

## 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 5月 1日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790934

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎における増悪化ループに関する解析

研究課題名（英文）Analysis of vicious circle in atopic dermatitis

研究代表者

白石 裕士 (SHIRAISHI HIROSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80452837

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎は、Th2型の免疫反応と皮膚のバリア機能の異常が複雑に絡み合った慢性炎症性皮膚疾患である。本研究では、アトピー性皮膚炎の病態形成には、IL-4/IL-13によって誘導された細胞外マトリックスタンパク質 periostin が、表皮細胞を刺激することによって TSLP をはじめとする別の炎症性メディエーターが産生され、再び IL-4/IL-13 を誘導するという増悪化ループが存在し、そのループを阻害すると皮膚炎症状が改善されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by skin barrier impairment and immunologic abnormalities, in which Th2 type responses dominate. In this study, we identified that a vicious circle constituted with IL-4/IL-13, periostin, and TSLP, is involved in the pathogenesis of AD and that the inhibition of this circle prevents the pathogenesis of AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー アトピー性皮膚炎 periostin Th2 細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、Th2型の免疫反応と皮膚のバリア機能の異常が複雑に絡み合った慢性炎症性皮膚疾患である。しかしながら、Th2型の免疫反応で産生されるIL-4/IL-13がどのような分子を誘導して、アトピー性皮膚炎の病態を形成し、炎症を慢性化させるのかはよく分かっていなかった。これまでの研究により、アトピー性皮膚炎の病変部において、IL-4/IL-13によって誘導される細胞外マト

リックスタンパク質 periostin が顕著に沈着していること、また periostin 欠損マウスではダニ抽出物による皮膚炎症状が顕著に改善されることを明らかにしてきた。さらに periostin 欠損マウスでは、Th2型の免疫反応も減弱していたことから、Th2型の免疫反応で誘導された periostin がさらに Th2型の炎症を促進することで、炎症の慢性化に寄与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、periostin による Th2 型免疫反応の促進機構を明らかにするとともに periostin を標的とした治療戦略を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Periostin 欠損マウスを用いた皮膚炎モデルマウスの解析

野生型マウス (C57BL/6) および periostin 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) にダニ抽出物を用いて皮膚炎を誘導した。具体的には、マウスの耳介をテープストリッピング後、ダニ抽出物を週 1 回 7 週間塗布することで皮膚炎を誘導した。皮膚炎の評価は、耳介の厚さの測定、組織像を用いて行い、病変部および所属リンパ節から RNA を抽出しサイトカイン等の発現の解析を行った。さらに Rag2 欠損マウスを用いて同様の解析を行った。また、periostin-integrin 経路を阻害するために抗 integrin 抗体を野生型皮膚炎モデルマウスに投与し、その効果を解析した。

### (2) in vitro 皮膚再構成系を用いた periostin の表皮細胞への作用の解析

新生仔マウスより表皮細胞を調製し、野生型マウスおよび periostin 欠損マウス由来の線維芽細胞と共培養することにより、生体外で皮膚を再構成し、表皮細胞の分化・増殖に periostin がどのような役割を果たすのか解析した。また periostin 存在下での表皮細胞から産生されるサイトカインを ELISA 法にて定量し、共培養上清の樹状細胞への作用を T 細胞との共培養で解析した。

## 4. 研究成果

野生型 (BALB/c) マウスの耳にダニ抽出物の塗布することにより、Th2 型の免疫反応、表皮肥厚、線維化といったアトピー性皮膚炎に特徴的な病態を示したが、T 細胞を欠損する Rag2 欠損マウスや、STAT6 欠損マウス、periostin 欠損マウスでは顕著な改善が見られた。これは C57BL/6 バックグラウンドでも同様だった。次に periostin がどのようにして Th2 型の免疫反応を促進しているかを in vitro 皮膚再構成系で解析したところ、periostin が integrin を介して表皮細胞の増殖を促進するとともに、表皮細胞からの TSLP や TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  などのサイトカインの産生を誘導することが明らかとなった。さらにこの培養上清で樹状細胞を刺激した後に T 細胞と共培養したところ、Th2 細胞の分化を誘導することが明らかとなった。これらの結果より、アレルゲンにより誘導された IL-4/IL-13 によって periostin が沈着し、その periostin が integrin を介して表皮細胞を活性化して、最終的には更なる Th2 型の免疫反応を促進す

るという炎症の慢性化の機序が明らかとなった。

そこでこの増悪化のループを、ダニ抗原誘導皮膚炎モデルマウスに抗 integrin 抗体を投与することにより阻害したところ、皮膚炎の顕著な改善が見られた。さらにダニ抗原により病態が十分に形成された後に抗 integrin 抗体を投与しても改善が見られた。よってこれらの知見より、periostin を介した増悪化ループがアトピー性皮膚炎における炎症の慢性化に重要であり、その阻害が治療の標的となることが明らかとなった。

## 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 7 件) (全て査読あり)

1. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, Takeuchi S, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* (in press) Equally contributed.
2. Ohtsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 21: 331-336 (2012)
3. Ohta S, Shibata R, Nakao Y, Azuma Y, Taniguchi K, Arima K, Suzuki S, Shiraishi H, Iwasaka T, Izuhara K. The usefulness of combined measurements of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in diagnosing atopic dermatitis. *Ann Clin Biochem* 49: 277-284 (2012)
4. Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, Okamoto M, Ahlfeld SK, Ohshima K, Kato S, Toda S, Sagara H, Aizawa H, Hoshino T, Conway SJ, Hayashi S, Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 677-686 (2012)
5. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, Ohshima K, Shiraishi H, Uchida M, Ono J, Ohta S, Kato S, Izuhara K, Aizawa H. Periostin, a matric protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 37: 1119-1127 (2011)
6. Matsushita H, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S,

Arima K, Toda S, Tanaka H, Nagai H, Kimoto M, Inokuchi A, Izuhara K. Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. *Int Immunol* 22: 739-747 (2010)

7. Shiraishi H, Okamoto H, Hara H, Yoshida H. Alternative cell death of Apaf1-deficient neural progenitor cells induced by withdrawal of EGF or insulin. *Biochim Biophys Acta* 1800: 405-415 (2010)

[学会発表] (計 7 件)

1. 御塚加奈子、壽順久、白石裕土、片山一朗、仲哲治、出原賢治、成澤寛。細胞外マトリックスタンパク質「ペリオスチン」は、皮膚線維芽細胞の活性化を介して創傷治癒を促進する 第 15 回九州基礎皮膚科研究会(福岡、12/3/2011)
2. Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Ohtsuka K, Suzuki S, Conway SJ, Izuhara K. ペリオスチンはインターロイキン 6 産生を介して表皮角化細胞の増殖・分化に関与する 第 40 回日本免疫学会学術集会 (千葉、11/27-29/2011)
3. Ohta S, Shibata R, Nakao Y, Azuma Y, Taniguchi K, Arima K, Suzuki S, Shiraishi H, Iwasaka T, Izuhara K. Development of combined measurement of squamous cell carcinoma antigen 1 and 2 as a potential companion diagnostic for anti-IL-4/IL-13 therapies in allergic diseases. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Berlin, 5/15-19/2011)
4. Uchida M, Shiraishi H, Okamoto M, Hoshino T, Sagara H, Aizawa H, Hayashi S, Izuhara K. Periostin is a critical mediator for acute lung injury induced by chemotherapeutic agents. American Thoracic Society International Conference (Denver, 5/13-18/2011)
5. Kawaguchi T, Fujimoto K, Nakashima O, Suzuki S, Shiraishi H, Ohta S, Kawaguchi A, Tonan T, Oshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, sata M. Periostin, a matrix protein, is a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. The 61<sup>th</sup> annual meeting of the American association for the study of Liver diseases. The Liver Meeting. (Boston, 10/29-11/2/2010)
6. Mauoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Sutoh H, Inagakki N, Furue M, Izuhara K. Periostin, an extracellular matrix protein, is a critical mediator for amplification and chronicity of inflammation in atopic dermatitis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Kobe, 8/22-27/2010)

7. Izuhara K, Mauoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S. Periostin, an extracellular matrix protein, acts as a master switch for the onset of inflammation in atopic dermatitis. 28<sup>th</sup> Symposium of the collegium Internationalale Allergologicum (Ischia, 4/25-30/2010)

[図書] (計 6 件)

1. Izuhara K Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S. Interleukin 4, interleukin 13, and interleukin 9. Inflammation and Allergy Drug Design. 175-185 Wiley-blackwell, London (2011)
2. 出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕土、太田昭一郎. IL-4; IL-13. 疾患モデルの作製と利用-免疫疾患. 231-239; 276-283 株式会社エル・アイ・シー 東京 (2011)
3. 白石裕土、出原賢治. Periostin (ペリオスチン) と肺疾患. 呼吸. 29(5): 479-484 Respiration Research Foundation (2010)
4. 吉村昭彦、古賀敬子、白石裕土. cAMP による炎症性サイトカイン産生抑制機構. 医学のあゆみ. 234(5): 364-370 医歯薬出版株式会社 (2010)
5. 出原賢治、白石裕土、鈴木章一、太田昭一郎. アレルギー疾患の生化学的検査方法. 臨床と研究. 87(2): 221-225 大道学館出版部 (2010)
6. 出原賢治、太田昭一郎、白石裕土、鈴木章一. インターロイキン 13. 関節リウマチ (日本臨床). 69(5): 141-144 日本臨床社 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 9 件)

1. 名称：ペリオスチンの特定領域に結合する抗体、ならびにこの抗体を用いるペリオスチンの測定方法、測定試薬及び正確性の改善方法、並びに疾患の検査方法  
発明者：出原賢治、白石裕土 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2011-077774  
出願年月日：2012年3月29日  
国内外の別：国内
2. 名称：気管支喘息の予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法  
発明者：出原賢治、白石裕土 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2012-11838  
出願年月日：2012年1月24日  
国内外の別：国内
3. 名称：慢性副鼻腔炎の検出方法  
発明者：出原賢治、白石裕土 他

権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2011-238913  
出願年月日：2011年10月31日  
国内外の別：国内

4. 名称：特発性間質性肺炎の検出方法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：12/995.769  
出願年月日：2010年12月2日  
国内外の別：国外
5. 名称：胆管細胞癌の検出方法および予防・  
治療剤のスクリーニング方法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：PCT/JP2010/071616  
出願年月日：2010年12月2日  
国内外の別：国内
6. 名称：特発性間質性肺炎の検出方法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2010-515954  
出願年月日：2010年12月2日  
国内外の別：国内
7. 名称：特発性間質性肺炎の検出方法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：9758451  
出願年月日：2010年11月29日  
国内外の別：国外
8. 名称：ペリオスチン測定の正確性の改善方  
法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2010-200564  
出願年月日：2010年9月8日  
国内外の別：国内
9. 名称：増殖糖尿病網膜症の検出方法および  
予防・治療剤のスクリーニング方法  
発明者：出原賢治、白石裕士 他  
権利者：同上  
種類：特許権  
番号：2010-093240  
出願年月日：2010年4月14日  
国内外の別：国内
- 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  
白石 裕士 (SHIRAISHI HIROSHI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：80452837
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし