

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461711

研究課題名(和文)皮膚感作におけるプロテアーゼアレルゲンの役割とその意義

研究課題名(英文) Roles of protease allergen in epicutaneous sensitization

研究代表者

高井 敏朗 (Takai, Toshiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70338375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルゲンへの経皮感作は、アトピー性皮膚炎のみならず、喘息などの他のアレルギー疾患の成立(アレルギーマーチ)にも重要である。ダニや花粉はプロテアーゼを産生・含有し、種々の細胞を刺激・活性化するが、経皮感作におけるその役割は不明であった。本研究では、抗原のプロテアーゼ活性に依存したマウス経皮感作モデルを初めて構築することに成功し、経皮感作におけるアレルゲンのプロテアーゼ活性は感作・皮膚炎症を強力に促進するとともに気道でのアレルギーマーチへの進展に重大な影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epicutaneous sensitization has been considered as an important route for sensitization to allergens not only in atopic dermatitis but also towards other allergic diseases such as asthma (atopic march). Allergen sources such as mites and pollen produce or contain proteases, which can stimulate various types of cells. In this study, we established a murine model of epicutaneous sensitization to protease allergen and demonstrated that the protease activity of epicutaneously administered antigen markedly promoted sensitization and skin inflammation towards development of atopic march in airway.

研究分野：アレルギー学・免疫学・皮膚科学

キーワード：経皮感作 プロテアーゼアレルゲン アレルギーマーチ IgE/Th2/Th17 皮膚炎症 バリア破壊 模擬
引っ掻きモデル 洗剤モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 経皮感作とアレルギー疾患

アトピー性皮膚炎は皮膚バリア破壊によって特徴づけられる疾患である。皮膚バリア機能低下はアトピー性皮膚炎の重要な病因であるとともに、経皮の感作ルートはアトピー性皮膚炎以外のアトピー疾患（喘息など）の成立（皮膚炎症を起点とした乳幼児期から始まるアレルギーマーチ）にも重要である。皮膚感作は小児のみならず成人においても重要である。社会問題となった小麦加水分解抽出物を含む石鹸の使用による成人の小麦アレルギー発症は記憶に新しい。

(2) プロテアーゼアレルギー

ダニ排泄物や花粉などのアレルギー原因物質はプロテアーゼを含有する。ダニ由来プロテアーゼアレルギーは、細胞間タイトジャンクション分子や気道上皮プロテアーゼインヒビターを切断し、プロテアーゼ活性依存的に様々な細胞を刺激することが報告されている。プロテアーゼアレルギー依存的マウス気道炎症モデルの作用機序解明が急速に進展している。一方、皮膚表面からのプロテアーゼアレルギー吸収感作によって皮膚炎症および IgE 産生を誘導する（つまりヒトにおける実際の感作ルートを反映した）マウスモデルの報告はなく、皮膚感作における *in vivo* でのプロテアーゼアレルギーの役割は不明である。

(3) 本研究の着想に至る背景

我々は、アレルギーの構造・機能によって誘導される自然免疫応答や、アレルギー疾患に付随して観察される微生物・ウイルスによる、「広義の Th2 アジュバント活性」に着目して研究を進めてきた。すなわち、それらの因子によるバリア破壊、細胞刺激活性、*in vivo* 免疫応答、そして物質レベルの解析を行ってきた。我々の究極の目標は、感作相（組織バリア障害 上皮・表皮の応答 免疫応答修飾）から効果相まで、物質から細胞・個体まで、多層的 / 多角的に解析することにより、アレルギー疾患における遺伝子-環境相互作用の実態を明らかにし、治療・予防に役立てることである。

プロテアーゼ活性等のアレルギーの特性に依存した「アレルギーに対する自然免疫応答」は感作相および効果相において重要な役割を担っており、予防・治療の新たな標的となり得る（Review: 高井 実験医学 2009, 2013）。呼吸器アレルギーについては、スギ花粉（Kamiyo S et al. J Immunol 2009）やプロテアーゼアレルギー（Kamiyo et al. JI 2013）の吸入感作による独自のマウスモデルを構築し、検討を行ってきた。一方、皮膚感

作については、プロテアーゼアレルギーのケラチノサイト刺激活性（Kato T et al. J Allergy Clin Immunol 2005; Allergy 2009）および皮膚バリア減弱能（ダニアレルギー Der f 1: Nakamura T et al. J Invest Dermatol 2006 および黄色ブドウ球菌 V8 プロテアーゼ: Hirasawa Y et al. J Invest Dermatol 2010）を、我々が世界に先駆け報告してきた。*in vivo* で全体像を把握する高次の解析を行うことを目的として、皮膚炎症や IgE 産生を伴う経皮吸収感作の独自のマウスモデル構築を含む本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プロテアーゼアレルギーを用いたマウス皮膚感作モデルを構築し、初期の自然型応答および続いて誘導される獲得免疫依存的応答を解析することによって、皮膚からの感作におけるプロテアーゼアレルギーの役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) マウス

6-13 週齢の雌マウスを使用した。マウス系統は C57BL/6N、C57BL6J、ヘアレスマウス（Skh:HR1）を使用した。遺伝子改変マウスは IL-33 欠損マウス（C57BL/6N 背景。中江進博士、斎藤博久博士より供与）と TSLP 受容体欠損マウス（C57BL/6J 背景。Steven Ziegler 博士より供与）を使用した。SPF 施設においてマウスの飼育を行い、順天堂大学動物実験委員会のガイドラインを遵守して使用した。

(2) 抗原

パパイン、V8 プロテアーゼ、卵白アルブミン（OVA）を使用した。パパインは食肉加工に用いられるパパイヤ由来のプロテアーゼであるが、ダニ主要アレルギー Der p 1/Der f 1 と同じシステインプロテアーゼファミリーに属することから、ダニ等の環境アレルギーに含有されるプロテアーゼアレルギーのものである抗原として使用した。アトピー性皮膚炎患者の皮膚では黄色ブドウ球菌の繁殖が見られるが、V8 プロテアーゼは黄色ブドウ球菌が分泌産生するプロテアーゼである。

一部の実験では、パパインを不可逆的システインプロテアーゼ阻害剤である E64 と反応させた後、透析処理することにより E64 とパパインが 1 対 1 で共有結合した標品を調製し、使用した（E64-パパイン）。対照として、E64 の添加は行わずに、しかしそれ以外は全く同じ操作によって処理を行ったパパイン標品を調製し使用した。

(3) 経皮感作

抗原の経皮投与は、抗原溶液の C57BL/6 マウスへの耳介塗布、あるいは抗原溶液をしみこませた濾紙のヘアレスマウス背部密封塗布によって行った。耳介抗原塗布は、未処置の耳介あるいはテープストリッピング処理を行った耳介、界面活性剤 (SDS) 処理を行った耳介のいずれかに対して行った。テープストリッピングは引っ掻き等の機械的バリア破壊を、SDS 処理はシャンプー・化粧品・洗剤等に含有される界面活性剤によるバリア破壊を模した操作である。

(4) 経皮水分蒸散量 (transpepidermal water loss: TEWL)

Mobile Tewameter (Courage + Khazaka Electronic GmbH, K.In, Germany) を使用して測定した。

(5) 耳介腫脹測定および組織標本

Dial thickness gauge (Ozaki, Tokyo) を使用して測定した。耳介をホルマリン固定・パラフィン包埋後に切片を切片を作製しヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

(6) 血清中抗体

血清中総 IgE 濃度はサンドイッチ ELISA によって測定した。抗原特異的 IgE および IgG1 の評価は、抗原を固定化したプレートへの抗体結合を吸光度にて比較することによって行った。

(7) リンパ節細胞の再刺激実験

耳介皮膚の所属リンパ節である頸部リンパ節を回収した。これを抗原の存在下で培養し再刺激した。培養上清を回収し測定キットを用いてサイトカイン濃度を測定した。

(8) 点鼻抗原チャレンジおよび気道炎症の評価

アレルギーマーチを模して、経皮感作後に抗原を点鼻投与した。肺胞洗浄液を回収し、細胞数を計数した。サイトスピン標本の Diff-Quick 染色後に顕微鏡観察によって細胞種別の計数を行った。

(9) 統計解析

t-test あるいは Mann-Whitney U test、ANOVA 解析後の Tukey post hoc test などにより統計解析を行った。P < 0.05 の場合に統計的有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) バリア破壊操作を伴わない皮膚を介したプロテアーゼ感作モデル
パパインおよび V8 プロテアーゼの背部への

貼付は TEWL と血中 IgE 濃度の上昇を誘導した。パパインの特異的 IgG 上昇も認められた。

パパインの耳介塗布は特異的 IgE および IgG の上昇を誘導した。IgG のサブクラスの中では IgG1 が最も強く誘導された。これに対し、E64-パパインの抗体誘導能は顕著に低かった。

以上より、プロテアーゼ抗原は皮膚バリア破壊を誘導するだけでなく、経皮的な投与によって高い IgE および IgG 産生誘導能をプロテアーゼ活性に依存的に発揮することが初めて明らかになった。以上の結果を論文報告した (Iida et al. Allergol Int 2014)。

(2) テープストリッピング後の皮膚を介したプロテアーゼ感作モデル

テープストリッピングとパパイン塗布を組み合わせたモデルを構築した。両者の組み合わせは、皮膚炎症 (耳介腫脹・表皮の過形成と細胞間浮腫・真皮の肥厚と細胞浸潤) や炎症性サイトカイン・成長因子の遺伝子発現上昇・血清中特異的 IgE/IgG1 産生の促進において相乗的な効果を発揮した。抗原特異的 Th2/Th17 分化が強力に誘導され、Th1 分化も誘導された。これに対し、テープストリッピング後の E64-パパイン塗布や OVA 塗布ではこれらの応答は誘導されないか低応答であったが、OVA とパパインを組み合わせると OVA 特異的抗体の誘導が促進された。IL-33 欠損マウスや TSLP 受容体欠損マウスでも野性型マウスと同様の応答が誘導された。

経皮感作後にパパインを点鼻投与するモデルを検討したところ、少量のパパインの経鼻投与によって、好酸球浸潤を主体とするアレルギー性気道炎症が誘導されるとともに特異的 IgE 抗体価が低下せず維持されることがわかった。しかし、これらの効果は IL-33 欠損マウスでは認められなかった。

以上より、抗原のプロテアーゼ活性と機械的バリア破壊 (テープストリッピング) の組み合わせは、皮膚炎症と経皮感作の促進において相乗的に働くこと、共存する非プロテアーゼ抗原に対するアジュバント作用を発揮することが明らかになった。また、経皮感作によって少量のプロテアーゼ抗原の経鼻チャレンジに対する応答性が獲得され、アレルギーマーチへの進展への関与が示唆された。IL-33 は経皮感作相における皮膚炎症・IgE 産生には必要ではないが、経皮感作後のアレルギー性気道炎症の発症には重要であることがわかった。以上の結果を論文報告した (Shimura et al. J Invest Dermatol 2016)。

(3) SDS 処理後の皮膚を介したプロテアーゼ感作モデル
皮膚の SDS 処理とパパイン塗布を組み合わせ

たモデルを構築した。両者の組み合わせは、血清中特異的 IgE/IgG1 産生と皮膚炎症を促進した。この応答は SDS 処理と OVA の組み合わせでは認められなかった。皮膚炎症促進の効果は、テープストリッピングと比較すると格段に弱かった。IL-33 欠損マウスは野性型マウスと同等の IgE/IgG1 応答を示したが、TSLP 受容体欠損マウスは低い IgE/IgG1 応答（ただし部分的な低下）を示した。

経皮感作後にパピンを点鼻投与するモデルを検討したところ、少量のパピンの経鼻投与によって、好塩球浸潤を主体とするアレルギー性気道炎症が誘導されるとともに特異的 IgE 抗体価が低下せずに維持された。これらの効果は IL-33 欠損マウスでは認められなかった。一方、TSLP 欠損マウスでは気道炎症の低下傾向がみられ、経皮感作期間を延長したモデルにおいて野性型マウスとの統計的有意差が示された。経皮感作後の点鼻抗原チャレンジ前の時点での皮膚の所属リンパ節細胞の再刺激実験での IL-5 および IL-13 産生は、野性型マウスでは SDS 処理とパピンの塗布の組み合わせにより上昇したが、TSLP 受容体欠損マウスでは有意な上昇は見られなかった。IL-17A 産生についても同じ傾向を認めた。

以上より、抗原のプロテアーゼ活性と皮膚の界面活性剤処理の組み合わせは、経皮感作と皮膚炎症の促進において相乗的に働くことが明らかになった。テープストリッピングモデルとの相違点として、皮膚炎症が弱いこと・IgE/IgG1 誘導が部分的に TSLP 受容体に依存することがあげられる。経皮感作によって少量のプロテアーゼ抗原の点鼻チャレンジに対する応答性が獲得されるが、皮膚の界面活性剤処理によってその応答性が増強され、以上の結果を論文報告した (Ochi et al. J Invest Dermatol 2017, in press)。

(4) その他

経皮感作モデルと共に耳介への皮下注射モデルによって皮膚炎症を誘導する新規モデルを構築し、論文報告した (Kamijo et al. J Immunol 2016)。経皮感作モデルとは異なる特徴も観察された。

経皮感作の際の種々の細胞の役割については不明な点が多く、今後、検討を進める必要がある。好塩球の応答について *in vitro* で検討を行った。プロテアーゼアレルギー (パピンおよびダニ主要アレルギー)・アレルギー原因花粉 (スギ・ヒノキ・ブタクサ・イネ科)・エンドトキシン (LPS)・IL-33・IL-18 による刺激のいずれにおいても、IL-4 分泌が誘導され、この応答が Fc 受容体 鎖あるいは Fc 受容体 鎖-Syk キナーゼ経路に依存することを見いだした (Kamijo et al. J

Allergy Clin Immunol 2016)。これらの様々な刺激にはアレルギー曝露部位において発生するという共通点があるが、IL-4 産生において機序を共有している点が興味深い。

(5) まとめ

プロテアーゼアレルギーが強力な経皮感作能を発揮することを *in vivo* で初めて明らかにし、一連の論文によって公知のものとした。主な新知見を以下にまとめて整理する。

- ・ プロテアーゼアレルギーはそのままのマウス耳介に直接塗布するだけでも強力な感作能を有するが、機械的バリア破壊操作や界面活性剤による皮膚処理と組み合わせると、相乗的にさらに強力な感作能を発揮する。
- ・ これらの応答はプロテアーゼ活性に依存しており、プロテアーゼ阻害剤で抗原を処理した場合や非プロテアーゼ抗原はこのような強い感作能を持たない。
- ・ プロテアーゼ経皮感作は IL-33 に依存せず、近年精力的に解明が進められた IL-33 依存のプロテアーゼ経皮感作モデルと機序を異にする。
- ・ 経皮感作の機序機械的バリア破壊モデルと界面活性剤処理モデルでは応答や機序が異なる。前者の皮膚炎症は後者よりも激しい。後者は TSLP 経路に一部依存するが前者は依存しない。
- ・ 経皮感作後には少量のプロテアーゼアレルギーの吸入によってアレルギー性気道炎症 (アレルギーマーチ) と特異的 IgE 抗体価が維持され、この応答は IL-33 に依存する。
- ・ 経皮感作相の機序は IL-33 非依存적であり、TSLP には非依存적経路と依存적経路の両方が存在する。気道におけるアレルギーマーチ効果相は IL-33 欠損によって抑止できる。経皮感作相での TSLP 経路欠損によってもアレルギーマーチ効果相を抑止できる。
- ・ 皮下注射感作・皮膚炎症モデルを構築し、特徴・機序を解析した。
- ・ *in vitro* での好塩球の応答を解析し、プロテアーゼアレルギーを含む外来および内在性刺激に対する IL-4 応答の機序の一端を明らかにした。

(6) 結論

本研究により、実際の環境中のアレルギー原因物質 (allergen sources) (ダニ・昆虫・カビ・花粉など) に含有されるプロテアーゼアレルギーが、引っ掻きや洗剤などによる後天的なバリア破壊とあいまって、経皮抗原感作と皮膚炎症を促進し、アレルギーマーチへの進展に重要な役割を担うことが示唆され

た。また、その機序は経呼吸器感作とは異なり、後天的な皮膚バリア破壊の種類によっても異なることが示唆された。

プロテアーゼアレルゲンに対する経皮感作・皮膚炎症の機序はほとんど不明であり、今後の研究の中で解明をすすめる必要がある。

5. 主な発表論文等（研究代表者には下線）

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Ochi H, Takai T, Shimura S, Maruyama N, Nishioka I, Kamijo S, Iida H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Skin Treatment with Detergent Promotes Protease Allergen-Dependent Epicutaneous Sensitization in a Manner Different from Tape Stripping in Mice. *J Invest Dermatol* (2017, in press) 査読有

doi: 10.1016/j.jid.2017.02.970.

Shimura S, Takai T, Iida H, Maruyama N, Ochi H, Kamijo S, Nishioka I, Hara M, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Epicutaneous Allergic Sensitization by Cooperation between Allergen Protease Activity and Mechanical Skin Barrier Damage in Mice. *J Invest Dermatol* (2016)

136:1408-17. 査読有

doi: 10.1016/j.jid.2016.02.810.

Kamijo S, Suzuki M, Hara M, Shimura S, Ochi H, Maruyama N, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Suto H, Ichikawa S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T.

Subcutaneous Allergic Sensitization to Protease Allergen Is Dependent on Mast Cells but Not IL-33: Distinct Mechanisms between Subcutaneous and Intranasal Routes. *J Immunol* (2016)

196:3559-69. 査読有

doi: 10.4049/jimmunol.1500717.

Kamijo S, Nunomura S, Ra C, Kanaguchi Y, Suzuki Y, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Innate basophil IL-4 responses against allergens, endotoxin, and cytokines require the Fc receptor

-chain. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137:1613-1615.e2. 査読有

doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.037.

Iida H, Takai T, Hirasawa Y, Kamijo S, Shimura S, Ochi H, Nishioka I, Maruyama N, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Epicutaneous administration of papain induces IgE and IgG responses in a cysteine protease

activity-dependent manner. *Allergol Int.* (2014) 63:219-26. 査読有
doi: 10.2332/allergolint.13-0A-0621.

〔学会発表〕(計 37 件)

Suchiva P, Takai T, Maruyama N, Iida H, Shimura S, Ochi H, Kamijo S, Nishioka I, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H.

Protease allergen and tape-stripping cooperatively promote epidermal barrier dysfunction and

proinflammatory gene expression in mice. 日本研究皮膚科学会（仙台国際センター，宮城県，仙台市）Dec 9, 2016.

Takai T, Iida H, Shimura S, Ochi H, Maruyama N, Nishioka I, Kamijo S, Hara M, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Ikeda S, Okumura K. Epicutaneous allergic sensitization by synergy between

allergen protease-activity and mechanical skin barrier damage in mice. 31th Symposium of the Collegium

Internationale Allergologicum (CIA) (Charleston, SC, USA) 3-8, Apr, 2016.

Takai T, Kamijo S, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K. Distinct mechanisms for allergic sensitization to protease antigen between skin and

airway. 30th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (CIA) (Petersberg, Germany) Sep 12-18, 2014.

〔その他〕

プレスリリース「アレルゲン皮膚感作の新しい型を発見 ～アレルゲンに触れて引っ掻くとアレルギーが重症化する～」
<http://www.juntendo.ac.jp/news/20160427-01.html>

新聞記事「解剖 先端拠点：順天堂大学 アトピー疾患研究センター 皮膚のバリア解析」
日経産業新聞（2016年11月15日）

新聞記事「ぜんそく悪化仕組み解明 ダニが含むタンパク質 順大、マウス実験」
日経産業新聞（2014年12月12日）

6. 研究組織

研究代表者

高井 敏朗 (TAKAI, Toshiro)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70338375