

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870728

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の難治性痒み発現に及ぼすグランザイムAの関与の解明

研究課題名(英文) Relationship of plasma granzyme levels to severity and itch of atopic dermatitis

研究代表者

木村 有太子 (Kimura, Utako)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00459091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ADの難治性痒みに対するグランザイム(Gzm)Aの関与を解明することを目的とし研究を行った。血漿GzmA濃度はAD患者で高い傾向があったが、有意差はなく、ADの病勢や痒みを示すマーカーの値といずれも相関がなかった。一方、血漿GzmB濃度は健常者と比較してAD患者で有意に高値であり、痒みの情報伝達に関与する血漿GRP濃度と有意な正の相関が認められ、痒みスコアのVASと正の相関がある傾向にあった。また、ADの病勢を反映するSCORADならびに血清TARC濃度と有意な正の相関を示した。以上の結果は、当初の目的で着目したGzmAよりも、GzmBがAD患者の痒みと皮膚炎の両者を反映することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Granzymes (Gzms), a family of serine proteases expressed by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, have been shown to modulate inflammation. Their relationship with pruritus of AD still remains unclear. In the present study, we assessed relationships among plasma Gzm levels and severity of pruritus or dermatitis in AD patients. In enzyme-linked immunosorbent assays, plasma GzmB levels were significantly increased in AD patients. Correlation analyses among other clinical markers of AD showed that plasma GzmB levels positively correlated with plasma gastrin releasing peptide (GRP) level, serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) levels or scoring atopic dermatitis (SCORAD). Visual analogue scale (VAS) score also tended to correlate with plasma GzmB level. However, plasma GzmA levels no correlation with these markers. These data suggest that plasma GzmB levels may be involved in the severity levels of both pruritus and dermatitis in AD patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：グランザイム アトピー性皮膚炎 痒み

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (AD) の激しい痒みは睡眠障害など患者の Quality of life を著しく障害することから、痒みのコントロールは必要不可欠である。ヒスタミンは古くから知られる起痒物質であり、痒み治療には抗ヒスタミン薬 (ヒスタミン H1 受容体拮抗薬) が汎用されてきた。しかしながら、AD 患者の痒みに抗ヒスタミン薬は奏効し難く、このような抗ヒスタミン薬抵抗性の難治性痒みの原因の1つに、プロテアーゼの存在が知られている。これまで種々のプロテアーゼについて起痒作用が研究された結果、エキソペプチダーゼには起痒作用がなく、トリプシンやキモトリプシンのようなエンドペプチダーゼには起痒作用があること、プロテアーゼインヒビターはプロテアーゼによる痒み発現を抑制することなどが示されている。

Steinhoff らは、AD 病変部においてトリプターゼ濃度が増加していること、求心性神経線維上にトリプターゼの受容体であるプロテアーゼ活性化受容体-2 (PAR-2) の発現が著増していること、肥満細胞の脱顆粒による痒みは健常人では抗ヒスタミン薬によって抑制されるが、AD においては抑制されないことから、プロテアーゼ/PAR-2 系が AD の神経原性炎症や痒みの増強に関与していることを明らかにした (Steinhoff et al, J Neuroscience, 23: 6176-6180, 2003)。

グランザイン (Gzm) はセリンプロテアーゼの一種であり、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) およびナチュラルキラー (NK) 細胞によって産生される (Hayes et al., J Exp Med, 170: 933-946, 1989)。Gzm は、パーフォリンとともに遊離され、パーフォリンにより形成される小孔を通り標的細胞に導入される。その後、Gzm は標的細胞の細胞死を誘導することが知られている (図 1)。ヒトでは GzmA, B, H, K, M の 5 種類が、マウスでは A, B, C, D, E, F, G, K, M, N の 10 種類が発現している。

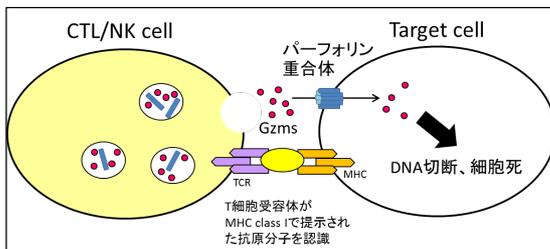


図 1. Gzm による細胞傷害のメカニズム

AD モデルマウスの病変部皮膚において GzmA の遺伝子発現の増加が認められており、健常マウスへの GzmA の皮内注射は痒み反応を用量依存的に誘発することが知られている (安東ら、第 84 回日本薬理学会年会、2011)。しかしながら、AD 患者における GzmA の発現動態と病態の関連については明らかになっていない。AD 患者皮膚では GzmA 産生細胞である T 細胞の病変部位への遊走とそれらの活性化因子 (IL-2 等) 発現の増加が報告される

一方で、健常者と比較してパーフォリンを含有するリンパ球の有意な減少が知られている (Ambach et al., J Allergy Clin Immunol, 2001, 107: 878-886)。このことは、AD 患者におけるパーフォリン/グランザイン経路の異常と、AD の難治性の痒みに対する GzmA の関与が強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、AD の難治性痒みに対する GzmA の関与を解明するために、1) AD 患者の GzmA 発現動態を検討し、2) 血中 GzmA 濃度と AD の重症度や痒みとの相関を検討した。

3. 研究の方法

(1) AD 患者の病変部皮膚ならびにリンパ球における GzmA 発現量の解析

順天堂大学医学部附属浦安病院皮膚科にて、患者のインフォームドコンセントを得た後、順天堂医学部附属浦安病院倫理委員会の審議、許可を受けたプロトコルに従って、患部皮膚と血液を採取した。健常者からも同様のプロトコルにて皮膚検体、血液を採取した。AD 患者の病態は Severity Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD; 皮疹の範囲、皮疹の程度、自覚症状、最高点数 103 点) を用いて評価し、痒みは視覚的評価スケール (Visual analog scale; VAS) を用いて、評価を行った。

皮膚組織における GzmA 産生細胞の同定

二重免疫組織化学染色法により、GzmA 産生細胞を同定した。健常者皮膚及び AD 患者病変部皮膚はパンチバイオプシーで採取し、OCT compound に包埋・凍結後、使用前まで -80 に保存した。クライオスタットで作成した凍結切片は風乾後、5% 正常ロバ血清と 2% BSA を含む PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。次に下記に示した抗体と 4 で一晚反応させた。切片は PBS 洗浄後、DAPI を含む封入剤で封入した。抗体は全て BioLegend (San Diego, CA) から購入した。

二重染色法に用いた抗体：

- Alexa Fluor 594 anti-human GzmA (GzmA の検出)
- Alexa Fluor 488 anti-human CD4 (ヘルパー T 細胞の検出)
- Alexa Fluor 488 anti-human CD8 (キラー T 細胞の検出)
- Alexa Fluor 488 anti-human CD56 (ナチュラルキラー細胞の検出)

AD 患者のリンパ球における GzmA の検出

健常者及び AD 患者の末梢血から IntraStain, fixtation and permeabilization kit for flow cytometry (Dako, Denmark) を用いて、単核球を分離調製し、Fc Receptor Blocking Solution にてブロッキング後、AlexaFluor488-抗 CD4, CD8,

CD56 抗体を用いて細胞表面抗原の染色を行った。次に Fixation Buffer で固定を行った後、AlexaFluor594-抗 GzmA 抗体を用いて細胞内抗原を染色し、FACS Calibur フローサイトメーター (BD, Franklin Lakes, NJ) で解析を行った。抗体は全て BioLegend (San Diego, CA) から購入した。

血漿 GzmA, GzmB, ガストリン遊離ペプチド (GRP) 濃度の定量

健常者及び AD 患者の末梢血を遠心分離し、血漿を得た後、使用前まで -80 で凍結保存した。GzmA, GzmB, GRP の血漿中濃度は市販の ELISA キット (Uscn Life Science, Wuhan, China) を用いて定量した。

ヒト GzmA, GzmB, GRP の各抗体がコーティングされたマイクロプレートに血漿を添加し、37 で 2 時間反応させた。次に検出試薬 A (ビオチン化抗体) を添加し、37 で 1 時間反応後、ウェルを洗浄し、検出試薬 B (アビジン-HRP 抗体) と 37 で 30 分反応した。再びウェルを洗浄後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 基質溶液を添加し、遮光して 37 で 15 分間反応させ、反応停止液を添加後に 450 nm の吸光度測定を行った。標準液を用いて作成した検量線を使用して、血漿中の GzmA, GzmB 及び GRP 濃度を求めた。

(2) 血漿 GzmA ならびに GzmB 濃度と AD の病態、痒みの相関

血漿 GzmA 及び GzmB 濃度と検体採取時に得られた、AD の重症度を示す SCORAD、痒みスコアである VAS、痒みの情報伝達に関わる血漿 GRP 濃度、AD の病勢を示すバイオマーカーである血清 thymus and activation regulated chemokine (TARC) 濃度の相関を検討した。

(3) 統計処理

すべての統計解析は統計ソフト GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。2 群間の有意差検定は Student's t-test を用い、 $P < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。相関解析は Pearson の相関係数を算出し、相関係数 (r) が 0.4 以上のものを相関有りとした。

4. 研究成果

(1) 皮膚組織における GzmA 産生細胞の同定

免疫組織化学染色により、健常者皮膚及び AD 患者病変部皮膚における GzmA 産生細胞の同定を行った結果、健常皮膚と比較して、AD 患者の病変部皮膚では GzmA 陽性細胞が多数浸潤していた。抗 CD4、抗 CD8、抗 CD56 抗体を用いたリンパ球表面抗原の染色では、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞と CD56+NK 細胞でいずれも GzmA の共局在が認められた (図 2)。これらのリンパ球は主に真皮に浸潤しており、一部表皮内にも浸潤が認められた。

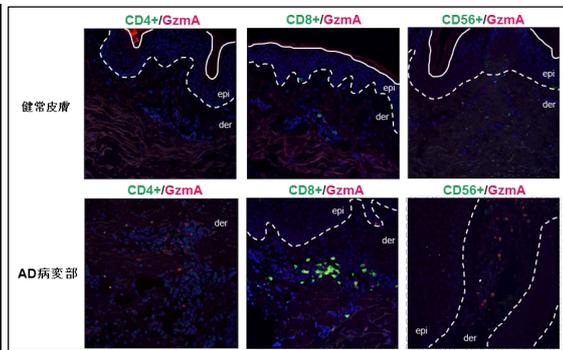


図 2. 免疫組織化学染色による GzmA 陽性細胞の同定

(2) AD 患者のリンパ球における GzmA の検出
フローサイトメーターで健常者及び AD 患者の末梢血リンパ球における GzmA の発現を解析した。健常者の末梢血リンパ球を調べた結果、GzmA 陽性 CD4+T 細胞、GzmA 陽性 CD8+T 細胞、GzmA 陽性 CD56+NK 細胞が各々検出された (図 3)。次に、健常者群と AD 患者群の末梢血中 GzmA 陽性リンパ球の割合を比較したところ、AD 患者群は健常者群に比べて有意に GzmA 陽性リンパ球の割合が高かった (図 4)。

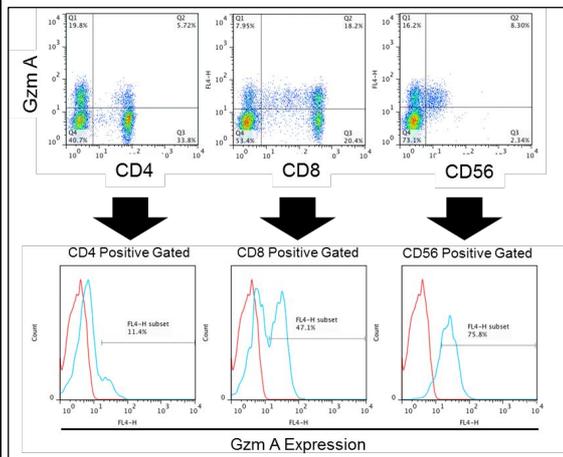


図 3. 健常者の末梢血リンパ球における GzmA 陽性細胞の検出

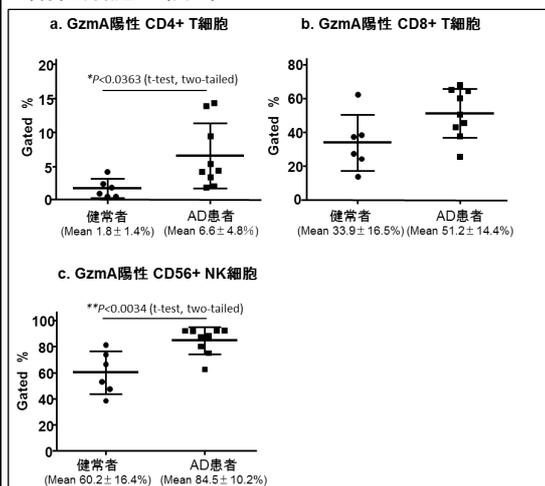


図 4. 健常者と AD 患者の末梢血における GzmA 陽性リンパ球の割合の比較

(3) AD 患者の血漿 GzmA 及び GzmB 濃度と AD 重症度の相関解析

ELISA による血漿 GzmA 及び GzmB 濃度の定量

健常者と比較して、AD 患者の血漿中 GzmB 濃度は有意に高かった。AD 患者の血漿 GzmA 濃度は健常者より高い傾向にあったが、有意差はなかった(図5)

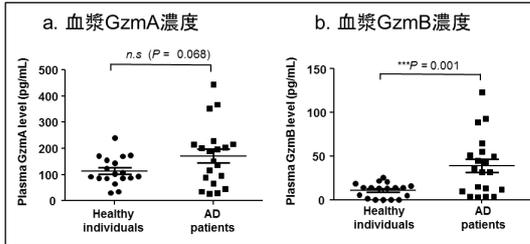


図5. 健常者とAD患者の血漿 GzmA 及び GzmB 濃度の比較

AD 患者の血漿 Gzm 濃度と痒みの相関

図5に示したAD患者の血漿 GzmA 及び GzmB 濃度と、痒みの客観的指標であるVASとの相関を解析した。血漿 GzmA 及び GzmB の濃度とVASに有意な相関は認められなかったが、血漿 GzmB 濃度とVASの間に正の相関がある傾向があった(図6)

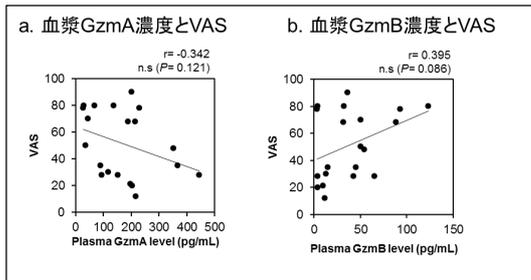


図6. AD患者の血漿 GzmA 及び GzmB 濃度とVASの相関解析

痒みの情報伝達に關するGRPの血漿中濃度を調べたところ、健常者と比較してAD患者は有意にGRP濃度が高かった(図7)。GRP濃度とVASの間には有意な正の相関が認められたことから、AD患者における血漿GRP濃度とGzm濃度の相関を解析した。その結果、GzmB濃度とGRP濃度は有意な正の相関があった(図8)。GzmA濃度とGRP濃度の間に相関は認められなかった。以上の結果は、血漿GzmB濃度がAD患者の痒みと相関することを示唆した。

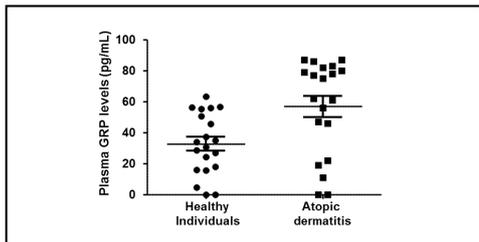


図7. 健常者とAD患者の血漿GRP濃度

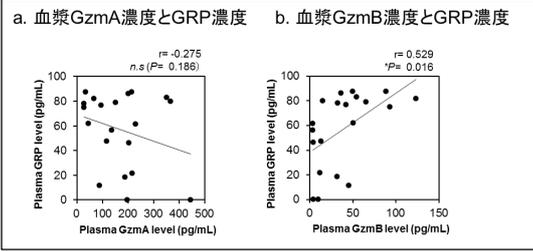


図8. 血漿 Gzm 濃度と GRP 濃度の相関解析

ADの重症度と血漿 Gzm 濃度の相関解析

AD患者の血漿 GzmA 及び GzmB 濃度とADの重症度分類であるSCORADとの相関を解析した結果、血漿 GzmB 濃度とSCORADの間に有意な正の相関が認められた(表1)。血漿 GzmA 濃度とSCORADの間に相関はなかった。次に、ADの病勢を反映する血液マーカーである血清TARC値との相関を解析したところ、血漿GzmB濃度とTARC値の間に有意な正の相関が認められた。血清GzmA濃度とTARC値の間に相関はなかった。

	VAS	Plasma GRP level	SCORAD	Serum TARC level
Plasma GzmA level	r = -0.342 P = 0.121 (n.s.)	r = -0.275 P = 0.186 (n.s.)	r = -0.191 P = 0.439 (n.s.)	r = -0.213 P = 0.397 (n.s.)
Plasma GzmB level	r = 0.395 P = 0.086 (n.s.)	r = 0.529 *P = 0.016	r = 0.557 *P = 0.011	r = 0.480 *P = 0.033
SCORAD	r = 0.625 **P = 0.003	r = 0.377 P = 0.149 (n.s.)	r = 1.000 -	r = 0.546 *P = 0.013

表1. 血漿 GzmA 及び GzmB 濃度とADの皮膚炎重症度ならびに痒みとの相関

(まとめ)

ADの難治性痒みに対するGzmAの関与を解明することを目的とし、研究を行った。

健常者の皮膚と比較して、AD患者の病変部皮膚はGzmA陽性CD4+及びCD8+T細胞及びCD56+NK細胞が多数浸潤していた。また、AD患者の末梢血は健常者と比較して、特にGzmA陽性CD4+及びCD56+リンパ球の割合が高かった。血漿GzmA濃度はAD患者で高い傾向があったが、有意差はなかった。一方、血漿GzmB濃度は健常者と比較してAD患者で有意に高値であった。

次に、ADの病勢を示すSCORADや血清マーカーのTARC、痒みの状態を反映するVASや血漿GRP濃度と血漿Gzm濃度の相関を解析した。GzmAはSCORAD、血清TARC濃度、VAS、血漿GRP濃度といずれも相関がなかった。一方、GzmB濃度は痒みの情報伝達に關する血漿GRP濃度と有意な正の相関が認められ、痒みの指標であるVASと正の相関がある傾向にあった。また、GzmB濃度はADの重症度分類法のSCORADならびにADの病勢を反映するTARCの血清中濃度と有意な正の相関を示した。

以上のことから、当初の目的で着眼したGzmAよりも、GzmBがAD患者の痒みと皮膚炎の両者を反映することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

鎌田弥生、木村有太子、松田浩則、Suhandy Tenggara、富永光俊、高森建二 . 血漿グランザイム濃度とアトピー性皮膚炎の重症度の相関解析 . 第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2015 年 8 月, ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県名古屋市).

Yayoi Kamata, Utako Kimura, Hironori Matsuda, Suhandy Tenggara, Kyoichi Iizumi, Mitsutoshi Tominaga, Kenji Takamori : Roles of granzyme A in pathology of patients with atopic dermatitis. 日本研究皮膚科学会第 39 回年次学術大会・総会, 2014 年 12 月 13 日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府豊中市).

鎌田弥生、木村有太子、Suhandy Tenggara、加茂敦子、富永光俊、高森建二 . アトピー性皮膚炎の難治性痒み発現におけるグランザイム A の役割 . 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 2014 年 8 月 8 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 有太子 (KIMURA, Utako)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 0 0 4 5 9 0 9 1

(2)研究協力者

鎌田 弥生 (KAMATA, Yayoi)
順天堂大学・大学院医学研究科・
非常勤助教
研究者番号 : 0 0 4 1 0 0 3 5

松田 浩則 (MATSUDA, Hironori)
順天堂大学・大学院医学研究科・技術員