

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590166
研究課題名 (和文) 難治性アトピー性皮膚炎に対する新規免疫抑制剤 FTY720 の有用性と作用機序
研究課題名 (英文) A novel immunomodulator, FTY720, ameliorates spontaneous dermatitis in NC/Nga mice
研究代表者
河野 武幸 (KOHNO TAKEYUKI)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号:50178224

研究成果の概要：アトピー性皮膚炎 (AD) は乳幼児期に発症し、その多くは成人に至るまでに寛解する。しかし、最近では治療に抵抗する症例が増加している。AD 治療はステロイドの外用薬による治療が主であるが、炎症が全身におよぶ難治症例への適用は困難である。本研究では、自然発症皮膚炎モデルマウスを用いて、ステロイド抵抗性 AD に対する FTY720 の有用性を調べた。その結果、FTY720 の経口投与は、ステロイドの外用薬との併用で、難治性 AD に対して極めて有用であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：FTY720, アトピー性皮膚炎, NC/Nga マウス

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、乳児期に発症し大部分が成長に伴って2歳程度で軽快する。薬物治療についても選択の幅は広く、糖質コルチコイドの軟膏や抗アレルギー薬などが用いられている。難治症例に対してもタクロリムス水和物の軟膏の使用が可能となり選択の幅は広がった。しかし、

- (1) 糖質コルチコイドの長期使用の有用性を示唆するエビデンスはない。
- (2) タクロリムス水和物軟膏の使用は首から上に限られている。
- (3) 思春期、成人期に至っても軽快せず、慢性化する症例が増加している。

以上のことから、難治症例にも有効な治療薬

を開発することには強い医学的および社会的要請がある。本申請課題は、このような要請の解決を企図して立案した。

これまでに申請者らは、NC/Nga マウスの皮膚炎発症を FTY720 が完全に抑制することを報告している (Kohno, T., et al, A Novel Immunomodulator, FTY720, Prevents Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Mice., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1392-1396(2004)) (図 1)。本申請課題では、この研究成果をさらに発展させ、FTY720 が難治性アトピー性皮膚炎 (ステロイド抵抗性アトピー性皮膚炎) に対する治療薬として育薬できるか否かを明らかにする。

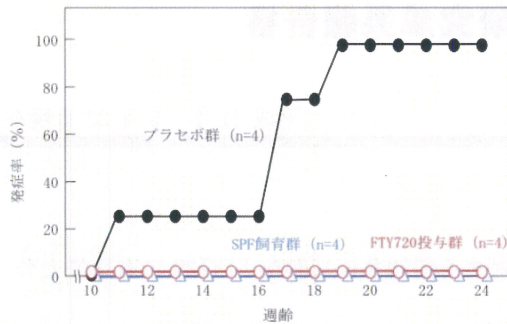


図1 発症予防効果

2. 研究の目的

(1) 難治性アトピー性皮膚炎の治療薬として新規免疫抑制剤 FTY720 を臨床に供給するため、アトピー性皮膚炎モデル動物（自然発症皮膚炎モデルマウス (NC/Nga マウス)）を用いて FTY720 の有用性を明らかにする。

(2) FTY720 の新たな作用点を解明する。これにより、FTY720 を免疫疾患に完全寛解を導入できる画期的な治療薬として育葉する。得られる成果の革新性は極めて高く、免疫疾患の治療戦略に大きなインパクトを与えられ考えられる。

3. 研究の方法

(1) 皮膚炎発症の確認および皮膚炎の程度
マウスの右前肢部、左前肢部、右後肢部、左後肢部、背部、尾部および胸部の炎症の程度を週 1 回観察し、4 段階 (AD スコア, 表 1) でスコア化した。なお、スコア 1 が確認された時点で発症とした。また、同時に脱毛の程度も 3 段階 (脱毛スコア, 表 2) でスコア化した。

表 1 AD スコア

皮膚の病変	スコア
乾燥	1
肥厚	2
点状出血	3
ひどい出血	4

表 2 脱毛スコア

脱毛の程度	スコア
毛並みが悪い	1
部分的な脱毛	2
全体的な脱毛	3

(2) グループ分け

NC/Nga マウスを通常環境下で飼育し、皮膚炎を自然発症させた後、下記の 4 群に分け、治療効果を評価した。各群の治療期間は 4 週間とした。

① プラセボ群 (n = 8)

注射用水を週 3 回経口投与した。

② ベタメタゾン群 (n = 8)

ベタメタゾン軟膏を週 6 回塗布した。

③ FTY720 群 (n = 8)

FTY720 (3mg / Kg, 週 3 回) を経口投与した。

④ FTY720 + ベタメタゾン群 (n = 8)

FTY720 (3mg / Kg, 週 3 回) を経口投与し、ベタメタゾン軟膏を週 6 回塗布した。

なお、発症時の週齢および皮膚炎の程度 (平均 AD スコア) を全群間で合致させた個体を用いた。即ち、プラセボ群 (19.3 ± 3.1 週齢および 2.6 ± 0.4)、ベタメタゾン群 (19.1 ± 2.6 週齢および 2.6 ± 0.7)、FTY720 群 (17.8 ± 4.4 週齢および 2.6 ± 0.4) および FTY720 + ベタメタゾン群 (17.9 ± 3.1 週齢および 2.8 ± 0.3) である。

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色

治療直前と治療終了後の皮膚組織を採取し、パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色した。その染色像から表皮の肥厚の程度を比較した。

(4) トルイジンブルー染色

治療直前と治療終了後の皮膚組織を採取し、パラフィン切片をトルイジンブルー染色した。その染色像から皮膚組織への肥満細胞の浸潤および脱顆粒の程度を比較した。

(5) 血中 IgE 濃度

① 加齢に伴う血中 IgE 濃度の変化

皮膚炎を発症しなかった個体 (n = 10) の 6, 10, 14, 18, 22, 26 および 30 週齢時の血中 IgE 濃度を 2 点結合 EIA 法 (ELISA MAX™ Set Deluxe Mouse IgE (432404, Biolegend, San Diego)) を用いて測定した。

② 治療による血中 IgE 濃度の変化

各個体の発症前 (3~5 週前)、治療直前および治療終了後の血中 IgE 濃度を①と同様の方法で測定した。

4. 研究成果

(1) 肉眼所見

ベタメタゾン群では、プラセボ群に比べて改善傾向は見られるものの、有意な皮膚炎の改善は見られなかった。この所見は、ヒトのステロイド抵抗性皮膚炎に類似していた。一方、FTY720 + ベタメタゾン群では、プラセボ群に比べて、皮膚炎の顕著な改善が見られた (図 2 および 3)。また、ベタメタゾン群で見られた脱毛は、FTY720 群で有意に改善していた (図 4)。

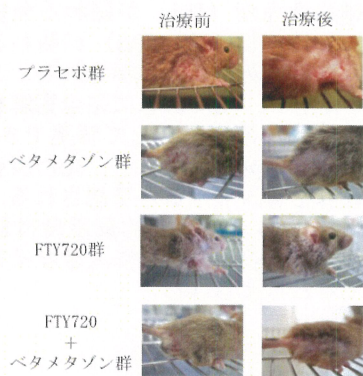


図2 外観所見

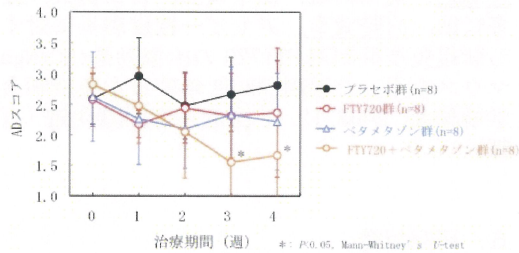


図3 ADスコアの推移

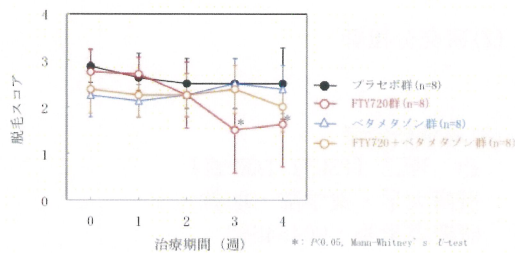


図4 脱毛スコアの推移

(2) ヘマトキシリン・エオジン染色

治療直前と治療終了後のヘマトキシリン・エオジン染色像から各群の表皮の肥厚の程度を比較した(図5)。プラセボ群およびベタメタゾン群では、治療による表皮の肥厚の改善は見られなかった。一方、FTY720群では改善傾向が見られ、FTY720+ベタメタゾン群では顕著な改善が見られた。この結果は、ADスコアの結果を組織学的に裏付ける結果であった。

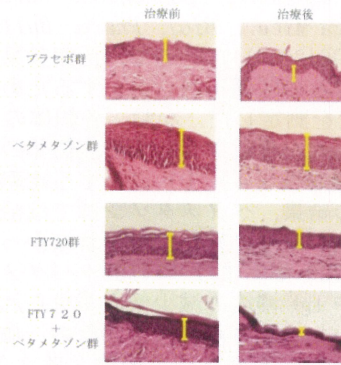


図5 表皮の肥厚の改善(ヘマトキシリン・エオジン染色)

(3) トルイジンブルー染色

アトピー性皮膚炎の病変部位周辺には、CD4陽性T細胞や肥満細胞が集積することが知られており、肥満細胞の脱顆粒が皮膚炎発症に密接に関与していると考えられている。そこで、各群の炎症部位のトルイジンブルー染色像から、治療前後の肥満細胞の浸潤の程度および脱顆粒の程度を比較したが有益な所見は得られなかった。

(4) 血中IgE濃度

①未発症個体の血中IgE濃度の推移

ヒトのアトピー性皮膚炎患者の多くは、アトピー素因(遺伝的素因)を持っているといわれている。すなわち、IgE抗体を産生しやすい性質がある。本研究で用いたNC/Ngaマウスについても同様にIgE抗体を産生しやすい性質がある。そこで、治療効果と血中IgE濃度との関係を明らかにするため、まず、未発症個体を用いて加齢に伴う血中IgE濃度の推移を調べた。その結果、10週齢以降、徐々に血中IgE濃度が上昇し、18週齢でプラトーに達した(図6)。

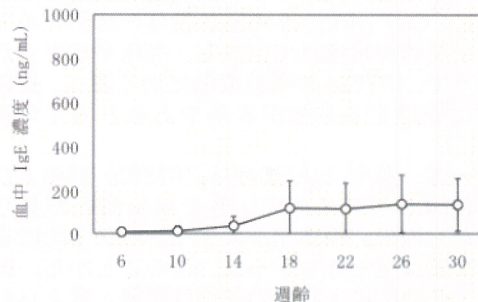


図6 加齢に伴う血中IgE濃度変化

②治療による血中IgE濃度の変化

申請者らは、既に、NC/Ngaマウスを用いた皮膚炎の発症予防実験で、FTY720投与によってIgE産生が抑制されることを報告している(Kohno, T., et al, A Novel Immunomodulator,

FTY720, Prevents Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Mice., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1392-1396(2004)). そこで、治療効果と血中 IgE 濃度との関係を明らかにするため、血中 IgE 濃度を測定した。なお、各個体の IgE 濃度は、週齢を合致させた未発症個体の IgE 濃度(研究成果(4)①)に対する比率で表した。その結果、ベタメタゾン群では治療前後で血中 IgE 濃度に変化は見られなかった。一方、FTY720 群および FTY720+ベタメタゾン群で血中 IgE 濃度の減少傾向が見られた(図7)。しかし、個体差が大きいため、血中 IgE 濃度のみでの薬効評価は困難と考えられた。

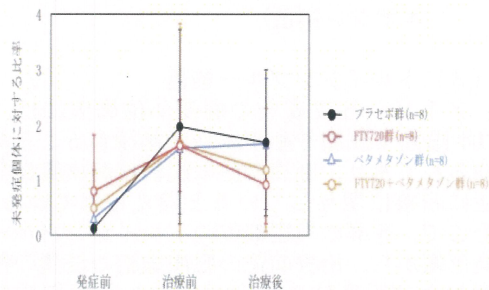


図7 血中 IgE 濃度変化

本研究結果(図2および3)から、本研究で見られた NC/Nga マウスの皮膚炎は、ヒトのステロイド抵抗性皮膚炎に類似していることが示唆された。この皮膚炎は、FTY720 の経口投与とベタメタゾン軟膏を併用することで、有意に改善できることが明らかとなった。これは、表皮の肥厚の改善効果(ヘマトキシリン・エオジン染色)からも裏付けられた。さらに、ベタメタゾン群で見られた脱毛は、FTY720 群では有意に改善した。以上の結果から、重症化した皮膚炎に対しては、FTY720 のみでは顕著な治療効果は得られないが、脱毛は改善されることが明らかとなった。従って、ステロイド抵抗性皮膚炎の治療には、まず、FTY720 の経口投与とステロイド外用薬の併用療法で治療し、炎症が治まった時点で、FTY720 の単独療法に切り替え、長期的に管理する方法が有用であると考えられる。

一方、血中 IgE 濃度は、FTY720 群および FTY720+ベタメタゾン群で減少傾向が見られたものの、個体差が大きく、統計学的に有意な差は見られなかった。このことから、血中 IgE 濃度による薬効評価は困難と考えられた。現在、ヒトのアトピー性皮膚炎の病勢評価に用いられている血中 TARC (Thymus and activation-regulated chemokine, CCL17) を測定し、有益な所見を得つつある。

本課題申請時に計画していた FTY720 の作用機序の解明については、予備試験を進行中であり、有益な成果を得つつある。FTY720 で制

御性 T 細胞を活性化できることが明らかとなれば、細胞性免疫(Th1)が関わる免疫疾患だけでなく体液性免疫(Th2)が関わる免疫疾患にも有用であることが示される。このことを明らかとし、免疫疾患に完全寛解を導入できる画期的な治療薬として育薬できれば、アトピー性皮膚炎のみならず、免疫疾患一般に完全寛解を導入できると予想される。これによる医学的および社会的貢献度は計り知れず、免疫疾患の治療戦略に大きなインパクトを与えると考えられる。

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)

[学会発表](計 1 件)

辻 琢己, 菊田裕規, 松下尚弘, 吉田侑矢, 藤多哲朗, 河野武幸, アトピー性皮膚炎に対する新規免疫抑制剤 FTY720 の治療効果:NC/Nga マウスを用いた検討, 2008 年度日本免疫学会学術集会, 2008. 12. 1, 国立京都国際会館(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 武幸 (KOHNO TAKEYUKI)
 摂南大学・薬学部・教授
 研究者番号: 50178224

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

辻 琢己 (TSUJI TAKUMI)
 摂南大学・薬学部・助教
 研究者番号: 90454652

(4) 研究協力者

吉田 侑矢 (YOSHIDA YUYA)
 摂南大学大学院薬学研究科博士前期課程

松下 尚弘 (MATSUSHITA NAOHIRO)
 摂南大学大学院薬学研究科博士前期課程