

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591654

研究課題名(和文) 神経ペプチドのIgE依存性アレルギー反応に対する調節作用の解析

研究課題名(英文) analysis for the role of the neuropeptides in the IgE-dependent allergic responses

研究代表者

水川 良子 (Mizukawa, Yoshiko)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：50301479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】表皮に恒常的に発現する神経ペプチドNeuromedin U (NMU)とIgE依存性アレルギー反応の相互の関係を明らかにする。【方法と結果】耳翼ハプテン繰り返し塗布によるアトピー性皮膚炎マウスモデルでの検討および足蹠へのIgE transferの系で、NMUはIgE依存性アレルギー反応を抑制していた。マウス骨髄からのBMCと結合織型肥満細胞(CTLMC)を用いたin vitroの検討では、主にCTLMCにおいてIgEはNMUによる脱顆粒を抑制していた。【まとめ】NMUを介した肥満細胞の活性化とIgE/FcRIを介する肥満細胞の活性化は相互に作用していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：No information is available about physiological roles of the keratinocyte-derived neuropeptides in controlling allergic skin inflammation. We asked whether a targeted disruption of the neuropeptide, neuromedin U (NMU) known as a mediator of innate-type mast cell activation, could render otherwise refractory C57BL/6 mice susceptible to allergic skin inflammation. The NMUKO mice developed IgE-mediated allergic inflammation characterized by increased serum IgE levels was repeatedly elicited with hapten. This indicates that depletion of NMU from the epidermis alone does not drive such allergic inflammation. Indeed, allergic skin inflammation mediated by IgE/FcεRI cross-linking was inhibited by prior injection with NMU in to NMUKO mice. NMU in the epidermis can have paradoxical functions, eliciting mast cell activation at an early stage, and playing an important physiological role as a negative regulator of IgE-mediated allergic skin inflammation at a late stage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：神経ペプチド アレルギー反応 IgE

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患では、IgE/FcεRI pathway による肥満細胞の活性化が即時型アレルギー反応 (immediate-type hypersensitivity; ITH) を引き起こし、症状の悪化に参与していると考えられている。一方で、肥満細胞は自然免疫担当細胞としても重要な役割を担っており、TLR を介した pathway が注目されている。我々は以前より耳翼にハプテンを繰り返し塗布し IgE 依存性の ITH を誘導するアトピー性皮膚炎 (AD) マウスモデルを確立しているが (Kitagaki H et al, J Invest Dermatol, 1995; J Immunol, 1997, 1999), 足蹠へのハプテン単回塗布では TLR2 を介する ITH 様反応を生じる (Mizukawa Y et al, 投稿中)。さらに、この反応には表皮細胞に恒常的に発現する神経ペプチド Neuromedin U (NMU) が不可欠であることを見いだしている。NMU は上皮系、リンパ球系の様々な細胞に発現している神経ペプチドであるが、外的刺激により表皮細胞から分泌され肥満細胞を活性化することが報告されている (Moriyama M et al, J Exp Med, 2005)。興味深いことに IgE 依存性のアレルギー反応を生じ易い Balb/c と抵抗性の B6 マウス各々を用いて耳翼ハプテン繰り返しモデルを作成すると、Balb/c では NMU が著明に減少するのに対し B6 では NMU が残存して認められた。これらの結果から、NMU は TLR2 依存性の自然免疫としての反応を生じる一方で、IgE 依存性のアレルギー反応を抑制していると予測された。

2. 研究の目的

表皮に恒常的に発現する神経ペプチド NMU が IgE 依存性のアレルギー反応に果たす役割を明らかにするとともに、NMU と IgE の相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NMU-/-マウスの耳翼を用いてハプテン (TNCB; 2,4,6-trinitro-chlorobenzene) 繰り返し塗布を行い、WT (B6) と比較した。現在までの Balb/c, B6 での予備実験において、繰り返しハプテン塗布後の NMU の発現が両者では異なる事から、NMU は IgE 依存性の反応を抑制している可能性が示唆されている。そこで、NMU-/-マウスの耳翼を用いてハプテン繰り返し塗布を行い、耳翼厚、ITH、血清 IgE レベル、搔破数を経時的に測定した。採取した組織検体での浸潤細胞の種類・程度、肥満細胞数の測定と組織でのサイトカインの発現を RT-PCR による mRNA の発現にて比較検討した。同時に所属リンパ節でのサイトカイン産生を FACS にて解析した。

(2) NMU が IgE 依存性の ITH を抑制していることを更に検討するために、NMU-/-の足蹠にハプテン特異的 IgE を局注後、ハプテンを塗布し足蹠の腫脹反応を検討した。また、IgE 局注による前処置後、抗 IgE 抗体投与により ITH を誘導し、この反応が NMU 投与にて抑制されるかを検討した。同様に処理した B6 マウスの反応と比較検討した。

(3) IgE が NMU によって誘導される反応にどのような影響をあたえているかを明らかにするために、B 細胞を欠損するために IgE の産生できない μ -/-マウスの足蹠に NMU を投与し、その腫脹反応を B6 と比較した。

(4) マウス骨髄より誘導した肥満細胞を用いた *in vitro* の系での検討を行った。マウス骨髄より採取し *in vitro* で分化させた肥満細胞を用いて、*in vivo* で得られた結果を *in vitro* でも再現できるかを検討した。IL-3 で分化させた肥満細胞 (BMDC) では神経ペプチド刺激での脱顆粒は生じないため、

BMMC を IL-4 環境下で培養することにより得られた connective tissue -like MC (CTLMC) (Karimi et al, 1998; Ekoff et al, 2007) を用いて、IgE および NMU に対する反応性を検討した。

IgE 前処置が NMU による脱顆粒にどのように影響を及ぼすのかも検討した。

4. 研究成果

(1) NMU-/-マウスではハプテン繰り返し塗布による IgE 依存性の反応は増強する。

従来より Th2 タイプの反応に傾き易い Balb/c は IgE 依存性の AD 様の皮膚炎を生じ易いが、Th1 タイプの反応を起こし易い B6 マウスでは Balb/c マウスと同様の処理を行っても IgE 依存性の反応は起こりにくいことが知られている。Balb/c ではハプテン繰り返し塗布により NMU が著明に減少することから、NMU の欠損は Th2 タイプの反応が生じる可能性があると考えた。NMU-/-マウスは IgE 依存性の反応が生じにくい B6 を免疫学的バックグラウンドとしているが、B6 に比較して耳翼厚、ITH、血清 IgE レベル、搔破数とも B6 に比較して著明に増強していた。

耳翼皮膚の mRNA の検討でも、B6 に比較して Th2 タイプのサイトカインである IL-4 の著明な増加に加え、IFN- γ 、IL-23 などのサイトカインの増加も確認され Th2 のみならず、Th1・Th17 の局所での産生増加が確認された。

所属リンパ節を用いた検討では $\gamma\delta$ 細胞からの IL-17 の産生増加が顕著であった。

以上より NMU の欠損は IgE 依存性のアレルギー反応を増強させる可能性があることが明らかになった。

(2) NMU は、IgE 依存性のアレルギー反応を抑制する。

NMU-/-の足蹠にハプテン特異的 IgE を局

注後、ハプテン塗布を行うハプテン特異的な腫脹反応は、NMU-/-マウスでは IgE 濃度依存性に増加し、かつ B6 足蹠で認められた腫脹反応に比較し有意に増強されていた。さらに IgE 前処置後に抗 IgE 抗体投与にて ITH を誘導すると、NMU-/-マウスでは B6 に比較してその腫脹反応は著しかった。すなわち、NMU-/-マウスでは IgE 依存性の反応が増強する結果であった。さらに、これらの反応は NMU 前投与を行うと、有意に抑制されることが確認された。

以上より、NMU は IgE 依存性のアレルギー反応を抑制することが明らかになった。

(3) μ -/-マウスでは NMU による足蹠腫脹反応は増強する。

μ -/-マウスは B 細胞を欠損するため IgE を産生できない。このマウスの足蹠を用いて NMU を投与すると μ -/-マウスでは B6 に比較して足蹠の腫脹反応は顕著であった。以上より、IgE は NMU によって誘導される即時型の腫脹反応すなわち肥満細胞の脱顆粒を抑制している可能性が示唆された。

(4) NMU は、CTLMC を脱顆粒させるが、BMMC では反応せず、IgE は NMU による CTLMC の脱顆粒を抑制する。

BMMC と CTLMC では、IgE および NMU に対する反応性は異なっていた。CTLMC は、*in vivo* で認められた反応と一致して NMU にて脱顆粒が確認されたが、BMMC では脱顆粒は確認されなかった。また、IgE に対する反応性は BMMC でより顕著であった。

また、CTLMC を IgE で前処置後、NMU で脱顆粒を誘導すると、脱顆粒率の低下が確認された。

以上より、NMU、IgE は相互に作用し、局所での反応をコントロールしていると考えられた。

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 13 件)

1. Hayakawa J, Mizukawa Y, Kurata M, Shiohara T: A syringotropic variant of cutaneous sarcoidosis -Presentation of three cases exhibiting defective sweating responses- J Am Acad Dermatol 68: 1016-1021, 2013. 査読有り doi: 10.1016/j.jaad.2012.11.039.
2. Shiohara T and Mizukawa Y: Fixed drug eruption: the dark side of activation of intraepidermal CD8+ T cells uniquely specialized to mediated protective immunity. Chem Immunol Allergy 97:106-121, 2012. 査読有り doi: 10.1159/000335623.
3. Shiohara T, Kano Y, Takahashi R, Ishida T and Mizukawa Y: Drug-induced hypersensitivity syndrome: recent advances in the diagnosis, pathogenesis and management. Chem Immunol Allergy 97:122-138, 2012 査読有り doi: 10.1159/000335624.
4. Mizukawa Y, Horie C, Yamazaki Y and Shiohara T: Detection of varicella-zoster virus antigens in lesional skin of zosteriform lichen planus but not in that of linear lichen planus. Dermatology 225(1); 22-26, 2012. 査読有り doi: 10.1159/000339771.
5. Kano Y, Horie C, Inaoka M, Ishida T, Mizukawa Y, Shiohara T: Herpes zoster in patients with drug-induced hypersensitivity syndrome/DRESS. Acta Derm Venereol 92(2); 2060207, 2012. 査読有り doi: 10.2340/00015555-1317
6. 佐藤洋平、水川良子、稲岡峰幸、塩原哲夫: 薬剤投与なく再燃し、色素沈着を伴った非色素沈着型固定薬疹の 1 例. 臨皮 65: 478-481, 2011 査読有り <http://top.islib.jp/bcs/ct/medicalfinder/fixedViewPdf.do?isid=1412102966>
7. 水川良子: 重症薬疹のモデルとしての固定薬疹. 医学のあゆみ 238: 775-778, 2011. 査読無し
8. 堀江千穂、水川良子、塩原哲夫: 苔癬型組織反応における汗腺、汗管の病理組織学的検討. 日皮会誌 121: 1869-1874, 2011. 査読有り
9. 水川良子: 皮膚病変から学ぶアレルギーの鑑別 主訴: 下肢の皮疹. 皮膚アレルギーフロンティア 9: 219-221, 2011. 査読無し
10. Horie C, Mizukawa Y, Yamazaki Y, Shiohara T: Varicella-zoster virus antigen expression of eccrine gland and duct epithelium in herpes zoster lesions. Br J Dermatol 165:802-807, 2011 査読有り doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10462.x.
11. 水川良子: 皮膚科研究の進歩・最前線 IgE は悪役か? 日皮会誌 121:2923-2924 2011. 査読無し
12. Shiohara T, Sato Y, Takahashi R, Kurata M, Mizukawa Y: Increased susceptibility of cutaneous viral infections in atopic dermatitis: the role of regulatory T cells and innate immune defects. Curr Probl Dermatol 41: 125-135, 2011. 査読有り doi: 10.1159/000323306.
13. Narita YM, Hirahara K, Mizukawa Y, Kano Y, Shiohara T: Efficacy of plasmapheresis for the treatment of severe toxic epidermal necrolysis: Is cytokine expression analysis useful in predicting its therapeutic efficacy? J Dermatol 38 (3);236-245. 査読有り doi: 10.1111/j.1346-8138.2010.01154.x.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 倉田麻衣子、水川良子、狩野葉子、塩原哲夫：帯状疱疹(HZ)の発症部位と HSV 抗体の関連 - 当科入院症例の解析. 第 77 回日本皮膚科学会、東京支部学術大会、東京、平成 26 年 2 月 16 日.
2. 水川良子、土肥孝彰、塩原哲夫：角質水分量は皮膚アレルギー反応の強さを決めている. 第 9 回日 TAP 研究会, 東京, 平成 25 年 12 月 7 日.
3. 水川良子、何川宇啓、塩原哲夫、高山信之¹ (¹ 同血液内科): 光線過敏性皮膚炎様症状および下腿の浮腫性硬化性病変が相互に生じた慢性 GVHD の 1 例. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会, 金沢, 平成 25 年 12 月 1 日.
4. Mizukawa Y, Shiohara T: Mechanisms insuring regulatory T cell recruitment in fixed drug eruption lesions. 8th International Congress on Cutaneous Adverse Drug Reactions. Taoyuan, Taiwan, Nov 17th, 2013.
5. 水川良子: 教育講演. 臨床医にとっての研究. 発汗異常が教えてくれる皮膚疾患の新たな側面. 第 112 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 平成 25 年 6 月 14 日.
6. Mizukawa Y, Komatsu Y, Yamazaki Y, Shiohara T: IgE has different effects on mast cell subtypes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Nago, Dec 8th, 2012.
7. Komatsu Y, Sato Y, Ushigome Y, Doi T, Mizukawa Y, Shiohara T: Involvement of sweating disturbance in the pathogenesis of lichen planus and atopic dermatitis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Nago, Dec 8th, 2012.
8. Mizukawa Y, Doi T, Komatsu Y, Ushigome Y, Shiohara T: Sweating disturbance as a trigger for lichen planus. 10th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology. Tokyo, Nov 18th, 2012.
9. Sato Y, Mizukawa Y, Doi T, Komatsu Y, Ushigome Y, Shiohara T: Impression mold techniques (IMT): A useful methods for the analysis of sweating responses. 10th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology. Tokyo, Nov 18th, 2012.
10. 堀江千穂、水川良子、岡崎亜希、塩原哲夫：Bell 麻痺後の打撲部位に発症した皮膚サルコイドーシスの 1 例. 第 75 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、東京、平成 24 年 2 月 18 日.
11. Mizukawa Y, Shiohara T: Multiple fixed drug eruption as a possible abortive variant of toxic epidermal necrolysis. The 22th World Congress of Dermatology. Korea, May 29th, 2011
12. Mizukawa Y, Shiohara T: A dual role of the degranulation of different mast cell subtypes The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Kyoto, Dec 9th, 2011
13. 牛込悠紀子、水川良子、塩原哲夫：マイコプラズマ感染症の関与が考えられた皮膚型結節性多発動脈炎(CPN). 第 75 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、群馬、平成 23 年 9 月 18 日.
14. 水川良子: 正常皮膚におけるヒト Langerhans 細胞の単純ヘルペスウイルス感染. HSV 皮膚病変の形成における保護的役割 第 18 回ヘルペス感染症フォーラム, 札幌, 平成 23 年 8 月 19 日.

15. 水川良子: 角質水分量は皮膚アレルギー反応の強さを決めている. 第 36 回日本化粧品学会, 東京, 平成 23 年 6 月 9 日.

〔図書〕(計 2 件)

1. 水川良子: 間擦疹型薬疹. 皮膚科 フォトクリニックシリーズ. 誤診されている皮膚疾患. 宮地良樹編. 東京、メディカルビュー社、平成 25 年 2 月 20 日. P116-119.
2. 水川良子: 扁平苔癬. 今日の治療指針 2013 年版. 戸倉 新樹編. 東京、医学書院、平成 25 年 1 月 1 日. p.1046-1047.

〔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 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 良子 (MIZUKAWA YOSHIKO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：50301479

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：