

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10124

研究課題名(和文)好塩基球を標的とした難治性皮膚疾患の病態解析とピンポイントな新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis and development of a pinpointed and novel treatment focused on basophils for untreated skin allergic diseases

研究代表者

横関 博雄 (YOKOZEKI, Hiroo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90210608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究室では抗原特異的IgE遺伝子を導入した遺伝子改変マウスに大量抗原を同一の部位で惹起することにより痒疹モデルマウスを樹立して痒疹の発症機序を解析した(Immunity, 2005, Mukai K, J Immunol, 2015, Hasimoto T et al)。その結果、痒疹の発症に好塩基球は必須であるがSTAT6が関与するTh2反応は増悪させる因子としても働くことを明らかにした。さらに経皮感作食物アレルギーモデルマウスを用いて作成し、好塩基球、肥満細胞ともに必要であることを明らかにした(Yu R eta l:Exp Dermatol, 2017;26(9):778-784.)

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性慢性痒疹は、著明な痒みを主訴として比較的孤立性の強い丘疹が見られる疾患中高齢者に多い難治性疾患である。アトピー性皮膚炎の皮膚病変においても痒疹結節が重症成人型アトピー性皮膚炎で認められることが多く非常に難治性である。

我々の研究室では抗原特異的IgE遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに大量抗原を同一の部位で惹起することにより痒疹モデルマウスを樹立して痒疹の発症機序を解析し、新規治療法の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Prurigo nodularis, prurigo type atopic dermatitis is a chronic and untreated diseases. In order to investigate a mechanism for prurigo reaction, we have been established a murine model of prurigo by using a TNP-IgE transgenic mice (Immunity, 2005, Mukai K, J Immunol, 2015, Hasimoto T et al). We investigated the mechanism of prurigo and that basophils are indispensable for prurigo-like inflammation, Th2 immunity mediated by STAT6 appears to play a protective role, and therapies targeting Th2-type cytokines may risk aggravating the inflammation. And we have established a murine model of food allergy caused by cutaneous immunization. We demonstrated that both basophils and mast cells play an important roles in the induction of this model mouse (Yu R eta l:Exp Dermatol, 2017;26(9):778-784.)

研究分野：皮膚科学

キーワード：basophil prurigo food allergy contact dermatitis atopic dermatitis stat6 Zn anti-IgE antibody

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性慢性痒疹は、著明な痒みを主訴として比較的孤立性の強い丘疹が見られる疾患中高齢者に多い難治性疾患である。特に慢性痒疹は皮膚科特定疾患として指定された難治性疾患であり非常に強い痒みにより、患者は様々な精神的苦痛を受ける。一方、アトピー性皮膚炎の皮膚病変においても痒疹結節が重症成人型アトピー性皮膚炎で認められることが多く非常に難治性である。慢性痒疹、アトピー性皮膚炎の痒疹反応の病態も依然明らかになっていない。近年、我々の研究室では抗原特異的 IgE 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに大量抗原を同一の部位で惹起することにより痒疹モデルマウスを樹立した(Immunity, 2005, Mukai K, J Immunol, 2015, Hasimoto T et al)。この痒疹モデルを解析して痒疹の発症機序を解析する(平成 28-30 年度)。一方、加水分解小麦の経皮感作による小麦依存性運動誘発性アナフィラキシーなど蛋白抗原の経皮感作によるアナフィラキシーが社会問題になっている。そこで我々の研究室では OVA をパッチテストチェンバーで 1 週間貼付後 2 週間ごとに 3 回貼付することを繰り返した後、OVA の経口投与することによりアナフィラキシー反応を誘導するモデルマウスを作成した。この実験系を用いて肥満細胞、好塩基球の役割を解析する(平成 28-30 年度)。さらに水疱性類天疱瘡の水疱形成において抗 17 型コラーゲン抗体が基底膜の 17 型コラーゲンに結合後 17 型コラーゲンが切断される機序は MMP、プラスミノゲンなどの蛋白分解酵素が重要な役割を果たしていると考えられているがまだ明らかでない。一方、皮膚病変部に好塩基球も多数浸潤することを我々は明らかにした。また、類天疱瘡の病勢と末梢好塩基球の活性化が一致することも明らかにした(Ugajin T et al, Br J D, 2015)。類天疱瘡モデルマウス(Nishie W et al, Nature Med)を用いて好塩基球の役割を解析する(平成 28-30 年度)。

2. 研究の目的

慢性痒疹・経皮感作食物依存性アナフィラキシー・水疱性類天疱瘡など難治性皮膚疾患の発症機序を好塩基球の機能解析を主体として解析する。まず痒疹、アナフィラキシー、類天疱瘡の病変部、末梢血中の好塩基球の表面マーカーを解析、さらに皮膚の重症度との関連性を検討。一方、抗原特異的 IgE 遺伝子導入マウスを用いて同一部位に大量の抗原投与によりすでに樹立した痒疹モデルマウス・経皮感作食物依存性アナフィラキシーモデルマウス・類天疱瘡モデルマウスを用いて病態を解析し新規治療法を開発。In vitro では好塩基球の活性化機序を解析するためメタロチオネイン(MT)の機能解析、プロスタグランジン D₂、E₂の産生機序および慢性難治性皮膚疾患における役割も解析して好塩基球を標的とした慢性皮膚疾患の新規治療法の開発をする。

3. 研究の方法

平成 28 年度

(1) 免疫組織学的解析・末梢好塩基球活性化の解析

慢性痒疹、アトピー性皮膚炎、経皮感作食物依存性アナフィラキシー、水疱性類天疱瘡の痒疹部および正常人の皮膚の病理組織のクリオ切片を用い、好塩基球特異的抗体(BB1)などのモノクローナル抗体を用いて病変部のリンパ球、好塩基球の浸潤を解析する。難治性皮膚疾患における好塩基球の役割を解析し、好塩基球が多数浸潤していることが明らかになった(Ito Y et al: Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. Allergy, 66: 1107, 2011)。平成 28 年度に、各難治性疾患の病変の病勢との好塩基球の活性化の関連性を詳しく検討。

各種皮膚疾患、重症度と好塩基球活性化との検討

アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹、慢性多形痒疹、結節性痒疹、亜急性痒疹、経皮感作食物依存性アナフィラキシー、水疱性類天疱瘡の患者を軽症、中等症、重症に分類して末梢血好塩基球の活性化マーカーであるCD203、メタロチネイン(MT)、Zn トランスポーターの発現との相関を解析して疾患特異性、重症度と発現レベルの相関性を検討。

(2) モデルマウスを用いた各種難治性疾患における好塩基球の役割解析

抗原特異的 IgE 導入マウスの背部に大量の抗原を数回皮下投与することにより誘導した痒疹モデルマウスを用いての発症機序、痒疹反応との違いなどに関して各種サイトカイン、ケモカイン、接着因子、Th1, Th2, Th17 細胞に関して RT-PCT 法を用いて mRNA の発現、ELISA にて蛋白レベルの解析(Hashimoto T, J Immunol, 2015)

経皮感作食物依存性アナフィラキシーモデルマウスを用いた病態解析

加水分解小麦の経皮感作による小麦依存性運動誘発性アナフィラキシーなど蛋白抗原の経皮感作によるアナフィラキシーが社会問題になっている。そこで我々の研究室では OVA をパッチテストチェンバーで1週間貼付後2週間ごとに3回貼付することを繰り返し後、50mgOVA の経口投与することによりアナフィラキシー反応を誘導するモデルマウスを作成した。この実験系を用いて肥満細胞、好塩基球の役割を解析する。アナフィラキシーを起こした腸管では肥満細胞、好塩基球ともに増加していることも明らかにしている。

水疱性類天疱瘡の水疱形成における好塩基球の役割解析

水疱性類天疱瘡の水疱形成において抗17型コラーゲン抗体が基底膜の17型コラーゲンに結合後17型コラーゲンが切断される機序はMMP、プラスミノゲンなどの蛋白分解酵素が重要な役割を果たしていると考えられているがまだ明らかでない。一方、皮膚病変部に好塩基球も多数浸潤することを我々は明らかにした。また、類天疱瘡の病勢と末梢好塩基球の活性化が一致することも明らかにした(Ugajin T et al, Br J D). 類天疱瘡モデルマウス(COL17-humanized mice; Nishie W et al, Nature Med)を用いて好塩基球の役割を解析する。

欠損マウスを用いた炎症、痒みの解析

さらに Zn transporter5 欠損マウス、MT 欠損マウス、プロスタグランジン D2、CRTH2, DP1 欠損マウスとワイルドタイプマウスの第3相反応を比較検討することにより Zn transporter, MT、プロスタグランジン D2 などの抗原特異的 IgE 誘導性第3相反応における役割を解析する。

(3) 好塩基球特異的モノクローナル抗体の作成と新規治療への応用

好塩基球に特異的モノクローナル抗体を用いて新規治療法の開発。すでに当教室特任助教宇賀神君が好塩基球特異的モノクローナル抗体を作成しているため、これらの抗体による治療法の可能性を検討。

平成29年度から30年度

(4) 好塩基球の活性化機序の解析: Zn transporter, MT の役割解析

好塩基球の Zn transporter, MT の解析

最近、亜鉛(Zn)がアレルギー炎症反応においてシグナル伝達因子の調節因子として重要な役割を果たすことが明らかにされている。亜鉛を細胞内に輸送する輸送体は現在 Zn transporter(Znt), MT と呼ばれ8種類ある。好塩基球に FcεRI を介した刺激を加え細胞内の亜鉛濃度を測定。各種 Znt, MT の発現レベルを PCT 法にて解析、また各種の transporter の阻害剤を用いて主にどの Znt が重要な役割を果たすか解析。また、Western blot 法を用いて蛋白レベルでも検討する。

難地性皮膚炎反応における亜鉛の役割解析

痒疹モデルマウス、アナフィラキシーモデルマウス、水疱性類天疱瘡モデルマウスなど In vivo における各種皮膚炎症反応モデルマウスを用いて亜鉛、Zn transporter, MT の役割を解析したい。各種の好塩基球欠損マウス、Znt, MT 欠損マウスと WT と比較検討する。Znt 阻害剤の炎症抑制作用を検討。

4 . 研究成果

皮膚作食物依存性アナフィラキシーモデルマウスを用いた病態解析

加水分解小麦の経皮感作による小麦依存性運動誘発性アナフィラキシーなど蛋白抗原の経皮感作によるアナフィラキシーが社会問題になっている。そこで当研究室では OVA をパッチテストチェンバーで1週間貼付後2週間ごとに3回貼付することを繰り返し後、50mgOVA の経口投与することによりアナフィラキシー反応を誘導するモデルマウスを作成した。OVA 抗原の経皮感作をした BALB/c マウス群では、OVA 特異的 IgG および IgE の上昇を認め、経口抗原投与後に直腸温の急激な低下を認めた。これは、OVA を経腹腔内投与し感作した陽性コントロール群と同程度であり、陰性コントロール群と有意差を認めた。また、好塩基球数に関しては、両群において、皮膚だけでなく腸管組織での増加を認めた。OVA 経皮感作群において、皮膚での TSLP の発現の上昇も認めた。Ba103 を惹起前に投与した群では、アナフィラキシー反応の抑制が観察されたが、コントロール IgG を前投与した群においても、部分的に反応の抑制を認めた。さらに、惹起より48 時間前にジフテリア毒素(DT)を静注することで好塩基球を末梢血中より選択的に除去した Mcpt8-DTR トランスジェニックマウス群においては、部分的にアナフィラキシー反応が抑制された。肥満細胞欠損 (Kit^{W-sh/W-sh}) マウス群では、アナフィラキシー反応のほぼ完全な抑制を認めた。これらの結果から、惹起相では肥満細胞がない状態ではアナフィラキシー反応が起こらないが、好塩基球がない状態でも、アナフィラキシー反応が減弱することが示された。以上より、アナフィラキシー惹起反応には肥満細胞が必須であること、また好塩基球がアナフィラキシーの惹起反応に対して一部を担うことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

1. Handa Y, Ugajin T, Igawa K, Hamamoto H, Kobayashi K, Komatsuno T, Yamamoto T, Kawahara K, Yokozeaki H. STAT6 decoy oligodeoxynucleotide (ODN)-containing ointment more potently inhibits mouse skin inflammation when formulated with ionic liquid technology than as a traditional Vaseline ointment. *Allergol Int*. 2019 Jan 28. pii: S1323-8930(19)30008-5. doi: 10.1016/j.alit.2018.12.011. [Epub ahead of print]
2. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeaki H. Prurigo successfully treated with duloxetine hydrochloride. *Australas J Dermatol*. 2019 Jan 24. doi: 10.1111/ajd.12996. [Epub ahead of print]
3. Hashimoto T, Yokozeaki H. Occupational contact dermatitis caused by Eucalyptus species and Tanacetum parthenium. *Contact Dermatitis*. 2018 Dec 24. doi: 10.1111/cod.13205. [Epub ahead of print]
4. Hashimoto T, Namiki T, Wakasa T, Shimokata M, Yokozeaki H. Dacryocystitis mimicking erysipelas due to a giant dacryolith. *J Dermatol*. 2018 Oct;45(10):e272-e274. doi: 10.1111/1346-8138.14317. Epub 2018 Apr 14.
5. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeaki H. Toe Gangrene Associated with Macroangiopathy in Systemic Sclerosis: A Case Series on the Unreliability of the Ankle-brachial Pressure Index. *Acta Derm Venereol*. 2018 Apr 27;98(5):532-533. doi: 10.2340/00015555-2897.
6. Yu R, Igawa K, Handa Y et al. Basophils and mast cells are crucial for reactions due to epicutaneous sensitization to ovalbumin. *Exp Dermatol*. 2017;26(9):778-784.
7. Ueno M, Namiki T, Hanafusa T, Miura K, Yokozeaki H. IgA-mediated leukaemic vasculitis in a patient with rapid progression of myelodysplastic syndrome to

- acute myeloid leukaemia. *Eur J Dermatol.* 2017 Jun 1;27(3):303-304.
8. Ugajin T, Shibama S, Nishida K, Yokozeiki H. Metallothioneins are required for human basophil interleukin-4 gene induction via FcεR stimulation. *Allergol Int.* 2016 Oct;65(4):466-468.
 9. Ugajin T, Takahashi M, Miyagishi C, Takayama K, Yokozeiki H. A case of bullous pemphigoid associated with infiltration and activation of basophils. *Br J Dermatol.* 2015 Oct;173(4):1095-8.
 10. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H. Protective Role of STAT6 in Basophil-Dependent Prurigo-like Allergic Skin Inflammation. *J Immunol.* 2015 May 15;194(10):4631-40.
 11. Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeiki H., Kawakami Y, Hearing VJ. NUA2 Amplification Coupled with PTEN Deficiency Promotes Melanoma Development via CDK Activation. *Cancer Res.* 2015 Jul 1;75(13):2708-15.
 12. Ugajin T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki J, Mita M, Kubo M, Yokozeiki H., Hirano T. Zinc-binding metallothioneins are key modulators of IL-4 production by basophils. *Mol Immunol.* 2015 Aug;66(2):180-8.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Ugajin T, Handa Y, Iijima H, Igawa K, Yokozeiki H.: Oral tolerance induction in murine model of food allergy caused by epicutaneous sensitization. International Investigative Dermatology ORLAND 2018, 2018 年 5 月 16-19 (国際学会)
2. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H.: Pruritus in ordinaly scabies: Its immunological response and IL-31 from macrophages under overexpression of TSLP and periostin. International Investigative Dermatology ORLAND 2018, 2018 年 5 月 16-19 (国際学会)
3. 飯島 葉月, 宇賀神 つかさ, 横関 博雄: IgE 依存性痒疹モデルにおける亜鉛補充療法の検討. 第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会 奈良市 2018 年 11 月 16-18 日
4. 宇賀神 つかさ, 横関 博雄: 慢性そう痒における抗 IgE 抗体療法の有効性の検討. 第 48 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会 奈良市 2018 年 11 月 16-18 日
5. 飯島 葉月, 宇賀神 つかさ, 梅本 直志, 横関 博雄: IgE 依存性痒疹モデルにおける亜鉛補充療法の検討. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 千葉市 2018 年 6 月 22-24 日
6. Hashimoto T, Satoh T, and Hiroo Yokozeiki.; Basophils release amphiregulin and may contribute to murine models of prurigo reaction and MC903-induced atopic dermatitis-like skin inflammation.,2017
7. Ugajin T., Shibama S., Yamaguchi T., Yokozeiki H.; Bilirubin oxidation is associated with the disease severity of atopic dermatitis in adults. Sep, 2017 ESDR
8. Hashimoto T. Implication of amphiregulin in basophil-dependent prurigo-like skin reactions. 46th Annual ESDR Meeting 2016, MUNICH, GERMANY, 7-10 SEPTEMBER 2016
9. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H. Deneralized pruritus in primary sclerosing cholangitis: implications of histamine release by lysophosphatidic acid. The 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Karuizawa, Nagano, 12-14 Oct., 2016
10. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H. Pruritus in scabies infestation: Implications of Th2 immunity and IL-31. Montagna Symposium on the Biology of Skin 2016, Oregon, USA, October 20 - 24, 2016
11. Chen Y, Yokozeiki H., Katagiri K. Dysfunction of the corneum in an ovariectomized mice model of climacterium is associated with aberrant epidermal differentiation and decreased expression of desmoglein-1. The 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Karuizawa, Nagano, 12-14 Oct., 2016
12. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H. Deneralized pruritus in primary sclerosing cholangitis: implications of histamine release by lysophosphatidic acid. The 12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Karuizawa, Nagano, 12-14 Oct., 2016
13. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeiki H. Pruritus in scabies infestation: Implications of Th2 immunity and IL-31. Montagna Symposium on the Biology of Skin 2016, Oregon, USA, October 20 - 24, 2016
14. 游 理恵, 井川 健, 宗次 太吉, 佐藤 貴浩, 横関 博雄: 動物モデル 病態形成 経皮感作によるアナフィラキシー反応マウスモデルの樹立及びその機序の解明. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会. 東京 2016 年 6 月 17-19 日
15. 野老 翔雲, 井川 健, 横関 博雄: アトピー性皮膚炎の性別による臨床症状の違い. 第 65 回

〔図書〕(計0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当無

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当無

(2)研究協力者

宇賀神つかさ(Tsukasa Ugajin)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。