様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ１９３７５

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎に対する新規創薬基盤の構築

研究課題名（英文）Construction of a new drug discovery platform for atopic dermatitis

研究代表者
垣塚　彰（KAKIZUKA, AKIRA）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：８０２０４３２９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、難治性疾患の新たな治療薬の候補として、新規化合物Kyoto University Substances（KUSs）を開発した。その中の１つ、KUS121は、これまでの疾患動物モデルを用いた実験で、網膜色素変性や心筋梗塞等の病態を劇的に改善できることを示した。本研究では、このKUS121を用いて、アトピー性皮膚炎のマウスモデルに対する治療効果の検証を行った。結果、KUS121を塗布することで、アトピー性皮膚炎の原因であるTh2型の免疫応答が抑制され、皮膚の肥厚・荒れが劇的に抑制され、皮膚のバリアー機能も維持され、さらに、かゆみに対するマウスのそう爬行動も劇的に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、アトピー性皮膚炎代表されるTh2型のアレルギー性疾患に罹患する患者が急増している。アトピー性皮膚炎は、激しいかゆみによって学童の勉学に支障が生じ、学業成績低下の主な原因となっている。また、かゆみによる睡眠不足や集中力不足によって、多大な経済的なロスをもたらしている。治療としては、全世界的にステロイドの外用剤が用いられているが、副作用への不安から非ステロイド性の治療薬の開発が切望されていた。本研究により、KUS121は、ステロイドに代わる、新たなアトピー性皮膚炎治療薬として極めて有望な化合物であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We have conducted research aiming to discover new treatments for incurable diseases and have developed novel compounds called Kyoto University Substances (KUSs). One of them, KUS121, has shown the ability to dramatically improve pathological conditions in retinitis pigmentosa, glaucoma, Parkinson's disease, cerebral infarction, myocardial infarction, and others, based on experiments using disease animal models. In this study, we used this KUS121 to verify its therapeutic effects on a mouse model of atopic dermatitis. As a result, the application of KUS121 suppressed the Th2-type immune response, which is the cause of atopic dermatitis, and dramatically inhibited skin thickening and inflammation, while maintaining the skin's barrier function. Furthermore, the scratching behavior of mice against itching was also dramatically reduced. These findings strongly suggest that KUS121 holds great promise as a novel therapeutic candidate for atopic dermatitis.

研究分野：創薬科学、分子細胞生物学

キーワード：アトピー性皮膚炎　p97/VCP　治療薬　Th2型アレルギー反応

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

近年の我が国の衛生環境の改善､特に寄生虫感染症の激減に伴い､アトピー性皮膚炎､花粉症､気管支喘息に代表される Th2 型のアレルギー性疾患に罹患する患者が急増している。アトピー性皮膚炎は、小学生以下の児童・乳幼児の実に 10%以上が罹患しており、激しいかゆみによって勉学に支障が生じ、学業成績低下の主な原因となっている。また、大人の場合でも、アトピー性皮膚炎のかゆみで睡眠不足や集中力不足が誘発され、ドイツで推定された経済的なロスは、実に年間 2,000~4,500 億円とされている。治療としては、全世界的にステロイドの外用剤が用いられているが、副作用への不安から非ステロイド性の治療薬の開発が切望されている。

現在、アトピー性皮膚炎の分子機構の解析が進み、アトピー性皮膚炎では、IgEと好酸球動員に必要なインターロイキン(IL)-4、-5、-13を分泌するTh2型の免疫応答が重要な役割を担っていること、さらに、このTh2型の免疫応答を誘導する分子として皮膚の上皮細胞が産生するthymic stromal lymphopoietin (TSLP)と呼ばれるサイトカインが重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。TSLPは、TSLPに特異的な受容体TSLP-RとIL-7の受容体(IL-7R)のヘテロダイマーによって受容され、他のインターロイキンと同様に、JAK-STAT系によってそのシグナルが細胞内で伝達される。このような知見の元、JAK阻害剤が、アトピー性皮膚炎の新たな治療薬として開発されつつあるが、JAK阻害剤によってかゆみが軽減されるという明確なエビデンスは示されていない。

我々は、難治性疾患に対する革新的な治療法の開発を目指して、研究を行ってきた。その過程で、VCPと呼ばれる細胞内に大量に存在するATPaseの活性を抑制することが神経細胞死を防ぐことに極めて有益であることを示す結果を得たため、細胞毒性を持たずVCPのATPase活性を特異的に阻害する低分子化合物の開発を行い、約200種類の新規化合物（KUSs: Kyoto University Substances）を合成した。幾つかのKUSsは、細胞毒性を示さないばかりか、低グルコース、血清除去、ミトコンドリアの呼吸鎖阻害剤処理のようなATPを減少させる厳しい培養条件で、細胞内ATPの減少を抑制し（ATP制御薬）、細胞の生存を維持させた。特に、KUS121は、マウスの網膜色素変性モデル、緑内障モデル、網膜中心動脈閉塞症モデル、パーキンソン病モデルで劇的な発症の予防・遅延効果を示した。また、KUS121の投与は、心筋梗塞および脳梗塞のモデル動物の梗塞領域を劇的に減少させることを示した。さらに、KUS121は、動物実験とヒトの網膜中心動脈閉塞症の臨床試験（京大病院で実施）でいかなる副作用も観察されておらず、ヒトに対する安全性が確認されている。もし、KUS121にアトピー性皮膚炎に対する治療効果が確認できれば、ステロイドに代わる新たな安全性の高い治療薬に展開する可能性がある。

２．研究の目的

ヒトは､ATP を用いて個体の健康を維持している。一方､加齢とともに ATP 産生力が低下し、その結果、認知症やパーキンソン病など、多種多様な加齢性疾患が引き起こされる。これまで、生体内で ATP レベルの低下を有効に抑制する方法は無く、これらの疾患の治療を困難にしていた。近年我々は、生体内での ATP レベルの減少を抑制する新規化合物（KUSs）を開発することに成功し、その内の１つ、KUS121 は、動物実験で、これらの加齢性疾患の病態が劇的に改善できることを示してきた｡一方､全年齢層の国民が罹患している疾患群として､アトピー性皮膚炎、

花粉症に代表されるアレルギー性疾患がある。本研究は、これらのアレルギー性疾患にも上記加齢性疾患と類似する仕組みが存在する可能性を想定し、薬剤誘導性アトピー性皮膚炎のマウスモデルに対し、KUS121 の治療効果を検証する。治療効果がみとめられた場合には、その分子メカニズムの詳細を解明することで、アトピー性皮膚炎に対する革新的な創薬基盤の構築に挑戦することを目的とする。

３．研究の方法

本研究では、薬剤（MC903）をマウスの耳に塗布することで誘導されるアトピー性皮膚炎のマウスモデルを対象とし、以下の実験を行った。

KUS121 の薬効の解析

（１） 炎症部位の組織解析：

① KUS121塗布の有無で、皮膚の耳圧を測定することで、KUS121による病態の改善効果を検証する。

② 切片に対する（免疫）組織学的な観察で、KUS121塗布の有無での病態を解析する。

③ 皮膚切片に対しTSLPの発現量と発現場所をKUS121塗布の有無で解析する。

④ 皮膚切片に対する抗リン酸化JAK抗体による免疫染色を行うことにより、JAKの活性化とその活性化の場所をKUS121塗布の有無で解析する。

（２）炎症性サイトカインの解析：

採取した皮膚からのRNAに対し、インターロイキン(IL)-1β、IL-6、IL-4、IL13、IL17、TNFα、TSLP等の炎症性サイトカインmRNAに対する定量PCRを行い、本疾患モデルでTh2型応答が励起されていること、さらに、この応答がKUS121によって阻害されていることを示す。

（３） かゆみの抑制効果の解析：

マウスの行動をビデオ撮影することで、かゆみを掻く行動（掻破行動）を定量し、KUS121 の塗布で掻破行動が減少することを確認する。また、マウスが耳を掻爬できないように首にカラーをつけ、その時の耳厚を測定して、掻爬と皮膚炎の関係を検証する。

（４） 皮膚のバリアー機能の解析：

経皮的な水分の蒸散量（経表皮水分蒸散量）を定量し、KUS121 の塗布によって、皮膚からの水分蒸散量が減少すること、すなわち、皮膚のバリアー機能が維持されることを確認する。

４．研究成果

本研究で得られた成果は、以下のとおりである。

KUS121の薬効の解析

（１） 炎症部位の組織解析：

① 本実験では、アトピー性皮膚炎を誘導するために 100μMの MC903 を一日おきにマウスの耳に塗布し、5mM の KUS121 を連日塗布した。皮膚の耳厚を連日測定することで、KUS121 の薬効の解析を行った。結果、KUS121 の塗布によって、アトピー性皮膚炎の典型的な所見である皮膚の肥厚と荒れがほぼ完全に抑制された。

② 上記薬剤を 10 日間処理したマウスの耳に対し､組織学的な解析を行ったところ､MC903 で処理した耳では、真皮の顕著な肥厚と大量の単核球の浸潤が観察され、ヒトのアトピー性皮膚炎と類似の組織像が観察された。一方、MC903 と KUS121 を同時に処理した耳では、真皮の肥厚も単核球の浸潤もなく、アトピー性皮膚炎が発症していないことが示唆された。

③上記薬剤を 10 日間処理したマウスの耳に対し、抗 TSLP 抗体を用いた免疫組織学的な解析を行ったところ、MC903 で処理した耳では、非処理の耳では観察されない TSLP の発現が表皮で観察された。一方、MC903 と KUS121 を同時に処理した耳でも、MC903 単独処理と同様の TSLP の発現が表皮で観察された。

④上記薬剤を 10 日間処理したマウスの耳に対し､抗リン酸化 JAK 抗体による免疫組織学的な解析を行ったところ、非処理の耳では観察されない抗リン酸化 JAK 抗体によるシグナルが、単核球が浸潤している真皮で観察された。一方、MC903 と KUS121 を同時に処理した耳では、非処理の耳と同様、真皮における抗リン酸化 JAK 抗体によるシグナルは、観察されなかった。

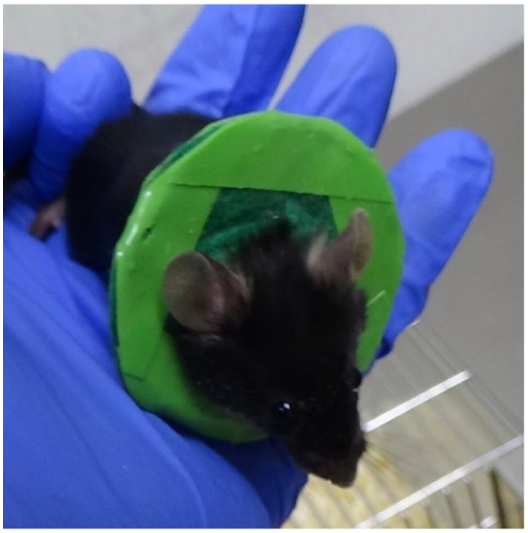
（２）炎症性サイトカインの解析：

上記薬剤を10日間処理したマウスの耳から、RNAを抽出し、インターロイキン(IL)-1β、IL-6、IL-4、IL13、IL17、インターフェロン(Ifn)-γ、TNFα、TSLP等の炎症性サイトカインmRNAに対する定量PCRを行った。結果、非処理の耳に比べ、MC903で処理した耳では、一般的な炎症に関わるIL-1β、IL-6、Ifn-γの上昇とTh2型炎症に関わるIL-4、IL-13、TSLPの発現亢進が観察された。一方、MC903とKUS121を同時に処理した耳では、MC903単独処理の耳に比べて、IL-1β、IL-6、IL-4の発現が顕著に抑制され、これらのサイトカインmRNAの発現レベルは、非処理の耳とほぼ同程度であった。本結果により、KUS121の塗布によって、Th2型の炎症が抑制されているが、上記の免疫組織学的な解析と同様、TSLPの発現は抑制されていないことが明らかになった。

（３）かゆみの抑制効果の解析：

上記薬剤を処理したマウスの行動を１日目、４日目、10 目に 30 分間ビデオ撮影し、後ろ足での掻爬行動をカウントした。１日目、４日目では、全ての４群で有意な差は観察されなかったが、10 日目では、MC903 単独塗布群での掻爬回数は、平均して 15 回/30 min であったが、KUS121 を同時に塗布することで平均 3 回/30 min となり、非処理群と有意差がないレベルまで減少していた。

アトピー性皮膚炎では、かゆみによる掻爬行動が皮膚のバリアー機能を破壊し、さらに炎症を増悪させることが知られている。これまでの実験では、KUS121 が直接炎症を抑制しているのか、かゆみを抑制することで、掻爬行動が減り、結果、炎症が抑制されているのかが検証できていない。そこで、マウスの首にカラーを付け（次ページ写真）、掻爬行動ができない状態で、耳厚を経日的に測定した。結果、カラーを付けることで、MC903 による耳厚の増加に変化は無く、また、KUS121 による治療効果にも変化は見られなかった。これらの結果から、KUS121 の治療効果は、炎症に対する直接的な効果であり、その時にかゆみも顕著に抑制されていることが示唆された。



首にカラーを付け、掻爬行動をできなくしたマウスの写真。

（４）皮膚のバリアー機能の解析：

上記薬剤を処理したマウスの耳に対し、経皮的な水分の蒸散量（経表皮水分蒸散量）を隔日測定した。結果、MC903 処理群で、10 日目から水分の蒸散量が見え始め、12 日目では、蒸散量が２倍以上に亢進した。この水分の蒸散量の亢進が、KUS121 の塗布によって、抑制され、ほぼ、非処理と同じレベルに保たれた。以上の結果から、皮膚のバリアー機能が KUS121 の塗布によって、維持されることが示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 垣塚　彰
２．発表標題 夢の途中：難病への挑戦
３．学会等名 第23回生命科学研究科シンポジウム（招待講演）（国際学会）
４．発表年 2022年

１．発表者名 垣塚　彰
２．発表標題 生物製剤の産生効率を劇的に高める方法
３．学会等名 アカデミックフォーラム大阪
４．発表年 2023年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計2件

産業財産権の名称 皮膚組織の異常を改善するための組成物	発明者 垣塚　彰、吉田有希、椛島健治、渋谷倫太郎、坂本美佳	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/019132	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 皮膚組織の異常を改善するための組成物	発明者 垣塚　彰、吉田有希、椛島健治、渋谷倫太郎、坂本美佳	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-76617	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

―

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	吉田　有希 (YOSHIDA TOMOKI)		

6．研究組織（つづき）

	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	坂本　美佳 (SAKAMOTO MIKA)		
研究協力者	椛島　健治 (KABASHIMA KENJI)		
研究協力者	小池　雅昭 (KOIKE MASA-AKI)		
研究協力者	稲垣　絢花 (INAGAKI AYAKA)		
研究協力者	松尾　光治良 (MATSUO KOHJIRO)		
研究協力者	渋谷　倫太郎 (SHIBUYA RINTAROU)		

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関