

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591468

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎のかゆみの発生機序と新規治療法の開発

研究課題名（英文） The development of mechanism and new therapy of the pruritis of atopic dermatitis.

研究代表者

竹中 基 (TAKENAKA MOTOI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：30281207

研究成果の概要(和文):

サブスタンスPは、皮膚の感覚神経より放出され、その結果皮膚局所の炎症を惹起することが知られている。アトピー性皮膚炎の患者において、血中サブスタンスPを測定したところ、標準的治療により、血中サブスタンスPは減少し、サブスタンスPの分解酵素の遺伝子発現が増強していた。また、ストレスを与えたマウスでは、より強く接触過敏反応(かぶれ)がみられ、その機序にサブスタンスPや接着分子であるL-セレクチンの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文):

Substance P is released from the sensory nerve of the skin, and it is known that substance P induce the inflammation of the skin. In the patient with the atopic dermatitis, when blood substance P was measured, substance P decreased by the standard treatment, and the m-RNA expression of degrading enzyme of substance P was enhanced. And, in the mouse which gave the stress, the contact hypersensitivity reaction enhanced, and L- selectin and substance P was indicated in the mechanism of enhanced response by the stress.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:皮膚科学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード:アトピー性皮膚炎、神経ペプチド、サブスタンスP、neutral endopeptidase

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の病態には、様々な因子が複雑に相互作用・クロス・トークを形成し、その病態を形成していることはよく知られている。その因子としては、従来より知られている皮膚バリアー機能の障害、Th1/Th2 バランスの異常、IgE 抗体の過剰産生などの免疫異常だけではなく、精神的ストレスや発汗異常などの神経内分泌的な調節異常が、アトピー性皮膚炎の発症、増悪に大きく関与をしている可能性が注目を集めている。

免疫反応は神経の機能を変化させ、逆に神経活動は免疫機能を変調させることが明らかにされつつある。この免疫系と神経系のクロス・トークは、共通の生化学的言語、特に神経ペプチドによって担われている。サブスタンスPは、脊髄後根神経節で合成され、末梢神経および中枢神経両方で神経伝達分子として働く神経ペプチドである。サブスタンスPは、皮膚の感覚神経より放出され、その結果皮膚局所の神経原性の炎症を惹起することが知られている。さらに重要なことは、精神的ストレスが加わると神経末端より放出されることが示されている。サブスタンス P はさらに皮膚肥満細胞からのヒスタミン遊離、ケラチノサイトやT細胞の細胞接着分子の増強、IL-1 などの炎症性サイトカイン産生誘導、B細胞からの抗体産生増強など多様な生物活性を有していることが明らかとなっている。

研究代表者の研究グループはサブスタンス P とヒスタミンが、皮膚由来線維芽細胞を刺激し、Th2 炎症の重要なメディエーターであるエオタキシン産生を増強することを報告した。このことはサブスタンス P が、エオタキシンを介して好酸球の遊走、活性化などに関与していることを示している。また、アトピー性皮膚炎患者と健常人の皮膚線維芽細胞を用いた実験では、アトピー性皮膚炎由来の線維芽細胞が、健常人由来線維芽細胞より高いエオタキシン産生能を有してい

ること、さらに IL-4、サブスタンス P、ヒスタミンなどアレルギー性メディエーターにサブスタンス P が痒みに関与しているとする報告は数多くなされている。

2. 研究の目的

痒みに関与するサブスタンス P、neutral endopeptidase (NEP)、および Lysophosphatidic acid (LPA)の発現および相互作用を解析することによって、アトピー性皮膚炎の痒みの発生機序を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

外来通院中のアトピー性皮膚炎患者12例を対象に、日本皮膚科学会の定める治療ガイドラインに沿って治療を行い、その前後で、治療効果、心理テスト、血清中のサブスタンス P 濃度を ELISA 法で、末梢血単核球の NEP mRNA 発現を RT-PCR 法により検討した。サブスタンス P は代表的な神経ペプチドで搔痒を誘発し、NEP により分解されると報告されている。

次に、ストレスが皮膚免疫系に与える影響について、接触皮膚炎モデルを用いて検討した。接触皮膚炎は、Oxazolone で感作したマウスで惹起させた。マウスは、400Hz の騒音と 25 秒間につき 2 秒の振動によるストレスに、晒されない群)、誘発期間のみ晒される群、感作期間と誘発期間に晒される群の3群に分け検討した。

4. 研究成果

日本皮膚科学会の定める診療ガイドラインに沿った治療により、皮膚症状は Costa 法により治療前は 29.0 ± 7.1 (中等症)であったものが、治療後は 12.6 ± 3.8 (軽症)となり、搔痒も VAS にて、 72.1 ± 13.8 であったものが、 33.6 ± 19.6 と著明に減少しており、いずれも有意差 ($p < 0.01$) をもって軽快していた。

心理テスト (STAI) では、12症例の平均で、治

療前の状態不安が 52.75、特性不安が 52.5 であった。治療後には状態不安は 45.3 と有意差 ($p < 0.05$) をもって、減少していた。特性不安については、平均では 49.6 と若干の減少傾向しか認めず、有意差は認めなかった。

治療前後にて血漿中のサブスタンスPを測定できた5例については図1に示す。1例ではほとんど変化を認めなかった (215pg/ml → 220pg/ml) が、4例において治療に伴い血漿中

のサブスタンスPの低下 (333.8pg/ml → 261.3pg/ml) を認めた。全例の平均では、治療前 310.0 ± 117.1 pg/ml、治療後 253.0 ± 68.3 pg/ml と減少傾向を認めた (図1A)。各症例の治療前のサブスタンスP濃度を 100% とし治療後のサブスタンスP濃度を比較したところ (図1B)、70.0% ~ 102.0%、平均 $86.8 \pm 12.9\%$ に減少していた

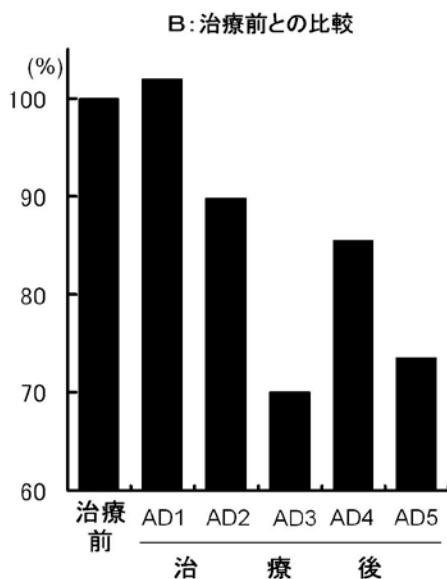
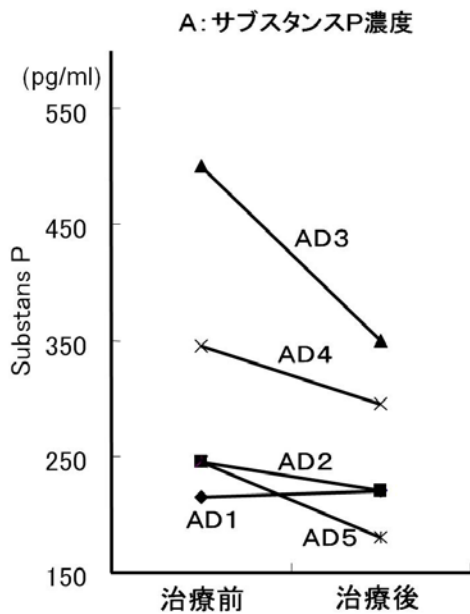


図 1. サブスタンスP の治療前後における変化

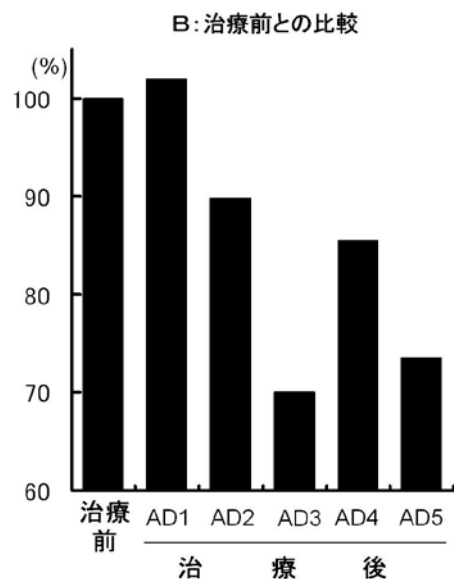
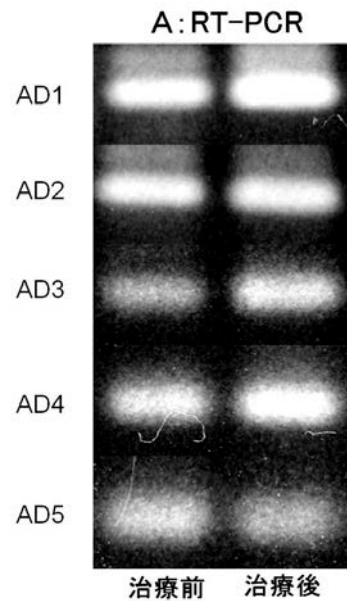


図 2. 末梢血単核球における NEP の mRNA 発現についての治療前後における変化

治療前後での末梢血単核球におけるNEPの mRNAについてのRT-PCRの結果を図2Aに示す。

発現量を比較するため、各バンドの吸光度を測定し治療前を 100%として比較検討したところ、全例において吸光度は治療後の方が高値であり(105%~119%、平均 113.5%)、治療後NEPの mRNAの発現が増強した(図2B)。

次に、ストレスが皮膚免疫系に与える影響について、接触皮膚炎モデルを用いて検討した。接触皮膚炎は、Oxazolone で感作したマウスで惹起させた。マウスは、400Hz の騒音と 25 秒間につき 2 秒の振動によるストレスに、晒されない群(control)、誘発期間のみ(single stress)晒される群、感作期間と誘発期間(double stress)に晒される群の3群に分け検討した。誘発後のマウスの耳介は、control 群に比べ、single stress 群で 15%、double stress 群で 50%厚くなっており、いずれも有意な差をもって腫脹していた。また、double stress 群は、single stress 群に比べ 30% 反応が増強されていた(図3A)。また、局所での肥満細胞の浸潤も、single stress 群、double stress 群の順で有意に多く認められた(図3B)。局所における mRNA の発現を real-time PCR でみたところ、サブスタンス P の前駆物質である preprotachykinin-A、IFN- γ 、IL-4、IL-6、TNF- α いずれも double stress 群で control 群に比べ有意に多く発現(順に、4 倍、4 倍、2.9 倍、7 倍、4.8 倍)しており(図4)、ストレスは接触過敏性を増強することが示唆された。

ストレスによる耳介の腫脹は L-selectin 欠損マウスでは有意な差をもって抑制されたが、P-selectin や E-selectin 欠損マウスでは抑制されなかった(図5)。また、L-selectin 欠損マウスでは、PPT-A、IL-4、IL-6、TNF- α の mRNA の発現が野生型の double stress マウスに比べ、それぞれ 90%、79%、79%、90%抑制されていた(図6)。

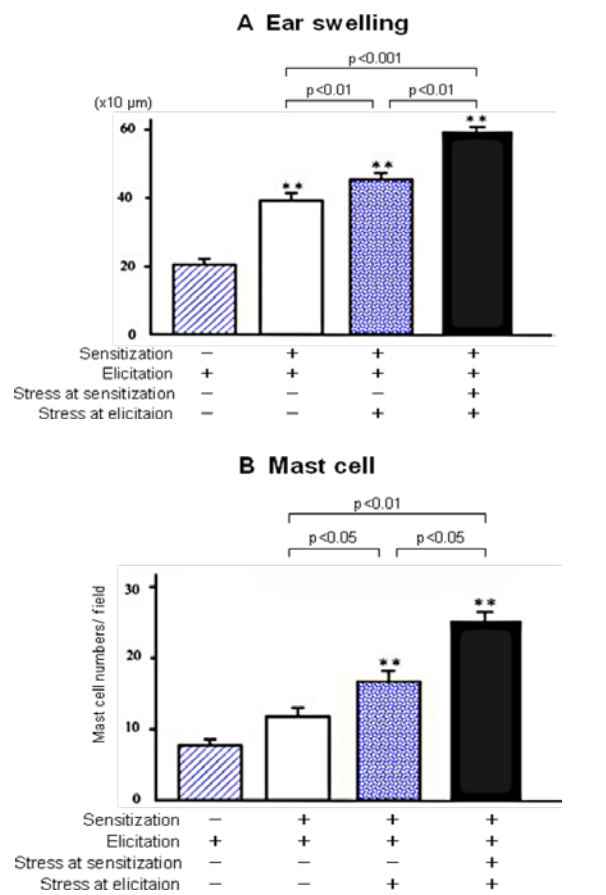


図 3.

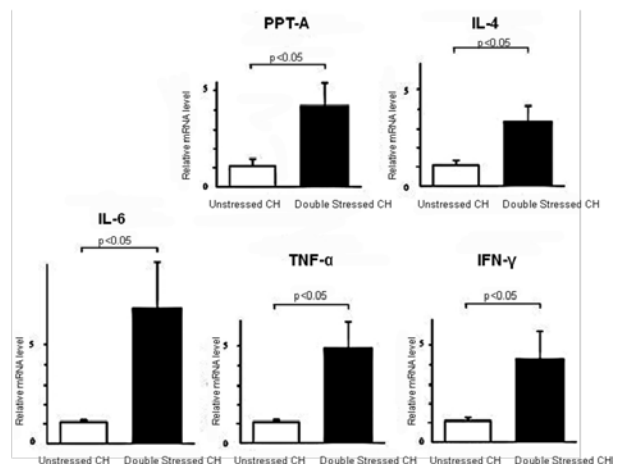


図 4.

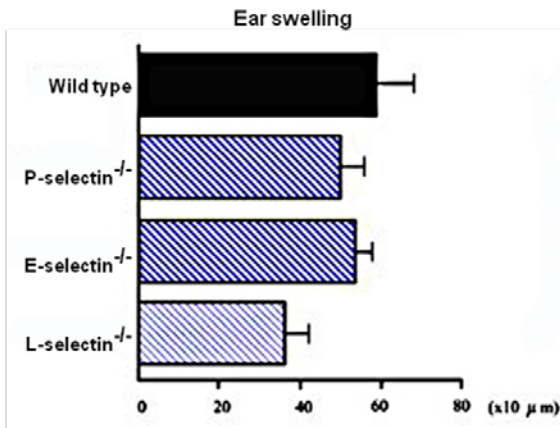


図 5.

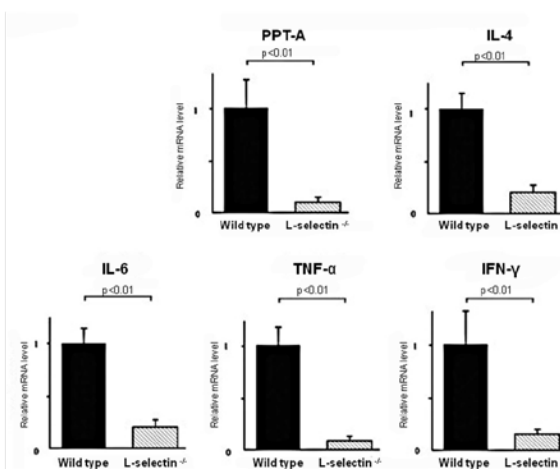


図 6.

サブスタンスPのレセプターである neurokinin 1 receptor の抗体を誘発前に投与することにより、耳介の腫脹は有意に抑制され、PPT-A、IL-4、IL-6、TNF- α の mRNA の発現も同様に有意に抑制された。このことから、ストレスによる接触過敏性の増強は L-selectin を介しており、サブスタンス P により、L-selectin が影響を受けている可能性が示唆された。アトピー性皮膚炎がストレスにより増悪することはよく知られているが、その機序に L-selectin が関与していることが考えられ、サブスタンスPも掻痒の惹起のみならず、他の機序を介してアトピー性皮膚炎の増悪に関与している可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件) 全て査読あり

- Muroi E, Hara T, Yanaba K, Ogawa F, Yoshizaki A, Takenaka M, Shimizu K, Sato S: A portable dermatoscope for easy, rapid examination of periungual nailfold capillary changes in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 31(12): 1601-1606, 2011
- Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis* 70(1): 194-200, 2011
- Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A: *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucormycosis. *Clin Exp Dermatol* 36(3): 312-314, 2011
- Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Iwata Y, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Kadono T, Sato S: The specific free radical scavenger edaravone suppresses fibrosis in the bleomycin-induced and tight skin mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 63(10): 3086-3097, 2011
- Bae SJ, Shimizu K, Yozaki M, Yamaoka T, Akiyama Y, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Sato S: Involvement of L-selectin in contact hypersensitivity responses augmented by auditory stress. *Am J Pathol* 176(1): 187-197, 2010
- Ogawa A, Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S: The differential role of L-selectin and ICAM-1 in Th1-type and Th2-type contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 130(6): 1558-1570, 2010
- Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 30(7): 871-878, 2010
- Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Sato S: Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthritic reaction. *Am J Pathol* 176(1): 259-269, 2010
- Ogawa F, Shimizu K, Hara T, Muroi E, Komura K, Takenaka M, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S: Autoantibody against one of the antioxidant repair enzymes, methionine sulfoxide reductase A, in systemic sclerosis: Association with pulmonary fibrosis and vascular damage. *Arch Dermatol Res* 302(1): 27-35, 2010

10. Tomita H, Ogawa F, Hara T, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Yoshizaki A, Komura K, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Elevated serum concentrations of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in diffuse cutaneous systemic sclerosis: Association with severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 37(4): 787-791, 2010
11. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki As, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 62(8): 2476-2487, 2010
12. Koike Y, Muroi E, Yoshizaki A, Ogawa F, Yanaba K, Takenaka M, Shimizu K, Sato S: Autoantibody against survivin in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 37(9): 1864-1870, 2010
13. Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Akiyama Y, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, T IF Tedder, Sato S: Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol* 185(4): 2502-2515, 2010
14. Yoshizaki A, Komura K, Iwata Y, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity.. *J Clin Immunol* 29(2): 180-189, 2009
15. Kuwatsuka Y, Ogawa F, Iwata Y, Komura K, Muroi E, Hara T, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Decreased levels of autoantibody against histone deacetylase 3 in patients with systemic sclerosis.. *Autoimmunity* 42(2): 120-125, 2009
16. Hara T, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Komura K, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Elevated serum concentrations of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte elastase in systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis.. *J Rheumatol* 36(1):99-105, 2009
17. Iwata Y, Yoshizaki A, Ogawa F, Komura K, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S.: Increased serum pentraxin 3 in patients with systemic sclerosis.. *J Rheumatol* 36(5): 976-983, 2009
18. Akiyama Y, Ogawa F, Iwata Y, Komura K, Hara T, Muroi E, Bae SJ, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Autoantibody against activating transcription factor-2 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 27(5): 751-757, 2009
19. Iwata Y, Yoshizaki A, Komura K, Shimizu K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Bae SJ, Takenaka M, Yukami T, Hasegawa M, Fujimoto M, Tomita Y, Tedder TF, Sato S: CD19, a response regulator of B lymphocytes, regulates wound healing through hyaluronan-induced TLR4 signaling. *Am J Pathol* 175(2): 649-660, 2009
20. Tomita H, Iwata Y, Ogawa F, Komura K, Shimizu K, Yoshizaki A, Hara T, Muroi E, Yanaba K, Bae SJ, Takenaka M, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: P-selectin glycoprotein ligand-1 contributes to wound healing predominantly as a p-selectin ligand and partly as an e-selectin ligand. *J Invest Dermatol* 129(8): 2059-2067, 2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹中 基 (TAKENAKA MOTOI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号:80420636

(2)研究分担者

佐藤 伸一 (SATO SHINICHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号:20215792

Bae Sangjae (BAE SANGJAE)

長崎大学・病院・医員

研究者番号:90325647

(H21~H22 のみ)