

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04866

研究課題名(和文) 経皮感作からアレルギー発症に至る分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms involved in epicutaneous sensitization

研究代表者

齋藤 博久 (Saito, Hirohisa)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・副所長室・副所長

研究者番号：40130166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：湿疹等のバリア機能が低下した皮膚への抗原がアレルギー感作を成立させ、アトピー性皮膚炎や、その後の他アレルギー疾患の発症に關与する可能性が示唆されている。そこで、皮膚のバリアを破壊する一つの要素として、アトピー性皮膚炎患者の病変部に多く存在する黄色ブドウ球菌、特にブドウ球菌が産生するプロテアーゼに着目し、プロテアーゼが皮膚に及ぼす影響を検討した。我々は、黄色ブドウ球菌が産生するプロテアーゼが、表皮バリアを破壊し、獲得免疫系を介さない機序で皮膚炎を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that epicutaneous sensitization through eczema may be involved in the development of atopic dermatitis and subsequent other allergic diseases. Staphylococcus aureus is known to be colonized especially on the lesional skin of patients with atopic dermatitis and some of those are known to produce protease that may lead barrier dysfunction. Therefore, we sought to elucidate the effect of protease produced by staphylococcus aureus on skin. Consequently, we found that protease from staphylococcus aureus induced skin inflammation accompanied by acanthosis and inflammatory cell infiltration even in the absence of acquired immunity.

研究分野：免疫アレルギー

キーワード：経皮膚感作 皮膚炎

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の有症率は先進国を中心にここ 30 年で 2-3 倍に増加している (N Engl J Med, 2008)。本邦では学童における罹患率は 10%を超えており、社会的、医療経済的に問題となっている。ステロイド外用剤による治療が一定の効果を示すものの、寛解増悪を繰り返し難治化する症例も少なくなく、有効な治療法及び予防法の開発が望まれる。一方気管支喘息では、吸入ステロイド薬による臨床介入試験が複数報告されており、例えば CAMP study (N Engl J Med, 2000) の小児に対する長期介入試験や PAC, PEAK (N Engl J Med, 2006)、IFWIN study (Lancet, 2006) などの乳幼児に対する早期介入試験の結果は、いずれもステロイド薬は喘息の natural course を変えることができず、寛解・治癒の達成には疑問が残されている。これらの臨床事実は、一旦発症したアレルギー疾患を完治させることの困難さを示すと同時に、アレルギー発症の詳細な分子メカニズムの理解に基づくより効果的な発症予防法の開発の重要性を示唆している。

近年、特に湿疹などによりバリア機能が低下した皮膚における抗原暴露がアレルギー感作を成立させ、アトピー性皮膚炎のみならず食物アレルギーや気管支喘息等アレルギー疾患発症の重要な引き金となる可能性が指摘されている。この”経皮感作”に注目が集まったきっかけは、皮膚のバリア機能に重要な役割を果たす filaggrin の遺伝子多型がアトピー性皮膚炎患者に高頻度に検出され、発症率と強く相関することが報告されたことにある。さらに重要なことは、皮膚のみに発現し気道上皮細胞には存在しないこの filaggrin の遺伝子変異が、アトピー性皮膚炎のみならず気管支喘息の発症リスクも高めることも報告されたことである (Nat Genet, 2006)。数年前、加水分解小麦配合の石鹼使用による小麦アレルギー発症が社会的な問題となり報道などでもクローズアップされたが、この事象は図らずも、食物アレルギー発症における経皮感作の重要性を証明する大規模な疫学的証拠となった。従って乳児期に皮膚炎が発症するメカニズムを明らかにすることは、アトピー性皮膚炎のみならず、他アレルギー疾患の発症予防法/治療法につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、アトピー性皮膚炎患者の湿疹部位にプロテアーゼ産生性の黄色ブドウ球菌が特に多く存在する事実に着目し、黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼが皮膚に与える影響を検討することとした。具体的にはプロテアーゼ塗布で表皮バリアを破壊することにより誘導されるマウス皮膚炎モデルの確立、及

びその発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、皮膚炎を介して抗原を感作させることで、他アレルギー疾患が誘導されるかも検討することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼによる皮膚炎モデルの確立

黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼである V8 プロテアーゼ (以下、V8) をマウスの耳介に塗布する方法を用いて炎症誘導を行った。マウス系統による差異を検討し、V8 の投与量、投与期間の最適化を行った。皮膚の評価は、経時的に回収した皮膚サンプルを用いて、下記に記載する病理学、免疫学的解析手法を用いて行った。

- ① 皮膚の病理像の解析 (HE 染色)
- ② 皮膚厚の測定 (厚さ測定器を用いて測定)
- ③ 皮膚組織での遺伝子発現解析 (real-time PCR 法)
- ④ 皮膚の浸潤細胞のプロファイル解析 (FACS)

(2) プロテアーゼによる皮膚炎発症に関与する細胞成分の同定

V8 による皮膚炎誘導に関与する細胞を探索するために、後述する遺伝子変異・突然変異マウスに V8 塗布で皮膚炎を誘導し、各種細胞の関与を検討する。

評価対象マウスは、*Rag-2*<sup>-/-</sup>マウス (T 細胞、B 細胞、NKT 細胞欠損)、*Kit*<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup>マウス (マスト細胞欠損)、*CD11c-DTR*マウス (樹状細胞欠損)、*Rag-2*<sup>-/-</sup> *Il2rg*<sup>-/-</sup>マウス (T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、NK 細胞、自然リンパ球欠損) とした。

(3) プロテアーゼによる皮膚炎の誘導分子の同定

重症アトピー性皮膚炎の皮膚組織では、リンパ球と共に好酸球と好中球の浸潤が認められる。好酸球の分化や局所への誘導には Th2 型の因子 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP) が、好中球の分化や局所への誘導には Th17 型の因子 (IL-1, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, RORγt) が関連していることが知られている。そこで、後述する各種サイトカイン遺伝子を欠損するマウスを用いて皮膚炎を誘導し、各種サイトカインの関与を検討した。また、プロテアーゼによるバリア破壊後、ブドウ球菌自体が炎症に加担するかを評価するために、TLR の遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

評価対象マウスは、*IL-1α/β*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-6*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-17A*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-17F*<sup>-/-</sup>マウス、*RORγt*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-4*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-5*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-13*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-25*<sup>-/-</sup>マウス、*IL-33*<sup>-/-</sup>マウス、*TSLP*<sup>-/-</sup>、*TLR2/4*<sup>-/-</sup>マウスとした。

(4) プロテアーゼによる皮膚炎の発症に関

与する細胞の性状解析

(3) で明らかにした皮膚炎発症に重要なサイトカインのレポーターマウスを用いて、サイトカイン産生細胞を同定するとともに、同細胞に特異的なマーカーを探索した。

(5) 皮膚炎を介した抗原感作による他アレルギー疾患の誘導

バリア機能が障害された皮膚を介した抗原感作が、気管支喘息等のアレルギー疾患の発展に関与していることが示唆されている。プロテアーゼにより誘導された皮膚炎を介して、経皮膚的な感作が増悪するか否かを検討した。具体的には、プロテアーゼにより皮膚炎を誘導し、抗原 (Ovalbumin: OVA) を塗布することで経皮膚的に抗原感作し、血清中抗原特異的 IgE 抗体を測定した。

#### 4. 研究成果

1) 黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼによる皮膚炎モデルの確立

V8 プロテアーゼをマウスの耳介に塗布することにより、濃度依存的に耳介の肥厚を伴う炎症が認められた (図1)。この炎症は、V8 プロテアーゼのプロテアーゼ活性を加熱処理により不活性化したものでは誘導されないことから、V8 プロテアーゼのプロテアーゼ活性により誘導されていると考えられる。また、マウスの系統によっても誘導の程度が異なることが明らかとなった (図1)。

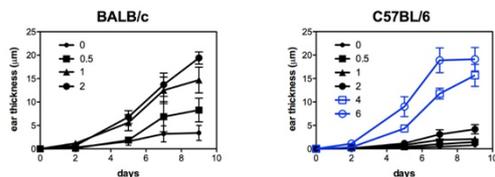


図1 プロテアーゼによる皮膚炎 系統別

また、組織学的検討で、プロテアーゼ塗布群では、表皮の肥厚、及び主に真皮への炎症細胞浸潤を認めることが明らかとなった (図2)。

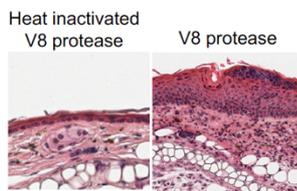


図2 プロテアーゼによる皮膚炎 組織像

(2) プロテアーゼによる皮膚炎発症に関与する細胞成分の同定

次に、プロテアーゼにより惹起される皮膚炎の誘導に関与する細胞群を同定するため、各種細胞の欠損マウスを用いて検討した。その結果、プロテアーゼによる皮膚炎は、T細胞、

B細胞、NKT細胞を有さない  $Rag2^{-/-}$  マウスでも野生型と同等に炎症が誘導された (図3左)。一方で、T細胞、B細胞、NKT細胞に加えて自然リンパ球を欠損している  $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$  マウスでは、炎症が減弱した (図3右)。これらの事実は、プロテアーゼによる皮膚炎の誘導には、獲得免疫系ではなく、自然免疫系に属する自然リンパ球が関与している可能性を示唆している。

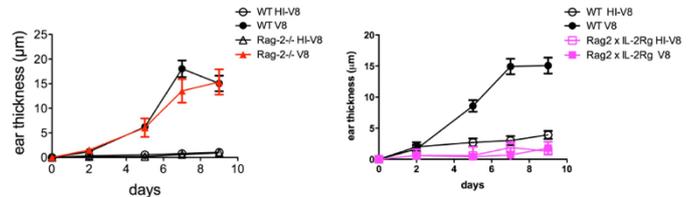


図3 プロテアーゼによる皮膚炎に関する細胞群

(3) プロテアーゼによる皮膚炎の誘導分子の同定

プロテアーゼによる皮膚炎は、 $TLR2/4^{-/-}$  マウスでは野生型と比較して同等に皮膚炎が生じたのに対し、 $IL-17A^{-/-}$  及び  $IL-17F^{-/-}$  マウスで炎症が減弱した。これらの事実は、プロテアーゼによる皮膚炎には、Th17型サイトカインが関与していることを示唆している。

(4) プロテアーゼによる皮膚炎の発症に関与する細胞の性状解析

(3) の結果から、IL-17が炎症惹起に重要な役割を担っている可能性が高い。そこで、IL-17レポーターマウスを用いてIL-17産生細胞の割合を測定した。その結果、皮膚炎局所において、主に3型自然リンパ球がIL-17を産生していることが判明した。

(5) 皮膚炎を介した抗原感作による他アレルギー疾患の誘導

プロテアーゼもしくは不活性化プロテアーゼを塗布した耳介に、抗原 (OVA) を塗布し経皮膚的に抗原を感作し、血清中OVA特異的IgE抗体値を測定した。その結果、プロテアーゼを塗布し皮膚炎を誘導した群では、不活性化プロテアーゼを塗布した皮膚炎を有しない群と比較して、血清中OVA特異的IgE抗体値が低下した。

#### 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8件)

- ① Tamari M, Orimo K, Motomura K, Arae K, Matsuda A, Nakae S, Saito H, Morita H, Matsumoto K. The optimal age for epicutaneous sensitization following tape-stripping in BALB/c mice. Allergol

- Int. 2018 in press. doi: 10.1016/j.alit.2018.01.003.
- ② Takeda T, Morita H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Recent advances in understanding the roles of blood platelets in the pathogenesis of allergic inflammation and bronchial asthma. *Allergol Int.* 2017 in press. doi: 10.1016/j.alit.2017.11.008.
- ③ Suto H, Nambu A, Morita H, Yamaguchi S, Numata T, Yoshizaki T, Shimura E, Arae K, Asada Y, Motomura K, Kaneko M, Abe T, Matsuda A, Iwakura Y, Okumura K, Saito H, Matsumoto K, Sudo K, Nakae S. IL-25 enhances Th17 cell-mediated contact dermatitis by promoting IL-1 $\beta$  production by dermal dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2018 in press. doi: 10.1016/j.jaci.2017.12.1007.
- ④ Matsumoto K, Mori R, Miyazaki C, Ohya Y, Saito H. Are both early egg introduction and eczema treatment necessary for primary prevention of egg allergy? *J Allergy Clin Immunol.* 2018 in press. Doi:10.1016/j.jaci.2018.02.033.
- ⑤ Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, Saito M, Kishino A, Takimoto T, Inoue E, Tang J, Kido H, Wong GW, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y; PETIT Study Team. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017;389:276-86.
- ⑥ Morita H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Semin Immunopathol* 2016;38:623-9.
- ⑦ Shimura S, Takai T, Iida H, Maruyama N, Ochi H, Kamijo S, Nishioka I, Hara M, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Epicutaneous allergic sensitization by cooperation between allergen protease activity and mechanical skin barrier damage in mice. *J Invest Dermatol.* 2016;136:1408-17.
- ⑧ Kamijo S, Suzuki M, Hara M, Shimura S, Ochi H, Maruyama N, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Suto H, Ichikawa S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Subcutaneous allergic sensitization to protease allergen is dependent on mast cells but not IL-33: distinct mechanisms between subcutaneous and intranasal routes. *J Immunol.* 2016;196:3559-69.

[学会発表] (計 0 件)

[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：  
 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  
 斎藤 博久 (SAITO HIROHISA)  
 国立研究開発法人 国立成育医療研究センター  
 一研究所 副所長  
 研究者番号：40130166

(2) 研究分担者  
 中江 進 (NAKAE SUSUMU)  
 東京大学 医科学研究所・准教授  
 研究者番号：60450409

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )