

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591652

研究課題名(和文)チオレドキシンとその誘導物質による皮膚炎治療薬の開発に関する研究

研究課題名(英文)Development of dermatitis therapeutic drug with thioredoxin and thioredoxin inducer

研究代表者

福永 淳(Fukunaga, Atsushi)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10467649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎を代表疾患とする湿疹・皮膚炎の薬物療法の中心は、長年ステロイド・免疫抑制剤外用療法のみである。本研究では抗酸化物質であるチオレドキシンに着目し、ヒトリコンビナントTRX(hrTRX)の外用塗布が角化細胞からの前炎症性サイトカインの産生抑制を介してマウス一次刺激性皮膚炎を抑制することを証明した。hrTRX含有外用剤を作成し健常人においてアレルギー・刺激反応がないことを確認し、hrTRX含有外用剤のアトピー性皮膚炎患者20名に対するダブルブラインド・プラセボコントロール・ランダム化試験を行った。副作用や有害事象は生じず、当該データはブラインドをオープンにして現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：The central medical therapy of eczema including atopic dermatitis has been both topical steroid and topical immunosuppressant for many years. In this study, we focused on thioredoxin (TRX), which has a crucial role in redox regulation. We demonstrated that topically applied recombinant human TRX (rhTRX) ameliorated a murine irritant contact dermatitis by regulating the epithelial production of pro-inflammatory cytokines. We made an external agent containing rhTRX, which did not show allergic or irritant reaction in healthy volunteers. We have completed the double-blinded, randomized, placebo-controlled study in 20 patients with atopic dermatitis. Any side effects and harmful phenomenon did not occur in this study. This data are being analyzed.

研究分野：皮膚アレルギー

キーワード：皮膚炎症 アトピー性皮膚炎 チオレドキシン 接触皮膚炎 外用療法

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎を代表疾患とする湿疹・皮膚炎は皮膚科を受診する患者の約40%を占める最も頻度の高い疾患である。またアトピー性皮膚炎は40歳以下における有症率が約10%と生産年齢における罹患率が非常に高い国民的疾患といえる。しかしアトピー性皮膚炎治療の薬物療法の中心であるステロイド・免疫抑制剤外用療法には無視できない特有の副作用があり、多く患者の症状のコントロールが不十分でQOLが損なわれている。このような背景から、湿疹・皮膚炎に対する新たな治療薬の開発が望まれている。研究代表者はチオレドキシン(TRX)腹腔内投与で接触過敏反応を抑制することを証明した背景があり、TRXの臨床応用を目指した基礎研究を行うとともにTRX誘導物質を用いて湿疹・皮膚炎の新規治療法を開発する基盤とする。TRXは、大腸菌のDNA合成に必須な酵素であるリボヌクレオチド還元酵素の補酵素として発見された分子内に-Cys-X-X-Cys-というレッドクス活性配列を有する分子量約12kDaのタンパク質である。TRXは様々な酸化ストレスによって誘導され、単独でヒドロキシラジカルを消去するほか、TRX依存性のペルオキシダーゼであるペルオキシレドキシンの協調作用によって細胞内の活性酸素種(ROS)を消去する抗酸化物質として知られている。またTRXは抗酸化作用の他に抗炎症作用を示すことも数多く報告されている。プレオマイシンの気管内投与による急性肺障害モデルラット・OVA感作による喘息モデルマウスでは、ヒトリコンビナントTRX(hrTRX)を腹腔内投与することで炎症が軽減される(Hoshino T et al. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:1075-1083, Ichiki H et al. Biochem Biophys Res Commun. 2005;334:1141-1148)。またデキストラン硫酸による潰瘍性大腸炎モデルやにおいて、hrTRXを腹腔内投与することで proinflammatory cytokine であるマクロファージ遊走阻害因子(MIF)の産生抑制が報告されている(Tamaki H et al. Gastroenterology. 2006;131:1110-1121)。一方、皮膚においてはTRXを過剰発現させたTRXトランスジェニックマウスでは接触過敏(CHS)反応やクロトンオイル皮膚炎反応が抑制される事、hrTRX腹腔内投与によりこれら皮膚炎反応が抑制される事を研究代表者がすでに報告している(Fukunaga A et al. Antioxid Redox Signal 2009;6:1227-1235)。Geranylgeranylacetone (GGA:テプレノン)は幅広く消化性潰瘍治療薬として臨床で使用され、胃粘膜に対する保護的効果を有する。いわゆる酸化ストレスを有さない物質であるGGAは肝細胞や胃腸粘膜細胞でTRXの発現を誘導できるTRX誘導物質であり、それぞれの細胞のエタノール誘導性細胞障害を減弱させることが知られている(Hirota K et

al. Ann N Y Acad Sci. 2002;957:189-199. Review)。しかしGGAが皮膚に及ぼす影響については全く知られていない。さらにGGAはすでに経口的に臨床で利用されておりヒトにおいて副作用の少なさが証明されている。

研究代表者はこれまでマウスを用いたCHS反応やクロトンオイル皮膚炎の研究を多数行ってきており、hrTRXやGGAの外用塗布によるマウス皮膚炎における抑制効果を検討する研究的基盤がある。アトピー性皮膚炎患者の日常診療にも数多く携っており、hrTRX外用剤をアトピー性皮膚炎患者に用いて、TRXの皮膚における抗炎症効果・TRXによる皮膚炎の臨床症状改善効果を検討することは困難ではない背景がある。

2. 研究の目的

本研究では以下の点を明らかにすることを目的とする。

(1)マウス皮膚炎モデルにおけるTRX外用効果の検討、アトピー性皮膚炎患者におけるTRX外用効果の臨床的検討

研究代表者はすでにTRX過剰発現マウス及びhrTRXの腹腔内投与でマウス皮膚炎が抑制されることを報告している(Fukunaga A et al. Antioxid Redox Signal 2009;6:1227-1235)。TRX外用療法のヒトへの臨床応用を目的として、マウス皮膚炎モデルを用いてTRX外用効果の検討を行う。まずはCHS反応やクロトンオイル皮膚炎などのマウス皮膚炎モデルにおけるTRX外用製剤の有効性の検討を行う。次にTRX外用製剤における適切な基剤を検討し、TRX外用製剤の安全性を尿中や血中へのhrTRXの分布を確認することで検討する。

(2)アトピー性皮膚炎患者におけるTRX外用効果の臨床的検討

健康人ボランティアにおいてhrTRX外用剤のパッチテストを行い、ヒトにおける外用剤としての安全性を確認する。軽症から中等症のアトピー性皮膚炎患者においてhrTRX外用が臨床症状の緩和に有効であるかを確認するために、hrTRX混合外用剤とプラセボ外用剤を同一患者の左右皮膚に塗り分けて外用局所の皮膚症状の変化とテープストリッピングで採取した角層のサイトカインの定量の検討を行い、TRXの皮膚における抗炎症効果・TRXによる皮膚炎の臨床症状改善効果を検討する。

(3)マウス皮膚炎モデルにおけるTRX誘導物質GGA(テプレノン)外用効果の検討

肝細胞や胃腸粘膜細胞でTRX発現を誘導することが知られているGGAによりヒト・マウス培養ケラチノサイトにおいてヒト・マウスTRXが誘導されるかを*in vitro*で観察する。さらにGGAをマウスに対して経口・経皮投与を行い、*in vivo*での皮膚組織におけるTRXの誘導を観察する。

次にCHS反応やクロトンオイル皮膚炎などの皮膚炎モデルを用いてGGAを経口投与す

ることその反応が抑制されるかを観察する。さらに GGA を外用投与（塗布）することでこれら皮膚炎反応が抑制できるかを観察する。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚炎モデルにおける TRX 外用効果の検討

研究代表者は、ヒト TRX を過剰発現させた TRX トランスジェニックマウスにおいて接触過敏(CHS)反応やクロトンオイル皮膚炎反応が抑制される事、野生型マウスへの hrTRX 腹腔内投与によりこれらの皮膚炎反応が抑制される事を報告している(Fukunaga A et al. Antioxid Redox Signal 2009;6:1227-1235)。さらに CHS 反応における感作相における hrTRX の投与が皮膚炎反応に影響を与えず、惹起相における投与で皮膚炎反応が抑制されたことを報告している。以上の結果から hrTRX の全身投与は免疫の獲得（感作）に影響を及ぼさず、炎症反応を抑制したと解釈できる。皮膚科臨床で診察するアレルギー性接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎を代表とする湿疹・皮膚炎群疾患患者はすでに何らかの原因抗原で感作されており、原因抗原で皮膚炎が惹起された状態で受診していると考えられる。そのため、免疫抑制を生じず炎症反応を制御できる TRX のような物質は理想的な湿疹・皮膚炎群疾患の治療薬になりうる可能性がある。湿疹・皮膚炎群疾患では局所的外用療法が全身投与と比較すると全身的副作用が少なく、ドラッグデリバリーの意味からも実用的である。このような背景からアレルギー性接触性皮膚炎のモデルである CHS 反応や刺激性接触皮膚炎のモデルであるクロトンオイル皮膚炎などの皮膚炎モデルにおける hrTRX 外用効果の検討を行う。hrTRX は研究協力者であるレドックスバイオサイエンス社から提供を受ける。hrTRX を溶解する基剤に関して適切な基剤を選択するため各種基剤を用いて効果の検討を行う。外用による安全性の検討のため hrTRX 外用後の hrTRX の皮膚、血中、尿中の分布を調べる。皮膚炎惹起時に皮膚局所で上昇する各種サイトカインや皮膚に浸潤してくる炎症細胞に対して hrTRX 外用が影響を及ぼすかを検討する。培養ケラチノサイトにクロトンオイルを加えると TNF- α ・IL-1 β ・IL-8 などのサイトカイン上昇することが報告されており (Wilmer JL et al. J Invest Dermatol 1994;102:915-922)、クロトンオイルによる培養ケラチノサイトにおけるサイトカイン発現・分泌上昇に与える hrTRX 添加の影響を *in vitro* で検討する。

(2) アトピー性皮膚炎患者における TRX 外用効果の臨床的検討

研究代表者は共同研究者として「アトピー性

皮膚炎に対する TRX 外用の効果に関する研究」という臨床研究の承認を神戸大学大学院医学研究科長から得ており、TRX 外用の臨床研究を行っていく基盤を有している。まず hrTRX 含有クリームと含有していないプラセボクリームをボランティアである健康人の上腕内側にパッチテスト用絆創膏を用いて 48 時間クローズドパッチテストを行い、除去後 1 時間後、24 時間後に貼付部位の発赤などでパッチテスト判定を行い、hrTRX 含有外用剤の皮膚における安全性を確認する。上記の各クリームは共同研究者であるレドックスバイオサイエンス社から提供を受ける。上記試験で安全性が確認された後に、神戸大学医学部附属病院に通院中のアトピー性皮膚炎患者を被験者として外用試験を行う予定である。被験者は hrTRX を含有しているクリームと含有していないプラセボクリームを皮膚が同程度出現している左右の皮膚に 4 週間外用する。外用前後でかゆみと皮膚所見を評価することで臨床的有用性を検討し、同時に外用時に生じた副事象を観察することで再度安全性の確認を行う。上記試験は二重盲見法で施行する。さらに治療の前後の局所皮膚における角層をテープストリッピングで回収し、角層のサイトカインを蛍光抗体法や ELISA を用いて定量する。

(3) マウス皮膚炎モデルにおける TRX 誘導物質 GGA 外用効果の検討

ヒト・マウス角化培養細胞に GGA を添加して TRX の発現を蛋白レベル、mRNA で解析する。次に GGA をマウスに経口・経皮投与を行い、マウスの皮膚における TRX の発現を免疫組織学的に解析する。

我々はすでに TRX の腹腔内投与でマウス皮膚炎反応が抑制されることを報告しており、GGA が皮膚において TRX の誘導物質であることが確認されれば、GGA も TRX と同様にマウス皮膚炎を抑制できる物質であると仮説を立てることができる。この仮説から、GGA を経口前投与したマウスで CHS 反応に与える影響を観察する。CHS 反応には皮膚樹状細胞が重要な役割を果たす感作相と T 細胞が重要な役割を果たす惹起相があり、それぞれの相の前に GGA を投与することでどちらの相に影響を及ぼしているかを検討する。クロトンオイル皮膚炎モデルを用いても GGA 経口投与の皮膚炎抑制効果を検証する。次に皮膚炎治療において実用的である外用治療を意識し、これら CHS 反応・クロトンオイル皮膚炎モデルにおける GGA の経皮的外用の効果について検討する。外用、内服でそれぞれ皮膚炎抑制効果が見られれば、皮膚におけるサイトカインの変化、酸化的 DNA 損傷、炎症細胞浸潤の程度に関しても検討を加える。

4. 研究成果

(1)マウス皮膚炎モデルにおける TRX 外用効果の検討

刺激性接触皮膚炎のモデルであるクロトンオイル皮膚炎などの皮膚炎モデルを用いて hrTRX 外用効果の検討を行った。まず、経皮的に塗布した hrTRX はマウス一次刺激性皮膚炎を有為に抑制することを確認した。外用を行った hrTRX は非炎症状態、炎症状態においても末梢血からは検出されず皮膚のみに分布した。さらに一次刺激性皮膚炎の皮膚における炎症性サイトカイン、ケモカイン産生を hrTRX 外用が抑制することを皮膚組織で確認した。次に、マウス培養ケラチノサイトにクロトンオイルを加えて TNF- α , IL-6, MCP-1 などの前炎症性サイトカインの発現、産生を確認し、hrTRX の添加がその発現、産生を抑制することを確認した。最後に、クロトンオイルの主要成分である PMA によってマウス培養ケラチノサイトから TNF- α 産生を検出し、hrTRX の添加がその産生を抑制することを確認した。以上の結果は、炎症性サイトカインやケモカインの皮膚などの局所での産生を TRX が抑制する事で、皮膚局所での炎症が予防できることを示唆していると考えている。

(2)アトピー性皮膚炎患者における TRX 外用効果の臨床的検討

hrTRX 含有クリームとゲル、含有していないプラセボクリーム、ゲルをボランティアである健常人 10 名の上腕内側にパッチテスト用絆創膏を用いて 48 時間クローズドパッチテストを行い、アレルギー反応や性差反応が全例で認められなかったことを確認した。

次に、hrTRX 含有クリーム、ゲルとプラセボ入りクリーム、ゲルを軽症から中等症の 20 名のアトピー性皮膚炎患者の前腕、大腿にそれぞれ左右に外用して皮膚臨床症状、自覚症状、角層中の炎症性サイトカインについて観察、測定した。当該試験はダブルブラインド・プラセボコントロール・ランダム化試験としてデザインを組んだ。経過中に 1 名の患者が元来あったアトピー性皮膚炎が増悪したため試験を中断したが、残りの 19 名は副作用や有害事象を生じずに外用試験を完了した。当該データは、ブラインドをオープンとして現在解析中である。

(3)マウス皮膚炎モデルにおける TRX 誘導物質 GGA 外用効果の検討

マウス角化培養細胞に GGA を添加して TRX の発現を蛋白レベル、mRNA で解析したが、肝細胞や胃腸粘膜細胞のように産生、発現の上昇が認められなかった。また、マウス皮膚に GGA を直接塗布もしくは経口投与して皮膚局所での TRX 産生、発現について検討を行ったが、GGA の産生、発現上昇は認められなかった。

以上より、GGA はマウス皮膚における TRX の誘導物質ではないと判断した。

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)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Ibusuki C, Oka M, Fukunaga A, Kunisada M, Nishigori C. Unilateral aquagenic wrinkling of the palms with a peculiar clinical course. 査読あり *Eur J Dermatol.* 2012;39:679-680

Ono R, Masaki T, Dien S, Yu X, Fukunaga A, Yodoi J, Nishigori C. Suppressing effect of recombinant human thioredoxin on ultraviolet light-induced inflammation and apoptosis in murine skin. 査読あり *J Dermatol.* 2012;39:843-851

Masuoka E, Fukunaga A, Kishigami K, Jimbo H, Nishioka M, Uchimura Y, Taguchi K, Ohgou N, Nishigori C. Successful and long-lasting treatment of solar urticaria with UVA rush hardening therapy 査読あり *Br J Dermatol.* 2012;167:198-201.

Ogura K, Fukunaga A, Taguchi K, Nagai H, Yu X, Oniki S, Okazawa H, Matozaki T, Horikawa T, Nishigori C. The Rho kinase pathway regulates the migration of dendritic cells through SIRP- α . 査読あり *J Dermatol Sci.* 2012;66:74-76.

Hatakeyama M, Fukunaga A, Shimizu H, Oka M, Horikawa T, Nishigori C. Drug fever due to S-carboxymethyl-L-cysteine: The demonstration of a causative agent with patch tests. 査読あり *J Dermatol.* 2012;39:555-556.

Fukunaga A, Shimizu H, Tanaka M, Kikuzawa A, Tsujimoto M, Sekimukai A, Yamashita J, Horikawa T, Nishigori C. Limited influence of aspirin intake on mast cell activation in patients with food-dependent exercise-induced anaphylaxis: comparison using skin prick and histamine release tests. 査読あり *Acta Derm Venereol.* 2012;92:480-483.

Fukunaga A, Washio K, Ogura K, Taguchi K, Chiyomaru K, Ohno Y, Masaki T, Nagai H, Nagano T, Oka M, Nishigori C. Onychomycosis as a Warning Sign for Peripheral Arterial Disease. 査読あり *Acta Derm Venereol.* 2013;93:747-748.

Tian H, Matsuo Y, Fukunaga A, Ono R, Nishigori C, Yodoi J. Thioredoxin ameliorates cutaneous inflammation by regulating the epithelial production and release of pro-inflammatory cytokines. 査読あり Front Immunol. 2013;4:269.

Washio K, Fukunaga A, Terai M, Hitomi K, Yamanishi K, Nishigori C. Hypohidrosis plays a crucial role in the vicious circle of bathing suit ichthyosis: a case with summer exacerbation. 査読あり Acta Derm Venereol. 2014;94:349-350.

Ogawa S, Fukunaga A, Kanata M, Kikuzawa A, Bito T, Otsuka Y, Sekiguchi K, Oka N, Nishigori C. Neurolymphomatosis associated with erythrodermic mycosis fungoides. 査読あり Acta Derm Venereol. 2014;94:227-228.

Shimoura N, Fukunaga A, Nagai H, Oka M, Nishigori C. Epstein-Barr Virus Associated Methotrexate-induced Accelerated Rheumatoid Nodulosis. 査読あり Acta Derm Venereol. 2015;95:100-101

Fukunaga A, Hatakeyama M, Tsujimoto M, Oda Y, Washio K, Nishigori C. Steroid treatment can improve the impaired quality of life of patients with acquired idiopathic generalized anhidrosis. Br J Dermatol. 2015;172:537-538.

〔学会発表〕(計 9 件)

Hai Tian, Atsushi Fukunaga, Kumiko Taguchi, Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Yoshiuki Matsuo, Junji Yodoi, Chikako Nishigori Thioredoxin Suppresses Irritant Dermatitis to Croton Oil via the Inhibition of Cytokines and Chemokines Produced by Keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology

福永淳 物理性蕁麻疹およびコリン性蕁麻疹の診断と治療 第111回日本皮膚科学会総会(教育講演)

福永淳、畠山真弓、千代丸康治、永井宏、長野 徹、岡昌宏、錦織千佳子(神戸大)、西谷奈生、正木太朗(西宮市立中央病院) 角質増殖型足白癬、爪白癬は末梢性動脈疾患の重要なサインである 第111回日本皮膚科学会総会

小倉香奈子、清水秀樹、千貫裕子、福永淳、錦織千佳子 食物依存性運動誘発アナフィラキシーにおけるミソプロストールまたはクロモグリク酸ナトリウム前投与による症状

抑制の検討 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会

下浦典子、福永淳、末廣尚美、永井宏、尾藤利憲、岡昌宏、錦織千佳子、神澤真紀、伊藤智雄 M T X 関連リンパ増殖症と M T X 誘導性多発リウマチ結節を合併した皮膚筋炎、関節リウマチの一例 第112回日本皮膚科学会総会

小川聡、福永淳、菊澤亜夕子、尾藤利憲、錦織千佳子、大塚喜久*、関口兼司、岡伸幸 Neurolymphomatosis により末梢神経障害を呈した紅皮症型菌状息肉症の一例 第112回日本皮膚科学会総会

福永淳 専門医試験に必要なアレルギー・光線検査 第65回日本皮膚科学会中部支部学術大会(専門医対策の教育講演1)

仲田 かわり、田島 翔子、小野 竜輔、福永淳、錦織 千佳子 当科で経験した日光蕁麻疹22例の検討 第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会

畠山 真弓、福永淳、鷲尾 健、小倉 香奈子、山田 陽三、錦織 千佳子 難治性コリン性蕁麻疹における H2 受容体拮抗薬ラファジンの臨床効果の検討 第44回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

福永 淳 (Fukunaga, Atsushi)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10467649

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：