

## 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 4月12日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 — 2011

課題番号：22791094

研究課題名（和文） PI3キナーゼ阻害剤を用いた新たな慢性アレルギー性皮膚炎の治療法の開発

研究課題名（英文） Innovation of a novel treatment for chronic allergic dermatitis using PI3-kinase inhibitors

研究代表者

黒田 悦史（KURODA ETSUSHI）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10299604

研究成果の概要（和文）：

遅延型のアレルギー疾患である慢性アトピー性皮膚炎の発症には、好塩基球の関与が示唆されている。本研究では、好塩基球の活性化にPI3キナーゼ経路が重要であり、PI3キナーゼ阻害剤は好塩基球からの脂質メディエータやTh2サイトカインの産生を抑制すること、さらにPI3キナーゼ阻害剤の投与はin vivoにおいて好塩基球が介在する実験的慢性アレルギー性皮膚炎の発症を抑えることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

It has reported that basophils participate in chronic allergic dermatitis. In this study, we found that PI3-kinase pathway plays an important role in the activation of basophils. Interestingly, PI3-kinase inhibitor(s) significantly suppressed the production of Th2 cytokines and lipid mediators. In addition, treatment with PI3-kinase inhibitor partially blocked IgE-mediated allergic dermatitis in mice in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：皮膚免疫学、好塩基球、PI3キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

慢性アレルギー性皮膚炎は血清IgEの上昇に伴って肥満細胞が活性化し、さらに活性化T細胞および好酸球が皮膚へ浸潤することにより病態を形成すると考えられていたが、最近これらの細胞に加え、好塩基球も慢性アレルギーの発症に重要であることが報告された。この研究結果は好塩基球を標的にした新たな慢性アレルギー治療法の開発の可能性

を示している。

申請者は最近、マウスにおいてPI3キナーゼ経路を恒常的に活性化させると、好塩基球の異常な活性化が起こり、それに伴って血清IgEの上昇やアレルギー性喘息が誘導されることを認めた。さらに、好塩基球から産生される代表的なアレルギー誘導因子であるインターロイキン(IL)-4をPI3キナーゼ阻害剤が強く抑制することも見いだした。これらの

結果はPI3 キナーゼが好塩基球の活性化を制御する重要なシグナル伝達体であることを示している。これらの結果より、好塩基球のPI3 キナーゼ活性化が皮膚炎の病態形成に重要であると考えられ、さらにPI3 キナーゼ阻害剤の投与が慢性アレルギー性皮膚炎発症を治療に有効であると申請者らは考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では好塩基球の活性化をPI3 キナーゼ阻害剤により抑制することで慢性アレルギー性皮膚炎の発症の制御を試みる。これにより、PI3 キナーゼ阻害剤を慢性アレルギー性皮膚炎の新しい治療薬に応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 「好塩基球機能を抑制する PI3 キナーゼ阻害剤のスクリーニング」

好塩基球はマウス骨髄細胞から IgE リセプター (FcεRIa) 陽性/CD49b 陽性細胞としてマグネティックソーティングにて回収する。得られた好塩基球を *in vitro* にて「IL-3」または「抗原特異的 IgE + 特異抗原」にて刺激する。これらの刺激により好塩基球はアレルギー性炎症のメディエーターである IL-4、IL-13 およびヒスタミンを産生する。そこで、刺激の際に種々の PI3 キナーゼ阻害剤を添加し、メディエーター産生に与える影響について評価する。これにより、効果的にメディエーター産生を抑制する PI3 キナーゼ阻害剤をスクリーニングする。

### (2) 「抗原特異的 IgE 抗体投与による慢性炎症モデルにおける PI3 キナーゼ阻害剤の効果」

慢性アレルギー性炎症のモデルとして、本研究ではまず好塩基球の活性化が深く関与することが明らかにされている抗原特異的 IgE 抗体投与モデルを使用する。

トリニトロフェニル (TNP) 特異的 IgE 抗体を静注し、1 日後に耳翼に TNP 標識された卵白アルブミン (TNP-OVA) を皮下注射する。阻害剤投与群については TNP-OVA の皮下注射 1 時間前に阻害剤を投与する。TNP-OVA 感作後 24~48 時間で皮膚炎が誘導されるので、以下の実験を行う。

- ① 耳翼の腫脹を測定することで炎症反応を評価する。
- ② それぞれの時間帯において耳翼および腹部皮膚組織から RNA を回収し、サイトカインおよびケモカインの遺伝子の発現を RT-PCR 法にて評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 「好塩基球活性化における PI3 キナーゼ経路の役割について」

マウスの骨髄細胞から単離した好塩基球を IgE および抗原にて刺激すると、多量の Th2 サイトカインおよび脂質メディエーターが誘導された。刺激の際に PI3 キナーゼの阻害剤である LY294002 を添加したところ、いずれの液性因子の産生の強く抑制された (図 1)。また、PI3 キナーゼ阻害剤として wortmannin を用いて実験を行ったが、同様の結果が得られた (データ示さず)。これらの結果は PI3 キナーゼ経路が好塩基球の活性化、特に液性因子の産生誘導に重要なシグナ

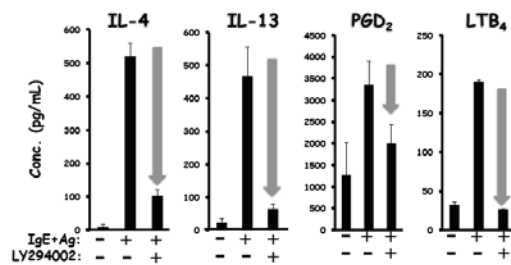


図 1 PI3 キナーゼ阻害剤は好塩基球からの Th2 サイトカインおよび脂質メディエーターの産生を抑制する

ル伝達体であることを示している。

### (2) 「*in vivo* 慢性炎症モデルにおける PI3 キナーゼ阻害剤の効果について」

好塩基球が関与する皮膚炎モデルを作製し、PI3 キナーゼ阻害剤の効果について評価した。抗原特異的 IgE を静注した後、耳翼に抗原を塗布すると 48~72 時間をピークに好塩基球依存性の皮膚炎が発症し、耳翼が腫脹する (図 2)。このモデルに対して、PI3 キナーゼ阻害剤である LY294002 を連日経口投与したところ、対照群に比して有為に耳翼の腫脹が抑制された (図 2)。

さらに PI3 キナーゼ経路の下流のシグナル伝達体である mTOR の阻害剤であるラパマイシンや PI3 キナーゼ-mTOR ハイブリッド阻害剤の投与でも同様の結果が得られた (図 2)。

以上の結果は PI3 キナーゼ経路の阻害剤がある種の皮膚炎に対して治療効果を有している事を示している。

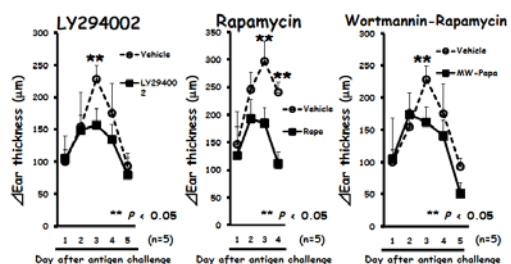


図 2 PI3 キナーゼ阻害剤の投与は好塩基球依存性の皮膚炎発症を抑制する

(3) 「皮膚炎発症に関与する好塩基球由来の液性因子の探索」

本研究で用いた皮膚炎モデルには好塩基球の活性化が必須であることが明らかにされているが、どのような機序で好塩基球が皮膚炎の発症に関与するかについては明らかにされていない。前述したように好塩基球はTh2 サイトカインや脂質メディエーターを産生するが、これらの因子はアレルギー性炎症に深く関与することが多く報告されている。そこで、これらの因子の遺伝子欠損マウスや阻害剤などを用い、どのような好塩基球由来因子が皮膚炎に関与するかを解析した。

まず、Th2 サイトカインのシグナル伝達体である STAT6 欠損マウスを用いて in vivo の実験を行ったが、耳翼の腫脹は野生型マウスと同様に認められた (図3)。この結果から Th2 サイトカインは皮膚炎の発症には関与しない事が明らかとなった。

次に脂質メディエーターの関与について解析した。ロイコトリエン B4 の受容体である BLT1 欠損マウス、プロスタグランジン E2 および D2 の合成酵素である mPGES および hPGDS 欠損マウスを用い、in vivo の実験を行ったが、やはり耳翼の腫脹は野生型マウスと同様に認められた (図3)。

さらに、ロイコトリエン C4 の受容体拮抗剤やプロスタグランジン合成酵素阻害剤の経口投与実験も行ったが、対照群との間に有為な耳翼腫脹の差は認められなかった。

以上の結果より、これまで報告されている Th2 サイトカインや脂質メディエーターは本研究で用いた炎症モデルには関与しない事が明らかとなった。

(4) 「まとめ」

本研究では好塩基球の活性化における PI3 キナーゼ経路の重要性を明らかにすること

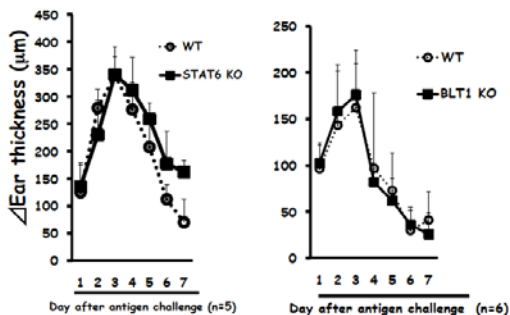


図3 好塩基球依存性の皮膚炎発症にはTh2サイトカインやロイコトリエンは関与しない

ができた。すなわち PI3 キナーゼ経路は好塩基球の活性化と液性因子の産生を制御する重要なシグナル伝達経路であることが明らかになった。

さらに好塩基球依存性炎症モデルにおいても PI3 キナーゼ阻害剤やその下流のシグナ

ル伝達体の阻害剤は炎症の発症を抑制する効果を示していた。この結果から PI3 キナーゼ経路の阻害剤はある種の炎症性疾患の治療に有効である事が示唆された。

我々はさらに、この炎症モデルを惹起する因子の同定を試みたが、これまで報告されている Th2 サイトカインや脂質メディエーターは本炎症モデルには関与しないことが明らかになった。

今後は、どのような因子が PI3 キナーゼ経路を介して好塩基球依存性の炎症反応を惹起するかについて検討する予定である。

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3件)

- ① 黒田悦史, Lee B. W., 森本泰夫  
吸入性化学物質によるマクロファージの活性化とアレルギー性炎症の誘導  
分子呼吸器病 2011, 15:116-118. 査読無  
[http://www.sentan.com/cgi-bin/db.cgi?mode=view\\_backno&no=774](http://www.sentan.com/cgi-bin/db.cgi?mode=view_backno&no=774)
- ② Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y.  
Silica crystal and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms.  
*Immunity* 2011, 34:514-526. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.019>
- ③ 坂部純一, 黒田悦史, 戸倉新樹  
PI3 キナーゼ経路による好塩基球におけるTh2 サイトカインの産生制御  
臨床免疫・アレルギー科 2011, 56:622-627. 査読無  
<http://www.kahyo.com/item/M201112-566>

[学会発表] (計6件)

- ① 第17回分子皮膚科学フォーラム  
2010.7.9 ホテルオークラ福岡 (福岡)  
PI3-kinase pathway regulates antigen-induced type 2 cytokine production from basophils.  
坂部純一, 黒田悦史, 中村元信, 戸倉新樹
- ② 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010.8.24 Kobe Convention Center (Hyogo)  
PI3-kinase pathway regulates antigen-induced type2 cytokine production from basophils.

Jun-ichi Sakabe, Etsushi Kuroda,  
Yoshiki Tokura

- ③ 40<sup>th</sup> European Society of Dermatological Research (ESDR) Meeting 2010. 9. 10  
Scandin Marina Congress Center  
(Finland/Helsinki)

The mandatory role of PI3-kinase pathway  
in IL-4 and IL-13 production by  
basophils stimulated with IgE and  
antigen.

Jun-ichi Sakabe, Etsushi Kuroda,  
Motonobu Nakamura, Yoshiki Tokura

- ④ ワクチンフォーラム2010 -日本発  
のワクチン開発をめざしてIV-  
2010. 9. 14 新宿明治安田生命ホール (東京)

アラムアジュバントをふくむ粒子状化学  
物質の新規免疫学的メカニズム

黒田悦史

- ⑤ 第14回九州基礎皮膚科研究会  
2010. 11. 6 ホテルセントラーザ博多 (福岡)

好塩基球依存的な慢性アレルギー性皮膚  
炎(very late phase reaction)における  
PI3-kinase 経路の重要性

坂部純一、黒田悦史、中村元信、戸倉新樹

- ⑥ 第35回日本研究皮膚科学会 2010. 12. 4  
和歌山県民文化会館 (和歌山)

The role of basophil-derived Th2  
cytokines in super late phase reaction  
in vivo.

Jun-ichi Sakabe, Etsushi Kuroda,  
Motonobu Nakamura, Yoshiki Tokura

[その他]

ホームページ等

黒田悦史

結晶シリカおよびアルミニウム塩はマクロ  
ファージを刺激しNALP3 インフラマソームに  
依存することなくプロスタグランジンの産  
生を制御する

ライフサイエンス新着論文レビュー 2011.

[http://first.lifesciencedb.jp/archives/  
2755#more-2755](http://first.lifesciencedb.jp/archives/2755#more-2755)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 悦史 (KURODA ETSUSHI)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10299604