

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461706

研究課題名(和文)慢性そう痒性皮膚疾患の病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology of pruritic dermatosis and development of treating medicine

研究代表者

相原 道子(AIHARA, Michiko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90231753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー皮膚炎(AD)におけるコラーゲントリペプチド(CTP)の効果をみた。1.培養ケラチノサイトにCTPを炎症性サイトカインやTh2サイトカインとともに添加したところ、CTPはTARC, MDS, TSLPのmRNAの発現を減弱させた。神経因子には影響をみなかった。CTPをアトピー性皮膚炎患者に3ヶ月投与したところ、かゆみを抑制した。

また、ADにおいて、ペリオスチン(PO)が皮膚のかゆみ神経と免疫細胞の両者に直接作用する可能性を示した。PO刺激で線維芽細胞ではSema3Aの発現の低下とNGFの発現の亢進を、末梢血単核球ではIL-18とTNF- α の発現の上昇をみた。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis is a highly pruritic disease. We assessed effects of collagen tripeptide (CTP); a highly purified, non-antigenic, low allergenic collagen fraction. Because CTP had been shown to have some effects on nerve growth factor (NGF) and semaphorin-3A (Sema3A) to suppress C-fiber extension in mice skin. In the results, CTP suppressed production of TARC, MDS, TSLP in keratinocytes cultured with inflammatory and Th2 cytokines. In AD patients, CTP-administration for 3 months suppressed pruritus. In conclusion, CTP administration may useful for AD treatment, especially to control pruritus. Periostin (PO) plays an important role in AD. We assessed effects of PO on the cultured cells. In the results, PO suppressed Sema3A production and promoted NGF production in the fibroblast and increased IL-18 and TNF- α production in peripheral mononuclear cells. PO may affect pruritus and immune cells in AD patients.

研究分野：皮膚科学、アレルギー学

キーワード：アトピー性皮膚炎 かゆみ コラーゲントリペプチド セマフォリン3A

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに痒痒性皮膚疾患において表皮内神経伸長と神経反発因子である semaphorin 3A(Sema3A)の発現低下および神経成長因子(NGF)の発現亢進との関係を明らかにし、Sema3A の投与が痒痒の改善に結びつくことをマウスで明らかにした。また、乾皮症モデルマウスおよび培養細胞を用いてコラーゲントリペプチドの経口投与がヒアルロン酸の産生亢進に加えてケラチノサイトの Sema3A と NGF の発現異常を是正し、神経伸長と痒みを抑制することを明らかにした。これらは、Sema3A 発現を皮膚に誘導する物質を経口投与することによる痒みの新規治療を示唆するものである。また、これまで、低分子ヒアルロン酸を用いて動物に投与実験を行い、保湿作用に加えて炎症抑制作用を示唆する結果を得ている(未発表データ)。

一方、近年 matricellular protein で組織の remodeling に関与する periostin がアトピー性皮膚炎(AD)患者皮膚で発現亢進していることが報告された。Periostin によるケラチノサイトからの TSLP をはじめとするサイトカインの産生誘導が AD の発症・増悪に関与することが示唆されているが、かゆみとの関係は明らかにされていない。

AD のバイオマーカーは好酸球や IgE、TARC などがあり、とくに TARC は病勢をよく反映することが知られているが、皮疹以外の因子の影響がみられることから、より AD の病勢を反映するバイオマーカーが求められている。Periostin もバイオマーカーになりうるが、SCCA (squamous cell carcinoma antigen) もその候補となる。SCCA は SCCA1 と SCCA2 があり、扁平上皮癌で血液中に上昇する。これらは皮膚の炎症性疾患でも上昇することが観察されているが、病態と関係づけた詳細な検討はない。

2. 研究の目的

本研究では AD や乾癬などの慢性痒痒性皮膚疾患における Periostin 産生の病態における意義と Periostin 神経表皮内神経伸長に関わる因子(Sema3A、NGF)や痒みに関するサイトカインとの関係について明らかにすることを目的とした。さらにこれらをコントロールする新規治療薬としての CTP や低分子ヒアルロン酸の開発を目指した。また、AD の新規バイオマーカーの検索も行った。

3. 研究の方法

(1) 慢性痒痒性皮膚疾患における Periostin の臨床的意義および Periostin が神経関連因子やサイトカイン産生におよぼす影響の検討

AD、乾癬患者および健常人の血液中の periostin を測定し、臨床症状、検査値(血清 IgE、末梢血好酸球数、血清 TARC 値)との関係をみた。臨床症状は病型ごとに分けて検

討した。さらに病変部から採取した皮膚生検組織を用いて免疫組織学的染色を行い、発現部位を確認した。また、治療が periostin の発現に及ぼす影響をみた。

次に、培養ヒト皮膚線維芽細胞と表皮ケラチノサイト、末梢血単核球をリコンビナント periostin で刺激し培養上清中の Sema3A と NGF およびサイトカインを測定した。また、培養細胞上のこれらの発現をタンパクおよび mRNA レベルで検討した。

(2) CTP の効果発現におけるメカニズムの検討

培養ケラチノサイトを前炎症性サイトカインや Th2 サイトカインで刺激し、さらに CTP を添加して、培養細胞の炎症性サイトカインや NGF および Sema3A 産生に及ぼす影響を検討した。

CTP を細胞内に取り込むペプチドトランスポーターについては小腸上皮に発現していることはこれまでに報告されているが、ケラチノサイトに関する報告はない。そこで、ペプチドトランスポーターがケラチノサイト上に発現しているかを培養細胞を用いてタンパクレベルおよび mRNA レベルで確認した。

(3) AD、乾皮症、痒痒患者に濃縮 CTP 製剤を 4, 8, 12 週間投与し、その前後で観察および採血し、臨床症状(紅斑、丘疹、乾燥、掻破痕、かゆみ)や皮膚バリア機能(経表皮水分蒸散量、TEWL)に及ぼす効果および TARC 等のバイオマーカーの変化との関係をみた。

(4) 低分子ヒアルロン酸の AD および乾皮症における効果の検討

低分子ヒアルロン酸を培養細胞に添加し、サイトカイン産生への影響をみた。また、アセトン処置を行なった乾皮症モデルマウスおよび NC/Nga マウスにヒアルロン酸を 2 週間連日塗布し、皮膚の乾燥や掻破行動、表皮および真皮内神経伸長・増殖と Sema3A および NGF への影響をみた。

(5) Sema3A ノックアウトマウスを用いた皮膚の正常構築における Sema3A の影響の研究

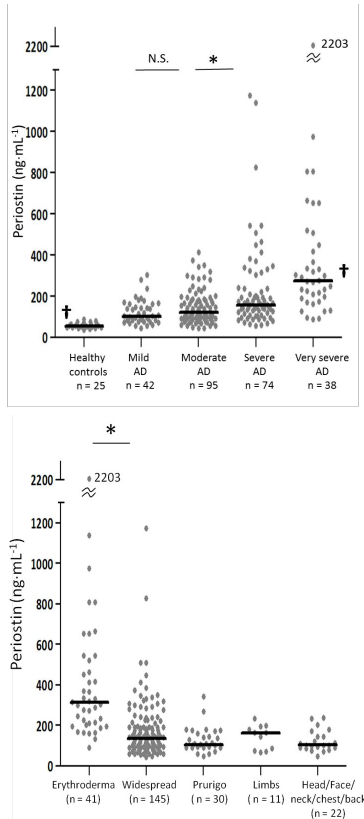
既に作成されている Sema3A ノックアウトマウスを用いて皮膚の正常構築における Sema3A 欠損の影響をみた。

(6) AD の病態における SCC の役割とバイオマーカーとしての異議についての検討

AD 患者血液中の SCCA1、SCCA2 を測定し、臨床症状や AD のバイオマーカーとの関係をみた。さらに、皮膚免疫学的染色結果と合わせて血液中の SCCA が AD の病勢を反映することかを検討した。同様の検討を乾癬患者についても行った。

4. 研究成果

(1) AD 患者において血液中 Periostin 値は有意に上昇し、紅皮症や苔癬化をきたした AD で特に著しい上昇をみた。Periostin は AD のバイオマーカーである末梢血好酸球数や TARC と相関を示し、治療により低下した。乾癬患者の血液中 Periostin 値も測定し、上昇をみたが AD 患者より低値であった。このことは Periostin が AD の慢性炎症および難治化の指標となることを示唆した。(下図)



また、培養細胞を用いた実験では periostin で刺激したところ、線維芽細胞では Sema3A の発現の低下と NGF の発現の亢進をみた。一方、ケラチノサイトでは有意な変化はみられなかった。末梢血を用いた実験では、LPS の存在下で健常人と AD 患者ともにペリオスチンの刺激で IL-18、TNF- α 、IL-1 の発現が上昇した。IL-1 α 、IL-6、IL-8 の発現に変化は見られなかった。また、AD における発現は健常人より著しかった。以上の結果はペリオスチンが皮膚のかゆみ神経の伸長に影響を及ぼすとともに免疫細胞に直接作用することにより AD の炎症を慢性化させる可能性を示唆した。

(2) 培養ケラチノサイトに様々な炎症性サイトカインと Th2 サイトカインを組み合わせることで添加したところ、IL-13、TNF- α 、IFN- γ の同時添加時に TARC、MDS、TSLP の mRNA の発現が亢進したが、CTP を添加するとその発現が減弱した。また、上記培養上清を用いた chemotaxis assay では CTP は末梢血単核球の走化性を抑制した。一方、NGF

および Sema3A 産生には有意な影響はみられなかった。さらに CTP を細胞内に取り込むペプチドトランスポーターがケラチノサイトにも発現していることを mRNA レベルで明らかにした。

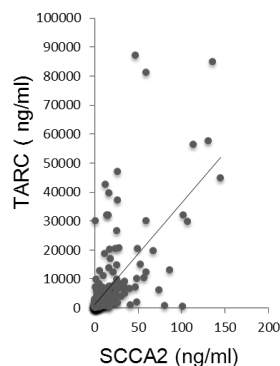
(3) CTP の AD 患者への投与は 1 ヶ月では明らかな効果が見られなかったため、投与期間が短かったことが問題と考え、3 ヶ月に延長して投与した。患者を 2 群にわけ、ダブルブラインド方式で通常量の CTP と高用量の CTP をそれぞれ 12 名の患者に投与した。その結果、高用量 CTP 投与群で低用量 CTP 投与群より明らかなかゆみの抑制をみた。血液検査では好酸球の低下を見たが血清 IgE 値は有意な低下を見なかった。皮膚バリア機能はいずれも有意な変化はなかったが、これは投与期間が長期にわたったため季節的な環境変化が影響したと思われる。

(4) 低分子ヒアルロン酸の効果は培養細胞において Th1 サイトカインの産生亢進と Th2 サイトカインの産生低下が傾向として観察されたが有意な差としてはみられなかった。また、明らかな神経関連因子の発現への影響はみられなかった。乾皮症および AD モデルマウスに塗布した実験では、皮疹の軽度の改善が見られたが、個体差が大きく有意な改善とまではいえなかった。

(5) Sema3A ノックアウトマウスを用いた皮膚の正常構築における Sema3A の影響の研究では、表皮の菲薄化がみられたものの、AD 様の皮疹や搔破行動の増加はみられなかった。

(6) 血液中の SCCA1、SCCA2 は AD 患者で高値であり、重症度と相関した。特に SCCA2 が高値であり、SCCA1 が高値の扁平上皮癌とは異なった。苔癬化の見られる皮膚で高く、痒疹では低いという結果であった。末梢血好酸球数や TARC と相関したが、血液中 IgE 値とは弱い相関しか示さなかった。皮膚免疫学的染色では重症ほど濃く染色された。乾癬患者にも同様の検討を行い、重症度と相関して高値であることが示されたことから、疾患特異性はなかった。

R=0.627, p=0.000, n=245



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14件)

Elevation of serum squamous cell carcinoma antigen 2 in patients with psoriasis: associations with disease severity and response to the treatment. Watanabe Y, Yamaguchi Y, Komitsu N, Ohta S, Azuma Y, Izuhara K, Aihara M. Br J Dermatol. 2016 Jan 29. doi: 10.1111/bjd.14426. Epub ahead of print. 査読有

Saeki H, Nakahara T, Tanaka A, Kabashima K, Sugaya M, Murota H, Ebihara T, Kataoka Y, Aihara M, Etoh T, Katoh N; Committee for Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis of Japanese Dermatological Association: Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. J Dermatol, doi:10.1111/1346-8138.13392. Epub ahead of print, 2016. 査読有.

中村史雄, 五嶋良郎, 相原道子: 皮膚における神経免疫クロストーク. 最新医学, 71(2):216-222, 2016, 査読無.

Aihara M, Kano Y, Fujita H, Kambara T, Matsukura S, Katayama I, Azukizawa H, Miyachi Y, Endo Y, Asada H, Miyagawa F, Morita E, Kaneko S, Abe R, Ochiai T, Sueki H, Watanabe H, Nagao K, Aoyama Y, Sayama K, Hashimoto K, Shiohara T: The efficacy of additional intravenous immunoglobulin to steroid therapy in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis, J Dermatol, 42(8):768-777, 2015. 査読有
doi:10.1111/1346-8138.12925.

Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis. Arima K, Ohta S, Takagi A, Shiraishi H, Masuoka M, Ontsuka K, Suto H, Suzuki S, Yamamoto K, Ogawa M, Simmons O, Yamaguchi Y, Toda S, Aihara M, Conway SJ, Ikeda S, Izuhara K. Allergol Int. ;64(1):41-48, 2015. 査読有

相原道子: 内因性アトピー性皮膚炎. アレルギー, 64(5):733-734, 2015, 査読なし.

井上雄介, 相原道子: 特集 アトピー性皮膚炎の克服 - よくわかる最新動向 臨床症状と経過. 小児科, 56(7):913-918, 2015. 査読なし.

侯 建全, 大川智子, 山口由衣, 相原道子: ペリオスチンは成人アトピー性皮膚炎患者の重症度と慢性化に関連する. アレルギーの臨床, 35(7):687-690, 2015.

査読なし.

Katayama I, Kohno Y, Akiyama K, Aihara M, Kondo N, Saeki H, Shoji S, Yamada H, Nakamura K, Japanese Society of Allergology: Japanese Guideline for Atopic Dermatitis 2014. Allergol Int, 63(3):377-398, 2014.

Doi:10.2332/allergolint.14-RAI-0769. 査読有.

Inoue Y, Kambara T, Murata N, Komori-Yamaguchi J, Matsukura S, Takahashi Y, Ikezawa Z, Aihara M: Effects of Oral Administration of Lactobacillus acidophilus L-92 on the Symptoms and Serum Cytokines of Atopic Dermatitis in Japanese adults: a double-blind, randomized, clinical trial. Int Arch Allergy Immunol, 165(4):247-254, 2014.

doi:10.1159/000369806. 査読有.

Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, Ono J, Inoue Y, Kohno M, Matsukura S, Kambara T, Ohta S, Izuhara K, Aihara M: Periostin levels correlate disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol, 171:283-291, 2014.

doi:10.1111/bjd.12943. 査読有.

Fujita H, Inoue Y, Seto K, Komitsu N, Aihara M: Interleukin-37 is elevated in subjects with atopic dermatitis. J Dermatol Sci, 69:173-175, 2013.

doi:10.1016/j.j.D dermtol sci.2012.11.001. 査読有.

Takada S, Kou K, Nagashima Y, Ikezawa Z, Aihara M: Aberrant epidermal expression of semaphorin 3A and nerve growth factor in prurigo nodularis. J Dermatol, 40:404-406, 2013.

doi:10.1111/1346-8138.12085. 査読有.

五嶋良郎, 相原道子: セマフォリンを用いたアトピー性皮膚炎治療の可能性. 実験医学, 31:488-494, 2013, 3. 査読無.

[学会発表](計7件)

Watanabe Y, Yamaguchi Y, Komitsu N, Aihara M: Leptin may enhance IL-6 production via decreased expression of caveolin-1 in human keratinocytes. The 40th JSLD, Okayama Convention Center(Okayama), 2015, 12, 12.

Okawa T, Yamaguchi Y, Kou K, Ono J, Inoue Y, Kohno M, Matsukura S, Kambara T, Ohta S, Izuhara K, Aihara M: The serum levels of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 are associated with severity and clinical types of atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Hotel

Hankyu Expopark(Osaka), 2014,12,10.
相原道子：ランチョンセミナー4 皮膚アレルギーを究める アトピー性皮膚炎における新規バイオマーカー. 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, 仙台国際センター(宮城), 2014,11,23.

Yamaguchi Y, Komitsu N, Arima K, Izuhara K, Aihara M : Periostin may promote production of extracellular matrix by modulating TGF- signaling in human skin fibroblasts. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, Boston Convention & Exhibition Center(Boston), 2014,11,17

Yamaguchi Y, Kou K, Okawa T, Ono J, Inoue Y, Kohno M, Matsukura S, Kambara T, Ohta S, Izuhara K, Aihara M : Periostin as a novel clinical biomarker of disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. The 30th CIA, Steigenberger Hotel(Petersberg), 2014,9,15.

大川智子, 侯 建全, 山口由衣, 河野真純, 松倉節子, 蒲原 毅, 小野純也, 太田昭一郎, 出原賢治, 相原道子: アトピー性皮膚炎患者における血清ペリオスチンの値の検討. 第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, ホテル日航金沢(石川), 2013,11,30.

侯 建全, 大川智子, 山口由衣, 小野純也, 太田昭一郎, 出原賢治, 相原道子: アトピー性皮膚炎患者における血清ペリオスチン変動の臨床的意義. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜(神奈川), 2013,5,11.

〔図書〕(計2件)

相原道子：アトピー性皮膚炎．医学書院(東京), 今日の小児 治療指針(総編集 水口 雅, 市橋 光, 崎山 弘),2015, 1028, 830-831.

一般社団法人日本アレルギー学会「アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2015」作成委員(委員：相原道子, 他)アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2015(片山一朗監修), 協和企画(東京), 103, 2015.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

相原 道子 (AIHARA, Michiko)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：90231753

(2)研究分担者

五嶋 良郎 (GOSHIMA, Yoshio)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：00153750

出原賢治 (IZUHARA, Kenji)
佐賀大学・医学部
教授
研究者番号：00270463

(3)連携研究者

なし