

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と  
病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 横関 博雄

平成27年(2015年)3月

# 【目 次】

## I. 平成26年度構成員名簿

## II. 総括研究報告

### アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

横関博雄（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野）

## III. 分担研究報告

### 1. アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

烏山 一（東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野）

### 2. アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究

安東嗣修（富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学）

### 3. 共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析

椋島健治（京都大学医学研究科皮膚科学）

### 4. アトピー性皮膚炎患者における血清中および汗中ニッケル濃度とニッケル高濃度含有食品負荷後の変動に関する研究

戸倉新樹（浜松医科大学皮膚科学）

### 5. アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

片山一朗（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室）

室田浩之（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室）

### 6. 慢性に経過する痒疹26例の検討—分類不能な痒疹の位置づけについて—

横関博雄（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野）

佐藤貴浩（防衛医科大学皮膚科学講座）

### 7. ヒトiPS細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響をin vitroで詳細に検討するシステム構築

井川 健（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野）

### 8. 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

金田安史（大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座）

### 9. アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査

野老翔雲（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野）

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 班會議プログラム・議事録・抄録

----- ?

**アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発**

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	横関 博雄	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	教授
研究分担者	片山 一郎 金田 安史 烏山 一 佐藤 貴浩 戸倉 新樹 椛島 健治 安東 嗣修 室田 浩之	大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座 東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学分野 防衛医科大学校皮膚科学講座 浜松医科大学皮膚科学 京都大学医学研究科皮膚科学 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科教室	教授 教授 教授 教授 教授 教授 准教授 准教授
研究協力者	端本 宇志 西澤 綾  平澤 典保 山口 隼人  中島 沙恵子  中林 数馬 羽座 沙都美 辻井 謙一郎 倉石 泰  井川 健 野老 翔雲 宇賀神つかさ  塩原 哲夫 加藤 則人 矢上 晶子 足立 厚子 高山 かおる	防衛医科大学校皮膚科学講座 防衛医科大学校皮膚科学講座  東北大学大学院生活習慣病治療薬学分野 浜松医科大学皮膚科  京都大学医学研究科皮膚科学  富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学  東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野  杏林大学医学部皮膚科学教室 京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学 藤田保健衛生大学医学部皮膚科学講座 兵庫県立加古川医療センター皮膚科 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	助教 講師  教授 診療従事者  研究員  大学院生 大学院生 大学院生 教授  講師 助教 特任助教  教授 教授 准教授 部長 講師

## アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 教授

**研究要旨** 本研究は重症型アトピー性皮膚炎（AD）における難治性皮膚病変（痒疹、紅皮症、顔面紅斑、手湿疹）などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症、異汗性湿疹様病変の発症頻度を各班員の施設にてアンケート調査した。その結果、**尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑**などが外因性ADに高率であった。内因性ADは全体の12%で女性に多く、臨床的には**手湿疹の合併**が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。内因性ADの患者の血清中のニッケル濃度が、外因性ADおよび正常人に比べて有意に高いことも見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一方、**手湿疹診療ガイドライン**委員会を立ち上げ診療アルゴリズム案を策定している。26例の痒疹患者を分類したところ分類しがたい症状を呈した症例が認められた。ADモデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離されるカリクレイン（KLK5）が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出されるmMCP-8が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。今後の将来的展望として**好塩基球をターゲット**とした痒疹型AD病変の新規治療法の開発する予定である。さらに神経栄養因子アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認されアーテミンの中和抗体で改善が認められた。非侵襲的にNMFを測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療とNMFを中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価をした。また、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒトiPS細胞を作成し、フィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行った。前年度報告した一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は、免疫細胞に作用してTh1シフトをおこすためアレルギー疾患治療に適していると考えられるが、今年度はその作用機構をさらに詳細に解析した。

### A．研究目的

本研究は重症型アトピー性皮膚炎（AD）における難治性皮膚病変（痒疹、紅皮症、顔面紅斑）などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症の発症頻度を明らかにするためのアンケート調査を施行し検討した。さらに、各病型ADの汗を解析して金属の濃度を測定する。さらに、金属負荷試験も試行した。各種のADの皮膚病変のモデルマウスを用いてADの発症機序を解析する。さらに、何故HVJ-EがADに効果があるのか、その作用機構を解明し、さら

に適した治療剤へと改良することを目的とする。

また、ヒトiPS細胞を利用して、アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行なった。

### B．方法

1) **外因性・内因性アトピー性皮膚炎（AD）**における臨床症状、フィラグリン遺伝子変異の比較検討

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎ガイドラインの診断基準を満たし、東京医科歯科大学、浜松医科大学、京都大学、大阪大学、防衛医科大学の皮膚科外来通院中のAD患者のうち同意が得られたものを対象とした。病型による臨床症状、検査値や

金属アレルギー（Ni、Co、Cr）の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。臨床症状としては Dennie-Morgan fold、魚鱗癬、palmar hyperlinearity、手湿疹、顔面難治性紅斑、紅皮症、頸部色素沈着、脱毛、Hertoghe、汗疱様発疹、亜急性痒疹、結節性痒疹の合併有無について調査を行った。浜松医科大学皮膚科アトピー性皮膚炎外来を受診した AD の患者のうち16歳以上で、かつ同意を得られた10名と健常ボランティア17名を対象に経口負荷試験前後の血清および汗中のニッケル濃度を測定した。

2) 本研究班の班員と京都府立医大皮膚科加藤則人教授、杏林大学塩原哲夫教授、藤田保健衛生大学矢上晶子准教授、兵庫県立加古川病院皮膚科足立厚子先生を加えて手湿疹氏音量ガイドライン委員会を立ち上げ2回委員会を開催、手湿疹の定義、病態、分類、診療アルゴリズムを検討した。

3) ADでみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立

近年、神経栄養因子アーテミンの皮膚局所への蓄積が全身皮膚の熱感受性を増感させることを見出した。アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認する。

4) ADマウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与

実験には、ADマウスモデルである雄性 NC 系マウスを用いた。痒み反応の評価は、8mm ビデオカメラでその行動を撮影し行った。本実験では吻側背部への掻き動作回数を数えた。一部の実験では、KLK5を SPF 飼育下健常マウスに皮内注射して、注射部位への後肢による掻き動作回数を数えた。

5) 好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

6) River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位（右示指先端指腹）および非外用部位の皮膚（左示指先端指腹）の NMF を解析し、ステロイド長期外用に伴う皮膚 NMF の変化について検討を行った。

7) ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼを利用するシステムを構築。ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。

8) 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は免疫細胞に作用して Th1シフトを起こすためアレルギー疾患の治療に適していると考えられる。そこで、さらにその作用を強力にするために一本鎖 IL12ポリペプチドと HVJ-E を併用することにより、樹状細胞や脾臓細胞からの Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )の産生が亢進するかどうかを、ELISA 法で測定した。

## C. 結果

174例が登録された。内因性 AD21例（男5、女16）、外因性 AD153例（男91、女62）。内因性 AD は全体の12%で女性に多く、喘息・鼻炎の既往歴や家族歴は少なかった。臨床的には手湿疹の合併が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。一方外因性 AD は喘息・鼻炎の既往歴や家族歴が多く、臨床的には尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向がみられた。痒疹は亜急性痒疹、結節性痒疹ともに外因性 AD との合併が多かったが、いずれも有意差はなかった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では病型にかかわらず尋常性魚鱗癬、palmar

hyperlinearity の合併が多かった(横関)。手湿疹診療ガイドラインは策定中である(横関)。金属負荷前血清ニッケル濃度 (mean±SD, ng/ml) は内因性 AD で3.48±1.27,外因性 AD で2.13±2.39, 正常人で0.40±0.93であった(戸倉)。フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断する TALENs を作製した(井川)。皮膚へのアーテミン投与、あるいはホットプレートによる熱刺激を加えたところ、いずれもマンガン造影 MRI で視床下部、扁桃体に造影効果がみられアーテミン中和抗体の投与によって減弱することが確認された(片山、室田)。健常 NC マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応は PAR2拮抗薬により抑制された。皮膚において KLK5 mRNA の発現や KLK5の活性が、健常マウスに比べ、皮膚炎マウスで増加していた(安東)。ステロイド長期外用後の皮膚における NMF は長期外用しなかった皮膚と比較して著明に低下していた。NMF の主要な構成成分であるピロリドンカルボン酸 (PCA) も同様の傾向を認めた。一方で、角質間脂質の一つとして知られるセラミドについてはステロイドの長期外用による影響を認めなかった(椋島)。HVJ-E と IL12の組み合わせで脾臓細胞からの interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )のみならず、IL12 receptor, Tbet, IL18の発現も IL12単独よりも有意に亢進することがわかった(金田)。

#### D . 考察

外因性 AD は重症型の発疹である**紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑**が多く見られた。IgE の関与する外因性 AD の方が重症 AD の傾向が示された。内因性 AD の発症機序の一つの可能性として、摂取された**金属**が汗を通じて経皮的に排泄され、正常な表皮バリアをも通過することで、金属アレルギーを発症し、皮疹が生じていると推測した。血清中に高濃度に存在するニッケル

が、内因性 AD の発症に寄与している可能性が推測された。AD モデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離される KLK5が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。今後の将来的展望として**好塩基球をターゲット**とした痒疹型 AD 病変の新規治療法の開発する予定である。AD では皮膚局所におけるアーテミンの蓄積がなんらかの形で中枢神経を増感させることによって痒みが誘導されるのではないかと考えられた。**アーテミン**はアトピー性皮膚炎の痒みの治療標的になりうると考えられた。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。HVJ-E の F 蛋白質が macrophage から IL18を産生させ、IL12と共同で T cell に作用して IFN- $\gamma$  が産生され、これが T cell での IL12 receptor の発現を T bet を介して高めることで、免疫細胞間で IFN- $\gamma$  産生亢進の positive feedback loop ができると考えられる。さらに、ヒト iPS 細胞を利用して、フィラグリンなどの遺伝子変異が実際の病態形成に与える影響について詳細に検討できるシステムの構築を作成中である。この iPS 細胞を用いた 3 次元表皮シートモデルにより遺伝子変が表皮全体の構築、サイトカインなどにどのような影響を与えるか明らかにできる。

#### E . 結論

今後さらに AD の病型と難治性皮膚病変の関連を明らかにすることによって、ターゲットを絞った新規治療法の開発が期待される。外因性 AD は重症が多く難治性病変である**痒疹、手湿疹診療ガイドライン**を作成してピンポイントに治療することは意義がある。血清中に高濃度に存在するニッケル

ルが、内因性アトピーの発症に寄与している可能性が推測された。内因性 AD では金属制限をターゲットとした治療法が可能である。AD モデルマウスを用いた研究では、痒疹反応が**好塩基球の異常**に起因することが強く示唆され mMCP-8が重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、PAR2は、本研究成果に加え、痒み反応発生に重要な役割を担っていることが明らかとなり、現在、低分子の PAR2拮抗薬の候補リード化合物の合成を進めており、薬理的にスクリーニングが必要である。その他、アーテミンもアトピー性皮膚炎の痒みの治療標的になりうると思われた。IL12 と HVJ-EnF 蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。さらに、本研究により、フィラグリン遺伝子変異が与える影響を検討するシステムの構築が完了した。今後、分化誘導して得られた表皮角化細胞において、フィラグリン遺伝子変異の有無のみが違う状況の比較検討をすることにより、アトピー性皮膚炎においてフィラグリン遺伝子変異が存在することの意味合いについて、これまでと違った面よりアプローチができると思えられる。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1. Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J. Japanese Guideline for Occupational Allergic Diseases 2014. Committee for Japanese Guideline for Diagnosis and Management of Occupational Allergic Diseases; Japanese Society of Allergology. **Allergol Int.** 2014 Sep;63(3):421-42.
2. Yokozeki H. [The research for atopic dermatitis: up to date]. **Nihon Rinsho.** 2014 Aug;72(8):1503-9. Review. Japanese.
3. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells Transl Med.** 2014 Sep;3(9):992-1001.
4. Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H, Nishimura EK. Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during the hair cycle. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2014 Jul;27(4):540-51.
5. Yokozeki H. A nucleic acid-based medication for allergic skin diseases. **J Dermatol Sci.** 2014 Aug;75(2):75-81.
6. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. **Acta Derm Venereol.** 2014 Jan;94(1):86-7.
7. Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H. Acrosyringal Involvement of Palmoplantar Lesions of Eosinophilic Pustular Folliculitis. **Acta Derm Venereol.** 10;93(1).2013.
8. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. **J Dermatol.**70(1):26-33.2013.
9. Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Masuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H. Anti-tumor effects



of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma. **Clin Immunol.** 2013 Oct;149(1):1-10.

10. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 Ligand Expression to Detect Antigen-specific T Cells in Patients with Drug Eruptions. **Acta Derm Venereol.** 2013 May 27
11. Saeki K, Satoh T, Yokozeki H.  $\alpha(1,3)$  Fucosyltransferases IV and VII are essential for the initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. **J Invest Dermatol.** 2013 Sep;133(9):2161-9.
12. Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2 : therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. **Immunology.** 2013 Sep;140(1):78-86.

## 2. 学会発表

1. 野老翔雲、井川 健、戸倉新樹、宮地良樹、片山一郎、佐藤貴浩、横関博雄：アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査．第26回日本アレルギー学会春季臨床大会．2014年5月9-11日．京都市
2. 芝間さやか、宇賀神つかさ、横関博雄：当科を受診した小麦アレルギー患者のまとめ．第26回日本アレルギー学会春季臨床大会．2014年5月9-11日．京都市
3. 端本宇志、佐藤貴浩、横関博雄：好塩基球とIgEにより誘発されるマウス痒疹反応におけるそう痒と病変部表皮内神経伸長．第26回日本アレルギー学会春季臨床大会．2014年5月9-11日．京都市
4. 加藤 恒平、西澤 綾、横関 博雄、近江 雅人：アトピー性皮膚炎患者の掌蹠に生じる水疱の

検討．第113回日本皮膚科学会総会．2014年5月30日-6月1日．京都市

5. 加藤恒平、西澤 綾、横関博雄、近江雅人：異汗性湿疹と汗管・発汗機能の関連の検討．第22回日本発汗学会総会.2014年9月17-18日 長崎市
6. 西澤 綾、加藤恒平、須川佳彦、近江雅人、横関博雄：成人アトピー性皮膚炎における精神性発汗の抑制機序の3次元解析．第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市
7. 須川佳彦、福田明広、近江雅人、西澤 綾、横関博雄：OCT を用いた掌蹠多汗症患者と健常者の汗腺の3次元構造解析による比較．第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市
8. 宗次太吉、藤本智子、高山かおる、井川健、横関博雄：東京医科歯科大学皮膚科で経験した特発性後天性全身性無汗症の臨床的検討．第22回日本発汗学会総会2014年9月17-18日 長崎市

## H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

研究分担者 烏山 一

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 教授

研究要旨

好塩基球はアレルギー病態に関わることが知られているが、どのようなエフェクター分子を使ってアレルギー炎症を引き起こしているのかは、よくわかっていない。セリン・プロテアーゼのひとつである mMCP-8 は、好塩基球のみで発現が認められ、細胞活性化にともなって細胞外に放出される。mMCP-8 のアレルギー炎症における役割を明らかにするために、mMCP-8 リコンビナント蛋白を作製し、マウス皮内投与したところ、好中球を主とした細胞浸潤をともなう皮膚腫脹が観察された。このことから、好塩基球由来 mMCP-8 がアレルギー炎症惹起分子として機能していることが強く示唆され、アレルギー治療の標的となる可能性が考えられた。

A. 研究目的

私たちは、これまでの研究で、マウス・マスト細胞プロテアーゼ・ファミリーに分類されるセリン・プロテアーゼのなかで、mMCP-8 と mMCP-11 がマスト細胞ではなく、好塩基球に選択的に発現していることを見いだした。それぞれの特異抗体を作製して、蛋白発現を解析したところ、いずれも好塩基球の分泌顆粒内に貯蔵されており、活性化した好塩基球の脱顆粒の際に、細胞外に放出されることが判明した。リコンビナント mMCP-11 を作製し、マウス皮内に投与したところ、血管透過性亢進と細胞浸潤を伴う皮膚腫脹が誘導された。このことから、mMCP-11 が好塩基球に依って誘導される皮膚アレルギー炎症のエフェクター分子として機能していることが示唆された。一方、mMCP-8 は構造的には Granzyme B に類似しており、トリプターゼ活性を有する mMCP-11 とは異なった機能を有する可能性が考えられる。そこで今回、好塩基球由来 mMCP-8 のアレルギー炎症における役割を明らかにすることを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内

に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

（倫理面への配慮）動物実験はすべて東京医科歯科大学動物実験指針に則り、実験動物委員会の承認を得ておこなった。

C. 結果

mMCP-8 を皮内投与した予備実験では、明確な血管透過性亢進は認められなかったが、好中球を主とした細胞浸潤をともなう皮膚腫脹が観察された。

D. 考察

さらなる繰り返しの実験が必要であるが、予備実験結果からみて、mMCP-8 も好塩基球の炎症惹起分子として機能している可能性が考えられた。mMCP-11 投与の場合と比べて、血管透過性亢進作用が弱いことや浸潤細胞の種類が異なることから、mMCP-8 と mMCP-11 では標的細胞・分子が異なる可能性がある。

E. 結論

好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8 が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報  
該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bakocevic, N., Claser, C., Yoshikawa, S., Jones, LA., Chew, S., Goh, CC., Malleret, B., Larbi, A., Ginhoux, F., de Lafaille, MC., Karasuyama, H., Renia, L., Ng, LG.: CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady-state and during helminth and malarial infections. *Eur. J. Immunol.* 44: 1823-1834, 2014.
2. Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H-U, and Yousefi, S.: NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J. Immunol.* 192: 5314-5323, 2014.
3. Reber, L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L.B., Robinson, W.H., Tsai, M., and Galli, S.J.: Mast cell-derived IL-1 $\beta$  contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 66: 2881-2891, 2014..
4. Karasuyama, H., and Yamanishi, Y.: Basophils have emerged as a key player in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 31: 1-7, 2014.
5. Tsai, S.H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada Y., Takeda A., Yoshikawa, S., Obata-Ninomiya, K., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., Kiyono, H., Karasuyama, H., and Takeda, K.: The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity* 42: 279-293, 2015.
6. 烏山 一: 炎症の抑制・終焉機構「序」 炎症と免疫 22 (2): 71, 2014
7. 二宮(小畑)一茂, 筒井英充, 烏山 一: 消化管寄生虫感染防御免疫応答における好塩基球の新

- たな役割 感染・炎症・免疫 44(1): 30-39, 2014
8. 烏山 一: 好塩基球の光と影「はじめに」 医学のあゆみ 250(12): 1079, 2014
  9. 太田卓哉, 吉川宗一郎, 烏山 一: マダニ感染防御と好塩基球 医学のあゆみ 250(12): 1114-1118, 2014
  10. 三宅健介, 烏山 一: 最近明らかになってきた好塩基球の役割 臨床免疫・アレルギー科 63 (2): 164-169, 2015
2. 学会発表
1. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in immunity-a neglected minority gains new respect. The 24<sup>th</sup> Congress of Interasma Japan/North Asia. Nagoya, 2014.07.19.
  2. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. Cold Spring Harbor Asia Conference “Frontiers of Immunology in Health & Diseases” Suzhou, China, 2014.09.04
  3. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. 第24回九州大学生体防御医学研究所国際シンポジウム 福岡 2014.11.08
  4. Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in allergy and protective immunity. Medical Research Institute 40<sup>th</sup> Anniversary Symposium. Tokyo 2014.11.28
  5. Karasuyama, H.: Non-redundant roles for basophils in allergy and protective immunity. British Society for Immunology Congress 2014. Briton, UK, 2014.11.02
  6. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in Th2-type protective immunity and allergy. Cell Symposium “The multifaceted roles of type 2 immunity” Bruges, Belgium 2014.12.11.

7. 烏山 一：教育講演「アレルギーに関連する新規の免疫細胞～ILC2 細胞と好塩基球を中心として～」第 26 回アレルギー学会春季臨床大会 京都 2014.05.10
8. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の役割 第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会 札幌 2014.06.19
9. 烏山 一：アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 第 41 回本郷呼吸器研究会 東京 2014.06.24
10. 烏山 一：教育講演「アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御」第 42 回日本臨床免疫学会 東京 2014.09.25
11. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 日本眼科アレルギー研究会 東京 2014.10.04
12. 烏山 一：生体内での好塩基球の役割解明とアレルギー治療への応用 CREST「免疫機構」第三回公開シンポジウム 東京 2014.10.08
13. 烏山 一：アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御 第 74 回臨床アレルギー研究会 東京 2014.11.01
14. 烏山 一：好塩基球研究のめざましい進展～日陰者がいっきに檜舞台に躍り出た！ 第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京 2015.02.21

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

無し。

## アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究

研究分担者 安東嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 准教授

研究協力者 辻井 謙一郎 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

中林 数馬 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 大学院生

倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学 教授

烏山 一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫アレルギー分野 教授

研究要旨 これまでに自然発症アトピー性皮膚炎マウスモデル（NC マウス）の自発的な痒み反応に好塩基球、セリンプロテアーゼ及びプロテアーゼ活性化受容体 2（PAR<sub>2</sub>）が関与することを見出してきた。セリンプロテアーゼの一つである kallikrein 5（KLK5）は、角質の剥離に寄与しており皮膚バリア破壊への関与が報告されている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討した。健常マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が認められ、PAR<sub>2</sub>拮抗薬で抑制された。健常 NC マウスと比べ、皮膚炎の発症した NC マウス皮膚において、KLK5 mRNA の発現及び酵素活性の増加が認められた。一方、内因性 KLK5 の阻害因子 Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor（LEKTI）の発現は、皮膚炎マウス皮膚で減少していた。KLK5 は、主にケラチノサイトに分布し、一部、好塩基球にも発現している可能性が免疫組織化学染色により見いだされた。以上の結果から、本病態の痒み反応に KLK5 一部関与することが示唆される。

### A．研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性痒痒性皮膚疾患の 1 つであり、その痒みの発生機序は未だ解明されていない。これまで、我々は、アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応に好塩基球が関与すること、プロテアーゼ活性化受容体 2（PAR<sub>2</sub>）や好塩基球から遊離されるセリンプロテアーゼ mMCP-11 が関与していることを見出してきた。アトピー性皮膚炎の症状の一つに皮膚バリア破壊が認められるが、その機序の 1 つにセリンプロテアーゼの kallikrein 5（KLK5）の関与が知られており、さらに KLK5 は PAR<sub>2</sub>を活性化することも知られている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討し

た。

### B．研究方法

実験には、雄性 NC 系マウス（NC マウスは、specific pathogen free（SPF）環境下で飼育した場合は健常状態を維持するが、conventional 環境下で飼育した場合は、アトピー様の皮膚炎と自発的な痒み反応（掻き動作）を示すようになる）を用いた。

行動実験は、無人環境下にマウスの行動をビデオカメラで撮影し、ビデオの再生により後肢による掻き動作回数をカウントした。マウスは、1 秒間に数回掻くので、足を挙げてから降ろすまでの一連の動作を掻き動作の 1 回としてカウントした。

皮膚内の KLK5 mRNA の発現はリアルタイム PCR 法により、KLK5 の発現分布は免疫染色法により解析した。Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI) の発現は、ウエスタンブロットイングにより解析した。また、皮膚における KLK5 の酵素活性は、特異的基質である、Bz-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide を用い、切断され遊離した p-nitroanilide を 420nm の吸光度を測定することで評価した。

### C . 研究結果

#### 1) 健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射による掻き動作と PAR2 拮抗薬の効果

健常 NC マウスへの KLK5 皮内注射により用量依存的に後肢による注射部位への掻き動作が観察された。この痒み反応は、KLK5 皮内注射後の最初の 10 分間をピークとして起こった。KLK5 誘発掻き動作は、PAR<sub>2</sub> 拮抗薬 FSLLRY-NH<sub>2</sub> により抑制された。

#### 2) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 mRNA の発現と酵素活性

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ KLK5 mRNA の発現は有意に増加し、また、酵素活性も増加していた。KLK5 の酵素活性は、セリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。

#### 3) 皮膚炎マウス皮膚における LEKTI の発現

皮膚炎マウス皮膚において、健常マウス皮膚に比べ LEKTI の発現は減少していた。

#### 4) 皮膚炎マウス皮膚における KLK5 の発現分布

皮膚炎マウス皮膚において、KLK5 の免疫活性は、主に表皮ケラチノサイトに認められ、さらに、皮膚内浸潤細胞にも求められた。KLK5 免疫活性細胞の一部が TUG8 免疫活性を示す好塩基球であった。

### D . 考察

本研究では、KLK5 の皮内注射により痒み反応が誘発され、PAR<sub>2</sub> 拮抗薬により抑制された。また、皮膚炎マウスの皮膚で KLK5 mRNA の発現の増加並びに酵素活性の増加が認められた。KLK5 を選択的に阻害する薬物はないが、KLK5 の活性は、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応を抑制する用量のセリンプロテアーゼ阻害薬ナファモスタットメシル酸塩で抑制された。これらの知見を勘案すると、皮膚炎マウスの自発的な痒み反応に KLK5 が関与することが示唆される。

皮膚における KLK5 の活性化の詳細は不明であるが、KLK5 の内因性阻害因子の LEKTI の発現の減少が一部関与している可能性が示唆される。

KLK5 の発現は、表皮に主に認められた。KLK5 の作用の 1 つとして PAR<sub>2</sub> を活性化することが知られている。PAR<sub>2</sub> は主にケラチノサイトに発現しており、KLK5 がオートクラインおよびパラクライン的にケラチノサイト上の PAR<sub>2</sub> に作用して leukotriene B<sub>4</sub> などの痒み因子を産生遊離して痒みを発生していることが示唆される。また、PAR<sub>2</sub> は、一次感覚神経にも発現しており、皮膚炎マウス皮膚では一次感覚神経が表皮内まで伸展していることからケラチノサイトから遊離された KLK5 の一部は直接一次感覚神経に作用する可能性も考えられる。興味あることに、KLK5 は皮膚内浸潤細胞にも発現しており、今後詳細な解析が必要であるが、KLK5 免疫活性を示す細胞の一つが好塩基球である可能性を見出したことから、好塩基球から産生遊離される KLK5 も痒みの発生に関与しているかもしれない。

### E . 結論

アトピー様皮膚炎マウスの自発的な痒み反応には、主にケラチノサイト（一部好塩基球）から産生される KLK5 が関与していることが示唆される。

## 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  $\alpha$ -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) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Firing pattern of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan ; 2014 Mar 16-18 ; Kagoshima.
- 4) Andoh T. Proteases and itch. The 87th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society; 2014 Mar 19-21 ; Sendai .
- 5) 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 .
- 6) 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 .
- 7) 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 .
- 8) Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K, Furue H. Electrophysiological analysis of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord. The 37rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society; 2014 Sep

- 11-13; Kanagawa.
- 2014 Dec 12-14; Osaka.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 白鳥(林)美穂,長谷川あゆみ,豊永穂奈美,安東嗣修,倉石 泰,井上和秀,津田 誠.  
痒み発症における一次求心性神経 P2X3 受容体の関与.第 67 回日本薬理学会西南部会; 2014 Nov 23; 北九州.
- 14) 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.
- 15) Shimizu K, Andoh T, Yoshihisa Y, Shimizu T. The histamine release from epidermal keratinocytes is involved in  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone-induced itching in mice. The 39th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology;
- 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)



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

分担研究報告書

共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析

研究分担者 椛島 健治 京都大学 医学研究科 皮膚科学 准教授  
研究協力者 中島沙恵子 京都大学 医学研究科 皮膚科学 研究員

**研究要旨** アトピー性皮膚炎を引き起こす遺伝的素因の一つであるフィラグリンは、角層内でケラチン繊維から遊離し、アミノ酸にまで分解され、天然保湿因子（Natural Moisturising Factor：NMF）として角層内に放出される。NMFは皮膚の水分保持のみならず、皮膚 pH の維持、感染防御など皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。そこで本研究では、非侵襲的に NMF を測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療と NMF を中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価を行った。共焦点ラマン分光装置を用いて、非侵襲的に同一アトピー性皮膚炎患者のステロイド長期外用部位と非外用部位の皮膚における NMF 含有量を測定した。ステロイド長期外用により NMF は低下し、皮膚バリア機能が低下していることが明らかとなった。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。

A. 研究目的

哺乳類皮膚表皮の顆粒層特異的に発現するフィラグリンのヒトにおける欠失変異がアトピー性皮膚炎を引き起こす遺伝子素因の一つとなっていることが、2006年に McLeanらにより報告された。フィラグリンは角層内でケラチン繊維から遊離し、アミノ酸にまで分解され、天然保湿因子（Natural Moisturising Factor：NMF）として角層間に放出される。NMFは皮膚の水分保持のみならず、皮膚 pH の維持、感染防御、角層内での酵素反応の制御を行い、皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。フィラグリン遺伝子変異の有無にかかわらず、多くのアトピー性皮膚炎患者の NMF は健常人と比較して低下していることが報告されており、NMF の低下がアトピー性皮膚炎のバリア機能低下の一因であることが明らかとなっている。NMF の測定はこれまで、テープstrippingによる表皮剥離や皮膚生検といった侵襲を伴う方法でしか測定することができず、同一個体・同一部位での評価や経時的な評価は困難であった。そこで本研究では、非侵襲的に NMF を測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度

や治療と NMF を中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価を目的とする。

B. 方法

アトピー性皮膚炎の標準的治療の一つであるステロイド局所外用療法は、皮膚に浸潤してきた炎症細胞に対して免疫抑制作用を発揮することにより治療効果を発揮する。一方で、ステロイドの長期的な外用により皮膚萎縮・菲薄化・毛細血管拡張といった副作用を生じることが知られているが、ステロイドの長期外用が皮膚バリア機能に及ぼす影響についての詳細は不明であった。そこで今回、ステロイド長期使用歴のあるアトピー性皮膚炎患者の皮膚と、同一患者でステロイド長期使用していない皮膚の NMF を共焦点ラマン分光装置を用いて測定し、ステロイド長期使用の皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討を行った。

具体的には、River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位（右示指先端指腹）および非外用部位の皮膚（左示指先端指腹）の

NMF を解析し、ステロイド長期外用に伴う皮膚 NMF の変化について検討を行った。同時に、皮膚 pH、経皮的水分蒸散量 (Trans-epidermal water loss: TEWL) およびセラミド含有量についても評価を行った。

#### C. 結果

ステロイド長期外用後の皮膚における NMF は長期外用しなかった皮膚と比較して著明に低下していた。NMF の主要な構成成分であるピロリドンカルボン酸 (PCA) も同様の傾向を認めた。一方で、角質間脂質の一つとして知られるセラミドについてはステロイドの長期外用による影響を認めなかった。経皮的水分蒸散量および pH はステロイド長期外用により共に低下した。

#### D. 考察

これまで侵襲的な方法でしか測定出来なかった皮膚 NMF 含有量を非侵襲的に測定し、ステロイド長期外用の皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討を行った。ステロイド長期外用により NMF は低下する一方、細胞間脂質の一つであるセラミドは低下しなかった。

#### E. 結論

共焦点ラマン分光装置を用いて、非侵襲的に皮膚における NMF 含有量を測定した。ステロイド長期外用により NMF は低下し、皮膚バリア機能が低下していることが明らかとなった。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Honda T, Kabashima K. Prostanoids in allergy. *Allergol Int.* 2015 Jan;64(1):11-16.
2. Nakamizo S, Egawa G, Honda T, Nakajima S, Belkaid Y, Kabashima K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. *Semin Immunopathol.* 2015 Jan;37(1):73-80.
3. Dainichi T, Hanakawa S, Kabashima K. Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders

of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. *J Dermatol Sci.* 2014 Nov;76(2):81-9.

4. Nomura T, Kabashima K, Miyachi Y. The panoply of  $\alpha\beta$ T cells in the skin. *J Dermatol Sci.* 2014 Oct;76(1):3-9.
5. Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Nakamizo S, Arita M, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jul;134(1):100-7.
6. Nakajima S, Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models. *J Invest Dermatol.* 2014 Aug;134(8):2122-30.
7. Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jan;133(1):139-46.e1-10.

#### 2. 学会発表

1. H. Tanizaki, Kenji Kabashima. Effect of topical steroid on the stratum corneum compositions by using confocal Raman microscopy. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, June 11-14, 2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎患者における血清中および汗中ニッケル濃度と  
ニッケル高濃度含有食品負荷後の変動に関する研究

研究分担者 戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科 教授  
研究協力者 山口隼人 浜松医科大学皮膚科 診療従事者  
平澤典保 東北大学大学院生活習慣病治療薬学分野 教授

研究要旨 内因性アトピー性皮膚炎の発症要因として金属の関与が推測されている。今回、内因性アトピー性皮膚炎の患者の血清中のニッケル濃度が、外因性および正常人に比べて有意に高いことを見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一日当たりの日本人のニッケル摂取量にほぼ相当する量を4日間負荷したチョコレートを用いた経口負荷試験前後では、汗および血清中のニッケル濃度の変化は、試験前後で有意な上昇は認めなかった。血清中に高濃度に存在するニッケルが、内因性アトピーの発症に寄与している可能性が推測された。体液中の金属という新しい着眼で検討を続けている。

#### A. 研究目的

我々は、内因性アトピー性皮膚炎を外因性アトピー性皮膚炎と比較し、臨床的特徴、免疫学的特徴を検討してきた。これまでIADのニッケル、コバルト、クロムに対する金属パッチテスト陽性率は、いずれか1つ以上の金属に陽性を示す割合は汗中のニッケル濃度がEADに比べて高いことを示した。IADの組織中で認められたTh1サイトカインの発現や高い金属パッチテスト陽性率を説明するものとして、金属やハプテンなどの小分子の関与したアレルギーはTh1に変調しやすいことから、IADの発症に金属アレルギーが何らかの形で関与していることを推測した。今回我々は、その仮説を検証するために、通常日本人の経口摂取するニッケルにほぼ相当する量を経口負荷し、その前後で血清および汗中のニッケル濃度を比較し、IADにおける金属アレルギーの関与を解明することを試みた。

#### B. 研究方法

当皮膚科アトピー性皮膚炎外来を受診したADの患者のうち16歳以上で、かつ同意を得られた10名と健常ボランティア17名を対象に経口負荷試験前後の血清および汗中のニッケル濃度を測定した。経口金属負荷の方法として、ニッケルを高濃度で含有する食品を用いた。簡便に入手できかつニッケルの含有量が測定(470 $\mu$ g/1枚)されているLindt chocolate excellence 85% cacao® (Lindt & Sprungli, Kilchberg, Switzerland)を使用し、1

日あたり1/2枚を4日間摂取させた。血清の回収は経口負荷前後に1回ずつ実施した。末梢血から血液を採取し、血清を分離した。負荷後血清の採取は、最終摂取してから約3-6時間後に実施した。採取した汗および血清中のニッケル濃度は東北大学にてICP-MS法により測定した。

#### C. 研究結果

金属負荷前血清ニッケル濃度(mean $\pm$ SD, ng/ml)はIADで3.48 $\pm$ 1.27, EADで2.13 $\pm$ 2.39, HCで0.40 $\pm$ 0.93であった。IADはHCより有意に高く、約8.7倍の濃度であった。金属負荷後の血清ニッケル濃度は負荷前と同様であった。負荷前後で金属濃度の有意な上昇は認めなかった。金属負荷前汗中濃度(mean $\pm$ SD, ng/ml)は、IADで62.39 $\pm$ 13.86, EADで106.05 $\pm$ 154.88, HCで142.32 $\pm$ 136.71であり、3群間で有意差は認めなかった。3群とも金属負荷後の汗中ニッケル濃度に有意な増加は認めなかった。負荷試験中、経口摂取金属により全身性金属アレルギー様の症状が出現したものが2例(顔面の紅斑が増悪したIAD患者1例、手掌の異汗性湿疹が増悪したEAD患者1例)あった。

#### D. 考察

本研究では、IADの患者では嗜好品としてコーヒーやナッツをよく摂取していることに着目し、趣味嗜好の程度で摂取されるであろう経口摂取量を再現し、皮疹の発生の機序を検討したが、直接的

な濃度の上昇は認めなかった。しかし IAD では、ニッケルは EAD や HC よりも血清中に高濃度に存在していることが示されたことから、IAD の発症機序の 1 つとして、金属アレルギーとの結びつきをより考えることができるであろう。高濃度に存在する金属が、血管内でより感作されやすい状況にあること、もしくは近年、ニッケルやコバルトは、樹状細胞を始めとした抗原提示細胞上にある TLR4 を直接刺激する機序を持っていることが明らかになっており、表皮内において抗原提示細胞を直接刺激し、皮疹の形成を担っていることも可能性の一つとして考えられた。

F . 健康危険情報  
なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakabe JI, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y: Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 288: 17179-17189, 2013.
- 2) Mori T, Kabashima K, Fukamachi S, Kuroda E, Sakabe J, Kobayashi M, Nakajima S, Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S, Nakamura M, Tokura Y: D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci* 71: 37-44, 2013.
- 3) Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K: Prostaglandin E2-EP3 Axis in Fine-tuning Excessive Skin Inflammation by Restricting Dendritic Cell Functions. *PLoS ONE* 8: e69599, 2013.
- 4) Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J-I, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y: High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 72: 240-245, 2013.
- 5) Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, Sakabe JI, Nakahigashi K, Kuroda E, Uematsu U, Nakamura J, Akira S, Nakamura M, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K: Prostaglandin E2 is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production. *Sci Rep* 3: 2973, 2013.
- 6) Yamaguchi H, Tatsuno K, Sakabe J, Tokura Y: Second report of FLG R501X mutation in Japanese patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 40: 498-499, 2013.
- 7) Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, Ikeya S, Suzuki T, Aoshima M, Tatsuno K, Fujiyama T, Suzuki M, Yatagai T, Ito T, Ojima T, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134: 957-967.e8, 2014.
- 8) 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.
- 9) Fujiyama T, Kawakami C, Sugita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Shimauchi T, Ito T, Kabashima K, Hashizume H, Tokura Y: Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions. *J Dermatol Sci* 73:85-88, 2014.
- 10) Kasuya A, Sakabe J, Tokura Y: Potential application of in vivo imaging of impaired lymphatic duct to evaluate the severity of pressure ulcer in mouse model. *Sci Rep* 4: 4173, 2014.
- 11) Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y, Nakamura M: IL-2 from Langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing  $\gamma\delta$  T cells. *J Invest Dermatol* 134: 1912-1921, 2014.
- 12) Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura Y, Hashizume H: Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis. *Clin Exp Immunol* 177: 110-120, 2014.
- 13) Tokura Y, Yagi H, Yanaguchi H, Majima Y, Kasuya A, Ito T, Maekawa M, Hashizume H: IgG4-related skin disease. *Br J Dermatol* 171: 959-967, 2014.
- 14) Ito T, Tokura Y: The role of cytokines/chemokines in T cell-mediated autoimmune inflammation: Lessons from hair loss in alopecia areata. *Exp Dermatol* 23: 787-791, 2014.
- 15) Kasuya A, Tokura Y: Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76(3): 169-172, 2014.
- 16) Nakazawa S, Moriki M, Ikeya S, Sakabe J-I, Tokura Y: Atopic dermatitis presenting as

- generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation. *J Dermatol* 41: 230-231, 2014.
- 17) Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y: Leukoderma in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 42: 215-218, 2015.
- 18) Kamiya K, Kamiya E, Kamiya Y, Niwa M, Saito A, Natsume T, Niwa H, Tokura Y: Drug eruption to clavulanic acid with sparing of cellulitis-affecting site. *Allergology Int* (in press)
- 19) Ito T, Tatsuno K, Fujiyama T, Sakabe J, Tokura Y: Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CCL17 in patients with atopic dermatitis. *Allergology Int* (in press).
- 20) Yamaguchi H, Hirasawa N, Asakawa S, Okita K, Tokura Y: Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. *Allergol Int* (in press).

## 2. 学会発表

- 1) 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) Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Tokura Y: High expression of TSLP receptors in circulating CD4+ T cells in atopic dermatitis. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.9. Albuquerque, United States of America.
- 4) 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
- 5) Yuki T, Kusaka A, Komiya A, Tobiishi A, Ota T, Tokura Y: IL-17A weakens the tight junction (TJ) barrier in a human-skin-equivalent model: A possible mechanism of impaired TJ in atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
総合分担研究報告書

アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

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

**研究要旨** アトピー性皮膚炎において痒みは主要な症状の1つとして知られる。既存の痒み治療に抵抗性を示す症例は多く、難治化メカニズムの解明と対策方法の立案が患者しいては社会に貢献できるものと期待される。アトピー性皮膚炎の痒み誘起因子には引用可能な報告があり、「温熱、発汗」が最大の悪化因子とされている。本研究ではこれらの悪化因子が誘導する痒みを選択的に抑制するアトピー性皮膚炎の新しい治療戦略確立を目的とする。

**A．研究目的：**

「温もるとかゆい」は皮膚科の日常診療でよく聞かれる訴えの一つであるとともに、経験的に制御困難な症状でもある。アトピー性皮膚炎の痒み誘起因子には引用可能な報告があり、アトピー性皮膚炎患者の96%は「温熱、発汗」が誘起因子と考えており最大の誘因とされている。本研究は温熱が痒みを誘発するメカニズムに着目した。アトピー性皮膚炎で見られる異常なかゆみ過敏が存在する。このように通常はかゆみに感じられない刺激をかゆみに感じる現象がアロネシスと表現され存在することが知られている。実際にアトピー性皮膚炎では通常疼痛に感じる熱刺激やアセチルコリン投与でかゆみが誘発されると報告されている。しかしこれまでにアロネシスが生じるメカニズムは明らかにされていない。本研究では温熱によるアロネシスの原因を解明し、治療に応用することを目的とする。アロネシスと増感因子が温もった時の痒みを誘発するという仮説をもとに、私たちは神経栄養因子アーテミンに焦点を当てた検討を行う。アーテミンの発現メカニズムを *in vitro* の細胞培養系で確認し、増感作用アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響を *in vivo* における動物実験によって確認してきた。またアーテミン投与と暑熱環境、熱刺激が中枢神経の興奮に与える影響をMRIによって検討した。本年度は、皮膚からアーテミンを中和することで中枢神経の異常な活動に伴うアロネシスが抑制できるかについて検討した。

**B．方法：**

皮膚炎に伴う神経栄養因子アーテミンの皮膚での蓄積が中枢神経の増感を誘導する結果、全身皮膚の熱感受性を誘導することを見出した。皮膚炎が中枢神経を増感させるメカニズムについてマウス

を用いたマンガン造影MRIで検討を行った。さらにこれらの反応が皮膚にアーテミン中和抗体を投与することでどのような影響を受けるかを検討した。

**C．結果：**

アーテミンはサブスタンスP刺激によって真皮線維芽細胞から発現誘導され、*in vitro* において神経芽細胞の増殖活性を亢進させることを見出した（図1）。さらにアーテミンはアトピー性皮膚炎病変部真皮に蓄積し（図2）末梢神経のsproutingを誘導することを確認しており、アーテミンがヒトのアトピー性皮膚炎の皮膚病変部真皮に蓄積していることが確認された。アーテミンを皮下投与したマウスは38度の環境下で全身をwipingする行動が確認された。ところが42度の環境下では飛び跳ねるなどの異常な行動が確認された（図3）。アーテミンは背部皮膚に投与したにも関わらずマウスは全身の熱過敏を来したことから、皮膚への限局的なアーテミンの蓄積が中枢神経の増感を介して全身の温度過敏を誘導しているのではないかと考えた（図3）。実際に背部皮膚限局的にアーテミンを投与したマウスを室温あるいは暑熱環境下におき、脳の興奮状態をMRIにて評価した（図4）。アーテミン投与マウスは室温でも中枢神経が増感しており、その興奮程度は暑熱環境下でより顕著になった。皮膚へのアーテミン投与、あるいはホットプレートによる熱刺激を加えたところ、いずれもマンガン造影MRIで視床下部、扁桃体に造影効果が確認された。次にアーテミン投与群に熱刺激を加えたところ、各々の単独あるいは熱刺激単独刺激よりも視床下部、扁桃体、皮質感覚野にさらに強い造影効果が確認された。この現象は皮膚からアーテ

ミン中和抗体の投与によって減弱した ( 図 5 )

D . 考察 :

アトピー性皮膚炎では皮膚局所におけるアーテミンの蓄積がなんらかの形で中枢神経を増感させることによって痒みが誘導されるのではないかと考えられた ( 図 6 )

E . 結論 :

アーテミンはアトピー性皮膚炎の既存治療に抵抗性を示す痒みの分子標的となりうると考えられた ( 図 6 )

F . 健康危険情報  
該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1: Lee J, Shin Y, Murota H. Oligonol Supplementation Modulates Plasma Volume and Osmolality and Sweating After Heat Load in Humans. *J Med Food*. 2015 Jan 20. PubMed PMID: 25602687.
- 2: Nakano-Tahara M, Terao M, Nishioka M, Kitaba S, Murota H, Katayama I. T Helper 2 Polarization in Senile Erythroderma with Elevated Levels of TARC and IgE. *Dermatology*. 2015 Jan 8. PubMed PMID: 25572944.
- 3: Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(4):824-830.
- 4: Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Yutani M, Murota H, Nakano H, Sawamura D, Katayama I. Atopic Diathesis in Hypohidrotic/Anhidrotic Ectodermal Dysplasia. *Acta Derm Venereol*. 2014 Oct 1. doi: 10.2340/00015555-1978.
- 5: Murota H, Matsui S, Ono E, Kijima A, Kikuta J, Ishii M, Katayama I. Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms. *J Dermatol Sci*. 2015;77:3-10.
- 6: Kurata R, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Sekiguchi K.

Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin. *Cell Struct Funct*. 2014;39:101-12.

- 7: Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Feb;54(2):349-58.
- 8: Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, Murota H, Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S, Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, Katoh N. Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8. *Br J Dermatol*. 2015, 172:272-5.
- 9: Yang F, Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Yang L, Nakamura A, Matsumoto S, Attia M, Murota H, Katayama I. Topical application of rapamycin ointment ameliorates *Dermatophagoides farinae* body extract-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Exp Dermatol*. 2014, 23:568-72.
- 10: Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, Murota H, Katayama I. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation. *PLoS One*. 2014 25;9:e93051.

( 日本語論文 )

1. 室田浩之 【アトピー性皮膚炎治療の最前線】痒み *Derma*. 2014.11(224);38-44
2. 室田浩之 診療の秘訣 アトピー性皮膚炎の汗対策指導 *Modern Physician* 2014.10;34(10);1231
3. 室田浩之 夏季のアトピー性皮膚炎悪化対策 *日本医事新報* 2014.09(4715);63
4. 室田浩之 アトピー性皮膚炎悪化因子の検証 汗と温度に関する最近の知見 *西日本皮膚科* 2014.06;76(3);189-193
5. 室田浩之 発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み *コスメトロジー研究報告* 2014.09;22;168-171
6. 室田浩之 アトピー性皮膚炎における発汗障害 *皮膚病診療* 2014.08;36(8);700-705

7. 室田浩之 新・皮膚科セミナー 汗 生理と病態の全て アトピー性皮膚炎における発汗障害 日本皮膚科学会雑誌 2014.06;124(7);1289-1293
  8. 室田浩之 【最近のトピックス2014 Clinical Dermatology 2014】 皮膚疾患の病態 温まるとなぜかゆいのか? 臨床皮膚科 2014.04;68(5);47-50
  9. 室田浩之 【痒疹の粘り強い治療】 内服・全身療法(かゆみ作働薬) Derma. 2014.02(214);41-47
2. 学会発表
- 1) 室田浩之 アトピー性皮膚炎の悪化因子対策 汗と温度の指導箋 日本皮膚科学会総会 2014.5
  - 2) 室田浩之 皮膚科からみた生活指導 PAD フォーラム 大阪 2014.3/21
  - 3) 室田浩之 発汗と温熱感覚の基礎研究から考えるアトピー性皮膚炎悪化因子対策 日本皮膚科学会東京支部学術大会 2014.2/15-2/16
  - 4) 室田浩之 日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー ーから考えるアトピー性皮膚炎の痒みとその対策 2014.5/10-5/11
  - 5) 室田浩之 日本皮膚科学会総会 教育講演 皮膚アレルギーの汗対策 2014.5/30-6/1
  - 6) 室田浩之 日本皮膚科学会総会 イブニングセミナー アトピー性皮膚炎(小児から成人まで) 2014.5/30-6/1
  - 7) 室田浩之 日本乾癬学会学術大会 ランチョンセミナー 乾癬のかゆみの特徴:皮膚-脳相関の視点からアトピー性皮膚炎と対比する 2014.9/19-9/20
  - 8) 室田浩之 日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会 セミナー アトピー性皮膚炎の痒みアップデート:皮膚と脳の対話 2014.11/22-23

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)  
該当なし

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

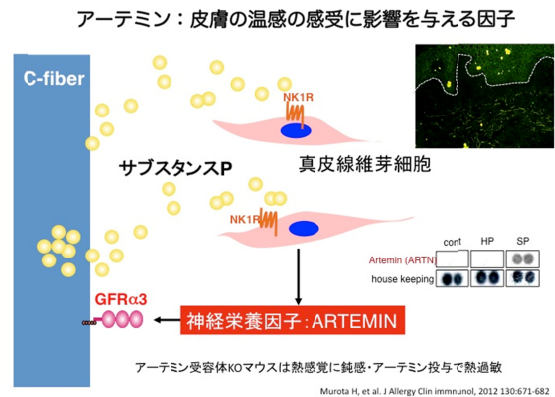


図2(下): 痒みを伴う皮膚疾患におけるアーテミンの発現パターン。アトピー性皮膚炎と貨幣状湿疹で顕著。

### PROTOCOL

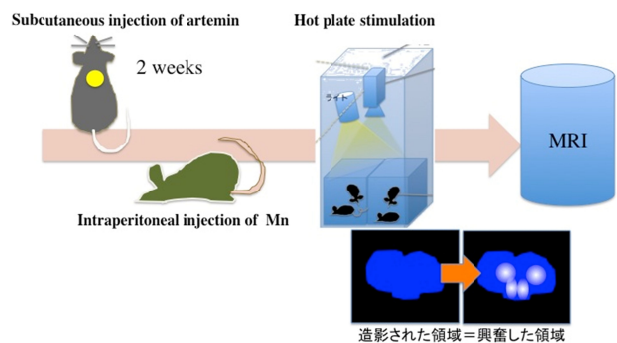


図3(下): アーテミンを投与したマウスを38°Cの環境におくと全身を搔破する動作を見せる。





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

局所皮膚におけるArteminの蓄積が中枢神経を増感させる?

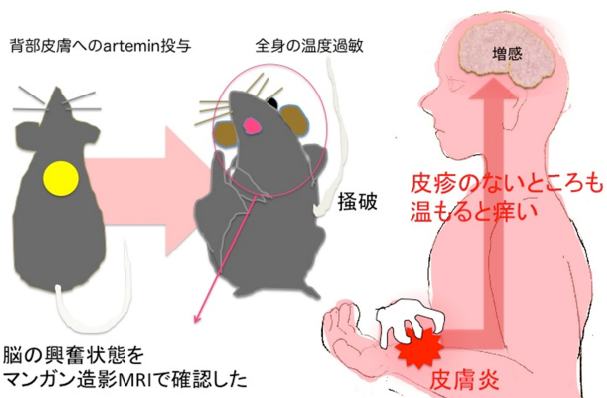


図5(下): アーテミンの中和抗体は脳の異常な興奮を抑制できる

The effect of artemin-neutralization on excitation of brain

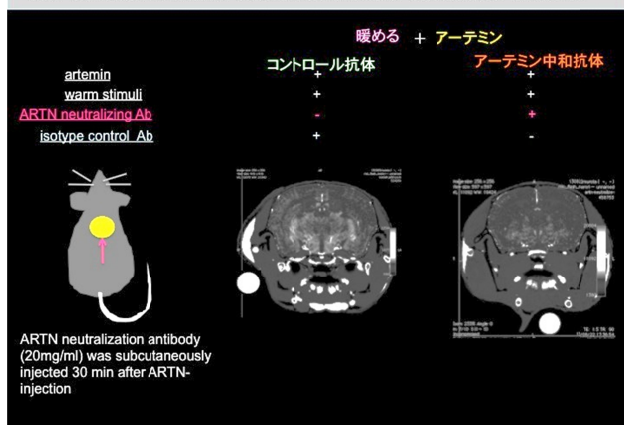
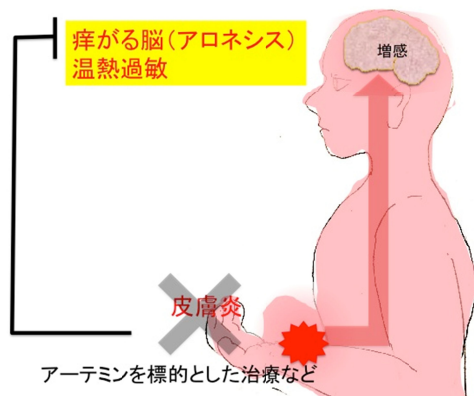


図6(下): アーテミンの中和が痒がる脳を改善する

皮膚から『痒がる脳』を改善できる



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

慢性に経過する痒疹 26 例の検討 分類不能な痒疹の位置づけについて

分担研究者	西澤 綾	防衛医科大学校皮膚科
	端本宇志	防衛医科大学校皮膚科
	佐藤貴浩	防衛医科大学校皮膚科
	横関博雄	東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野

**研究要旨** 慢性痒疹には結節性痒疹と多形慢性痒疹の二つが知られるが、いずれとも判断しがたい痒疹群を経験する。慢性に経過する痒疹患者 26 例について検討したところ、結節性痒疹 5 例、多形慢性痒疹 5 例であり、残りの 16 例はどちらとも分類しがたい症状を呈していた。悪性腫瘍が誘因と考えられた例は極めて少なかった。分類不能な一群は、蕁麻疹様紅斑を伴って広範囲に病変をみる病型が主体であり、TARC 値が他の 2 型に比して高く、またステロイド全身投与歴のあるものが多かった。分類不能な痒疹の位置づけについてさらに検討する必要がある。

**A 研究目的**

痒疹は急性痒疹、亜急性痒疹、慢性痒疹に分けられる。日本皮膚科学会における診療ガイドラインでは、慢性痒疹として結節性痒疹と多形慢性痒疹の二つをあげ、その概念を定義した。しかし多形慢性痒疹の定義にはいまだあいまいな点があるため皮膚科医によってとらえ方に差を生じている。また診療の現場では結節性痒疹とも多形慢性痒疹ともつけがたい痒疹群を経験する。

**B 方法**

慢性に経過する痒疹患者 26 例についてその臨床病型と検査データ、原因などにつき検討した。

**C 結果**

26 例の痒疹患者のうち結節性痒疹 5 例、多形慢性痒疹 5 例であり、残りの 16 例はどちらと

も分類しがたい症状を呈していた。いずれの痒疹においても悪性腫瘍が誘因と考えられた例は極めて少なかった。分類不能な一群は、蕁麻疹様紅斑を伴って広範囲に病変をみる病型が主体であり、TARC 値が他の 2 型に比して高く、またステロイド全身投与歴のあるものが多かった。

**D 考察**

痒疹患者では悪性腫瘍の検索が勧められているが、関連が確認される例は非常に少ないことは注目に値する。また分類不能な痒疹は病変の範囲が広いことや、紅斑性病変が目立っていることに特徴があるが、個疹の反応は多形慢性痒疹に類似している面もある。したがって多形慢性痒疹と病態は同じで、その重症型ないし悪化時の状態を見ている可能性もある。ステロイドの全身投与が表現型の修飾に関与しているかどうか検討が必要である。

**E 結論**

分類不能な痒疹の位置づけ、そして多形慢性痒疹の定義と概念については今後検討の余地がある。

F . 健康危険情報  
なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Sakiyama M, Maeda M, Fujimoto N, Satoh T. Eruptive syringoma localized on intertriginous area. *J Dtsh Dermatol Ges* 12: 72-73, 2014.
2. Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Diffuse disseminated lichenoid-type sarcoidosis mimicking erythroderma. *Int J Dermatol* 53: e369-370, 2014
3. Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, Nakamura T, Takada T, Morita E, Naito M, Wakai K, Inoue H, Tatsukawa S, Sato J, Shimono K, Makino T, Satoh T, Suzuki H, Kanai Y, Hamajima N, Sakurai Y, Ichida K, Shimizu T, Shinomiya N. A common variant of leucine-rich repeat containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Human Cell* 27: 1-4, 2014.
4. Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial porokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition. *Int J Dermatol* 53: e94-95, 2014.
5. Fujimoto N, Iwasaki J, Satoh T. Scrotal calcinosis may arise from cyst wall apoptosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 28: 128-130, 2014.
6. Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H. Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions. *Acta Derm Venereol* 94: 86-87, 2014.
7. Hashimoto T, Satoh T, Furuya A, Kataoka N, Yokozeki H. Kimura's disease with prurigo lesions treated with systemic indomethacin. *J Eur Acad Dermatol venereal* 28: 1260-1262, 2014.
8. Shiba Y, Satoh T. Isolated benign primary cutaneous plasmacytosis. *Int J Dermatol* 53: e397-398, 2014.
9. Furuya A, Takahashi E, Ishii N, Hashimoto T, Satoh T. IgG/IgA pemphigus recognizing desmogleins 1 and 3 in a patient with Sjögren's syndrome. *Eur J Dermatol* 24: 512-513, 2014.
10. Ono K, Fujimoto E, Fujimoto N, Akiyama M, Satoh T, Maeda H, Fujii N, Tajima S. In vitro amyloidgenic peptides of galectin-7: possible mechanism of amyloidogenesis of primary localized cutaneous amyloidosis. *J Biol Chem* 289: 29195-29207, 2014
11. 佐藤貴浩 : 高齢者のアレルギー性皮膚疾患 IV. 多形慢性痒疹とかゆみ アレルギー・免疫 21(2): 288-291, 2014
12. 佐藤貴浩 : 痒疹の粘り強い治療 /慢性痒疹の定義と分類 *Monthly Book Derma* 214(2): 1-4, 2014
13. 佐藤貴浩 : 虫刺され、ストロフルス、痒疹 今日の治療指針—私はこうしている

ー2014 Vol. 56 総編集 山口徹 北原  
光夫 福井次矢 医学書院 東京  
pp1097-1098, 2014

14. 佐藤貴浩：痒疹はどのようにしてできる？ WHAT'S NEW IN 皮膚科学 2014-2015 宮地良樹編 メディカルレビュー社 東京 pp58-59, 2014
15. 端本宇志, 佐藤貴浩：慢性痒疹治療の決め手—慢性痒疹の診断はついたが治療の解決法は？ 苦手な外来皮膚疾患の解決法 宮地良樹編 メディカルレビュー社 東京 pp64-65, 2014
16. 佐藤貴浩：皮膚癢痒症. 診療ガイドラインUP-TO-DATE 監修 門脇 孝, 小室一成, 宮地良樹 メディカルレビュー社 東京 pp631-633, 2014

## 2. 学会発表

1. 佐藤貴浩：アトピー性皮膚炎—基礎の側面から— モーニングセミナー 第44 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 仙台市 23/11/2014
2. Satoh T: What is prurigo? —a mysterious disease with pruritic papules of unknown etiology— The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Osaka, 14/12/2014
3. 佐藤貴浩：好塩基球からみた痒疹の病態と治療 第44 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 仙台市 22/11/2014
4. 佐藤貴浩：皮膚アレルギー疾患の薬物療法—ステロイド外用薬の使い方— 第1回総合アレルギー講習会 横浜市 20/12/2014

H：知的財産権の出願・登録状況  
なし

ヒト iPS 細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響を  
in vitro で詳細に検討するシステム構築

研究協力者 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科 講師  
研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科 教授

**研究要旨** 炎症性皮膚疾患は、その要因が多因子にわたり推測され、遺伝的要因もその一つと考えられる。しかしながら、その遺伝的要因が本当の意味でどのような機序をもって生体に影響を与えるのかをヒトの系で厳密に調べることは難しかった。KO マウスを作成することにより、その遺伝子の持つ意味についてある程度の理解をうることは可能であったが、種の違いは大きく、病態を完全に模倣することは難しいことが度々であった。我々はヒト iPS 細胞を利用すればこのような状況を打開できると考え、まず、アトピー性皮膚炎でその変異が大きく取り上げられているフィラグリン遺伝子をターゲットとした。前年度までに K14-eGFP-hiPS 細胞を作成した。本年度は、そのシステムが動くことを確認した上に、フィラグリン遺伝子の KO あるいは変異挿入に着手した。

A. 研究目的

皮膚疾患の多くは多因子性の疾患であると考えられ、遺伝的要因もそれに含まれると考えられる。これまでもアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異についての報告は多数なされているが、それらの変異が実際に角化細胞の振る舞いにおいてどのような役割を果たしているのかをヒトの系で詳細に検討できるシステムはなかった。そこで、我々は、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒト iPS 細胞を作成し、フィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行うこととした。

B. 方法

目的を達成するために下記のような手順を踏むこととした。

ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs( TAL Effector Nucleases ) あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼを利用するシステムを構築。

ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。

上記システムを導入したヒト iPS 細胞においてフィラグリン遺伝子に変異を導入する(人工ヌクレアーゼ)。

のヒト iPS 細胞を角化細胞に分化させ、検討を行う。

なお、使用するヒト iPS 細胞は研究協力者により、piggybac トランスポゾンシステムを利用して作製し、transgene-free かつ mutation-free であることが確認されたものを使用する。

本年度は、の後半ならびに、について研究をおこなった。

C. 結果

K14-eGFP のシステムが稼働することの確認

K14-eGFP ヒト iPS 細胞より表皮角化細胞を誘導し、誘導された角化細胞が eGFP が発現することを確認した。

フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認

同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断する TALENs を作製した。作成した hFLG-TALENs をヒト iPS 細胞にトランスフェクトし、コロニーをランダムに pick した。これらの iPS 細胞から genomic DNA を採取し、TALENs の認識サイトを中心とした部分を PCR にて増幅し、direct sequence を施行した。その結果、hFLG-TALENs によっては変異あるいは KO されたコロニーを得ることはできなかった。TALENs は作成が容易であるが、DNA の切断効率はせいぜい数%にとどまるとされる。今回、TALENs で変異コロニーを得ることができなかった理由はその切断効率の低さにあると考え、より新しい人工ヌクレアーゼである

CRISPR/Cas9 のシステムを利用することとした。ヒトフィラグリンをターゲットにした CRISPR/Cas9 をデザインし、作成した。

D . 考察 ならびに E . 結論

遺伝子の変異が本当の意味でどのような影響を与えるのか、ということヒトの系で検討する場合には、現状では、iPS 細胞を利用した本研究のようなシステムを利用するほかに方法がないと考えられる。フィラグリン遺伝子と表皮角化細胞をターゲットにした本研究であるが、対象を別にしての応用を広く求めうる研究と考えられる。

F . 健康危険情報  
なし

G . 論文発表

- 1: Shibama S, Igawa K, Munetsugu T, Fukuyama K, Nishizawa A, Takayama K, Yokozeki H. A case of sarcoidosis presenting as livedo. *Ann Dermatol*. 2014 Dec;26(6):773-4.
- 2: Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Diffuse disseminated lichenoid-type cutaneous sarcoidosis mimicking erythroderma. *Int J Dermatol*. 2014 Aug;53(8):e369-70.
- 3: Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Sep;3(9):992-1001.
- 4: Kato K, Hanafusa T, Igawa K, Tatsumi M, Takahashi Y, Yamanaka T, Katayama I. A rare case of annular pustular psoriasis associated with pemphigus foliaceus. *Ann Dermatol*. 2014 Apr;26(2):260-1.
- 5: Senda S, Igawa K, Nishioka M, Murota H, Katayama I. Systemic sclerosis with sarcoidosis: case report and review of the published work. *J Dermatol*. 2014 May;41(5):421-3.
- 6: Igawa K, Konishi M, Moriyama Y, Fukuyama K,

Yokozeki H. Erythroderma as drug eruption induced by intravesical mitomycin C therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Feb 25.

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

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

“ 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究”

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 前年度報告した一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は、免疫細胞に作用してTh1シフトをおこすためアレルギー疾患治療に適していると考えられるが、今年度はその作用機構をさらに詳細に解析した。

A . 研究目的

HVJ-E は Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ)を紫外線等で不活化した粒子に遺伝子や siRNA を封入し、膜融合作用によって直接細胞質内に導入できるベクターである。この粒子と IL12 の組み合わせが、何故、免疫システムを Th1 優位にシフトできるのかを解明し、アトピー等のアレルギー疾患治療剤としての優位性を明らかにする。

B . 研究方法

マウスの一本鎖IL12蛋白質をCHO細胞から精製する。膜融合能を有する、或いは欠失したHVJ-Eを作成する。これらを単独或いは併用して、マウス脾臓細胞全体、さらには脾臓細胞から選別したT cell, B cell, macrophageに作用させ、Th1関連遺伝子の発現をRT-PCRで解析する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

C . 研究結果

HVJ-EとIL12の組み合わせで脾臓細胞からのinterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )のみならず、IL12 receptor, T-bet, IL18の発現もIL12単独よりも有意に亢進することがわかった。この中でIL18のみ、HVJ-E単独で同様に高い発現を得ることができた。その発現亢進は、膜融合能には左右されず、HVJ-EのF蛋白質に依存した。選別した免疫細胞を用いると、IL18はmacrophageにおいて発現が増強された。macrophageではHVJ-EによりCaspase 11, Caspase 1の発現も亢進した。一方IL12のみで低値ながら、有意にIFN- $\gamma$ の発現が増強されるのは、T cellであったがHVJ-Eを併用させてもIFN- $\gamma$ の発現は増強しなかった。しかしHVJ-Eを作用させた

macrophageの培養上清を用いると増強され、IL18の抗体で阻害された。そこでIL12と組換えIL18蛋白質を併用するとT cellからのIFN- $\gamma$ の発現が増強された。IL12 receptor, T-betの発現はIFN- $\gamma$ がT cellに作用して増強された。

D . 考察

HVJ-EのF蛋白質がmacrophageからIL18を産生させ、IL12と共同でT cellに作用してIFN- $\gamma$ が産生され、これがT cellでのIL12 receptorの発現をT betを介して高めることで、免疫細胞間でIFN- $\gamma$ 産生亢進のpositive feedback loopができると考えられる。

E . 結論

IL12とHVJ-E nF蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。

F 健康危険情報  
異常なし

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 第 11 回日本中性子捕捉療法学会 教育講演  
Kaneda, Y. “ウイルスに学ぶ癌治療戦略”  
2014/7/6 大阪
- 第 20 回日本遺伝子治療学会 理事長講演  
Kaneda, Y. “Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients”  
“2014/8/7 東京
- 第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演

Kaneda, Y. "Virosome-mediated cancer  
treatment ~from basic to clinic~" 2014/10/11  
Osong (Korea)

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



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査

研究協力者氏名 野老 翔雲 東京医科歯科大学皮膚科助教  
宇賀神つかさ 東京医科歯科大学皮膚科助教  
井川 健 東京医科歯科大学皮膚科講師  
研究責任者氏名 横関 博雄 東京医科歯科大学皮膚科教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎(AD)は様々な要因が複雑に絡み合って発症する疾患であるが、近年いくつかの subgroup の集まりとする考え方が報告されるようになった。代表的には総 IgE 値により分類する方法がある。今回我々はアトピー性皮膚を IgE <200 の内因性と IgE>200 の外因性の病型に分類し、アトピー性皮膚炎にみられる皮膚症状、特に痒疹反応などを含めた難治性皮膚症状との関連を詳細に検討した。さらに病型や皮膚症状による検査値や金属アレルギー（Ni、Co、Cr）の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着、結節性痒疹などの難治性皮膚症状は内因性 AD に比べて外因性 AD に多い傾向がみられた。内因性 AD は顔面難治性紅斑、手湿疹の合併が多かったが病型による有意差は認めず、金属アレルギーやフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が多かった。今後それらの病変の発症メカニズムを検討していくことでターゲットを絞った新規治療法につながっていくことが期待される。

A．研究目的

AD を IgE <200 の内因性と IgE>200 の外因性の病型に分類し、病型による臨床症状に違いがないか詳細に検討した。さらに病型や皮膚症状による検査値や金属アレルギー（Ni、Co、Cr）の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無についても違いがないか調査を行った。このような検討を多施設にわたって大規模に行った例はなく、今後アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連が明らかになれば、そのような病変の発症メカニズムを検討していく上で大きな利点となり、ひいては、ターゲットを絞った新規治療法の開発につながっていくことが期待される。

B．方法

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎ガイドラインの診断基準を満たし、東京医科歯科大学、浜松医科大学、京都大学、大阪大学、防衛医科大学の皮膚科外来通院中の AD 患者のうち同意が得られたものを対象とした。病型による臨床症状、検査値や金属アレルギー（Ni、Co、Cr）の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。臨床症状としては Dennie-Morgan fold、尋常性魚鱗癬、palmar hyperlinearity、手湿疹、顔面難治性紅斑、紅皮症、頸部色素沈着、脱毛、Hertoghe 徴候、汗疱様発疹、亜急性痒疹、結節性痒疹の合併有無について調査を行った。

## C . 結果

前年の 168 例に新たに 11 例が加わり、計 179 例が登録された。内因性 AD21 例（男 5、女 16）、外因性 AD158 例（男 95、女 63）。内因性 AD は全体の 12%で女性に多く、喘息・鼻炎の既往歴や家族歴は少なかった。臨床的には顔面紅斑、手湿疹の合併が多かったが病型による有意差は認めず、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。一方外因性 AD は喘息・鼻炎の既往歴や家族歴が多く、臨床的には内因性 AD に比べ尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向がみられた。痒疹は亜急性痒疹、結節性痒疹ともに外因性 AD との合併が多かったが、いずれも有意差はなかった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では尋常性魚鱗癬、palmar hyperlinearity の合併が多かった。

## D . 考察

今回の調査では 1 ポイントの血清 IgE で病型を分けたため、将来的に IgE が上がってくる可能性のある軽症 AD 群を内因性アトピー性皮膚炎として集計した可能性がある。しかし、内因性 AD の平均 SCORAD は 37.8 で内訳としては中等症以上の症例が多く、軽症例は少なかった。内因性 AD は女性に多く、金属アレルギーを有する割合が高かった。原因として化粧品や装飾品などで感作された可能性を考えた。内因性 AD の皮膚病変としては顔面紅斑、手湿疹の合併が多かったが病型による有意差はなかった。外因性 AD は内因性 AD に比べて尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向を認め、結節性痒疹も有意差はないものの外因性 AD に多かった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では尋常性魚鱗癬、palmar hyperlinearity の合併が多かった。今回の我々の

調査ではフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合は内因性 AD に多く、これまでの報告とは逆の結果となった。IgE が低く、アトピー素因が少ない内因性 AD の発症にフィラグリン遺伝子変異によるバリア障害やそれに伴うアレルギー感作が関与していても矛盾はなく興味深い。しかし、今回の調査では内因性 AD の症例数は 21 例と少なく、今後さらなる症例の集積をしていく予定である。

## E . 結論

今後さらに AD の病型と難治性皮膚病変の関連を明らかにすることによって、ターゲットを絞った新規治療法の開発が期待される。

## F . 健康危険情報 なし。

## G . 研究発表

1. 論文発表
1. Scalp sarcoidosis mimicking organoid nevus. Yamamoto T, Yokozeki H. Eur J Dermatol. 2014 Dec 16.
2. A case of sarcoidosis presenting as livedo. Shibama S, Igawa K, Munetsugu T, Fukuyama K, Nishizawa A, Takayama K, Yokozeki H. Ann Dermatol. 2014 Dec;26(6):773-4
3. Subcutaneous sarcoidal granuloma underlying porokeratosis in a patient with sarcoid-lymphoma syndrome. Yamamoto T, Yokozeki H. Eur J Dermatol. 2014 Dec 3.
4. Japanese Guideline for Occupational Allergic Diseases 2014. Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J; Committee for Japanese Guideline for Diagnosis and Management of Occupational Allergic Diseases; Japanese Society of Allergology. Allergol Int. 2014 Sep; 63(3):421-42
5. The research for atopic dermatitis: up to date Yokozeki H. Nihon Rinsho. 2014 Aug;72(8):1503-9.
6. Diffuse disseminated lichenoid-type cutaneous sarcoidosis mimicking erythroderma. Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H. Int J Dermatol. 2014 Aug;53(8):e369-70
7. Removal of reprogramming transgenes im

proves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Sep;3(9):992-1001

8. Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during the hair cycle. Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H, Nishimura EK. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jul;27(4):540-51
9. A nucleic acid-based medication for allergic skin diseases. Yokozeki H. *J Dermatol Sci.* 2014 Aug;75(2):75-81
10. Amicrobial pustulosis-like rash associated with systemic lupus erythematosus. Nakazono S, Nojima K, Kumagai J, Hagiyaama H, Yokozeki H, Namiki T. *J Dermatol.* 2014 Apr;41(4):359-60
11. Erythroderma as drug eruption induced by intravesical mitomycin C therapy. Igawa K, Konishi M, Moriyama Y, Fukuyama K, Yokozeki H. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015 Mar;29(3):613-4
12. Kimura's disease with prurigo lesions treated with systemic indomethacin. Hashimoto T, Satoh T, Furuya A, Kataoka N, Yokozeki H. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014 Sep;28(9):1260-2

## 2. 学会発表

1. 野老翔雲、宇賀神つかさ、井川 健、戸倉新樹、宮地良樹、片山一朗、佐藤貴浩、横関博雄 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会

## 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。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐藤貴浩	虫刺され、ストロフルス、痒疹	山口徹 北原光夫 福井次矢	今日の治療指針—私はこうしている—2014 Vol. 56 総編集	医学書院	東京	2014	pp1097-1098
佐藤貴浩	痒疹はどのようにしてできる？	宮地良樹	WHAT'S NEW IN 皮膚科学	メディカルレビュー社	東京	2014	pp58-59
端本宇志, 佐藤貴浩	慢性痒疹治療の決め手—慢性痒疹の診断はついたが治療の解決法は？	宮地良樹	苦手な外来皮膚疾患の解決法	メディカルレビュー社	東京	2014	pp64-65
佐藤貴浩	皮膚瘙癢症.	門脇 孝, 小室一成, 宮地良樹	診療ガイドライン UP-TO-DATE	メディカルレビュー社	東京	2014	pp631-633

## 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
Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J.	Japanese Guideline for Occupational Allergic Diseases 2014. Committee for Japanese Guideline for Diagnosis and Management of Occupational Allergic Diseases: Japanese Society of Allergology.	<i>Allergol Int.</i>	63(3)	421-42.	2014
Yokozeki H.	The research for atopic dermatitis: up to date].	<i>Nihon Rinsho.</i>	72(8)	1503-1509	2014
Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J.	Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells.	<i>Stem Cells Transl Med.</i>	3(9)	992-1001.	2014
Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H, Nishimura EK.	Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during the hair cycle.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	27(4)	540-51.	2014
Yokozeki H.	A nucleic acid-based medication for allergic skin diseases.	<i>J Dermatol Sci.</i>	75(2)	75-81.	2014

Higuchi T, Satoh T, Yokozeki H.	Using CD40 ligand expression to detect antigen-specific T cells in patients with drug eruptions.	<i>Acta Derm Venereol.</i>	94(1)	86-87	2014
Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H	Acrosyringeal Involvement of Palmoplantar Lesions of Eosinophilic Pustular Folliculitis.	<i>Acta Derm Venereol.</i>	93(1).		2013
Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Saeki K, Nakamura M, Masuzawa M, Kaneda Y, Katayama I, Yokozeki H.	Anti-tumor effects of inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene on angiosarcoma	<i>Clin Immunol.</i>	149(1)	1-10	2013
Saeki K, Satoh T, Yokozeki H.	$\alpha(1,3)$ Fucosyltransferases IV and VII are essential for the initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation.	<i>J Invest Dermatol.</i>	133(9):	2161-2169	2013
Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H.	Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2 : therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis.	<i>Immunology.</i>	140(1)	140(1)	2013
Bakocevic, N., Claser, C., Yoshikawa, S., Jones, L.A., Chew, S., Goh. CC., Malleret, B., Larbi, A., Ginhoux, F., de Lafaille, MC., Karasuyama, H., Renia, L., Ng, LG	CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady-state and during helminth and malarial infections.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	44	1823-1834	2014
Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H-U, and Yousefi, S.	NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils.	<i>J. Immunol.</i>	192	5314-5323	2014
Reber, L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L.B., Robinson, W.H., Tsai, M., and Galli, S.J.	Mast cell-derived IL-1 $\beta$ contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice.	<i>Arthritis Rheum.</i>	66	2881-2891	2014
Karasuyama, H., and Yamanishi, Y.	Basophils have emerged as a key player in immunity.	<i>Curr. Opin. Immunol.</i>	31	1-7	2014
Tsai, S.H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada Y., Takeda A., Yoshikawa, S., Obata-Ninomiya, K., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., Kiyono, H., Karasuyama, H., and Takeda, K.	The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells.	<i>Immunity</i>	42	279-293	2015
烏山 一	炎症の抑制・終焉機構「序」	炎症と免疫	22(2)	71	2014
二宮（小畑）一茂、筒井英充、烏山 一	消化管寄生虫感染防御免疫応答における好塩基球の新たな役割	感染・炎症・免疫	44(1)	30-39	2014

烏山 一	好塩基球の光と影「はじめに」	医学のあゆみ	250(12)	1079	2014
太田卓哉、吉川宗一郎、烏山 一	マダニ感染防御と好塩基球	医学のあゆみ	250(12)	1114-1118	2014
三宅健介、烏山 一	最近明らかになってきた好塩基球の役割	臨床免疫・アレルギー科	63 (2)	164-169	2015
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.	<i>Exp Dermatol.</i>	23	359-361	2014
Andoh T, Takayama Y, Kuraishi Y.	Involvement of leukotriene B4 in dermatophyte-related itch in mice.	<i>Pharmacol Rep.</i>	66	699-703	2014
Inami Y, Sasaki A, Andoh T, Kuraishi Y.	Surfactant-induced chronic pruritus: Role of L-histidine decarboxylase expression and histamine production in epidermis.	<i>Acta Derm Venereol.</i>	94	645-650	2014
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.	<i>J Dermatol. Sci</i>	76	206-213	2014
安東嗣修	かゆみ解析の動物モデル	<i>MB. Derma</i>	214	6-11	2014
Honda T, <u>Kabashima K.</u>	Prostanoids in allergy.	<i>Allergol Int.</i>	64(1)	11-16	2015
Nakamizo S, Egawa G, Honda T, <u>Nakajima S.</u> , Belkaid Y, <u>Kabashima K.</u>	Commensal bacteria and cutaneous immunity.	<i>Semin Immunopathol.</i>	37(1)	73-80.	2015
Dainichi T, Hanakawa S, <u>Kabashima K.</u>	Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity.	<i>J Dermatol Sci.</i>	76(2)	81-89	2014
Nomura T, <u>Kabashima K.</u> , Miyachi Y.	The panoply of $\alpha\alpha$ T cells in the skin.	<i>J Dermatol Sci.</i>	76(1)	3-9	2014
Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Egawa G, <u>Nakajima S.</u> , Nakamizo S, Arita M, Kubo M, Miyachi Y, <u>Kabashima K.</u>	Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis.	<i>J Allergy Clin Immunol.</i>	134(1)	100-107	2014

<u>Nakajima S</u> , Kitoh A, Egawa G, Natsuaki Y, Nakamizo S, Moniaga CS, Otsuka A, Honda T, Hanakawa S, Amano W, Iwakura Y, Nakae S, Kubo M, Miyachi Y, <u>Kabashima K</u> .	IL-17A as an inducer for Th2 immune responses in murine atopic dermatitis models.	<i>J Invest Dermatol.</i>	134(8)	2122-30.	2014
Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, <u>Nakajima S</u> , Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, <u>Kabashima K</u> .	Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression.	<i>J Allergy Clin Immunol.</i>	133(1)	139-146	2014
Sakabe JI, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y	Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes.	<i>J Biol Chem</i>	288	17179-17189,	2013
<u>Mori T</u> , <u>Kabashima K</u> , <u>Fukamachi S</u> , <u>Kuroda E</u> , <u>Sakabe J</u> , <u>Kobayashi M</u> , <u>Nakajima S</u> , <u>Nakano K</u> , <u>Tanaka Y</u> , <u>Matsushita S</u> , <u>Nakamura M</u> , <u>Tokura Y</u> :	D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells.	<i>J Dermatol Sci</i>	71	37-44	2013
Shiraishi N, Nomura T, Tanizaki H, Nakajima S, Narumiya S, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K	Prostaglandin E2-EP3 Axis in Fine-tuning Excessive Skin Inflammation by Restricting Dendritic Cell Functions.	<i>PLoS ONE</i>	8	e69599	2013
Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J-I, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y	High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis.	<i>J Dermatol Sci</i>	72	240-245	2013
Sugita K, Nomura T, Ikenouchi-Sugita A, <u>Sakabe JI</u> , <u>Nakahigashi K</u> , <u>Kuroda E</u> , <u>Uematsu U</u> , <u>Nakamura J</u> , <u>Akira S</u> , <u>Nakamura M</u> , <u>Narumiya S</u> , <u>Miyachi Y</u> , <u>Tokura Y</u> , <u>Kabashima K</u>	Prostaglandin E2 is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production.	<i>Sci Rep 3</i>	2973		2013
<u>Yamaguchi H</u> , <u>Tatsuno K</u> , <u>Sakabe J</u> , <u>Tokura Y</u>	Second report of FLG R501X mutation in Japanese patients with atopic dermatitis.	<i>J Dermatol</i>	40	498-499	2013
Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, Ikeya S, Suzuki T, Aoshima M, Tatsuno K, Fujiyama T, Suzuki M, Yatagai T, Ito T, Ojima T, Tokura Y	Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer.	<i>Journal of Allergy and Clinical Immunology</i>	134	957-967	2014
Yamaguchi H, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hashizume H, Tokura Y	Psychological aspects of patients with intrinsic atopic dermatitis.	<i>Eur J Dermatol</i>	24	253-254	2014

Fujiyama T, Kawakami C, Sugita K, Kubo-Kabashima R, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Shimauchi T, Ito T, Kabashima K, Hashizume H, Tokura Y	Increased frequencies of Th17 cells in drug eruptions.	<i>J Dermatol Sci</i>	73	85-88	2014
Kasuya A, Sakabe J, Tokura Y	Potential application of in vivo imaging of impaired lymphatic duct to evaluate the severity of pressure ulcer in mouse model.	<i>Sci Rep</i>	4	4173	2014
Yoshiki R, Kabashima K, Honda T, Nakamizo S, Sawada Y, Sugita K, Yoshioka H, Ohmori S, Malissen B, Tokura Y, Nakamura M	IL-2 from Langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells.	<i>J Invest Dermatol</i>	134	1912-1921	2014
Fujiyama T, Ito T, Ogawa N, Suda T, Tokura, Hashizume H	Preferential infiltration of interleukin-4-producing CXCR4+ T cells in the lesional muscle but not skin of patients with dermatomyositis.	<i>Clin Exp Immunol</i>	177	110-120	2014
Tokura Y, Yagi H, Yanaguchi H, Majima Y, Kasuya A, Ito T, Maekawa M, Hashizume H	IgG4-related skin disease.	<i>Br J Dermatol</i>	171	959-967	2014
Ito T, Tokura Y	The role of cytokines/chemokines in T cell-mediated autoimmune inflammation: Lessons from hair loss in alopecia areata.	<i>Exp Dermatol</i>	23	787-791	2014
Kasuya A, Tokura Y:	Attempts to accelerate wound healing.	<i>J Dermatol Sci</i>	76(3)	169-172,	2014
Nakazawa S, Moriki M, Ikeya S, Sakabe J-I, Tokura Y	Atopic dermatitis presenting as generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation.	<i>J Dermatol</i>	41	230-231	2014
Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y	Leukoderma in patients with atopic dermatitis.	<i>J Dermatol</i>	42	215-218	2014
Kamiya K, Kamiya E, Kamiya Y, Niwa M, Saito A, Natsume T, Niwa H, Tokura Y	Drug eruption to clavulanic acid with sparing of cellulitis-affecting site.	<i>Allergology Int</i>			in press
Ito T, Tatsuno K, Fujiyama T, Sakabe J, Tokura Y	Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CCL17 in patients with atopic dermatitis.	<i>Allergology Int</i>			in press
Yamaguchi H, Hirasawa N, Asakawa S, Okita K, Tokura Y	Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration.	<i>Allergology Int</i>			in press
Lee J, Shin Y, Murota H.	Oligonol Supplementation Modulates Plasma Volume and Osmolality and Sweating After Heat Load in Humans.	<i>J Med Food.</i>			2015
Nakano-Tahara M, Terao M, Nishioka M, Kitaba S, Murota H, Katayama I.	T Helper 2 Polarization in Senile Erythroderma with Elevated Levels of TARC and IgE.	<i>Dermatology.</i>			2015



Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, <u>Murota H</u> , Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y.	Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis.	<i>J Allergy Clin Immunol.</i>	134(4)	824-830.	2014
Koguchi-Yoshioka H, Wataya-Kaneda M, Yutani M, <u>Murota H</u> , Nakano H, Sawamura D, Katayama I.	Atopic Diathesis in Hypohidrotic/Anhidrotic Ectodermal Dysplasia.	<i>Acta Derm Venereol.</i>			2014
<u>Murota H</u> , Matsui S, Ono E, Kijima A, Kikuta J, Ishii M, Katayama I.	Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms.	<i>J Dermatol Sci.</i>	77	3-10	2015
Kurata R, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, <u>Murota H</u> , Katayama I, Sekiguchi K.	Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin.	<i>Cell Struct Funct.</i>	39	101-112	2014
Yang L, Fujimoto M, <u>Murota H</u> , Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T.	Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon.	<i>Rheumatology (Oxford).</i>	54(2)	349-358	2015
Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, <u>Murota H</u> , Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S, Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, Katoh N.	Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8.	<i>Br J Dermatol.</i>	172	272-275	2015
Yang F, Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Yang L, Nakamura A, Matsumoto S, Attia M, <u>Murota H</u> , Katayama I.	Topical application of rapamycin ointment ameliorates <i>Dermatophagoides farinae</i> body extract-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice.	<i>Exp Dermatol.</i>	23	568-572.	2014
Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, <u>Murota H</u> , Katayama I.	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation.	<i>PLoS One.</i>	25	9	2014
室田浩之	【アトピー性皮膚炎治療の最前線】痒み	<i>Derma.</i>	11(224)	38-44	2014
室田浩之	診療の秘訣 アトピー性皮膚炎の汗対策指導	<i>Modern Physician</i>	34(10)	1231	2014
室田浩之	夏季のアトピー性皮膚炎悪化対策	<i>日本医事新報</i>	09(4715)	63	2014
室田浩之	アトピー性皮膚炎悪化因子の検証	<i>西日本皮膚科</i>	76(3)	189-193	2014

室田浩之	発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み	コスメトロジー研究報告	22	168-171	2014
室田浩之	アトピー性皮膚炎における発汗障害	皮膚病診療	36(8)	700-705	2014
室田浩之	新・皮膚科セミナーium 汗生理と病態の全て アトピー性皮膚炎における発汗障害	日本皮膚科学会雑誌	124(7)	1289-1293	2014
室田浩之	【最近のトピックス2014 Clinical Dermatology 2014】皮膚疾患の病態 温まるとなぜかゆいのか?	臨床皮膚科	68(5)	47-50	2014
室田浩之	【痒疹の粘り強い治療】内服・全身療法(かゆみ作働薬)	Derma.	214	41-47	2014
Sakiyama M, Maeda M, Fujimoto N, Satoh T.	Eruptive syringoma localized on intertriginous area.	J Dtsch Dermatol Ges	12	72-73	2014
Nishizawa A, Igawa K, Teraki H, Yokozeki H.	Diffuse disseminated lichenoid-type sarcoidosis mimicking erythroderma.	Int J Dermatol	53	369-370	2014
Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, Nakamura T, Takada T, Morita E, Naito M, Wakai K, Inoue H, Tatsukawa S, Sato J, Shimono K, Makino T, Satoh T, Suzuki H, Kanai Y, Hamajima N, Sakurai Y, Ichida K, Shimizu T, Shinomiya N.	A common variant of leucine-rich repeat containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility.	Human Cell	72	1-4	2014
Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H.	Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial porokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition.	Int J Dermatol	53	94-95	2014
Fujimoto N, Iwasaki J, Satoh T.	Srcotal calcinosis may arise from cyst wall apoptosis.	J Eur Acad Dermatol Venereol	28	128-130	2014
Hashimoto T, Satoh T, Furuya A, Kataoka N, Yokozeki H.	Kimura's disease with prurigo lesions treated with systemic indomethacin.	J Eur Acad Dermatol venereal	28	1260-1262	2014
Shiba Y, Satoh T.	Isolated benign primary cutaneous plasmacytosis. I	Int J Dermatol	53	397-398	2014
Furuya A, Takahashi E, Ishii N, Hashimoto T, Satoh T.	IgG/IgA pemphigus recognizing desmogleins 1 and 3 in a patient with Sjögren's syndrome.	Eur J Dermatol	24	512-513	2014
Ono K, Fujimoto E, Fujimoto N, Akiyama M, Satoh T, Maeda H, Fujii N, Tajima S.	In vitro amyloidgenic peptides of galectin-7: possible mechanism of amyloidogenesis of primary localized cutaneous amyloidosis.	J Biol Chem	289	29195-29207	2014
佐藤貴浩	高齢者のアレルギー性皮膚疾患 IV. 多形慢性痒疹とかゆみ	アレルギー・免疫	21(2)	288-291	2014
佐藤貴浩	痒疹の粘り強い治療 /慢性痒疹の定義と分類	Monthly Book Derma	214(2)	1-4	2014

<u>Shibama S, Igawa K, Munetsugu T, Fukuyama K, Nishizawa A, Takayama K, Yokozeki H.</u>	A case of sarcoidosis presenting as livedo.	<i>Ann Dermatol.</i>	26(6)	733-734	2014
Kato K, Hanafusa T, <u>Igawa K</u> , Tatsumi M, Takahashi Y, Yamanaka T, Katayama I.	A rare case of annular pustular psoriasis associated with pemphigus foliaceus.	<i>Ann Dermatol.</i>	26(2)	260-261	2014
Senda S, <u>Igawa K</u> , Nishioka M, Murota H, Katayama I.	Systemic sclerosis with sarcoidosis: case report and review of the published work.	<i>J Dermatol.</i>	41(5)	421-423.	2014
<u>Igawa K</u> , Konishi M, Moriyama Y, Fukuyama K, Yokozeki H.	Erythroderma as drug eruption induced by intravesical mitomycin C therapy.	<i>J Eur Acad Dermatol Venereol.</i>			2014
Inoue T, Yamaoka T, Murota H, Yokomi A, Tanemura A, <u>Igawa K</u> , Tani M, Katayama I.	Effective oral psoralen plus ultraviolet a therapy for digital ulcers with revascularization in systemic sclerosis.	<i>Acta Derm Venereol.</i>	94(2)	250-251	2014

**平成 26 年度 厚生労働科学研究補助金**

**(難治性疾患克服研究事業)**

**アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいた**

**ピンポイントな新規治療の開発**

**班会議**

開催日:平成 26 年12月13日(土)

会 場:ホテル阪急エキスポパーク 2階 うめ

日本研究皮膚科学会第39回年次学術大会・総会にて

平成26年度 厚生労働科学研究補助金

(難治性疾患克服研究事業(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))

アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発班班会議

平成26年12月13日(土)(13:30-16:30) ホテル阪急エキスポパーク 2階 うめ

座長: 横関博雄

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野

13:30 - 13:35

班長挨拶

研究発表 (1名15分:発表10分、質疑応答5分)

13:35 - 13:50

1. アトピー性皮膚炎患者における血清中および汗中ニッケル濃度とニッケル高濃度含有食品負荷後の変動に関する研究

戸倉新樹

浜松医科大学 皮膚科学

13:50 - 13:55

2. アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

烏山 一(代理:横関博雄)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー分野

13:55 - 14:10

3. アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査

野老翔雲、横関博雄

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 皮膚科学分野

14:10 - 14:25

4. ヒトiPS細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響をin vitroで詳細に検討するシステム構築

井川 健、横関博雄

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 皮膚科学分野

- 休憩 10分 -

14:40 - 14:55

5. アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

室田浩之、片山一朗

大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科教室

14:55 - 15:10

6. 共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析

椋島健治、中島沙恵子

京都大学大学院医学研究科 皮膚科学

15:10 - 15:25

7. 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

金田安史

大阪大学大学院医学系研究科 医学系研究科遺伝子治療学講座

15:25 - 15:40

8. アトピー性皮膚炎の痒みへの好塩基球の関与

安東嗣修

富山大学大学院薬学研究部 応用薬理学

15:40 - 15:55

9. 慢性に経過する痒疹26例の検討 分類不能な痒疹の位置づけについて

西澤 綾、端本宇志、佐藤貴浩

防衛医科大学校 皮膚科

横関博雄

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 皮膚科学分野

15:55 - 16:00

今後の予定について

班長 横関博雄

## アトピー性皮膚炎の難治性皮膚病変の病態解析と病態に基づいたピンポイントな新規治療の開発

研究代表者	横関博雄	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野	教授
研究分担者	佐藤貴浩	防衛医科大学校皮	
	片山一朗	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学	教授
	戸倉新樹	浜松医科大学皮膚科	教授
	烏山 一	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー分野	教授
	安東嗣修	富山大学大学院応用薬理学	准教授
	椛島健治	京都大学医学研究科皮膚科学	准教授
	室田浩之	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学	准教授
	金田安史	大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座	教授
研究協力者	高森 建二	順天堂大学浦安病院	院長
	塩原 哲夫	杏林大学皮膚科	教授
	三橋 善比古	東京医科大学皮膚科	教授
	森田 栄伸	島根大学皮膚科	教授
	坂部 純一	浜松医科大学皮膚科学	特任助教
	山口 隼人	浜松医科大学皮膚科	診療従事者
	龍野 一樹	浜松医科大学皮膚科	助教
	羽座 沙都美	富山大学応用薬理学	大学院生
	倉石 泰	富山大学応用薬理学	教授
	中島 沙恵子	京都大学皮膚科学	研究員
井川 健	東京医科歯科大学皮膚科学分野	講師	
野老翔雲	東京医科歯科大学皮膚科学分野	助教	
端本 宇志	防衛医科大学校皮膚科学講座	助教	

本研究は重症型アトピー性皮膚炎（AD）における難治性皮膚病変（痒疹、紅皮症、顔面紅斑、手湿疹）などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症、異汗性湿疹様病変の発症頻度を各班員の施設にてアンケート調査した。その結果、**尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑**などが外因性ADに高率であった。内因性ADは全体の12%で女性に多く、臨床的には**手湿疹の合併**が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。内因性ADの患者の血清中のニッケル濃度が、外因性ADおよび正常人に比べて有意に高いことも見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一方、**手湿疹診療ガイドライン**委員会を立ち上げ診療アルゴリズム案を策定している。26例の痒疹患者を分類したところ分類しがたい症状を呈した症例が認められた。ADモデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離されるカリクレイン（KLK5）が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出されるmMCP-8が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。今後の将来的展望として**好塩基球をターゲット**とした痒疹型AD病変の新規治療法の開発する予定である。さらに神経栄養因子アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認されアーテミンの中和抗体で改善が認められた。非侵襲的にNMFを測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療とNMFを中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価した。また、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒトiPS細胞を作成し、フィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行った。前年度報告した一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-E(不活性化センダイウイルスエンベロープ)は、免疫細胞に作用してTh1シフトをおこすためアレルギー疾患治療に適していると考えられるが、今年度はその作用機構をさらに詳細に解析した。

### A. 研究目的

本研究は重症型アトピー性皮膚炎（AD）における難治性皮膚病変（痒疹、紅皮症、顔面紅斑）などの発症頻度及びアトピー性皮膚病変の難治性皮膚病変の診療ガイドラインを作成して適切な標準的治療法の確立を目指している。今年度はADを内因性と外因性に分類して各病型における痒疹結節、難治顔面紅斑、紅皮症の発症頻度を明らかにするためのアンケート調査を施行し検討した。さらに、各病型ADの汗を解析して金属の濃度を測定する。さらに、金属負荷試験も試行した。各種のADの皮膚病変のモデルマウスを用いてADの発症機序を解析する。さらに、何故

HVJ-E が AD に効果があるのか、その作用機構を解明し、さらに適した治療剤へと改良することを目的とする。また、ヒト iPS 細胞を利用して、アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行なった。

## B . 方法

### 1 ) 外因性・内因性アトピー性皮膚炎 ( AD ) における臨床症状、フィラグリン遺伝子変異の比較検討

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎ガイドラインの診断基準を満たし、東京医科歯科大学、浜松医科大学、京都大学、大阪大学、防衛医科大学の皮膚科外来通院中の AD 患者のうち同意が得られたものを対象とした。病型による臨床症状、検査値や金属アレルギー ( Ni、Co、Cr ) の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。臨床症状としては Dennie-Morgan fold、魚鱗癬、palmar hyperlinearity、手湿疹、顔面難治性紅斑、紅皮症、頸部色素沈着、脱毛、Hertoghe、汗疱様発疹、亜急性痒疹、結節性痒疹の合併有無について調査を行った。浜松医科大学皮膚科アトピー性皮膚炎外来を受診した AD の患者のうち 16 歳以上で、かつ同意を得られた 10 名と健常ボランティア 17 名を対象に経口負荷試験前後の血清および汗中のニッケル濃度を測定した。

2 ) 本研究班の班員と京都府立医大皮膚科加藤則人教授、杏林大学塩原哲夫教授、藤田保健衛生大学矢上晶子准教授、兵庫県立加古川病院皮膚科足立厚子先生を加えて手湿疹氏音量ガイドライン委員会を立ち上げ 2 回委員会を開催、手湿疹の定義、病態、分類、診療アルゴリズムを検討した。

### 3 ) AD でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立

近年、神経栄養因子アーテミンの皮膚局所への蓄積が全身皮膚の熱感受性を増感させることを見出した。アーテミンが熱痛覚過敏に与える影響をマウスによって確認する。

### 4 ) AD マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与

実験には、AD マウスモデルである雄性 NC 系マウスを用いた。痒み反応の評価は、8mm ビデオカメラでその行動を撮影し行った。本実験では吻側背部への掻き動作回数を数えた。一部の実験では、KLK5 を SPF 飼育下健常マウスに皮下注射して、注射部位への後肢による掻き動作回数を数えた。

5 ) 好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

6 ) River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位 ( 右示指先端指腹 ) および非外用部位の皮膚 ( 左示指先端指腹 ) の NMF を解析し、ステロイド長期外用に伴う皮膚 NMF の変化について検討を行った。

6) ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼを利用するシステムを構築。ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。

### 7 ) 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

HVJ-E (不活性化センダイウイルスエンベロープ) は免疫細胞に作用して Th1 シフトを起こすためアレルギー疾患の治療に適していると考えられる。そこで、さらにその作用を強力にするために一本鎖 IL12 ポリペプチドと HVJ-E を併用することにより、樹状細胞や脾臓細胞からの Interferon- ( IFN- ) の産生が亢進するかどうかを、ELISA 法で測定した。

## C . 結果

174 例が登録された。内因性 AD 21 例 ( 男 5、女 16 )、外因性 AD 153 例 ( 男 91、女 62 )。内因性 AD は全体の 12% で女性に多く、喘息・鼻炎の既往歴や家族歴は少なかった。臨床的には手湿疹の合併が多い傾向がみられ、金属パッチテス



トが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。一方外因性ADは喘息・鼻炎の既往歴や家族歴が多く、臨床的には尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向がみられた。痒疹は亜急性痒疹、結節性痒疹ともに外因性ADとの合併が多かったが、いずれも有意差はなかった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では病型にかかわらず尋常性魚鱗癬、palmar hyperlinearityの合併が多かった(横関)。手湿疹診療ガイドラインは策定中である(横関)。金属負荷前血清ニッケル濃度(mean±SD, ng/ml)は内因性ADで $3.48 \pm 1.27$ , 外因性ADで $2.13 \pm 2.39$ , 正常人で $0.40 \pm 0.93$ であった(戸倉)。フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断するTALENsを作製した(井川)。皮膚へのアーテミン投与、あるいはホットプレートによる熱刺激を加えたところ、いずれもマンガン造影MRIで視床下部、扁桃体に造影効果がみられアーテミン中和抗体の投与によって減弱することが確認された(片山、室田)。健常NCマウスへのKLK5の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応はPAR2拮抗薬により抑制された。皮膚においてKLK5 mRNAの発現やKLK5の活性が、健常マウスに比べ、皮膚炎マウスで増加していた(安東)。ステロイド長期外用後の皮膚におけるNMFは長期外用しなかった皮膚と比較して著明に低下していた。NMFの主要な構成成分であるピロリドンカルボン酸(PCA)も同様の傾向を認めた。一方で、角質間脂質の一つとして知られるセラミドについてはステロイドの長期外用による影響を認めなかった(桜島)。HVJ-EとIL12の組み合わせで脾臓細胞からのinterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )のみならず、IL12 receptor, T-bet, IL18の発現もIL12単独よりも有意に亢進することがわかった(金田)。

#### D. 考察

外因性ADは重症型の発疹である**紅皮症、頸部色素沈着の合併、結節性痒疹、顔面紅斑**が多く見られた。IgEの関与する外因性ADの方が重症ADの傾向が示された。内因性ADの発症機序の一つの可能性として、摂取された**金属**が汗を通じて経皮的に排泄され、正常な表皮バリアをも通過することで、金属アレルギーを発症し、皮疹が生じていると推測した。血清中に高濃度に存在するニッケルが、内因性ADの発症に寄与している可能性が推測された。ADモデルマウスではアトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離されるKLK5が関与している可能性があること好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出されるmMCP-8が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していること明らかになった。今後の将来的展望として**好塩基球をターゲット**とした痒疹型AD病変の新規治療法の開発する予定である。ADでは皮膚局所におけるアーテミンの蓄積がなんらかの形で中枢神経を増感させることによって痒みが誘導されるのではないかと考えられた。**アーテミン**はアトピー性皮膚炎の痒みの治療標的になりうると考えられた。共焦点ラマン分光装置を用いたNMFを中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。HVJ-EのF蛋白質がmacrophageからIL18を産生させ、IL12と共同でT cellに作用してIFN- $\gamma$ が産生され、これがT cellでのIL12 receptorの発現をT betを介して高めることで、免疫細胞間でIFN- $\gamma$ 産生亢進のpositive feedback loopができると考えられる。さらに、ヒトiPS細胞を利用して、フィラグリンなどの遺伝子変異が実際の病態形成に与える影響について詳細に検討できるシステムの構築を作成中である。このiPS細胞を用いた3次元表皮シートモデルにより遺伝子変異が表皮全体の構築、サイトカインなどにどのような影響を与えるか明らかになる。

#### E. 結論

今後さらにADの病型と難治性皮膚病変の関連を明らかにすることによって、**ターゲットを絞った新規治療法の開発**が期待される。外因性ADは重症が多く難治性病変である**痒疹、手湿疹診療ガイドライン**を作成してピンポイントに治療することは意義がある。血清中に高濃度に存在するニッケルが、内因性アトピーの発症に寄与している可能性が推測された。内因性ADでは金属市制限をターゲットとした治療法が可能である。ADモデルマウスを用いた研究では、痒疹反応が**好塩基球の異常**に起因することが強く示唆されmMCP-8が重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、PAR2は、本研究成果に加え、痒み反応発生に重要な役割を担っていることが明らかとなり、現在、低分子の**PAR2拮抗薬**の候補リード化合物の合成を進めており、薬理的にスクリーニングが必要である。その他、**アーテミン**もアトピー性皮膚炎の痒みの治療標的になりうると考えられた。IL12とHVJ-EのF蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。さらに、本研究により、フィラグリン遺伝子変異が与える影響を検討するシステムの構築が完了した。今後、分化誘導して得られた表皮角化細胞において、フィラグリン遺伝子変異の有無のみが違う状況の比較検討をすることにより、アトピー性皮膚炎においてフィラグリン遺伝子変異が存在することの意味合いについて、これまでと違った面よりアプローチができると考えられる。

# アトピー性皮膚炎患者における血清中および汗中ニッケル濃度とニッケル高濃度含有食品負荷後の

## 変動に関する研究

研究分担者 戸倉新樹 浜松医科大学皮膚科 教授  
研究協力者 山口隼人 浜松医科大学皮膚科 診療従事者  
平澤典保 東北大学大学院生活習慣病治療薬学分野 教授

### 総括

内因性アトピー性皮膚炎の発症要因として金属の関与が推測されている。今回、内因性アトピー性皮膚炎の患者の血清中のニッケル濃度が、外因性および正常人に比べて有意に高いことを見出した。汗中のニッケル濃度は3群間で差を認めなかった。一日当たりの日本人のニッケル摂取量にほぼ相当する量を4日間負荷したチョコレートを用いた経口負荷試験前後では、汗および血清中のニッケル濃度の変化は、試験前後で有意な上昇は認めなかった。血清中に高濃度に存在するニッケルが、内因性アトピーの発症に寄与している可能性が推測された。体液中の金属という新しい着眼で検討を続けている。

### A. 研究目的

我々は、内因性アトピー性皮膚炎を外因性アトピー性皮膚炎と比較し、臨床的特徴、免疫学的特徴を検討してきた。これまでIADのニッケル、コバルト、クロムに対する金属パッチテスト陽性率は、いずれか1つ以上の金属に陽性を示す割合は汗中のニッケル濃度がEADに比べて高いことを示した。IADの組織中で認められたTh1サイトカインの発現や高い金属パッチテスト陽性率を説明するものとして、金属やハプテンなどの小分子の関与したアレルギーはTh1に変調しやすいことから、IADの発症に金属アレルギーが何らかの形で関与していることを推測した。今回我々は、その仮説を検証するために、通常日本人の経口摂取するニッケルにほぼ相当する量を経口負荷し、その前後で血清および汗中のニッケル濃度を比較し、IADにおける金属アレルギーの関与を解明することを試みた。

### B. 方法

当皮膚科アトピー性皮膚炎外来を受診したADの患者のうち16歳以上で、かつ同意を得られた10名と健常ボランティア17名を対象に経口負荷試験前後の血清および汗中のニッケル濃度を測定した。経口金属負荷の方法として、ニッケルを高濃度で含有する食品を用いた。簡便に入手できかつニッケルの含有量が測定(470 $\mu$ g/1枚)されているLindt chocolate excellence 85% cacao® (Lindt & Sprungli, Kilchberg, Switzerland)を使用し、1日あたり1/2枚を4日間摂取させた。血清の回収は経口負荷前後に1回ずつ実施した。末梢血から血液を採取し、血清を分離した。負荷後血清の採取は、最終摂取してから約3-6時間後に実施した。採取した汗および血清中のニッケル濃度は東北大学にてICP-MS法により測定した。

### C. 結果

金属負荷前血清ニッケル濃度 (mean  $\pm$  SD, ng/ml) はIADで $3.48 \pm 1.27$ , EADで $2.13 \pm 2.39$ , HCで $0.40 \pm 0.93$ であった。IADはHCより有意に高く、約8.7倍の濃度であった。金属負荷後の血清ニッケル濃度は負荷前と同様であった。負荷前後で金属濃度の有意な上昇は認めなかった。金属負荷前汗中濃度 (mean  $\pm$  SD, ng/ml) は、IADで $62.39 \pm 13.86$ , EADで $106.05 \pm 154.88$ , HCで $142.32 \pm 136.71$ であり、3群間で有意差は認めなかった。3群とも金属負荷後の汗中ニッケル濃度に有意な増加は認めなかった。負荷試験中、経口摂取金属により全身性金属アレルギー様の症状が出現したものが2例(顔面の紅斑が増悪したIAD患者1例、手掌の異汗性湿疹が増悪したEAD患者1例)であった。

### D. 考察

本研究では、IADの患者では嗜好品としてコーヒーやナッツをよく摂取していることに着目し、趣味嗜好の程度で摂取されるであろう経口摂取量を再現し、皮疹の発生の機序を検討したが、直接的な濃度の上昇は認めなかった。しかし、IADでは、ニッケルはEADやHCよりも血清中に高濃度に存在していることが示されたことから、IADの発症機序の1つとして、金属アレルギーとの結びつきをより考えることができるであろう。高濃度に存在する金属が、血管内でより感作されやすい状況にあること、もしくは近年、ニッケルやコバルトは、樹状細胞を始めとした抗原提示細胞上にあるTLR4を直接刺激する機序を持っていることが明らかになっており、表皮内において抗原提示細胞を直接刺激し、皮疹の形成を担っていることも可能性の一つとして考えられた。

## アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

研究分担者 烏山 一 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 教授

### A. 研究目的

私たちは、これまでの研究で、マウス・マスト細胞プロテアーゼ・ファミリーに分類されるセリン・プロテアーゼのなかで、mMCP-8 と mMCP-11 がマスト細胞ではなく、好塩基球に選択的に発現していることを見いだした。それぞれの特異抗体を作製して、蛋白発現を解析したところ、いずれも好塩基球の分泌顆粒内に貯蔵されており、活性化した好塩基球の脱顆粒の際に、細胞外に放出されることが判明した。リコンビナント mMCP-11 を作製し、マウス皮内に投与したところ、血管透過性亢進と細胞浸潤を伴う皮膚腫脹が誘導された。このことから、mMCP-11 が好塩基球に依って誘導される皮膚アレルギー炎症のエフェクター分子として機能していることが示唆された。一方、mMCP-8 は構造的には Granzyme B に類似しており、トリプターゼ活性を有する mMCP-11 とは異なった機能を有する可能性が考えられる。そこで今回、好塩基球由来 mMCP-8 のアレルギー炎症における役割を明らかにすることを目的に研究を進めた。

### B. 方法

好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。（倫理面への配慮）動物実験はすべて東京医科歯科大学動物実験指針に則り、実験動物委員会の承認を得ておこなった。

### C. 結果

mMCP-8 を皮内投与した予備実験では、明確な血管透過性亢進は認められなかったが、好中球を主とした細胞浸潤をとともなう皮膚腫脹が観察された。

### D. 考察

さらなる繰り返しの実験が必要であるが、予備実験結果からみて、mMCP-8 も好塩基球の炎症惹起分子として機能している可能性が考えられた。mMCP-11 投与の場合と比べて、血管透過性亢進作用が弱いことや浸潤細胞の種類が異なることから、mMCP-8 と mMCP-11 では標的細胞・分子が異なる可能性がある。

### E. 結論

好塩基球に特異的に発現し、脱顆粒にともなって細胞外に放出される mMCP-8 が、好塩基球によるアレルギー炎症の誘導に関与していることが示唆された。

## アトピー性皮膚炎の病型と難治性皮膚病変の関連に関する疫学調査

研究協力者氏名 野老 翔雲 東京医科歯科大学皮膚科助教  
宇賀神つかさ 東京医科歯科大学皮膚科助教  
井川 健 東京医科歯科大学皮膚科講師  
研究責任者氏名 横関 博雄 東京医科歯科大学皮膚科教授

### A．背景

アトピー性皮膚炎(AD)は様々な要因が複雑に絡み合って発症する疾患であるが、近年いくつかの subgroup の集まりとする考え方が報告されるようになった。代表的には総 IgE 値により分類する方法がある。

### B．目的

AD を IgE < 200 の内因性と IgE > 200 の外因性の病型に分類し、臨床症状や検査値の相違について検討した。

### C．方法

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎ガイドラインの診断基準を満たし、東京医科歯科大学、浜松医科大学、京都大学、大阪大学、防衛医科大学の皮膚科外来通院中の AD 患者のうち同意が得られたものを対象とした。病型による臨床症状、検査値や金属アレルギー (Ni, Co, Cr) の有無、フィラグリン遺伝子変異の有無に違いがないか調査を行った。臨床症状としては Dennie-Morgan fold、魚鱗癬、palmar hyperlinearity、手湿疹、顔面難治性紅斑、紅皮症、頸部色素沈着、脱毛、Hertoghe、汗疱様発疹、亜急性痒疹、結節性痒疹の合併有無について調査を行った。

### D．結果

174 例が登録された。内因性 AD 21 例 (男 5、女 16)、外因性 AD 153 例 (男 91、女 62)。内因性 AD は全体の 12% で女性に多く、喘息・鼻炎の既往歴や家族歴は少なかった。臨床的には手湿疹の合併が多い傾向がみられ、金属パッチテストが陽性の患者やフィラグリン遺伝子変異を有する患者の割合が高かった。一方外因性 AD は喘息・鼻炎の既往歴や家族歴が多く、臨床的には尋常性魚鱗癬、紅皮症、頸部色素沈着の合併が多い傾向がみられた。痒疹は亜急性痒疹、結節性痒疹ともに外因性 AD との合併が多かったが、いずれも有意差はなかった。フィラグリン遺伝子変異を有する症例では病型にかかわらず尋常性魚鱗癬、palmar hyperlinearity の合併が多かった。

### E．結論

今後さらに AD の病型と難治性皮膚病変の関連を明らかにすることによって、ターゲットを絞った新規治療法の開発が期待される。

## ヒト iPS 細胞を利用してフィラグリン遺伝子変異が角化細胞に与える影響を in vitro で詳細に検討するシステム構築

研究協力者 井川 健 東京医科歯科大学皮膚科講師  
研究代表者 横関博雄 東京医科歯科大学皮膚科教授

### A．研究目的

皮膚疾患の多くは多因子性の疾患であると考えられ、遺伝的要因もそれに含まれると考えられる。これまでもアトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子の変異についての報告は多数なされているが、それらの変異が実際に角化細胞の振る舞いにおいてどのような役割を果たしているのかをヒトの系で詳細に検討できるシステムはなかった。そこで、我々は、フィラグリン遺伝子の変異の有無のみに差異のある一組のヒト iPS 細胞を作成し、フィラグリン遺伝子変異の影響について検討を行うこととした。

### B．方法

目的を達成するために下記のような手順を踏むこととした。

ヒト iPS 細胞において遺伝子ターゲティングをある程度自在に行うために TALENs ( TAL Effector Nucleases ) あるいは CRISPR/Cas9 といった人工ヌクレアーゼを利用するシステムを構築。

ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導する際のモニタリングシステムとして、ケラチン遺伝子の発現状況を可視化してモニターできるシステムを構築。

上記システムを導入したヒト iPS 細胞においてフィラグリン遺伝子に変異を導入する (人工ヌクレアーゼ)。

のヒト iPS 細胞を角化細胞に分化させ、検討を行う。

なお、使用するヒト iPS 細胞は研究協力者により、piggybac トランスポゾンシステムを利用して作製し、transgene-free かつ mutation-free であることが確認されたものを使用する。

### C．結果

TALENs を利用するシステムの構築ならびにケラチン遺伝子発現可視化システムの構築

Voytas らにより確立されている Golden Gate Methods を modify した方法を用いて、TALENs を作製するシステムを構築し、それを用いて、ヒト iPS 細胞において、K14 遺伝子の下流に eGFP 遺伝子をノックインすることに成功した。

上記システムが稼働することの確認

上記のヒト iPS 細胞より表皮角化細胞を誘導し eGFP が発現することを確認した。

フィラグリン遺伝子変異挿入のための人工ヌクレアーゼの作製と変異挿入の確認

同様に、上記システムを利用して、ヒトフィラグリン遺伝子を切断する TALENs を作製した。

### D．考察 ならびに E．結論

遺伝子の変異が本当の意味でどのような影響を与えるのか、ということヒトの系で検討する場合には、現状では、iPS 細胞を利用した本研究のようなシステムを利用するほかに方法がないと考えられる。フィラグリン遺伝子と表皮角化細胞をターゲットにした本研究であるが、対象を別にしての応用を広く求めうる研究と考えられる。

## アトピー性皮膚炎でみられる痒み過敏選択的な治療戦略の確立にむけて

研究分担者 片山一郎 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学教授

研究分担者 室田浩之 大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座皮膚科学准教授

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎において痒みは主要な症状の1つとして知られる。既存の痒み治療に抵抗性を示す症例は多く、難治化メカニズムの解明と対策方法の立案が患者しいては社会に貢献できるものと期待される。アトピー性皮膚炎の痒み誘起因子には引用可能な報告があり、「温熱、発汗」が最大の悪化因子とされている。本研究ではこれらの悪化因子が誘導する痒みを選択的に抑制するアトピー性皮膚炎の新しい治療戦略確立を目的とする。

### B. 方法

皮膚表面の刺激が中枢あるいは末梢神経の影響を受け増感されることで通常はかゆみに感じられない刺激がかゆみに感じられることがある(アロネシス)。私達は近年、皮膚炎に伴う神経栄養因子アーテミンの皮膚での蓄積が中枢神経の増感を誘導する結果、全身皮膚の熱感受性を誘導することを見出した。皮膚炎が中枢神経を増感させるメカニズムについてマウスを用いたマンガン造影MRIで検討を行った。さらにこれらの反応が皮膚にアーテミン中和抗体を投与することでどのような影響を受けるかを検討した。

### C. 結果

皮膚へのアーテミン投与、あるいはホットプレートによる熱刺激を加えたところ、いずれもマンガン造影MRIで視床下部、扁桃体に造影効果が確認された。次にアーテミン投与群に熱刺激を加えたところ、各々の単独あるいは熱刺激単独刺激よりも視床下部、扁桃体、皮質感覚野にさらに強い造影効果が確認された。この現象は皮膚からアーテミン中和抗体の投与によって減弱した。

### D. 考察

アトピー性皮膚炎では皮膚局所におけるアーテミンの蓄積がなんらかの形で中枢神経を増感させることによって痒みが誘導されるのではないかと考えられた。

アーテミンはアトピー性皮膚炎の既存治療に抵抗性を示す痒みの分子標的となりうると考えられた。

## 共焦点ラマン分光装置を用いた非侵襲的な皮膚バリア機能の解析

研究分担者 梶島 健治 京都大学 医学研究科 皮膚科学 准教授  
研究協力者 中島沙恵子 京都大学 医学研究科 皮膚科学 研究員

### A. 研究目的

哺乳類皮膚表皮の顆粒層特異的に発現するフィラグリンのヒトにおける欠失変異がアトピー性皮膚炎を引き起こす遺伝子素因の一つとなっていることが、2006年に McLean らにより報告された。フィラグリンは角層内でケラチン繊維から遊離し、アミノ酸にまで分解され、天然保湿因子 (Natural Moisturising Factor: NMF) として角層間に放出される。NMF は皮膚の水分保持のみならず、皮膚 pH の維持、感染防御、角層内での酵素反応の制御を行い、皮膚バリア機能の維持に重要な役割を果たす。フィラグリン遺伝子変異の有無にかかわらず、多くのアトピー性皮膚炎患者の NMF は健常人と比較して低下していることが報告されており、NMF の低下がアトピー性皮膚炎のバリア機能低下の一因であることが明らかとなっている。NMF の測定はこれまで、テープストリッピングによる表皮剥離や皮膚生検といった侵襲を伴う方法でしか測定することができず、同一個体・同一部位での評価や経時的な評価は困難であった。そこで本研究では、非侵襲的に NMF を測定出来る共焦点ラマン分光装置を用い、アトピー性皮膚炎患者の疾患重症度や治療と NMF を中心とする皮膚バリア機能の関連について多変量的な視点での評価を目的とする。

### B. 方法

アトピー性皮膚炎の標準的治療の一つであるステロイド局所外用療法は、皮膚に浸潤してきた炎症細胞に対して免疫抑制作用を発揮することにより治療効果を発揮する。一方で、ステロイドの長期的な外用により皮膚萎縮・菲薄化・毛細血管拡張といった副作用を生じることが知られているが、ステロイドの長期外用が皮膚バリア機能に及ぼす影響についての詳細は不明であった。そこで今回、ステロイド長期使用歴のあるアトピー性皮膚炎患者の皮膚と、同一患者でステロイド長期使用していない皮膚の NMF を共焦点ラマン分光装置を用いて測定し、ステロイド長期使用の皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討を行った。具体的には、River Diagnosis 社製共焦点ラマン分光装置を用いて、アトピー性皮膚炎患者のステロイド軟膏長期外用部位(右示指先端指腹)および非外用部位の皮膚(左示指先端指腹)の NMF を解析し、ステロイド長期外用に伴う皮膚 NMF の変化について検討を行った。同時に、皮膚 pH、経皮的水分蒸散量 (Trans-epidermal water loss: TEWL) およびセラミド含有量についても評価を行った。

### C. 結果

ステロイド長期外用後の皮膚における NMF は長期外用しなかった皮膚と比較して著明に低下していた。NMF の主要な構成成分であるピロリドンカルボン酸 (PCA) も同様の傾向を認めた。一方で、角質間脂質の一つとして知られるセラミドについてはステロイドの長期外用による影響を認めなかった。経皮的水分蒸散量および pH はステロイド長期外用により共に低下した。

### D. 考察

これまで侵襲的な方法でしか測定出来なかった皮膚 NMF 含有量を非侵襲的に測定し、ステロイド長期外用の皮膚バリア機能に及ぼす影響について検討を行った。ステロイド長期外用により NMF は低下する一方、細胞間脂質の一つであるセラミドは低下しなかった。

### E. 結論

共焦点ラマン分光装置を用いて、非侵襲的に皮膚における NMF 含有量を測定した。ステロイド長期外用により NMF は低下し、皮膚バリア機能が低下していることが明らかとなった。共焦点ラマン分光装置を用いた NMF を中心とするアトピー性皮膚炎の皮膚病態の解析により、皮膚バリア機能に焦点を当てた新規治療法の探索が可能となることが期待される。

## 生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科教授

### A．研究目的

HVJ-E は Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ) を紫外線等で不活化した粒子に遺伝子や siRNA を封入し、膜融合作用によって直接細胞質内に導入できるベクターである。この粒子と IL12 の組み合わせが、何故、免疫システムを Th1 優位にシフトできるのかを解明し、アトピー等のアレルギー疾患治療剤としての優位性を明らかにする。

### B．研究方法

マウスの一本鎖 IL12 蛋白質を CHO 細胞から精製する。膜融合能を有する、或いは欠失した HVJ-E を作成する。これらを単独或いは併用して、マウス脾臓細胞全体、さらには脾臓細胞から選別した T cell, B cell, macrophage に作用させ、Th1 関連遺伝子の発現を RT-PCR で解析する。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

### C．研究結果

HVJ-E と IL12 の組み合わせで脾臓細胞からの interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) のみならず、IL12 receptor, T-bet, IL18 の発現も IL12 単独よりも有意に亢進することがわかった。この中で IL18 のみ、HVJ-E 単独で同様に高い発現を得ることができた。その発現亢進は、膜融合能には左右されず、HVJ-E の F 蛋白質に依存した。選別した免疫細胞を用いると、IL18 は macrophage において発現が増強された。macrophage では HVJ-E により Caspase 11, Caspase 1 の発現も亢進した。一方 IL12 のみで低値ながら、有意に IFN- $\gamma$  の発現が増強されるのは、T cell であったが HVJ-E を併用させても IFN- $\gamma$  の発現は増強しなかった。しかし HVJ-E を作用させた macrophage の培養上清を用いると増強され、IL18 の抗体で阻害された。そこで IL12 と組換え IL18 蛋白質を併用すると T cell からの IFN- $\gamma$  の発現が増強された。IL12 receptor, T-bet の発現は IFN- $\gamma$  が T cell に作用して増強された。

### D．考察

HVJ-E の F 蛋白質が macrophage から IL18 を産生させ、IL12 と共同で T cell に作用して IFN- $\gamma$  が産生され、これが T cell での IL12 receptor の発現を Tbet を介して高めることで、免疫細胞間で IFN- $\gamma$  産生亢進の positive feedback loop ができると考えられる。

### E．結論

IL12 と HVJ-E nF 蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。



## アトピー性皮膚炎マウスモデルの自発的痒み関連動作への皮膚好塩基球の関与に関する研究

研究分担者 安東嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部准教授  
研究協力者 中林数馬 富山大学大学院医学薬学教育部院生  
辻井謙一郎 富山大学大学院医学薬学教育部院生  
倉石 泰 富山大学大学院医学薬学研究部名誉教授

### A．研究目的

アトピー性皮膚炎は、難治性痒痒性皮膚疾患の1つであり、その痒みの発生機序は未だ解明されていない。これまで、我々は、アトピー性皮膚炎マウスモデルの痒み反応に好塩基球が関与すること、プロテアーゼ活性化受容体2 (PAR2) や好塩基球から遊離されるセリンプロテアーゼ mMCP-11 が関与していることを見出してきた。アトピー性皮膚炎の症状の一つに皮膚バリア破壊が認められるが、その機序の一つにセリンプロテアーゼの一つある Kallikrein 5 (KLK5) の関与が知られており、さらに PAR2 を活性化することも知られている。そこで、本研究では、本マウスモデルの痒み反応への KLK5 の関与について検討した。

### B．方法

実験には、雄性の SPF (specific pathogen free) 環境下飼育健全 NC マウス及び conventional 環境下で飼育しアトピー様皮膚炎の発症した NC マウスを用いた。痒み反応の評価は、無人環境下にマウスを撮影用ケージにいれ、デジタルビデオカメラでその行動を撮影し、その後、ビデオの再生により行った。マウスは、1秒間に数回後肢で掻くので、足を挙げて降ろすまでの一連の掻き動作を1回として、本実験では吻側背部への掻き動作回数を数えた。一部の実験では、KLK5 を SPF 飼育下健全マウスに皮内注射して、注射部位への後肢による掻き動作回数を数えた。皮膚内の KLK5 mRNA の発現は RT-PCR 法により、KLK5 の発現分布は免疫染色法により解析した。

### C．結果

健全 NC マウスへの KLK5 の皮内注射により痒み反応が惹起され、この反応は PAR2 拮抗薬により抑制された。皮膚において KLK5 mRNA の発現や KLK5 の活性が、健全マウスに比べ、皮膚炎マウスで増加していた。KLK5 の活性は、セリンプロテアーゼ阻害薬の nafamostat mesilate で抑制された。皮膚において KLK5 は、主にケラチノサイトでの発現が認められ、一部好塩基球にも認められた。

### D．考察

KLK5 は角層の剥離に関係していることが知られているが、さらに本研究において痒み因子の一つであることが見出された。KLK5 誘発の痒み反応が PAR2 拮抗薬で抑制されたことから、PAR2 を介して痒み反応が起こっていると示唆される。PAR2 は、皮内では主にケラチノサイトに発現しており、KLK5 発現分布からオートクラインおよびパラクラインによりケラチノサイトの活性化を介して痒み反応が起こっていることが示唆される。また、PAR2 は一次感覚神経にも発現していることから、KLK5 が一部直接一次感覚神経を活性化して痒み反応を誘発している可能性も示唆される。さらに KLK5 は好塩基球にも発現している可能性が示めされたことから、好塩基球は mMCP-11 に加え、KLK5 を産生遊離することで痒みの発生に寄与していると考えられる。

### E．結論

アトピー性皮膚炎の痒みには、ケラチノサイトや好塩基球から遊離される KLK5 が関与している可能性がある。

## 慢性に経過する痒疹26例の検討 分類不能な痒疹の位置づけについて

研究分担者 西澤 綾 防衛医科大学校皮膚科  
端本宇志 防衛医科大学校皮膚科  
佐藤貴浩 防衛医科大学校皮膚科

### A. 研究目的

痒疹は急性痒疹、亜急性痒疹、慢性痒疹に分けられる。日本皮膚科学会における診療ガイドラインでは、慢性痒疹として結節性痒疹と多形慢性痒疹の二つをあげ、その概念を定義した。しかし多形慢性痒疹の定義にはいまだあいまいな点があるため皮膚科医によってとらえ方に差を生じている。また診療の現場では結節性痒疹とも多形慢性痒疹ともつけがたい痒疹群を経験する。

### B. 方法

慢性に経過する痒疹患者26例についてその臨床病型と検査データ、原因などにつき検討した。

### C. 結果

26例の痒疹患者のうち結節性痒疹5例、多形慢性痒疹5例であり、残りの16例はどちらとも分類しがたい症状を呈していた。いずれの痒疹においても悪性腫瘍が誘因と考えられた例は極めて少なかった。分類不能な一群は、蕁麻疹様紅斑を伴って広範囲に病変をみる病型が主体であり、TARC値が他の2型に比して高く、またステロイド全身投与歴のあるものが多かった。

### D. 考察

痒疹患者では悪性腫瘍の検索が勧められているが、関連が確認される例は非常に少ないことは注目に値する。また分類不能な痒疹は病変の範囲が広いことや、紅斑性病変が目立っていることに特徴があるが、個疹の反応は多形慢性痒疹に類似している面もある。したがって多形慢性痒疹と病態は同じで、その重症型ないし悪化時の状態を見ている可能性もある。ステロイドの全身投与が表現型の修飾に関与しているかどうか検討が必要である。

### E. 結論

分類不能な痒疹の位置づけ、そして多形慢性痒疹の定義と概念については今後検討の余地がある。