

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10237

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の皮膚サイトカイン環境の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of cytokines in the skin of atopic dermatitis

研究代表者

加納 宏行 (Kano, Hiroyuki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40566494

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)：アトピー性皮膚炎(AD)の病態にはタイプ2サイトカインのみならず、IL-17やIFN- γ の関与がわかっている。これらサイトカインをAD患者の病変部から非侵襲的に検証する目的で、ニトロセルロースメンブレンを皮膚表面に貼付して、皮膚の蛋白質を経皮的に採取し、抗体を用いて検出する「スキンプロットティング法」の検討をした。途中、2次抗体(抗マウスIgG抗体など)がヒトIgGも認識することが判明。皮疹部にはグロブリンも検出されるため、交叉反応を除外する方法(三重染色)を確立し、臨床例での検討を行ったが、陽性シグナルは検出できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
残念ながら、有意なデータが得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Various kinds of cytokine including type2 cytokines, IL-17 and IFN- γ are involved in the pathophysiology of atopic dermatitis (AD). In order to detect these cytokines in the skin of AD patients in a non-invasive manner, we examined "skin-blotting method" i.e., nitrocellulose membranes are attached to the skin surface to detect these proteins by specific antibodies. On the way, the secondary antibody (e.g. anti-mouse IgG antibody) was proved to detect human IgG. Since globulins are detected in the skin of AD patients, we have established the staining method to avoid the cross reaction, and performed the refined skin-blotting method, however, positive signal was not detected in the patient skin.

研究分野：アトピー性皮膚炎の病態

キーワード：アトピー性皮膚炎 スキンプロット サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バリア機能は皮膚の基本的機能のひとつであり、特に角層は生きた細胞を外界から隔離するバリアとして重要で、その破綻は微生物や各種アレルゲンが直接表皮細胞や樹状細胞に作用する場を提供する。そして、そこに免疫・アレルギー反応が惹起されるとアトピー性皮膚炎(AD)等が誘導される。角層バリア機能は 1.角質細胞内の天然保湿因子、2.角質細胞のコリーニドエンベロップ、3.角質細胞間脂質から構成される。AD では天然保湿因子の主要供給源でもあるフィラグリンの機能損失変異が 20~50% で認められ、AD 発症素因のひとつであるが、遺伝子変異がなくても皮膚における Th2 型炎症がフィラグリンの発現を抑制しバリア機能の二次的低下を引き起こす。一方、角質細胞間脂質の主要構成成分 セラミドも AD では減少しており、その原因としてセラミド代謝分解酵素の活性上昇が言われているが、近年、セラミドは量のみならず分子を構成する脂肪酸側鎖の長さが重要と指摘されている。つまり長鎖脂肪酸セラミドの割合が減少すると疎水性が低下しバリア機能が低下すると考えられている。

セラミドはパルミトイル-CoA、セリン、脂肪酸アシル-CoA から多段階反応を経て顆粒細胞で産生され、角層に分泌されるが、長鎖脂肪酸セラミド合成には、elongation of very long chain fatty acid (ELOVL) と ceramide synthase (CerS) が重要な役割を果たす。申請者らは AD 患者角層のセラミドの長鎖脂肪酸/短鎖脂肪酸比率が低下していること、3 次元培養皮膚で各種サイトカインの中で IFN が ELOVL、CerS の発現を抑制すること、IFN を 3 次元培養皮膚に作用させると産生されるセラミドの長鎖脂肪酸/短鎖脂肪酸比率が低下することを見いだした(Tawada, Kanoh et al. J Invest Dermatol 134: 712-718, 2014)。さらに、Nc/Nga マウスにダニ抗原を反復塗布し発症させた皮膚炎では、IFN の発現上昇とともに ELOVL、CerS の発現が低下し、セラミドの長鎖脂肪酸/短鎖脂肪酸比率も低下することが観察された(Kanoh et al. J Immunol Res 2019 Jan 29; 2019:3030268)。このことは、角層セラミド組成が Th1 型炎症により制御される可能性を示唆している。しかし、AD は通常 Th2 型炎症であり、代表的な Th1 サイトカイン IFN がどこまで AD の角層バリア異常に関与しているか不明である。申請者らはさらにマウス IFN の長期発現ベクターを肝細胞に取り込ませ血中 IFN を高濃度に維持したマウスで、皮膚 ELOVL、CerS の発現、セラミドの長鎖脂肪酸/短鎖脂肪酸比率を検討したが、変化は見られなかった(Kanoh et al. 未発表)。このことは、血中ではなく皮膚組織中のサイトカイン濃度が重要であることを示唆する。したがって、AD 患者の皮膚病変局所のサイトカイン環境、角層セラミド組成、バリア機能の関連を評価することが重要になる。そのためには皮膚生検(組織採取)が必須となり、さまざまな病態での検討は困難である。

2. 研究の目的

AD の病態生理は、多くの研究から得られた知見で格段に理解が進んでいるが、培養細胞や動物実験などの単純化した系で得られたデータから構築されている部分も多い。実臨床で診る患者の臨床像は実に多彩で、個々のサイトカインプロファイルを集積し分類・評価することは非常に興味深く、サイトカインをターゲットにした治療薬の開発・適応・評価の面からも有意義であると考えられる。具体的には Th2 関連サイトカイン・ケモカイン(TSLP、TARC、IL-4、IL-5、IL-13 など)、Th17(IL-17、IL-23 など)、Th1(IFN など)、Treg(IL-10 など)、痒み関連(IL-31)、自然免疫関連(IL-33)のサイトカイン等を AD のサブタイプ、重症度、皮疹の性状、治療前後、年齢などさまざまな因子と関連させて解析し、一般論として理解されているアトピー性皮膚炎の病態をより臨床的に役立つ視点で明らかにする。

我々の提唱した仮説、つまりサイトカイン(特に IFN)と角層セラミド組成との関連を、上記解析を踏まえて AD 患者で検証する。角層脂質解析はサンプリング・抽出・LC-MS/MS 分析まで技術的にバラツキを生じやすい。網羅的解析によりサイトカインプロファイルの特徴を十分に把握してから、サイトカインバランスが Th1 に傾いた皮膚、Th2 に傾いた皮膚という視点を中心にできるだけ効率的に脂質解析を進める。

3. 研究の方法

非侵襲的に AD 患者皮膚のサイトカイン環境を測定し、角層セラミド組成、バリア機能、サイトカインの関連について解析を試みるために、「スキンプロットティング」という手法を採用することを考えた(図)。AD にはサイトカインプロファイルの異なる内因性・外因性という病型や、また同一個体内でも急性期病変と慢性期病変でサイトカイン環境が異なることが指摘されている。スキンプロットティング法は、多様な AD 患者のサイトカイン環境を in situ で調べることができ、目的に適った方法と考えられる。具体的には以下の 3 つを行う。

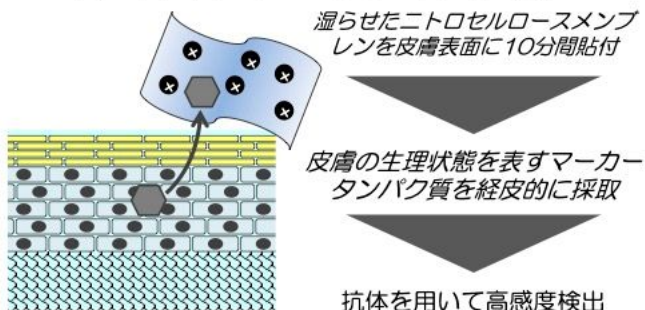
1.スキンプロットティング法の技術的確立(基礎実験とマウスでの検討)。患者間でバリア機能の状態が異なっても比較できるように内部標準などによる補正方法も確立する。

2.アトピー性皮膚炎の患者皮膚におけるサイトカイン環境の網羅的解析を行った後、角層セラミド組成・バリア機能と ELOVL、CerS の発現、サイトカイン環境の関連を解析し、多彩な臨床像

と病態の関係を明らかにする

3. アトピー性皮膚炎様症状を呈する疾患のサイトカイン環境の解析。スキンプロットティングのキット化も視野に入れつつ、AD 類似疾患のサイトカイン解析を通してバイオマーカーの確立を目指す。

図 スキンプロットティング法



4. 研究成果

各種基礎実験(抗体の特異性、濃度、反応時間等の条件検討)の後、IL-4、IL-13、IL-31、IL-33、IFN- γ 、TSLP、TNF 等について、AD 患者皮疹部におけるスキンプロットティング法による検出を試みた。その結果、IL-4、IFN- γ のシグナルがAD 患者皮疹部で捉えられた。一方、IL-13、IL-31、IL-33、TSLP、TNF のシグナルは捉えられなかった。加えて、バリア機能の低下の指標としてアルブミンを調べ、AD 皮疹部で強い陽性シグナルがえられた。しかし、その後、2次抗体(抗マウス IgG 抗体など)がヒト IgG も認識することが判明。皮疹部ではグロブリンも検出されるため、検出法を再検討。まず2次抗体だけを反応させ発色、その後に抗サイトカイン抗体、2次抗体で発色し(間接法)、交叉反応を除外、最後に HRP 標識抗ヒトアルブミン抗体で発色する方法(三重染色)を確立し、臨床例での検討を行った。しかしながら、“明らかな陽性”と判断できるサンプルを得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	清島 真理子 (Seishima Mariko) (00171314)	岐阜大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (13701)	
研究分担者	中村 光浩 (Nakamura Mitsuhiro) (30433204)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関