

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K09745

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における自然免疫低下のメカニズムの解明と治療

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism and treatment of down-regulated innate immunity in atopic dermatitis

研究代表者

中井 浩三 (Nakai, Kozo)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40363204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは自然免疫の中心となる細胞である。我々はアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚のマクロファージの活性化を調べた。アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚では通常マウスの皮膚と比べて異常なマクロファージの活性化がみられた。マウスのアトピー性皮膚炎の治療薬として、インターロイキン17Aの阻害薬を投与したところ、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚のマクロファージは通常皮膚のマクロファージとは違った活性化抑制がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の病態について、表皮のバリア形成異常や炎症性サイトカイン産生過剰などについて明らかになってきた。我々はこれまで皮膚における活性酸素の生理学的・病理学的役割について基礎・臨床研究を行ってきた。アトピー性皮膚炎患者尿中の活性酸素代謝物が増加していること、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて活性酸素が表皮バリア機構を形成する細胞接着因子の発現を調節すること、抗酸化剤アセチルシステインがAD患者の皮膚バリア機構を改善することなどを報告している。そして、これら皮膚の活性酸素発生にはマクロファージが最も重要な役割を果たしていることが今回の研究でわかってきた。

研究成果の概要(英文)：Macrophages are central to innate immunity and become polarized towards the M1 or M2 states upon activation by immunostimulants. We examined whether macrophages are activated in the skin of a model for IL-17A-induced chronic atopic dermatitis-like skin inflammation. LPS and IL-17A independently increased the expression levels of iNOS, CX3CR1, CD206, phospho-STAT1 and phospho-STAT3 proteins in the skin of B6 mice, and the effects of LPS was not altered by IL-17A. The expression levels of these proteins were increased in the skin of atopic mice. IL-17A neutralization decreased the expressions of CD206 and phospho-STAT3 proteins in the skin of atopic mice, suggesting that macrophages to change from the M2 to the M1 state in the skin of these mice. These results suggest that IL-17A is involved in the activation of macrophages that are in the process of adopting the heterogeneous profiles of both the M1 and M2 states.

研究分野：皮膚科

キーワード：アトピー性皮膚炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする難治性皮膚疾患である。アトピー性皮膚炎の病態について、表皮のバリア形成異常によるアレルギーや細菌・ウイルスの侵入や Th2 細胞のサイトカイン産生過剰といった獲得免疫反応の異常については明らかになってきた。

一方、アトピー性皮膚炎では細菌やウイルスを直接排除する自然免疫反応は低下しており、アトピー性皮膚炎患者は伝染性膿痂疹やカポジ水痘様発疹症といった感染症を合併しやすい。自然免疫の役割を担う主要な細胞はマクロファージであるが、アトピー性皮膚炎におけるマクロファージの機能についての詳細は不明である。

獲得免疫反応の異常で産生されたサイトカインの中には IL-4 などのマクロファージの機能を変化させるものがある。アトピー性皮膚炎の皮膚では獲得免疫反応の異常によって過剰に産生されたサイトカインなどがマクロファージの機能を変化、あるいは抑制しているため、自然免疫反応が低下していると推察される。

我々はこれまで皮膚における活性酸素とフリーラジカルの生理学的・病理学的役割について基礎・臨床研究を行ってきた。活性酸素が表皮の角化異常をきたすこと、アトピー性皮膚炎患者の尿中活性酸素代謝物の増加やアトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて活性酸素が表皮バリア機構形成を調節すること、抗酸化剤アセチルシステインがアトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア機構を改善することを報告している。

我々は inducible nitric oxide synthase (iNOS) が皮膚における活性酸素・フリーラジカル発生に必要であることを報告した。活性酸素・フリーラジカルは自然免疫反応に伴って過剰に発生する。アトピー性皮膚炎では自然免疫が低下しているため、それに伴い発生する活性酸素とフリーラジカル発生が減少し、細菌やウイルスを直接排除することができないと思われる。

2. 研究の目的

- 上アトピー性皮膚炎のモデルマウス (flaky tailマウス) を用いて、アトピー性皮膚炎における自然免疫反応低下のメカニズム、特にマクロファージの役割を明らかにする。
- flaky tailマウスの自然免疫反応を正常化し、アトピー性皮膚炎、またはその合併症の予防・治療に有用か検討する。

具体的な研究項目

(1) アトピー性皮膚炎のモデルマウス (flaky tailマウス) における自然免疫反応低下の確認

flaky tailマウスと対照マウスの皮膚にリポポリサッカライド (LPS) を注射し自然免疫反応を起こす。自然免疫反応で活性化されるシグナル伝達物質、産生されるサイトカインやタンパク質、発生する活性酸素やフリーラジカルを測定し、flaky tailマウスの皮膚で自然免疫反応が低下していることを確認する。

(2) flaky tailマウスの自然免疫反応を抑制する因子の同定

flaky tailマウスで過剰に産生されているサイトカインを培養マクロファージに添加しLPSによる自然免疫反応を抑制する因子を決定し、対照マウスの皮膚にマクロファージの自然免疫反応を抑制する因子を注射し、LPSによる自然免疫反応を抑制することを確認する。

(3) flaky tailマウスの自然免疫反応を正常化した時の影響

マクロファージの自然免疫反応の抑制因子を中和または阻害する薬剤をflaky tailマウスの皮膚に注射し、LPSによる自然免疫反応の正常化し、自然免疫反応の正常化による皮膚症状の改善を臨床的（発赤、経皮水分蒸散量）組織学的、免疫学的（獲得免疫の異常によるサイトカインの過剰産生）に示す。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎のモデルマウス（flaky tailマウス）における皮膚の自然免疫反応低下を確認

flaky tailマウスと対照マウスの背中皮膚にリポポリサッカライド（LPS）を10mg注射して自然免疫反応を起こす。3、6、12時間後に皮膚を採取する。

自然免疫反応で活性化するシグナル伝達物質（IRAK-4, IKK, NF- κ B）のリン酸化、産生されるサイトカイン（IL-6, TNF- α ）やタンパク質（iNOS）をWestern Blot法やELISA法で、mRNAの発現をリアルタイムRT-PCR法で測定する。免疫組織学的に活性化やサイトカイン、タンパクの発現がマクロファージに局在することを確認する。発生するフリーラジカルを電子スピン共鳴法で測定する。

LPSをflaky tailマウスと対照マウスの腹腔内に投与6時間後、腹腔内マクロファージを単離培養。flaky tailマウスより単離培養したマクロファージでは自然免疫反応が低下していることを示す。

(2) flaky tailマウスの自然免疫反応を抑制する因子の同定

flaky tailマウスで獲得免疫により過剰に産生されているサイトカイン（IL-4, IL-13, IL-17, IL-25）を培養マクロファージに添加し24時間、さらにLPSを0.1mg添加して3、6、12時間後に細胞のタンパクと上清を回収。自然免疫反応で活性化するシグナル伝達物質のリン酸化、産生されるサイトカインやタンパク質の発現、フリーラジカルの発生が低下していることを確認、自然免疫反応を抑制する因子を決定する。

対照マウスの皮膚にIL-4やIL-13、IL-17、IL-25を注射し、LPSによる自然免疫反応を抑制することを確認する。

IL-4やIL-13、IL-17、IL-25とLPSを対照マウスの腹腔内に投与6時間後、腹腔内マクロファージを単離培養し、自然免疫反応が低下していることを示す。

(3) flaky tailマウスの自然免疫反応の正常化

IL-4やIL-13、IL-17、IL-25を中和または阻害する薬剤をflaky tailマウスの皮膚、腹腔内に注射し、LPSによる自然免疫反応を正常化する。

自然免疫反応の正常化による皮膚症状の改善を臨床的（発赤、経皮水分蒸散量）組織学的、免疫学的（獲得免疫の異常によるサイトカインIL-4やIL-13、IL-17、IL-25の発現）に示す。

4. 研究成果

マクロファージは自然免疫の中心となる細胞である。我々はアトピー性皮膚炎モデルマウスの

皮膚のマクロファージの活性化を調べた。アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚では通常マウスの皮膚と比べて異常なマクロファージの活性化がみられた。マウスのアトピー性皮膚炎の治療薬として、インターロイキン17Aの阻害薬を投与したところ、アトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚のマクロファージは通常皮膚のマクロファージとは違った活性化抑制がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakai K, Haba R, Kushida Y, and Kubota Y | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Macrophages express Klotho in skin lesions of psoriatic patients and the skin of imiquimod-treated mice. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Dermatol. | 6. 最初と最後の頁 1475-1477 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14671. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Nakai K, Karita S, Igarashi J, Tsukamoto I, Hirano K, Kubota Y. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 COA-CI prevented TGF- β 1-induced CTGF expression by Akt dephosphorylation in normal human dermal fibroblasts, and it attenuated skin fibrosis in mice models of systemic sclerosis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Dermatol Sci | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nakai K, He YY, Nishiyama F, Naruse F, Haba R, Kushida Y, Katsuki N, Moriue T, Yoneda K, Kubota Y. | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 IL-17A induces heterogeneous macrophages, and it does not alter the effects of lipopolysaccharides on macrophage activation in the skin of mice. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 12473 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-12756-y. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 中井浩三 | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 アトピー性皮膚炎における自然免疫低下 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 月刊 細胞 | 6. 最初と最後の頁 26 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kozo Nakai, Yu-Ying He, Reiji Haba, Yoshio Kushida, Naomi Katsuki, Tetsuya Moriue, Kozo Yoneda, and Yasuo Kubota |
| 2. 発表標題 IL-17A induces heterogeneous macrophages, and it does not alter the effects of lipopolysaccharides on macrophage activation in the skin of mice. |
| 3. 学会等名 IID 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井浩三、森上徹也、窪田泰夫 |
| 2. 発表標題 IL-17Aはマウス皮膚のマクロファージ細胞活性化に関する |
| 3. 学会等名 日本アレルギー学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kozo Nakai, Yu-Ying He, Fumiko Nishiyama, Fukiko Naruse, Tetsuya Moriue, Yasuo Kubota |
| 2. 発表標題 IL-17 is involved in the activation of macrophages in the skin of mouse |
| 3. 学会等名 Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kozo Nakai, Yu-Ying He, Kozo Yoneda, Tetsuya Moriue, and Yasuo Kubota |
| 2. 発表標題 In vivo evidence of IL-17A induced heterogeneous activation of macrophages in the skin of mouse |
| 3. 学会等名 第42回日本研究皮膚科学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|