

---

アトピー性皮膚炎に対する標的特異的変異型  
サイトカイン療法の有効性の検討

---

(研究課題番号：18591242)

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金

(基盤研究(C))研究成果報告書

平成20年3月

研究代表者 水谷 仁

三重大学大学院医学研究科教授

アトピー性皮膚炎に対する標的特異的  
変異型サイトカイン療法の有効性の検討

(研究課題番号：18591242)

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成20年3月  
研究代表者 水谷 仁  
三重大学大学院医学研究科教授

## CONTENTS

---

はしがき	..... 1
IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppressed Th2 type chronic dermatitis	..... 8
Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells	..... 32
A novel acoustic evaluation system of scratching in mouse dermatitis : Rapid and specific detection of invisibly rapid scratch in an atopic dermatitis model mouse	..... 53
痒みの新しい計測法——音声解析による搔破行動の計測	..... 60
Human Mast Cell Chymase Cleaves Pro-IL-18 and Generates a Novel and Biologically Active IL-18 Fragment	..... 63
アトピー性皮膚炎と自然免疫	..... 68

## <はしがき>

近年における著しいアトピー性皮膚炎の増加は社会問題化し、副作用の少ない本質的な治療法の開発が急がれている。アトピー性皮膚炎の病態は Th2 優位のサイトカイン環境であり、これは我々の作成したアトピー性皮膚炎モデルマウスの研究から表皮由来の IL-18 がサイトカインカスケードのキーとなり、下流のサイトカインである IL-4、IL-13、IL-5 の皮膚での過剰により引き起こされていることが明らかにされている。本研究ではマスト細胞に注目しアトピー性皮膚炎の発症におけるその機能を見出すとともに、実験的アトピー性皮膚炎に対する変異型サイトカインによる治療効果を検証した。

## 研究組織

研究代表者：水谷 仁  
(三重大学大学院医学研究科教授)

研究分担者：山中恵一  
(三重大学医学部附属病院講師)

## 「交付決定額(配分額)」

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	
平成18年度	2,400,000	0	2,400,000
平成19年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

「研究発表」  
論文

- 1) Umeda, k., Noro, Y., Murakami, T., Tokime, K., Sugisaki, H. A novel acoustic evaluation system of scratching in mouse dermatitis: Rapid and specific detection of invisibly rapid scratch in an atopic dermatitis model mouse. *Life Science*, 79, 2144-2150, 2006
- 2) 水谷 仁, 野呂雄一. 痒みの新しい計測法-音声解析による搔破行動の計測, *医学の歩み*, 218, 2006, 176-178
- 3) Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Habe, K., Morioka, T. Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *The Journal of Immunology*, 177, 8315-8319, 2006
- 4) 水谷 仁, アトピー性皮膚炎と自然免疫, *皮膚アレルギーフロンティア*, 5, 2007, 91-94

## 学会発表

- 1) Omoto, Y., Tokime, K., Yamanaka, K., Morioka, T., Kurokawa, I., Tsutsui, H., Yamanishi, K., Nakanishi, K. and Mizutani, H., Effective conversion of human proIL-18 into a novel functional IL-18 by human mast cell chymase, 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2006. 5. 3-6, Philadelphia, Pennsylvania, USA
- 2) 時女和也, 仙波りつ子, 山中恵一, 溝口 明, 水谷 仁, アトピー性皮膚炎病巣からのグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)の産生、分泌, 日本研究皮膚科学会第31回年次学術大会総会, 2006. 5. 31-6. 2, 京都市
- 3) 尾本陽一, 時女和也, 山中恵一, 森岡竜彦, 黒川一郎, 筒井ひろ子, 山西清文, 中西憲司, 水谷 仁, マスト細胞キマーゼによる新活性型 IL-18 分子の産生, 日本研究皮膚科学会第31回年次学術大会総会, 2006. 6. 2, 京都市
- 4) 水谷 仁, サイトカイン・ケモカイン, 第36回日本皮膚アレルギー学会第31回日本接触皮膚炎学会総会, 2006. 7. 16, 淡路市
- 5) 今井康友, 寺田 信, 筒井ひろ子, 安田好文, 山西清文, 水谷 仁, 久保允人, 松井 聖, 佐野 統, 中西憲司, アトピー性皮膚炎と IL-18, 第71回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2006. 7. 7-8, 西宮市
- 6) 尾本陽一, 時女和也, 山中恵一, 森岡竜彦, 黒川一郎, 筒井ひろ子, 山西清文, 中西憲司, 水谷 仁, 肥満細胞キマーゼによる新活性型 IL-18 分子の産生, 第71回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2006. 7. 7-8, 西宮市
- 7) 森 如, 山中恵一, 黒川一郎, 保富康宏, 水谷 仁, Ag85Bによる contact hypersensitivity の制御, 日本研究皮膚科学会第32回年次学術大会・総会, 2007. 4. 18-19, 横浜市

- 8) Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Yasutomi, Y. and Mizutani, H., Suppression of chronic picryl chloride-induced contact hypersensitivity responses by IL-4/IL-13 dual inhibitor but not IL-4 inhibitor, The Society for Investigative Dermatology 68th Annual Meeting:2007, 2007. 5. 9-12, Los Angeles, USA
- 9) 水谷 仁, 招請講演: アトピー性動物モデルから臨床へ, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2007. 6. 10, 横浜市
- 10) 森岡竜彦, 森 如, 山中恵一, 尾本陽一, 時女和也, 黒川一郎, 保富康宏, 水谷 仁, ハプテン反復塗布アトピー性皮膚炎モデルマウスに対する IL-4 変異体の抑制効果, 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2007. 6. 12, 横浜市

# 「研究成果」

## 1. 本研究の背景

アトピー性皮膚炎は、主として免疫・アレルギー異常と皮膚バリアー機能異常の2つが病態形成に関わると考えられている。近年の免疫・アレルギー学の研究から、アトピー性皮膚炎ではTh1・Th2 タイプのサイトカイン環境が局所あるいは全身的なTリンパ球を介した免疫不均衡を引き起こし、症状の経過に伴ってTh2優位となることが明らかにされている。この現象がアトピー性皮膚炎の多様な症状の発現に深く関与し、免疫担当細胞によるIL-4、IL-13、IL-5の産生亢進はIgE産生の増加、好酸球増多につながり、IFN- $\gamma$ 産生の低下はアトピー性皮膚炎にみられる感染症の発症を容易にしている。皮膚におけるTh2型サイトカイン環境の形成にはリンパ球系の関与が強く言われてきた。しかし、本研究者らのアトピー性皮膚炎モデルマウスの研究から皮膚のIL-18を介したIL-4をはじめとする皮膚Th2サイトカイン環境の形成が非常に重要であることが明らかになった。なかでも、マスト細胞はヒスタミン脱顆粒によるヒスタミン分泌による搔痒の誘導のみが取り上げられてきたが、局所のTh2サイトカイン環境形成に果たす機能が注目されるようになった。しかし、従来の技術ではその機能解析も不十分で、治療への応用を視野に入れることは不能であった。

## 2. 本研究の目的

本研究では、マスト細胞が生体内でTh2を強く誘導するという性質に着目して、Th2優位のアトピー性皮膚炎の発症機序におけるマスト細胞の機能の解明を行うとともに、皮膚を標的としてサイトカイン環境を変異型サイトカインを用いて人為的に操作することにより治療に応用しようとするものである。従来のアトピー性皮膚炎の治療としてドミナントネガティブサイトカインによる



治療試験に関しては蛋白製剤の投与による治療では極めて大量の変異サイトカインを長期間持続的に投与しなければならず、実用に供されていない。今回の研究はマスト細胞のアトピー性皮膚炎におけるサイトカイン環境形成における機能解析と、広く免疫誘導・抑制をかけることによる副作用を避け、アンタゴニストTh2サイトカインを皮膚にDNAワクチン発現させることにより、極めて効率的に免疫機能を操作することさらにその評価を主な目的とするものである。

### 3. 本研究の成果

#### 1) マスト細胞特異的なサイトカイン遺伝子発現誘導に関する研究

マスト細胞特異的なサイトカイン遺伝子発現を誘導する試みとして、マウスマスト細胞特異的に発現するプロモーターにIL-4の遺伝子をつないだDNAを作成し、受精卵に注射することによりトランスジェニックマウスを作成し、IL-4の遺伝子発現と表現形の変化を観察した。得られたマウスから数系統のマウスを樹立し検索を行った。樹立されたマウス系の大多数のマウスでは導入遺伝子の発現が確認できなかった。一方、皮膚炎を有する表現形を持つマウスが見いだされたが、検索により今回導入したIL-4DNAの発現が確認できず、目的とするマスト細胞特異的IL-4遺伝子発現マウス系統は樹立できなかった。今回用いたマスト細胞特異的プロモーターではトランスジェニックマウスの樹立が困難と判明した。

#### 2) ドミナントネガティブ変異型IL-4のDNAワクチンによるアトピー性皮膚炎の治療効果の検討

ドミナントネガティブ変異型IL-4のDNAワクチンによる遺伝子発現とその免疫学的効果を得ることを目標とした。変異型IL-4のDNAの導入による遺伝子発現とその免疫学的効果観察するために、ハプテン連続塗布によるTh2型慢性皮膚炎マウスモデルを作成した。このモデルマウスに、IL-4シグナルを抑制するドミナントネガティブ変異型IL-4(smIL-4)、IL-4/IL-13両シグナルを抑制するドミナントネガティブ変異型IL-4(dmIL-4)およびアゴニストとしてIL-4DNAのDNAワクチンを作成し、注射にて投与してその効果を検討した。dmIL-4DNA投与によりマウスの

皮膚炎症が抑制されるとともにマウスのサイトカインプロファイルは IFN- $\gamma$  産生の増加などの効果が認められ、その有効性が期待できる結果が得られた。

### 3) マウスにおける搔破音による搔破行動の検出システムの構築

アトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚炎の症状の評価には搔破行動の定量的評価が不可欠であるが、その測定は多大な労力を要し、再現性が低い問題があった。そこで、マウスの搔破音に注目し、搔破回数を収録し、音声解析することにより定量的な計測を可能とした。また、抗アレルギー薬の搔痒に対する有効性を本邦を用いることにより明らかにした。

### 4) マスト細胞キマーゼによる IL-18 活性化の解明

Th2 優位のアトピー性皮膚炎の発症機序におけるマスト細胞の機能の解明のため、マスト細胞由来酵素を検索した。マスト細胞顆粒に含まれるキマーゼがアトピー性皮膚炎を引き起こす IL-4 を誘導する上流のサイトカイン IL-18 の活性化酵素として機能することを見いだした。

## 4. 今後の課題と展望

今回の研究により、IL-4/IL-13 両シグナルを抑制するドミナントネガティブ変異型 IL-4(dmIL-4) を DNA ワクチンとして投与することにより、その蛋白が持続産生され、サイトカイン環境を変化させることにより、Th2 型皮膚炎を抑制できることが明らかになった。ヒトでの応用を考慮した場合、今後はより安全で効果的な DNA ワクチンの開発が必要であると共に、ドミナントネガティブ変異型 IL-4 のさらなる新しい投与方法の開発により、アトピー性皮膚炎に対する全く新しい治療展開が期待される。