

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08469

研究課題名(和文) ランゲルハンス細胞とマスト細胞を同時標的にした抗アレルギー薬の新評価

研究課題名(英文) New evaluations of antiallergic drugs that simultaneously targeted Langerhans cells and mast cells

研究代表者

松井 勝彦 (Matsui, Katsuhiko)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20257140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗アレルギー薬のエメダスチンが、ランゲルハンス細胞やマスト細胞に直接作用してTh1細胞およびTh2細胞分化を阻害すること、そしてエメダスチンの局所塗布が、NC/Ngaマウスに誘導されたアトピー性皮膚炎の皮膚重症度スコアの上昇を顕著に抑制することを明らかにした。また、その治療効果は、NC/Ngaマウスの二次リンパ組織や皮膚局所でのTh1/Th2免疫応答の阻害と関連していた。さらに、エメダスチンは、皮膚への副作用もなく、マスト細胞からのケミカルメディエーター放出も抑制するため、エメダスチン軟膏の使用は、アトピー性皮膚炎の新たな治療戦略となるであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られた結果は、抗アレルギー薬のエメダスチンが表皮のランゲルハンス細胞と真皮のマスト細胞に直接作用することで、アトピー性皮膚炎を根治させる可能性を有していることを示した。この薬効は、従来の経口投与では引き出すことができないため、エメダスチンを外用薬として用いることが重要となる。また、ランゲルハンス細胞およびマスト細胞は粘膜にも存在するため、エメダスチンの吸入や点鼻が、気管支喘息やアレルギー性鼻炎の患者に対しても同様の効果を発揮することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that emedastine, an antiallergic drug, inhibited the development of Th1 and Th2 cells mediated by Langerhans cells or mast cells, and topical treatment with emedastine significantly suppressed the increase in the skin severity score of atopic dermatitis induced in NC/Nga mice. Furthermore, the therapeutic effects are associated with the inhibition of Th1/Th2 immune response in the second lymphoid tissue or the dermis of NC/Nga mice. Besides, as emedastine has few side effects to the skin and suppresses release of chemical mediators from mast cells, the use of emedastine ointment would be a new therapeutic strategy for atopic dermatitis.

研究分野：免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 ランゲルハンス細胞 マスト細胞 抗アレルギー薬 Th1細胞分化 Th2細胞分化

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。

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、マクロライド系抗生物質であるジョサマイシンが、ランゲルハンス細胞(LCs)に直接作用し、Th2細胞分化を阻害することを明らかにした(Matsui K. *et al.* J. Pharm. Pharm. Sci. 19: 357, 2016.)。さらに、アトピー性皮膚炎(AD)のモデルマウスの皮膚病変に対して、ジョサマイシンがステロイド薬と同等の治療効果をもたらすと同時に、その治療効果がTh2細胞分化の阻害に基づくものであることを明らかにした(Matsui K. *et al.* J. Pharm. Pharm. Sci. 20: 38, 2017.)。これらの発見とそれ以前の研究代表者の研究成果(Matsui K. *et al.* Clin. Exp. Allergy 37: 615, 2007., Matsui K. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol. 146: 262, 2008., Matsui K. *et al.* Int. Arch. Allergy Immunol. 149: 167, 2009., Matsui K. *et al.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 20: 463, 2010., Matsui K. *et al.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 21: 354, 2011., Matsui K. *et al.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 22: 80, 2012., Matsui K. *et al.* Microbiol. Immunol. 57: 130, 2013., Matsui K. *et al.* Microbiol. Immunol. 58: 260, 2014., Matsui K. *et al.* Biol. Pharm. Bull. 38: 317, 2015.)は、LCsをターゲットにしたTh2細胞分化の阻害とTh2免疫応答の抑制が、ADをはじめとするアレルギー性炎症の制圧へ向けた新たな治療戦略に結びつくことを裏付けた。

(2) アレルギー疾患は、Th2免疫応答が過剰となった免疫疾患であるため、その原因療法ではTh2細胞分化の促進を食い止めることが必須条件となるが、抗アレルギー薬を用いた既存の治療法はその条件を満たしていない。その理由として、既存の抗アレルギー薬は、主に経口投与で用いられているため、その効果は表皮および粘膜上皮に存在するLCsにまで及んでいないことが挙げられる。また最近、研究代表者は長い間議論されてきたマスト細胞(MCs)の抗原提示能の存在を自ら確認したが(Matsui K. *et al.* J. Pharm. Pharm. Sci. 21: 296, 2018.)、抗アレルギー薬の経口投与によってもたらされる血中濃度では、真皮や粘膜固有層に定着しているMCsの抗原提示能にまで影響を及ぼすことは不可能である。しかし、皮膚および粘膜から侵入したアレルゲンは、LCsだけではなく、MCsにも取り込まれ、二次リンパ組織に加えて侵入局所でもTh0細胞からTh2細胞への分化を誘導し、Th2免疫応答の促進を介してアレルギー性炎症を増大しているものと考えられる。従って、アレルギー性炎症を根治させるためには、LCsに加えてMCsを介したTh2細胞分化をも同時に制御することが重要となってくる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既存の抗アレルギー薬の中に、皮膚に局在する従来型の抗原提示細胞としてのLCsおよび新抗原提示細胞としてのMCsの両方に直接かつ同時に作用することで、Th2細胞分化の亢進とそれによって引き起こされるアレルギー性炎症の誘導を制御できるものが存在することを明らかにすることである。本研究を通して明らかにしようとする具体的内容は、以下の通りである。

(1) 抗アレルギー薬として、メディエーター遊離抑制薬、第1世代H₁受容体拮抗薬(抗ヒスタミン薬)、第2世代H₁受容体拮抗薬、トロンボキササンA₂合成阻害薬、トロンボキササンA₂受容体拮抗薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬、Th2サイトカイン阻害薬を選択し、これらの中から、LCsに直接作用することでTh2細胞分化を阻害する薬物を見出す。

(2) LCsを介してTh2細胞分化を阻害する抗アレルギー薬の中から、MCsにも直接作用することでTh2細胞分化を阻害する薬物を見出す。

(3) Th2細胞分化の誘導とその阻害に関与する因子をLCs側およびMCs側に求め、サイトカインとしてのIL-10、IL-12の産生や細胞表面分子としてのB7分子(CD80, CD86)発現、CD40発現、Notchリガンド発現、OX40L発現、TIM-4発現などを解析し、それらの因子とTh2細胞分化阻害との関連性を明らかにする。

(4) アレルギー性炎症としてADを取り上げ、AD様炎症を誘発したNC/Ngaマウスに候補薬物の軟膏を塗布し、その治療効果をステロイド薬軟膏と比較して評価する。

(5) NC/NgaマウスのAD様炎症に対する候補薬物の薬効・薬理を生体内でのTh2細胞分化阻害とそれに基づくTh2免疫応答の抑制に関連付けて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LCsおよびMCsの分化誘導: LCsは、マウス骨髄細胞よりGM-CSF, IL-4, TGF- β を用いて分化誘導する。MCsは、マウス脾臓細胞よりTNF- α を用いて分化誘導し、IL-3, IL-4を用いて増殖・維持する。

(2) LCsおよびMCsを介したTh2細胞分化誘導を阻害する抗アレルギー薬の探索: LCsに各抗アレルギー薬とOvalbumin由来ペプチド(OVAペプチド; 323-1SQAVHAAHAEINEAGR-339)を18時間パ

ルスした後、D011.10 TCR Tg マウスの両足蹠に皮内投与することで膝裏の膝窩リンパ節において Th1/Th2 細胞分化を誘導する。5 日後、リンパ節細胞を取り出して T 細胞上の CD3/CD28 分子を *in vitro* 刺激し、増大させた Th1/Th2 サイトカインの産生量を比較することで各抗アレルギー薬の Th2 細胞分化阻害能の有無を明らかにする。続いて、これによって選択された候補薬物を 96 穴プレート中に準備した MCs に対して OVA ペプチドとともに 18 時間パルスした後、D011.10 TCR Tg マウスより分取したナイーブ (naïve) ヘルパー T 細胞 (Th0) を加えることで Th1/Th2 細胞分化を誘導する。5 日間培養した後、プレート中で分化・増殖した T 細胞を PMA とイオノマイシン (Ionomycin) で *in vitro* 刺激し、増大させた Th1/Th2 サイトカインの産生量を比較することで各抗アレルギー薬の Th2 細胞分化阻害能の有無を明らかにする。

(3) 抗アレルギー薬による Th2 細胞分化阻害の機構の解明：Th2 細胞分化阻害の候補薬物として選択された抗アレルギー薬がどのような機序で Th2 細胞分化を阻害（あるいは Th2 細胞分化阻害を増強）するのかを明らかにするために、抗原提示細胞の細胞表面分子（CD40、B7 分子 [CD80, CD86]、Notch リガンド [Jagged 1, Jagged 2, Delta 1, Delta 3, Delta 4]、TIM-4、OX40L）および産生サイトカイン（IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70）に焦点を当てて調べる。これらはいずれも Th2 細胞分化の誘導に関与すると考えられる LCs 側および MCs 側の因子であり（Matsui K. *et al.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 22: 80, 2012., Matsui K. *et al.* Microbiol. Immunol. 57: 130, 2013., Matsui K. *et al.* Biol. Pharm. Bull. 39: 1220, 2016.）、細胞表面分子の発現は RT-PCR 法および FACS 解析により、産生サイトカインの検出は RT-PCR 法および細胞内サイトカインをターゲットにした FACS 解析によって行なう。

(4) 皮膚炎の治療効果の判定：AD のモデルマウスとして使用されている NC/Nga マウス (日本 SLC) のハプテン誘導皮膚炎に対して候補薬物の治療効果を判定する。候補薬物は 5%流動パラフィン含有白色ワセリン 1g 中に 1 mg を含有 (0.1%軟膏) するように調整する。陰性コントロールとして軟膏基剤のみを、陽性コントロールとしてステロイド薬であるベタメタゾンを用いる。各軟膏を 50 mg/body で 1 日 1 回、頸背部および両耳介に 4 週間塗布する。0, 1, 8, 15, 22, 29 日目に右側のスコア表に基づいて、皮膚炎スコアを算出し、両コントロールのスコアと比較することで、その治療評価を行なう。

所見	スコア		
	0	1	2
発赤・掻破痕	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)
浮腫・苔癬化・肥厚	なし	1/3未満の面積にあり	1/3以上の面積にあり
出血・痂皮形成	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)
腐爛	なし	1/3未満の面積にあり	1/3以上の面積にあり
落屑	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)

左右耳介および頸背部についてそれぞれ以下のスコア付けをし、その合計を個体スコアとする。
(2点×5項目×3部位=30点満点)

(5) 抗アレルギー薬の *in vivo* における Th2 細胞分化阻害能の評価：皮膚炎スコアが陰性コントロールを下回った場合、その効果が Th2 細胞分化阻害と相関しているか否かを確認するために、評価後のマウス皮膚における病理組織学的検査に加えて、炎症部位の Th2 細胞浸潤の程度、リンパ節細胞中の Th2 細胞分化阻害の程度および血中 IgE 濃度の変化を評価する。

4. 研究成果

(1) 第 1 世代 H₁ 受容体拮抗薬 (抗ヒスタミン薬) (4 薬物)、メディエーター遊離抑制薬 (4 薬物)、第 2 世代 H₁ 受容体拮抗薬 (10 薬物)、トロンボキサン A₂ 合成阻害薬 (1 薬物)、トロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬 (1 薬物)、ロイコトリエン受容体拮抗薬 (3 薬物)、Th2 サイトカイン阻害薬 (1 薬物) を LCs に直接作用させ、Th2 細胞分化阻害能の指標として LCs に対する TIM-4 発現阻害能を調べた。その結果、第 1 世代 H₁ 受容体拮抗薬であるシプロヘプタジンおよびプロメタジンが LCs の TIM-4 発現を阻害することがわかった。また、第 2 世代 H₁ 受容体拮抗薬のエメダスチンおよびロラタジンも同様の阻害活性を示した。次に、TIM-4 発現阻害薬として選択された上記 4 薬物で処理した LCs の Th1/Th2 細胞分化誘導能を調べた結果、エメダスチンとロラタジンの 2 薬物が Th2 細胞分化阻害能に加えて Th1 細胞分化阻害能も有することを確認した。アレルギー性炎症の急性期に加えて慢性期も同時に制御していくためには、Th1 細胞分化と Th2 細胞分化の両方を同時に制御できる薬物を選択することが望ましい。そこで、エメダスチンとロラタジンを用いて、MCs を介する Th1/Th2 細胞分化に対する影響を調べたところ、LCs を介するそれと同様に両薬物は Th1 細胞分化に加えて Th2 細胞分化も同時に阻害することが明らかとなった。以上の結果は、既存の抗アレルギー薬の中からエメダスチンとロラタジンが LCs と MCs を同時標的にして Th1/Th2 細胞分化を阻害できることを示した。

(2) Th1/Th2 細胞分化阻害の候補薬物として選択された抗アレルギー薬のエメダスチンおよびロラタジンがどのような機序で LCs および MCs を介した Th1/Th2 細胞分化を阻害するのかを明らかにするために、抗原提示細胞の細胞表面分子（CD40、B7 分子 [CD80, CD86]、Notch リガンド [Jagged 1, Jagged 2, Delta 1, Delta 3, Delta 4]、TIM-4、OX40L）および産生サイトカイン（IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70）に焦点を当てて調べた。その結果、エメダスチンの LCs を介した Th2 細胞分化阻害は、LCs の TIM-4 発現の抑制、また Th1 細胞分化阻害は、LCs の CD40 発現の抑制とそれに続く IL-12 p70 産生の抑制に基づいていることがわかった。さらに、エメ

ダスチンの MCs を介した Th1/Th2 細胞分化阻害は、MCs の CD86 発現の抑制に基づいていることがわかった。一方、LCs および MCs を介したロラタジンの Th1/Th2 細胞分化抑制には、分化初期段階におけるロラタジンのナイーブ T 細胞への細胞毒性が関与していることが明らかとなった。また、NC/Nga マウスを用いたアトピー性皮膚炎の治療実験においてもロラタジンの外用は皮膚炎症状をむしろ悪化せる傾向を示した。

(3) 第 2 世代抗ヒスタミン薬のエメダスチンを外用薬として用い、NC/Nga マウスの AD 様皮膚炎に対する治療効果を検討した。その結果、エメダスチンは急性期から慢性期の皮膚炎に対して安定した治療効果を示した。また、その治療効果は、血清中の総 IgE 濃度の低下と局所リンパ節における Th1/Th2 細胞分化阻害能ともよく相関していた。しかし、エメダスチンの治療効果をステロイド薬のベタメタゾンと比較した場合、皮膚炎の制御能、IgE 産生の抑制能、生体内での Th1/Th2 細胞分化阻害能のいずれも、ベタメタゾンに劣っていた。

(4) 総括：本研究では抗アレルギー薬の中でも特にエメダスチンを外用薬として用いることで、NC/Nga マウスの AD 様皮膚炎に対して最も優れた治療効果を発揮することを明らかにした。また、その治療効果は、LCs を介する二次リンパ組織での Th1/Th2 細胞分化阻害とそれに引き続いて生じる皮膚炎症部位での Th1/Th2 免疫応答阻害、さらには MCs を介する皮膚局所での Th1/Th2 細胞分化阻害とそれによる免疫応答阻害に基づくものであることを明らかにした。加えて、エメダスチンは皮膚への毒性もなく、MCs からのケミカルメディエーター放出も抑制するため、ステロイド薬と併せて外用薬として用いることでステロイド薬単独では得られない薬効が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Katsuhiko Matsui, Azusa Kashima, Ayaka Motegi	4. 巻 22
2. 論文標題 Norfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, inhibits Langerhans cell-mediated Th1 and Th2 cell development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pharm. Pharm. Sci.	6. 最初と最後の頁 122-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18433/jpps30335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松井勝彦	4. 巻 39
2. 論文標題 アトピー性皮膚炎の増悪因子としての黄色ブドウ球菌	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 1007-1011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsuhiko Matsui, Saeko Kanai, Manami Ikuta, Saki Horikawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Mast cells stimulated with peptidoglycan from Staphylococcus aureus augment the development of Th1 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Pharm. Pharm. Sci.	6. 最初と最後の頁 296-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18433/jpps29951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Katsuhiko Matsui, Keisuke Shigehara, Reiko Ikeda	4. 巻 8
2. 論文標題 Peptidoglycan synergistically augments production of allergic mediators from murine mast cells in combination with muramyl dipeptide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Allergy Ther.	6. 最初と最後の頁 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4172/2155-6121.1000256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井勝彦、加島梓、茂木綾香
2. 発表標題 ランゲルハンス細胞を介するTh2細胞分化におけるノルフロキサシンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村中円香、山口徒佳、前田真奈美、松井勝彦
2. 発表標題 NC/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変に対するステロイド薬およびジョサマイシンの併用療法の効果について
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 顧彩華、加瀬里美、松井勝彦
2. 発表標題 テトラサイクリン系抗生物質の経口投与によるマウス脾臓細胞サブセットへの影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口徒佳、村中円香、松井勝彦
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎患者におけるアレルギー特異的IL-5産生に対する黄色ブドウ球菌由来リポタイコ酸の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加瀬里美、顧彩華、松井勝彦
2. 発表標題 マスト細胞の炎症性メディエーター産生に対する黄色ブドウ球菌由来細胞壁成分の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田真奈美、松井勝彦
2. 発表標題 ランゲルハンス細胞のTh2ケモカイン産生に対する黄色ブドウ球菌由来細胞壁成分の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井勝彦、加島梓、茂木綾香
2. 発表標題 Norfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, inhibits Langerhans cell-mediated Th2 cell development
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井勝彦
2. 発表標題 Topical application of doxycycline inhibits Th2 cell development mediated by Langerhans cells and exhibits therapeutic effect on atopic dermatitis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井勝彦、堀川早紀、池田玲子
2. 発表標題 マスト細胞を介するTh1/Th2細胞分化における黄色ブドウ球菌由来ペプチドグリカンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井勝彦、森島彩、池田玲子
2. 発表標題 ランゲルハンス細胞様樹状細胞を介するTh1/Th2細胞分化におけるテトラサイクリン系抗生物質の影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茂木琴音、柴田里紗、池田玲子、松井勝彦
2. 発表標題 ランゲルハンス細胞のCCL5/RANTES産生に対するTh1免疫応答の影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井勝彦、池田玲子
2. 発表標題 Effects of peptidoglycan from Staphylococcus aureus on Th1 cell development mediated by mast cells
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井勝彦
2. 発表標題 Effects of new quinolone antibiotics on Th1 cell and Th2 cell development mediated by Langerhans cells
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井勝彦、池田玲子
2. 発表標題 Mast cells stimulated with peptidoglycan from Staphylococcus aureus enhance the development of Th1 cells
3. 学会等名 第46回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室（臨床免疫学） https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/lab/lab0_92.html 研究 / 教授：松井 勝彦（マツイ カツヒコ） https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/kyoin/kyoin_43.html

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	川崎 泰子	明治薬科大学・薬学部・研究補助員	
	(Kawasaki Yasuko)	(32684)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	日野 由美 (Hino Yumi)	明治薬科大学・薬学部・研究補助員 (32684)	