

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16272

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎に対する新規治療の個別化医療のためのバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Exploring Biomarkers for Individualized Treatment Approaches in Novel Therapeutic Strategies for Atopic Dermatitis

研究代表者

中嶋 千紗（Nakashima, Chisa）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50733573

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：近年、アトピー性皮膚炎（AD）は多様なフェノタイプからなるヘテロな疾患であることが分かってきており、新しい治療薬の承認が進んでいる。しかし、ADのかゆみは治療に難渋する場合があります、今後も課題となることが予想される。そこで、ADのかゆみメカニズムの解明、と新規治療の奏功因子を解明するために、より侵襲の少ない方法での臨床検体収集を目指した。テープストリッピング法とオイルブロッティング法を用いた臨床検体収集方法を確立した。またこれまでのAD患者の皮膚検体を用いて、免疫組織学的手法により末梢神経等の免疫染色を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、アトピー性皮膚炎（AD）に対する新規治療法の発展に大きく貢献するものである。ADに対する新規治療薬が次々と承認されている現状において、各薬剤の治療効果に關与する因子を特定しようとする事は、今後の臨床現場での治療精度の向上につながる事が期待される。これにより、患者一人一人に最適な治療法を提供することが可能となり、ADの治療成績の向上が期待できる。また、本研究では、より低侵襲な方法での臨床検体採取方法を確立した。患者の身体的・精神的負担を大幅に軽減することにつながる。本研究の成果は、ADの治療と診断の両面において、患者のQOL向上と医療の発展に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become apparent that atopic dermatitis (AD) is a heterogeneous disease consisting of diverse phenotypes, and the approval of new therapeutic agents has been progressing. However, the management of pruritus in AD can be challenging, and it is expected to remain an issue in the future. Therefore, to elucidate the mechanisms of pruritus in AD and identify factors contributing to the success of novel therapies, we aimed to establish methods for collecting clinical specimens using less invasive techniques. We established clinical specimen collection methods using tape stripping and oil blotting techniques. Furthermore, using skin samples from AD patients collected to date, we performed immunohistochemical staining for peripheral nerves and other structures.

研究分野：アトピー性皮膚炎

キーワード：アトピー性皮膚炎 かゆみ

1. 研究開始当初の背景

(1) 背景および学術的「問い」

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis: AD) は、世界的に発症頻度の高いアレルギー性疾患であるが、近年の研究成果により AD の病態解明がすすみ、多様なフェノタイプ (表現型) から構成されるヘテロな疾患であることが分かってきた (*J Allergy Clin Immunol.*(2019) 143:(1)1-11)。AD のフェノタイプは、人種、年齢、フィラグリン変異の有無、血中 IgE 値など多くの遺伝因子・環境因子との複雑な相互作用によって発症や病態が規定されると考えられ、その背景にある分子病態に基づいた疾患サブグループ (エンドタイプ) ごとの治療の確立をめざす必要がある。さらに、これまで欧米を中心とした解析が中心であったが、日本人の AD 患者を対象とした、ゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study: GWAS) が実施され、AD の病態に関わると考えられる新しい四つの疾患関連領域と四つの既知領域が報告された (*J Allergy Clin Immunol.*(2021) in press)。このように、日本人 AD 患者を対象とした疾患サブグループ解析は重要な課題といえる。

一方で、実臨床においては AD の新規治療薬の開発・承認が目覚ましい。2018 年 4 月に、本邦で、インターロイキン (Interleukin: IL) 4 受容体 サブユニット (IL-4R α) に対する高親和性完全ヒト抗体であるデュピルマブ治療が中等症～重症の AD に対し承認された。臨床的にも、デュピルマブを投与することで、AD の皮疹の改善に加え、かゆみの改善や Quality of life(QOL)の改善など、AD の多岐にわたる症状に対するデュピルマブの有効性が報告されており、申請者も経験している (Nakashima C et.al. *Br J Dermatol* (2020) 182:487-488.)。さらに、2020 年 12 月以降、低分子分子標的薬である JAK 阻害剤の内服が既存治療で効果不十分な AD の治療として適応追加された。それ以外にも、かゆみ特異的なサイトカインである IL-31 の受容体 (Nakashima C et.al. *Exp Dermatol* (2018) 27:327-331.)や、Th2 免疫応答のマスターレギュレーターといわれている胸腺間質性リンパ球新生因子(thymic stromal lymphopoietin: TSLP)をターゲットとした生物学的製剤の登場も予想されている。このような中で、どの患者にどの薬剤を選択していくか、奏功を予想できるバイオマーカーを探索することは緊要の課題となるだろう。

さらに、申請者はこれまで、AD をはじめとするアレルギー性疾患の“かゆみ”に着目し、末梢神経と顆粒球をはじめとする免疫細胞の相互作用に関する研究をすすめてきた (Nakashima C et.al. *Exp Dermatol* (2019) 28:1405-11.)。皮膚末梢神経は古典的に、有髄神経と無髄神経に分類され、“かゆみ”は、主に C 線維と呼ばれる無髄神経に伝達されると言われている。有髄神経は、髄鞘 (ミエリン) 形成シュワン細胞により被覆されているが、C 線維を代表とする無髄神経は、非ミエリン形成シュワン細胞 (Remak Schwann) という末梢グリア細胞により、いくつかの神経が束となり存在する。さらに、近年かゆみの領域において、脊髄内グリア細胞であるアストロサイトが、末梢から中枢へのかゆみ伝達経路の中で、AD の慢性的なかゆみに関連しているという報告がされた (*Nat Med.* (2015) 21:927.)。そこで申請者は、かゆみを伝える C 線維とともに存在する末梢グリア細胞に着目し、かゆみメカニズムにおける末梢グリア細胞の役割を明らかにしたいと考えている。

以上より、臨床検体を用いた網羅的解析を実施することで、治療に奏功する因子を見出すことを目的とする。また、解析結果と治療効果を照らし合わせることで難治性のかゆみのメカニズムを解明することを目指す。

2．研究の目的

- ・AD患者を対象とした個別化医療実践のための、臨床現場で応用可能な治療奏功因子を検索する。
- ・ADの“かゆみ”メカニズムにおける、末梢グリア細胞の役割を解明する。

3．研究の方法

(1)AD臨床検体の低侵襲な検体収集方法の確立

新規の生物学的製剤や低分子分子標的薬を投与予定のAD患者を対象とした前向きのコホート研究である。まず、AD患者のフェノタイプを分類するために、カルテ情報より年齢・性別・既往歴・家族歴などの患者属性や血清中のIgE値やTARC値を収集する。また、皮疹の状態は、Eczema Area and Severity Index (EASI)などのスコアにより分類し、重症度別に解析を行う。また、新規治療によるADのかゆみやQOLの改善をスコア化するため、Numerical rating scale (NRS)といったかゆみ強度に関する問診だけではなく、患者の治療満足度を数値化するためNine-item Treatment Satisfaction Questionnaire for Medication(TSQM-9)やコミュニケーションカードを用いた数値化、5-Dかゆみスケールによるかゆみの質の評価を行う。

具体的な低侵襲なサンプル回収方法として、テープストリッピング法とオイルプロットティング法を実施した。そのサンプルを用いてまずは、各種サイトカインの定量的PCRを実施した。

(2)AD病変部における末梢グリア細胞の分布

収集したヒト皮膚検体を用い、免疫組織学的な手法を使用し末梢神経、非ミエリン形成シュワン細胞、免疫細胞の分布を検討する。具体的には、末梢神経のマーカーとしてPGP9.5、非ミエリン形成シュワン細胞のマーカーとしてp75、免疫担当細胞は注目する細胞により該当するマーカーを多重染色し、おのおの位置関係を統計学的かつ他覚的に解析する。

(3)(2)の網羅的解析時に、末梢グリア細胞マーカーの検索

これまで質問紙等を用いて収集した患者の“かゆみ”スコアを強度や質、治療による改善の程度によりグループ分けする。Single cell RNA sequenceを実施する際に、各グループのADに関わる免疫細胞のケモカインやサイトカインの発現の程度だけではなく、グリア細胞特異的なマーカー(p75など)についても解析を行う。(3)で見出した免疫学的な位置関係と網羅的解析を組み合わせることで、末梢グリア細胞が関わるかゆみに関わる因子を同定する。

4．研究成果

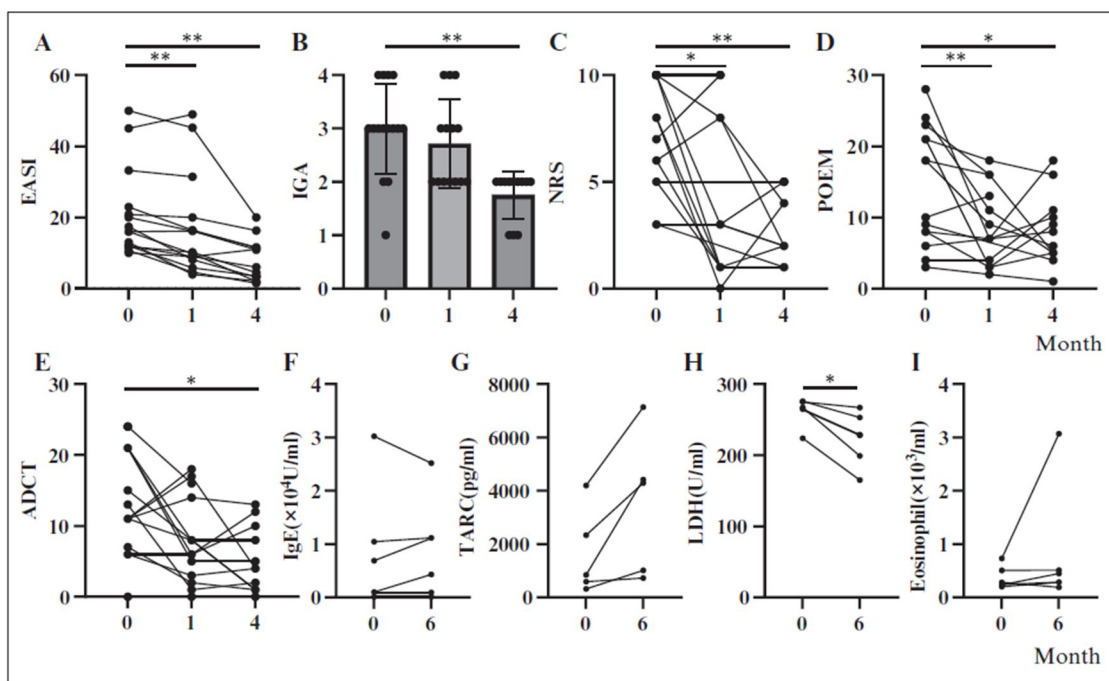
(1)AD臨床検体の低侵襲な検体収集方法の確立と臨床データの収集

AD臨床検体の低侵襲な検体収集方法の確立のために、まずは健常人においてテープストリッピング法とオイルプロットティング法を実施した。どちらも定量的PCRに耐えうることを確認し、現在はAD臨床検体をオイルプロットティング法を中心に収集し、解析中である。

また、自施設でのADに対する臨床データ収集のためのデータベースを作成した。その中でADに対する新規薬剤の一つであるネモリズマブ（ミチーガ®）投与患者を後方視的アプローチにより解析を行った。

自施設でネモリズマブを投与された中等症から重症のアトピー性皮膚炎患者15名（男性13名、女性2名、平均年齢47.6歳）を対象に、治療開始から1ヶ月後と4ヶ月後の臨床データを収集し、評価した。投与4ヶ月後には、62%の患者がEASI-50を、31%の患者がEASI-75を達成した。また、かゆみの指標であるNRSスコアも有意に改善し、1ヶ月後で40%、4ヶ月後で62%の患者がNRSスコアを4点以上改善させた。患者報告アウトカム（POEM、NRS）とアトピー性皮膚炎コントロールツール（ADCT）のスコアも、ベースラインと比較して4ヶ月後に減少した。血液検査では、乳酸脱水素酵素（LDH）の低下が見られたが、好酸球数や血清IgE値に有意な減少は認められなかった。最も多い有害事象は、アトピー性皮膚炎の悪化であり、2名（13%）の患者が1ヶ月後にネモリズマブを中止した。この解析において皮疹の改善率は、先行する臨床試験と比較して高かった。これは、ステロイド、保湿剤、タクロリムス、デルゴシチニブ軟膏の併用が寄与している可能性がある。

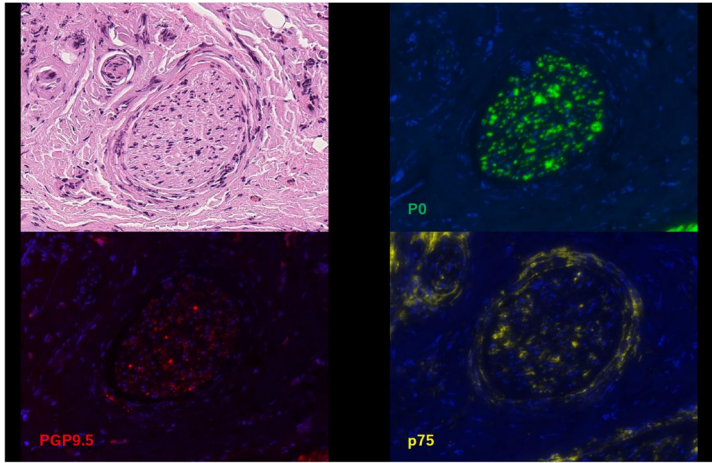
以上より、リアルワールドにおけるネモリズマブはアトピー性皮膚炎の治療に概ね有効で、有害事象は少ないものの、一部の症例では効果不十分や症状悪化が見られることが示され、この成果を *Eur J Dermatol.* 2023 1;33(6):691-2 に報告した。



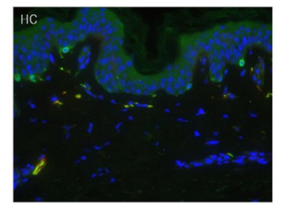
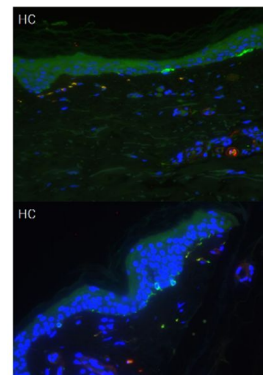
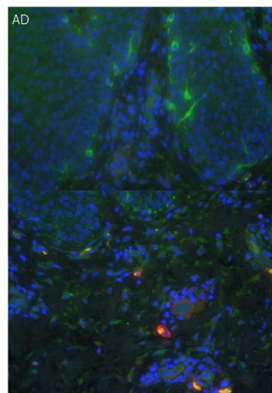
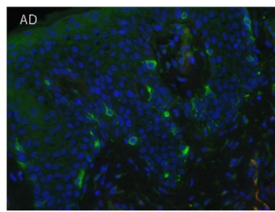
(2)AD病変部における末梢グリア細胞の分布

(3)(2)の網羅的解析時に、末梢グリア細胞マーカーの検索

末梢神経の過形成病変であるNeuromaの検体を用いて、各種抗体（P0、p75、GFAP、PGP9.5、2チュブリン（Tuj1））の染色条件を検討した。その結果、実際に染色可能であった抗体はP0、p75、PGP9.5であった。



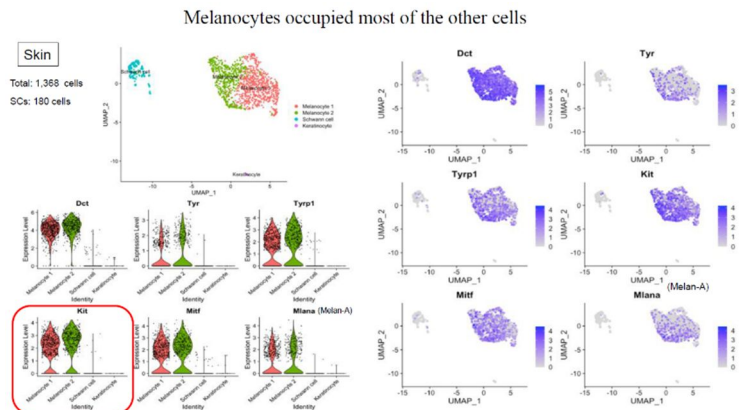
その後、過去の健常人（HC）およびAD皮膚生検の検体を用いて、末梢神経のマーカーであるPGP9.5・ 2 チュブリン(Tuj1)や非ミエリン形成シュワン細胞のマーカーとしてのp75の染色を行った。真皮の末梢神経には、シュワン細胞の共染色を認めた。



They are the normal immunofluorescent staining of TuJ1.

1次抗体	host	抗原性	2次抗体
Tuj1	abcam/ab107215	Chicken 1:500	Alexa 488 anti-chi (goal)
p75	abcam/ab229877	rabbit 1:2000	Alexa 594 anti-rabbit (goal)

また、網羅的解析のための健常皮膚を用いた、シュワン細胞のシングル細胞解析の条件検討を繰り返した。その結果、メラノサイトとシュワン細胞の分離できる条件を確立した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyawaki Kayo, Nakashima Chisa, Otsuka Atsushi	4. 巻 33
2. 論文標題 Real-world effectiveness and safety of nemolizumab for the treatment of atopic dermatitis in Japanese patients: a single-centre retrospective study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 691 ~ 692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1684/ejd.2023.4551	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------