

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591461

研究課題名（和文）表皮を免疫調整臓器とする新規アレルギー疾患治療の開発

研究課題名（英文）

Control of allergy with skin based immunomodulation

研究代表者

水谷 仁（Mizutani Hitoshi）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30115737

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎(AD)の免疫異常を調整する物質を検索し、治療の基礎的研究を行った。免疫調整物質を皮膚から供給するため変異型サイトカインを皮膚特異的に発現するマウスを作成した。同マウスでは実験的接触皮膚炎における皮膚腫脹が軽減され、同マウスの皮膚を移植した野生型マウスにおいても、同皮膚炎の早期の炎症が軽減し、皮膚の細胞内伝達物質のmRNA発現も減少した。表皮細胞を免疫調整物質産生臓器とする治療法は、ヒト疾患の治療への応用も考慮される基礎技術として期待される。

研究成果の概要（英文）：

Immunological balance in AD is shifted to Th2 dominant conditions, and we have been investigated various therapeutic method to correct Th2 shifted immune systems based on the skin immunomodulation systems. In addition to supplementation of exogenous immunomodulators to the skin, we have developed a skin specific dominant negative type mutant IL-4 expressing transgenic mouse. This mouse decreased inflammation in a hapteninduced experimental dermatitis at the early phase. Wild type mouse with skin graft from the transgenic mouse, also decreased inflammation and Th2 cytokine signal proteins mRNA expression in the skin lesions. This concept, production of therapeutic peptide from keratinocytes, is a potent therapeutic strategy for various systemic diseases including allergic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎, Th2, ワクチン, サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は、主として免疫・アレルギーと皮膚バリアー機能の2つの異常が病態形成に関わると考えられている。免疫学的には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病態を形成すると考えられている。我々のIL-18/カスパーゼ遺伝子導入マウスの研究から、表皮由来のIL-18が皮膚のIL-4/IL-13をはじめとするTh2サイトカイン環境を誘導することを明らかにしてきた。我々はこのADを引き起こすTh2側へシフトしたサイトカイン環境の改善を目的として、免疫の抑制系の誘導、免疫のTh1側への誘導系、Th2系のシグナル抑制系に注目しその効果の検討を行っている。特にTh2系の主体となるIL-4/IL-13のシグナルを抑制する新規の手法として、皮膚でのドミナントネガティブIL-4タンパク遺伝子発現による新規の免疫抑制系の開発が1つの候補となる。ADに対する標的的特異的変異型サイトカイン療法の有効性を検討するとともに、皮膚を免疫調整物質産生の場として利用し、アレルギー疾患をはじめとする種々の新規治療法開発の可能性が期待できる。

### 2. 研究の目的

アトピー性炎症の治療ではアレルギーを起こす標的臓器である皮膚において、そのサイトカインカスケードを制御する方法の開発が必要とされる。本研究では皮膚におけるTh2に傾いた免疫環境を、Th1誘導あるいは中立に回復させる免疫調整物質の検索、投与方法、奏功機序の解明を行う。特に、表皮炎症を持続的に制御する新規の方法として表皮を治療物質産生臓器として利用するシステムの開発、検討を目指す。

### 3. 研究の方法

ハプテン持続誘発によるADモデルを構築し、アトピー性炎症を抑制する物質の検索を行う。特に、シグナル非伝達型変異IL-4分子の効果を検証するため、そのDNAワクチンの有効性を検証する。DNAワクチンで主に発現されるのが血球系細胞である。皮膚での持続的な蛋白の発現が必要であること、ヒトでの応用を視野に入れた場合、遺伝子導入細胞の回収が可能とするため、表皮細胞を産生細胞とした持続的な分泌型蛋白発現系を構築し治療への応用を試みる。候補分子の1つであるドミナントネガティブIL-4タンパク遺伝子の効果的な分泌システムとして、皮膚特異的トランスジェニックマウスを作成し、同マウスにおける皮膚炎の変化を解析おこなう。さらに、ADモデルマウスへのトランスジェニックマウスの皮膚移植により、皮膚炎の改善効

果を解析する。

### 4. 研究成果

ハプテン持続誘発によるADモデルを構築し、アレルギー反応の抑制を試みた。アレルギーを抑制する免疫調整物質として、抗酸菌、抗酸菌由来タンパク、*P. acnes*のほか変異型サイトカイン(変異型IL-4)が有効であり、皮膚炎抑制には、IL-18、IL-4等のサイトカインの抑制とTh1型サイトカインおよび抑制性T細胞の誘導の重要性が見いだされた。

皮膚を治療臓器とするため、移植による治療を目標とした。皮膚から分泌可能な調整物質の候補として、ドミナントネガティブ変異型IL-4蛋白に注目し、K14プロモーターを用い、同タンパクを皮膚特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスではIL-4類似タンパクが血中に検出され皮膚からの分泌が確認された。同マウスを用いたハプテン持続誘発によるアトピー性皮膚炎モデルにおいて、耳介腫脹など局所の炎症反応が正常マウスに比して軽減され、接触過敏症の早期病変を抑制することが可能であった。次いで、このトランスジェニックマウスの皮膚を正常マウスに移植し、同様の皮膚炎モデルを構築すると、やはり早期の炎症が軽減し、病変部皮膚ではIL-4/IL-13の細胞内伝達物質のmRNA発現も減少していた。これらの結果から、適切なプロモーターを選択し、表皮から免疫抑制タンパクを発現させることにより、皮膚における免疫調節タンパクが産生され、全身へと分泌されることが判明し、アレルギー反応を抑制する方法の1つとなることがわかった(投稿中)。また、皮膚移植により調節機能が伝達できたことから、表皮を免疫調節臓器として移用できる可能性が示された。

本研究ではTh2優位のアトピー性皮膚炎に対して、皮膚を変異型サイトカインの産生の場として利用し治療へ応用する方法の可能性を明らかにした。皮膚特異的プロモーターを使用することにより炎症の場に持続的に安定した量の免疫調整物質遺伝子産物を供給することができ、移植によっても調節機能が得られることが明らかになりヒトへの応用の可能性が示された。今回の研究では表皮から一定量の持続的な遺伝子タンパクが分泌されたが、ヒトへの応用では移植皮膚片の大きさの制限があり、発現効率の向上が不可欠であり、より効率の良い治療用免疫調節物質の選択も課題と言える。

以上のようにこの皮膚を治療用遺伝子産物産

生の場合とした方法は皮膚疾患・アレルギー疾患の抑制だけでなく、各種全身性疾患の治療への応用も可能と思われ、新しい診断・治療法開発の基礎技術として発展が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naïve T cells into cytokine-producing mature T cells.

Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, Akeda T, Naka M, Niwa K, Nakanishi T, Kakeda M, Gabazza EC, Mizutani H. PLoS One, 査読有り, 7, 2012, e31465,

2. Intratumoral injection of Propionibacterium acnes suppresses malignant melanoma by enhancing Th1 immune responses.

Tsuda K, Yamanaka K, Linan W, Miyahara Y, Akeda T, Nakanishi T, Kitagawa H, Kakeda M, Kurokawa I, Shiku H, Gabazza EC, Mizutani H. PLoS One, 査読有り, 6, 2011, e29020,

3. Heat-killed bacillus Calmette-Guérin and Mycobacterium kansasii antigen 85B combined vaccination ameliorates dermatitis in a mouse model of atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. Kakeda M, Yamanaka K, Kitagawa H, Tsuda K, Akeda T, Kurokawa I, Gabazza EC, Mizutani H. Br J Dermatol. 査読有り, 2011 Dec 2.[Epub ahead of print]

4. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. Yamanaka K, Mizutani H. Curr Probl Dermatol., 査読無, 14, 2011, 80-92

5. Contribution of interleukin 18 to the development of infection-associated atopic dermatitis. Tsutsui H, Mizutani H, Nakanishi K. Curr Probl Dermatol., 査読無, 41, 2011, 93-103.

6. Propionibacterium acnes vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse atopic dermatitis. Kitagawa H, Yamanaka K, Kakeda M, Inada H, Imai Y, Gabazza EC, Kurokawa I, Mizutani H. Exp Dermatol.,

査読有り, 20, 2011, 157-8

7. SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and Monocytes~IL-10 productivity is critical for becoming allergic~. Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, Kitagawa H, Ogihara H, Gabazza EC, Okubo K, Kurokawa I, Takeuchi K, Mizutani H. Allergol Int. 査読有り, 60, 2010, 45-51

8. Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. Yamanaka K, Yuta A, Kakeda M, Sasaki R, Kitagawa H, Gabazza EC, Okubo K, Kurokawa I, Mizutani H. J Allergy Clin Immunol., 査読有り, 124, 2009, 842-5

9. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis, Morioka T, Yamanaka K, Mori H, Omoto Y, Tokime K, Kakeda M, Kurokawa I, Gabazza EC, Tsubura A, Yasutomi Y, Mizutani H. Br J Dermatol. 査読有り, 160, 2009,1172-9

[学会発表] (計 5 件)

1. Mutant IL-4 skin grafting showed therapeutic effects to acute phase dermatitis Yamanaka K, Nakanishi T, Kakeda M, Tsuda K, Mizutani H The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011.12.9-11, Kyoto

2. Care for the Dry Skin and Atopic Dermatitis - from a Theoretical Point of View, Mizutani H., 8th CUHK Dermatology Symposium and Cosmetic Dermatology Workshop 2011(招請講演), 2011.10.23, Hong Kong

3. アトピー性皮膚炎 up-to-date, 水谷 仁, , 2010.9.11,第 61 回日本皮膚科学会中部支部学術大会(招請講演), 大阪市

4. Novel anti-inflammatory treatment in atopic eczema Mizutani, H. New Trends in Allergy VII&6th George Rajka Symposium on Atopic Dermatitis (招請講演), 2010.7.24, Munich (Germany)

5. Animal models in atopic dermatitis, The

annual symposium of the Cutaneous Biology Research Institute at Yonsei University College of Medicine, Mizutani, H. The annual symposium of the Cutaneous Biology Research Institute at Yonsei University College of Medicine (招請講演), 2009.9.19, Seoul

〔図書〕 (計 1 件)

アトピー性皮膚炎と自然免疫, 水谷 仁,  
WHAT'S NEW IN 皮膚科学 2010-2011, メジ  
カルレビュー社, 東京都, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 仁 (Mizutani Hitoshi)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 30115737

### (2) 研究分担者

山中 恵一 (Yamanaka Keiichi)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 70314135

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :