

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591647

研究課題名(和文)花粉症皮膚炎の病態解明と抑制性細胞誘導による治療

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism and therapy for Japanese cedar pollen dermatitis

研究代表者

水谷 仁 (Mizutani, Hitoshi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30115737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉皮膚炎(CPD)の病態解析と治療開発のためCPDモデルマウスの作成を行った。日本スギ花粉(JCP)抗原の非経皮感作と経皮感作を併用し一部のマウスで感作が成立し、感作動物のリンパ系細胞ならびに皮膚のサイトカインFACS解析を行った。しかし、マウスへの感作の頻度は低く実用性が問題となった。そこでヒトCPDを模倣し、経鼻的感作による花粉症モデルを成立させ、引き続き経皮感作を行うCPDモデルを目指した。長期の経鼻感作により効率のよいTh2型花粉症マウスの作成に成功した。その解析と治療開発を進めると共に、経皮感作によるCPDモデルマウスの樹立を進めている。

研究成果の概要(英文)：We tried development of a mouse model for the Japanese cedar pollen dermatitis (CPD). Immunization with combination of the percutaneous and non-percutaneous application with Japanese cedar pollen antigens successfully sensitized some mice. FACS analysis of the lymphocytes and the skin cytokine mRNA profile of the immunized mouse revealed sensitization in some mouse. However, we have to change the strategy because of the very low sensitization efficiency of this model. Following to human Japanese cedar pollinosis (JCP), we developed a mouse model for JCP by repeated trans-nasal immunization, and successfully developed a Th2 type JCP mouse model. We are analyzing the immunological profile of the JCP model and are developing the CPD model by additional immunization.

研究分野：皮膚科学

キーワード：花粉皮膚炎 スギ花粉症 アレルギー アトピー性皮膚炎 アレルギー性鼻炎

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでアトピー性皮膚炎(AD)およびスギ花粉アレルギー(CP)の発症機序の解明と治療の研究を行って来た (*Nat Immunol* 1:132, 2000. *Immunol Reviews* 202:115, 2004, *Allergol Int.* 2011)。ADでは原因抗原は多種多様にわたるため、抗原特異的T細胞の研究は困難である。また我々はCPにおいて抗原特異的T細胞クローンの存在を明らかにした(*J Allergy Clin Immunol* 2009)。そこで、CPに伴い発症する皮膚炎:スギ花粉皮膚炎(CPD)に注目し、その抗原特異性を用い皮膚炎発症機序の解明と治療開発を目指した。

2. 研究の目的

我々はADなどアレルギー性炎症の発症機序の解明と治療の研究を行って来ており、自然型AD皮膚炎などの概念を提唱してきた (*J Immunol* 165:997, 2000. *Nat Immunol* 1:132, 2000. *PNAS* 99:11340, 2002. *Immunol Reviews* 202:115, 2004)。ADでは、抗原特異的なT細胞クローンの増殖が発症の契機となるが、原因抗原が多種多様のため、T細胞クローンおよびそのメディエーターに焦点を当てた研究は極めて困難である。そこで我々は日本人の多くが単一の抗原類に感作されているCPに注目し研究を進めてきた。CPの季節には鼻粘膜、眼症状のほか眼周囲を中心にした皮膚炎(スギ花粉皮膚炎:CPD)を合併することも多いがその注目度は低く病因解明は不十分である。CPはスギ花粉抗原(主にCryj1, Cryj2)に対するIgE抗体とともにスギ抗原特異的T細胞が病態成立に深く関わっていることを明らかにしてきた(*J Allergy Clin Immunol* 2009)。スギの主要なT細胞抗原決定基は既に同定されているため、反応性スギ抗原特異的T細胞クローンの解析が可能であり、特異環境抗原に対するヒト皮膚炎の病因解明に適した

モデルを構築できる。三重大学医学部附属病院耳鼻咽喉科では重症のスギ花粉症患者に対して、スギ花粉標準化アレルゲン治療エキスをを用いた減感作療法を施行し、鼻粘膜・眼症状の改善など良好な結果を得ているが、皮膚炎への影響は明確になっていない。

抑制性T細胞(以下Tregと略する)は、免疫の調節因子として注目されているが、皮膚炎における誘導性の非自己抗原特異的Tregに関する知見は一定していない。減感作治療が効果的な理由を患者の治療に用いるスギ花粉標準化アレルゲン治療エキスの投与により、IL-10産生性の誘導性スギ花粉特異的Tregが誘導され、飛散した花粉によるT細胞の反応増殖を抑制しているという知見を得て報告している(*Allergol Int.* 2011)。

本研究では、まずマウスをスギ花粉にて感作することにより抗原特異的な鼻炎及び花粉皮膚炎を発症するモデルマウスを作製する。次にその成立に関して表皮由来炎症性サイトカインや血球由来の炎症性サイトカインの関与並びに増強・抑制効果を検索する。

3. 研究の方法

スギ抗原感作を行い、適切な惹起反応を行うことにより鼻炎と皮膚炎を発症するマウスモデルを作成する。次にマウスモデル発症に関与するサイトカインを明らかにする。マウスモデルの解析により鼻炎モデルと皮膚炎合併モデルの免疫学的差異を明らかにし、皮膚炎の特異的免疫学的特性を明らかにすることを目指した。

BALB/cマウスをアジュバント存在下にスギ花粉抗原を腹腔内投与し感作し、その1週間後から鼻粘膜、皮膚の双方で惹起し、

モデルを作成する。モデル作成時に特定のサイトカイン等を投与することによりモデルの反応性の変化を検討する。皮膚におけるサイトカインの動き、所属リンパ節、脾臓におけるサイトカインの検索を施行する。スギ花粉標準化アレルゲン治療エキスを投与した花粉症患者と同様に、Tregが誘導可能か検索する。

4 . 研究成果

スギ花粉皮膚炎(CPD)の病態解析と治療開発のため CPD モデルマウスの作成を行った。日本スギ花粉(JCP)抗原の非経皮感作と経皮感作を併用し一部のマウスで感作が成立し、皮膚のサイトカインレベルの測定、感作動物のリンパ系細胞・脾臓細胞のサイトカインレベルの FACS 解析を行った。感作されたマウスではコントロールに比して、皮膚の mRNA の解析では Th2 サイトカインである IL-4 の上昇のみならず、Th1 サイトカインである IFN- γ の上昇も伴っていた。しかし、所属リンパ節や脾臓などの炎症性サイトカインの測定と比較を試みたがコントロールに比して変化せず、また Treg の割合も不変であった。さらに、マウスへの感作の頻度が低くモデルとしての実用性が問題となった。そこでヒト CPD を模倣し、頻回の経鼻的感作による花粉症モデルを成立させ、引き続き経皮感作を行う CPD モデルを目指した。長期の経鼻感作により Th2 型花粉症マウスの作成に成功した(投稿中)。現在、さらにその解析を進めると共に、同モデルへの経皮感作による CPD モデルマウスの樹立を進めている。

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 11 件)

(全て査読あり)

1: Kido-Nakahara M, Katoh N, Saeki H, Mizutani H, Hagihara A, Takeuchi S, Nakahara T, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nakagawa H, Omoto Y, Matsubara K, Furue M. Comparative cut-off value setting of pruritus intensity in visual analogue scale and verbal rating scale. *Acta Derm Venereol.* 2015 Mar;95(3):345-346. doi: 10.2340/00015555-1972.

2: Yamanaka K, Shah SA, Sakaida H, Yamagiwa A, Masuda S, Mizutani H, Takeuchi K. Immunological parameters in prophylactic sublingual immunotherapy in asymptomatic subjects sensitized to Japanese cedar pollen. *Allergol Int.* 2015 Jan;64(1):54-59. doi:10.1016/j.alit.2014.07.001.

3: Yamanaka K, Nakanishi T, Saito H, Maruyama J, Isoda K, Yokochi A, Imanaka-Yoshida K, Tsuda K, Kakeda M, Okamoto R, Fujita S, Iwakura Y, Suzuki N, Ito M, Maruyama K, Gabazza EC, Yoshida T, Shimaoka M, Mizutani H. Persistent release of IL-1s from skin is associated with systemic cardio-vascular disease, emaciation and systemic amyloidosis: the potential of anti-IL-1 therapy for systemic inflammatory diseases. *PLoS One.* 2014 Aug 13;9(8):e104479. doi: 10.1371/journal.pone.0104479.

4: Yamanaka K, Umezawa Y, Yamagiwa A, Saeki H, Kondo M, Gabazza EC, Nakagawa H, Mizutani H. Biologic therapy improves psoriasis by decreasing the activity of monocytes and neutrophils. *J Dermatol.*

2014 Aug;41(8):679-685. doi:
10.1111/1346-8138.12560.

5: Noro Y, Omoto Y, Umeda K, Tanaka F, Shiratsuka Y, Yamada T, Isoda K, Matsubara K, Yamanaka K, Gabazza EC, Nishikawa M, Mizutani H. Novel acoustic evaluation system for scratching behavior in itching dermatitis: rapid and accurate analysis for nocturnal scratching of atopic dermatitis patients. *J Dermatol*. 2014 Mar;41(3):233-238. doi:10.1111/1346-8138.12405.

6: Akeda T, Yamanaka K, Tsuda K, Omoto Y, Gabazza EC, Mizutani H. CD8+ T cell granzyme B activates keratinocyte endogenous IL-18. *Arch Dermatol Res*. 2014 Mar;306(2):125-130. doi: 10.1007/s00403-013-1382-1.

7: Yamanaka K, Nakanishi T, Watanabe J, Kondo M, Yamagiwa A, Gabazza EC, Mizutani H. Continuous high-dose antigen exposure preferentially induces IL-10, but intermittent antigen exposure induces IL-4. *Exp Dermatol*. 2014 Jan;23(1):63-65. doi: 10.1111/exd.12295.

8: Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e66614. doi: 10.1371/journal.pone.0066614.

9: Nakanishi T, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Mizutani H. Mutant interleukin-4/13 signaling blockade successfully suppresses acute phase inflammation. *Arch Dermatol Res*. 2013 Apr;305(3):241-247. doi: 10.1007/s00403-012-1302-9.

10: Tsuda K, Yamanaka K, Kondo M, Matsubara K, Sasaki R, Tomimoto H, Gabazza EC, Mizutani H. Ustekinumab improves psoriasis without altering T cell cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity. *PLoS One*. 2012;7(12):e51819. doi: 10.1371/journal.pone.0051819.

11: Kakeda M, Yamanaka K, Kitagawa H, Tsuda K, Akeda T, Kurokawa I, Gabazza EC, Mizutani H. 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. *Br J Dermatol*. 2012 May;166(5):953-963. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10763.x.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. A novel acoustic evaluation system for scratching behavior in itching dermatitis: rapid and accurate analysis for scratching of atopic dermatitis patients, H. Mizutani, International Symposium of Atopic Dermatitis, 2014: 2014.5.21-23, Nottingham, UK.

2. A new sensitive scratch recorder for human dermatitis: evaluation of nocturnal scratching sound of AD patients, Y. Omoto, Y. Noro, K. Matsubara, K. Isoda, K. Umeda, M. Naka, A.

Yamagiwa, M. Kondo, T. Akeda, K. Yamanaka,
H. Mizutani

International Investigative Dermatology 2013,
2013. 5.8-11, Edinburgh, UK.

3. Ustekinumab improved psoriasis without
altering T cell immunity: cytokine production,
differentiation, and T cell receptor repertoire
diversity, K. Yamanaka, K. Tsuda, K.

Matsubara, M. Kondo, H. Mizutani

International Investigative Dermatology 2013,
2013. 5.8-11, Edinburgh, UK.

4. Care for atopic dermatitis, H. Mizutani: the
9th Asian Dermatological Congress,
2013.7.7-13, Hong Kong, China.

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

K. Yamanaka, K. Tsuda, H. Kitagawa, T.

Akeda, M. Naka, K. Niwa, T. Nakanishi, M.

Kakeda, H. Mizutani, 75th Annual Meeting of
the Society for Investigative Dermatology:
2012.5.9-12, Raleigh, USA.

6. Intratumoral vaccination of
Propionibacterium acnes induces Th1 immune
responses and suppresses the growth of
malignant melanoma. K. Tsuda, K. Yamanaka,
T. Akeda, T. Nakanishi, H. Kitagawa, M.
Kakeda, I. Kurokawa, H. Mizutani, 75th
Annual Meeting of the Society for Investigative
Dermatology: 2012.5.9-12, Raleigh, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水谷 仁 (MIZUTAI, 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・大学院医学系研究科・准教

授

研究者番号 : 70314135