制し、掻破行動も抑制すると、関連が報告されている。我々はこれまでに、ハプテンおよびダニ抗原誘発性のアトピー性皮膚炎モデルにおいて、MAPK/ERK kinase1/2 (MEK1/2)阻害薬のひとつであるCX659S (CX)が、FKと同程度に表皮内神経伸長は抑制する一方、FKとは異なり掻破行動の抑制はしないことを確認した。

1. 掻破行動を抑制したFKと抑制しなかったCXとの検討では、血清IgE値や局所でのIL-17A発現が掻破行動と何らかの関連を持つ可能性が考えられた。前回、抗IgE抗体を投与による治療を試みたが血清IgE値を軽度低下させたものの、完全なブロッキングができなかった。
2. また、FK外用の抗かゆみ効果が外用終了からの程度継続するかは、臨床上的治療計画に非常に重要である。

**B. 研究方法**

1. IgE抗体がシグナルを伝達する受容体であるFce受容体(FceRI)のノックアウト(KO)マウスを用いてIgE上昇と掻破行動をコントロールマウスと比較検討する。
2. C57BL/6マウスの剃毛した背部と耳に、0.5%ピクリルクロライド(PC)を週に2回、3週間塗布してTh2型慢性皮膚炎を発症させ、同時に

外用薬としてFKを用いて連日外用する。最終外用後、掻破行動、皮膚炎の状態、組織像、mRNA等を日ごとに計測した。

**(倫理面への配慮)**

これらの研究に関する動物実験プロトコールおよび遺伝子組み換え実験については施設倫理委員会承認されている。

**C. 研究結果**

1. FceRIKOマウスを購入し、施設内に清潔マウスへの人工授精によるクリーンアップ作業を行った。2度目で成功し、現在交配して少数のヘテロマウスを施設移入できた。
2. FK外用により、ハプテン反復塗布による慢性皮膚炎におけるマウスの掻破行動はこれまで得られていた結果と同様に有意に抑制されていたが、外用終了1, 2, 3日後までは、ハプテンを再チャレンジしても有意に掻破行動を抑制していた。終了4日目からは次第に掻破行動の抑制効果が薄れ、6日後には無治療群と同レベルに戻った。

**D. 考察**

1. FceRIKOマウスは現在KOコロニーをマウスの再樹立と繁殖を目指して交配中である。
2. 今回、FK外用終了後、3日まではマウスの慢性皮膚炎の掻破行動が抑制されることがしめされた。これは臨床ではADの治療法を考えるうえで重要である。中等症、重症AD患者の病勢をコントロールする方法としてプロアクティブ外用療法が注目され、実際に大きな効果を上げている

が、病勢コントロール後、治療薬の外用間隔を空けていくことが患者の負担、副作用の低減上、重要である。我々は臨床研究でFKのプロアクティブ療法の効果を示しているが (Takeuchi S et al. Ann Dermatol, 2012) かゆみが改善した後に外用を中止した群では、全例が痒みを再発し、その中央値が3日であったことを考えると、今回のマウスによるFKの抗かゆみ効果継続期間の検証結果はほぼ一致していると思われ、非常に興味深い。

#### E. 結論

1. FceRIK0マウスでIgE上昇と搔破行動の関連を近日中に検証できる見込みである。

2. 今回FKの抗かゆみ効果の継続が臨床研究だけでなく、客観的なマウスモデルでも示された。かゆみは搔破行動を介してAD皮膚症状を悪化させるため、プロアクティブ療法における外用間隔としては、週に2日(約3日に1回外用)程度の外用が多くの人に無理なく継続できる外用間隔であるかもしれない。今後もマウスモデルを介してADの病態、治療のメカニズムに迫りたい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takeuchi S, Esaki H, Furue M. Epidemiology of atopic dermatitis in Japan. (Review) J Dermatol. 2013 accepted for publication.
2. Hayashi M, Hirota T, Saeki H, Nakagawa H, Ishiujii Y, Matsuzaki H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H,

**Takeuchi S**, Furue M, Tamari M. Genetic polymorphism in the TRAF3IP2 gene is associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. J Dermatol Sci. 2013 Dec 10. pii: S0923-1811(13)00381-2. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.11.012. [Epub ahead of print]

3. Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, **Takeuchi S**, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. 2013 Aug;71(2):148-50. (原著). \_
4. **竹内聡** アトピー性皮膚炎 -ステロイド外用剤に抵抗性のかゆみ- Dermatology Today, 2014 (in press) (総説)

##### 2. 学会発表

1. 竹内聡. 基礎・臨床データから見た痒みのマネジメント タクロリムス軟膏の有用性 第29回日本臨床皮膚科医会総会 平成25年4月7日 ウェスティンナゴヤキャッスル 星雲の間西(第4会場)(名古屋市)

#### 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。

## 分担研究報告書

### アトピー性皮膚炎の発症・症状の制御および治療法の確立普及に関する研究 1. 脊髄内痒み神経の同定に関する研究 2. 石垣島コホート研究、 3. 本土・琉球クラスターにおけるアトピー関連遺伝子の探索に関する研究

研究分担者 古江増隆（九州大学大学院医学研究院皮膚科学 教授）

研究協力者 竹内聡（九州大学病院 特別教員）、中原剛士（九州大学大学院医学研究院皮膚科学）、蜂須賀淳一、江崎仁一、林亜矢子（同 大学院生）、林 純、古庄憲浩（九州大学大学院感染環境医学分野）、玉利 真由美、広田 朝光（理化学研究所統合生命医科学研究センター）、天谷雅行、海老原 全（慶應義塾大学医学部皮膚科学）、工藤 純（慶應義塾大学生命情報学センター）、佐伯秀久（東京慈恵会医科大学皮膚科）

#### 研究要旨

1. アトピー性皮膚炎で重要なかゆみに対し、ラットモデルを用いてその痒み特異的神経の伝導路を明らかにした。より中枢でのかゆみ伝導路を見出し、かゆみの制御につなげたい。

2. 卵アレルギーの既往が乳幼児期のアトピー性皮膚炎の危険因子のひとつであり、また、アンケート上での卵アレルギーの既往やオボムコイド IgE 卵アレルギーの既往がアトピー性皮膚炎の危険因子のひとつであり、乳幼児期のアトピー性皮膚炎には卵アレルギーが深く関わっていることが示唆された。また、アンケート上での卵アレルギーの既往がある群がより重症であることが分かり、卵白への特異的血清 IgE 検査（オボムコイド）でも関与が示された。

3. GWAS の結果、過去に報告されたヨーロッパあるいは中国から報告された領域に加え、新たに 8 領域が同定された。GWAS は、アトピー性皮膚炎のメカニズム及び治療を切り開くうえで重要な強力な手法であると考えられる。また、石垣島コホートにおいて、フィラグリン遺伝子変異の有無がアトピー性皮膚炎の発症に必ずしも寄与しないことを見出した。

#### A. 研究目的

1. 痒みという感覚は「掻きたいという欲求を引き起こす不快な感覚」であり、皮膚における痒みを伝達する一次求心性神経線維に関しては C 線維がその役割を担っていることが知られている。一方で、C 線維は痛みや冷温覚をはじめとした痒みとは異なる感覚を伝達することも知られている。我々はこれまでに、痒み特異的な一次求心性神経線維の同定のため、ラットにセロトニン（5-HT）塗布による痒み知覚モデルを作製して脊髄後根神経節における電気生理学的記録を行い、5-HT による痒み刺激に特異的に反応する C 線維を同定した。本研究では後根神経節で記録した一次求心性神経線維が脊髄後角の入力部と、その後の神経伝導路を検討したい。

2. アトピー性皮膚炎の発症寄与因子の解明は重要な課題であるが、我が国におけるコホート研究は数少ない。我々は平成 13 年度より沖縄県石垣島の保育園児の集団検診と保護者へのアンケート調査、採血データの解析を開始し、発症頻度・IgE 値・感染症の合併・本症発症の寄与因子などを報告してきた。今回は、CCL17/TARC や CCL22/MDC などの Th2 ケモカインの推移とアトピー性皮膚炎の発症および卵アレルギーの関与を明らかに

したい。

3. アトピー性皮膚炎の有病率は上昇しており、現在、社会問題化している。本疾患の解明は未だ進んでおらず、分子生物学的アプローチを含めた、幅広い視点に立った病因の解明と新規治療薬の開発が切望されている。わが国でも IgE 産生能や気道過敏性に関する候補遺伝子や、最近ではフィラグリン遺伝子の転突然変異が高率に発見されるなどの報告がされつつあるが、未だ疾患を包括的に説明する決定的なものはない。より正確な候補遺伝子の探索のためには、ある地域に生活する集団を全体として解析するコホート解析を用いる必要があり、また複数の地域集団でゲノム解析を行うことでより関連の高い疾患候補遺伝子を同定できる。

我々は平成 13 年度から沖縄県石垣島の保育園児の集団検診と採血、アンケート調査によるコホート解析を開始しているが、現在までにデータ固定されている 2011 までに延べ 7856 人の 0 - 6 歳時を診察し、平記入社率は 6.3%であった。この検診は毎年継続されており、石垣島の乳幼児コホートの前向き調査を可能としている。H15-16 年にかけては最近保険適応となったアトピー性皮膚炎の重症度マーカー、TARC の血清値がアトピー患児での発症、持続、消退などの自然経過と強く関連することを見いだした。さらにアトピー疾患関連遺伝子の解明を進めるべくこのコホート群における遺伝

子解析を行うため、血液サンプルの採取を行っている。

最近、日本人が SNP タイピングにより大きく Ryukyu- と Hondo クラスターの 2 つに分けられることが判明した。石垣島のコホート群における追跡調査、血液検査、遺伝子研究などで得られた成果 すなわち様々な臨床的アトピー関連因子や数々の候補遺伝子群やまた将来的にそれらを元にした病因の解明・新規治療などが日本人に広く応用可能であるかどうか、またはある特定の疾患サブグループや地域特異性（石垣島など）に認められる傾向にあるのかなどをより正確に検討するには、次なるステップとして同様の採血検査、遺伝子調査を本邦の他地域においても実施し、石垣島で得られた結果の有意性を確認する必要がある。そこで九州・山口地域一円からの人口流入地域である福岡と、全国からの人口流入地域である東京地域において得られる結果を、石垣スタディの結果と比較・検討したい。

## B．研究方法

1. SD ラットの胸髄を麻酔下に露出し、末梢に 5-HT を塗布してパッチクランプ法にて脊髄後角部の膜電流を測定することで、脊髄後角における 5-HT による痒み刺激の入力部位を検討した。

2. 園児検診、アンケート結果、血清データ解析を行った。

3. 九州大学病院皮膚科、同総合診療部、慶応義塾大学病院皮膚科、東京大学にてアトピー性皮膚炎患者、健常者各 1000 人を目標に血液検体、アンケート調査票、ゲノムタイピングの結果を用いて解析する

### （倫理面への配慮）

本研究での動物実験あるいは臨床研究は施設の倫理委員会にて承認されている。

## C．研究結果

1. 5-HT による痒み刺激に応答する C 線維は、応答しない C 線維と比較すると有意に脊髄後角の浅層に入力していた。また、5-HT による痒み刺激に反応する脊髄後角ニューロンは、後根神経節ニューロンと同じく機械的刺激に反応する性質を持っていた。

2. データ固定された 2011 年までに、のべ 7856 人の園児を診察し、平均有病率は 6.3% で男女差はなかった。また 2009 までの解析で、男児の血清 IgE が高いこと、気管支喘息合併が高いことが判った。アンケート調査の多変量解析の結果、患児のアトピー性皮膚炎罹患の危険因子として、本人の気管支喘息とは卵アレルギーの既往、父親や同胞のアトピー性皮膚炎の既往が挙げられた。卵アレルギー歴のあるアトピー性皮膚炎園児は有意に血清 TARC 値が高く、またオボムコイド特異的 IgE 値高値（クラス 2 以上）のアトピー性皮膚炎園児で有意に血清 TARC 値が高かった。

3. GWAS の結果、過去に報告されたヨーロッパあるい

は中国から報告された領域に加え、新たに 8 領域が同定された。（Hirota T, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. Nat Genet 2012;44(11):1222-6.）。また、本ゲノム解析で遺伝子多型とアトピー発症の関連が確認された Th 2 ケモカイン MDC は石垣島園児でアトピー性皮膚炎園児は対照群に比して有意に検査値が高いことがわかり、また健常人でも成人に比して非常に数値が高いことが判った。さらに、石垣島コホートにおいて、フィラグリン遺伝子変異の有無がアトピー性皮膚炎の発症に必ずしも寄与しないことを見出した。

## D．考察

1. 5-HT による痒み刺激に反応する 1 次求心性神経線維は、後根神経節において C 線維の中で機械的刺激にも反応する多様的なニューロンであり、脊髄後角においても同様の性質を持っていた。脊髄後角での入力部位に関しては浅層であることから、侵害刺激や温熱刺激の伝導路と同一部位であることが確認された。

2. 卵アレルギーの既往がアトピー性皮膚炎の危険因子のひとつであり、乳幼児期のアトピー性皮膚炎には卵アレルギーが深く関わっていることが示唆された。また、アンケート上での卵アレルギーの既往がある群が血清 TARC 値（アトピーの疾患重症度マーカー）が高値、すなわちより重症であることが判った。オボムコイド（卵白の主要アレルゲン）特異的 IgE 検査でも同様の知見が示されており、より確からしいことが判った。ミルクやコムギなどの 3 大食餌アレルゲンの他の抗原とやダニアレルギーと重症度との関連は見られず、興味深い。

3. 新たに同定された 8 領域は、気管支喘息における GWAS と同様に好塩基球活性化因子を含んでおり、また免疫調節因子であるビタミン D 代謝経路に関わる因子が含まれていた。実集団で関連を検証したい。

## E．結論

1. より中枢における痒み特異的神経の伝導路に関する検討を行う必要がある。

2. 男児の気管支喘息の高合併率なども見られているため、食物アレルゲンに加え、カビなど他の環境因子と AD に関連疾患の発症、重症度との関連解析が必要と思われる。

3. 今後、GWAS で同定された因子についてさらなる検討が必要である。GWAS の結果は、アトピー性皮膚炎のメカニズム及び治療を切り開くうえで重要な強力な手法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

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 NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing Extremes of the Visual Analogue Scale for Pruritus: A Consensus Statement. *Acta Derm Venereol*. 2013 Mar 27;93(2):214-5.

Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, Hirata T, Furue M. Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands. *J Dermatol Sci*. 2013 Oct;72(1):9-15.

Chiba T, Tatematsu S, Nakao M, Furue M. Urinary biopyrrin: a potential inflammatory marker of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014

Feb;112(2):182-3. doi:  
10.1016/j.anai.2013.12.011.

川島 眞、古江増隆、秀 道広、佐藤伸一、宮地良樹、慢性蕁麻疹における標準治療不応例に対するペポタスチンベシル酸塩増量の有油性の検討(UPDATE trial)、*臨床医薬* 29:1057-1070, 2013

(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。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

「みんなで考えましょう、アトピー性皮膚炎とおつきあい(市民公開講座)」

<http://www.kyudai-derm.org/atopy/openlec/index.html>

「エキスパートから学ぶ!子どものぜん息・アレルギーの予防と対策」

[http://www.congre.co.jp/apapari2011\\_48jspaci/html/shimin/shimin.html](http://www.congre.co.jp/apapari2011_48jspaci/html/shimin/shimin.html)

「アトピー性皮膚炎についていっしょに考えましょう」

<http://www.kyudai-derm.org/atopy/>

「アトピー性皮膚炎 よりよい治療のためのEvidence-based medicine (EBM)とデータ集」

2010年改定版 [http://www.kyudai-derm.org/atopy\\_ebm/index.html](http://www.kyudai-derm.org/atopy_ebm/index.html)

「アトピー性皮膚炎かゆみをやっつけよう!」

<http://www.kyudai-derm.org/kayumi/index.html>

「アトピー性皮膚炎の標準治療」

[http://www.kyudai-derm.org/atopy\\_care/index.html](http://www.kyudai-derm.org/atopy_care/index.html)

雑誌 発表者氏名、論文タイトル名、発表誌名、巻号、ページ、出版年

Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, Hirata T, Furue M. Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands. *J Dermatol Sci*. 2013 Oct;72(1):9-15.

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 NQ, Weisshaar E, Yosipovitch G, Ständer S. Verbalizing Extremes of the Visual Analogue Scale for Pruritus: A Consensus Statement. *Acta Derm Venereol*. 2013 Mar 27;93(2):214-5.

Kashiwakura J, Okayama Y, Furue M, Kabashima K, Shimada S, Ra C, Siraganian RP, Kawakami Y, Kawakami T. Most Highly Cytokinergic IgEs Have Polyreactivity to Autoantigens. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012 Nov;4(6):332-40.

Kamo A, Tominaga M, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits the increase in intraepidermal nerve density in the acetone-treated dry-skin mouse model. *Clin Exp Dermatol*. 38(6): 665-8, 2013.

Tominaga M, Takamori K. An update on peripheral mechanisms and treatments of itch. *Biol Pharm Bull*. , 36(8): 1241-7, 2013.

Tominaga M, Tengara S, Kamo A, Ogawa H, Takamori K. Matrix metalloproteinase-8 is involved in dermal nerve growth: Implications for possible application to pruritus from *in vitro* models. *J Invest Dermatol* 131: 2105-12, 2011

Taneda K, Tominaga M, Negi O, Tengara S, Kamo A, Ogawa H, Takamori K. Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch. *Br J Dermatol* 165: 277-284, 2011

Kamo A, Tominaga M, Negi O, Tengara S, Taneda K, Ogawa H, Takamori K. Inhibitory effects of UV-based therapy on dry skin- inducible nerve growth in acetone-treated mice. *J Dermatol Sci* 62: 91-97, 2011

Taneda K, Tominaga M, Tengara S, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin inhibits both capsaicin-induced substance P release and nerve growth factor-induced neurite outgrowth in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Clin Exp Dermatol* 35: 73-77, 2010

Tengara S, Tominaga M, Kamo A, Taneda K, Negi O, Ogawa H, Takamori K. Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycol-protein encoded by X-linked Kallmann syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 58: 64-71, 2010

Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiuchi Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 40: 736-9, 2013.

Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013;71:148-150.

Yano C, Saeki H, Ishiji T, Ishiuchi Y, Sato J, Tofuku Y, Nakagawa H: Impact of disease severity on sleep quality in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 72: 195-7, 2013.

Hiragun T, et al. Fungal protein MGL\_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. *J Allergy Clin Immunol* 132: 608-615, 2013.

Hiragun M, et al. Elevated serum IgE against MGL\_1304 in patients with atopic dermatitis and cholinergic urticaria. *Allergol Int*, in press.

Kagami S, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Kai H, Ohmatsu H, Fujita H, Tsunemi Y, Sato S. Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 133: 1673-5, 2013.

Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Kawaguchi M, Morimura S, Kai H, Kagami S, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum visfatin levels in patients with atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 23: 629-35, 2013.

Kimura T, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Miyamoto A, Kai H, Kagami S, Yanaba K, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Variations in serum TARC and I-TAC levels reflect minor changes in disease activity and pruritus in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* in press.

Kawakami T, Soma Y. Questionnaire survey of the efficacy of emollients for adult patients with atopic dermatitis. *J Dermatol*. 2011;38(6): 531-535

Kawakami T, Kimura S, Haga T, Doi R, Kyoya M, Nakagawa K, Soma Y. Health-related quality of life assessed by the effect of bepotastine besilate in patients with pruritus: Importance of emotions score in atopic dermatitis. *J Dermatol*. 2012; 39(6): 527-530

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23(6):428-434

Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Blockade of Interleukin-33 attenuates allergic contact dermatitis in model mice: possible mechanism via eosinophil infiltration. *Clin Exp Dermatol Res* 2013;4(3):1000183