

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750156

研究課題名(和文) 抗炎症作用と皮膚バリア機能を有する新規アトピー性皮膚炎治療デバイスの創出

研究課題名(英文) Novel topical device for atopic dermatitis through the skin barrier protection and the anti-inflammatory effect

研究代表者

下畑 宣行 (Shimohata, Nobuyuki)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：30419709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、現在の治療法はステロイド外用薬による対症療法が中心となっている。アトピー性皮膚炎患者に見られる皮膚バリア機能障害は、症状の拡大との関連が指摘されておりその改善を目的とした新たな予防・治療法の開発も研究されている。我々は、ある種のポリマーに着目し、ダニ抗原の塗布によって症状を惹起したADモデルマウスを用いて、皮膚バリア機能を付与する新たなアトピー性皮膚炎鎮静剤の開発を行い、その有効性を評価した。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis (AD) is a common inflammatory disease of the skin, which is characterized by xerosis, pruritus, and erythematous lesions. AD arises as a result of the interaction between environmental and genetic factors. Especially, epidermal barrier dysfunction caused by genetic barrier defects is a primary event in the development of AD. In this study, we planned to develop the novel topical device which had the skin barrier protection and anti-inflammatory effect, consisting of candidate material A and B, and evaluated the efficacy of this device using the model mouse which exhibited AD-like lesions.

研究分野：生体医工学

キーワード：炎症抑制 アトピー性皮膚炎 医療機器

1. 研究開始当初の背景

日本皮膚科学会における、アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis; 以下 AD) の定義とは、「増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因をもつ」というものである。アトピー素因は「(1) 家族歴・既往歴 (気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患)、または (2) IgE 抗体を産生しやすい素因」のことを意味している。従って、AD は、遺伝的要因、免疫的要因、外部環境要因が相互に関連して発症し、進行すると考えられる。遺伝的要因としては、免疫に関わる因子だけでなく、皮膚バリア機能を担う構成因子の機能欠損が AD の病態に関わることも報告されており、AD における皮膚バリア機能障害はその改善も含めて重要だと認識されている。更に、AD は強い掻痒感を伴うため病変部において生じる掻破行動が原因である後天的な皮膚バリア破壊も増悪因子の一つとされている。

AD の発症機序には明確でない部分もあり、効果的な根治療法は確立されておらず、対症療法が中心となっているのが現状である。現在行われている治療法としては、ステロイド剤や免疫抑制剤などの外用薬塗布療法が中心であるが、皮膚萎縮や一過性の刺激感などの副作用の問題、適用部位、年齢による制限や免疫抑制剤によるリンパ腫や皮膚癌の発生といった複数の問題点が指摘されており、新たな治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、易感作性系統のマウス (NC/Nga マウス) にダニ抗原を反復塗布することで AD 様症状を惹起させた後、抗炎症作用及び皮膚バリア機能を有する複合型候補治療デバイス (候補物質 A 及び候補物質 B の混合剤) を塗布することで症状の抑制効果が得られるかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 候補物質の皮膚バリア保護機能の有効性評価

皮膚傷害性を有する低分子化合物と、候補物質 A を凍結乾燥して、三次元培養皮膚 TESTSKIN™ LSE-high (TOYOBO) に塗布し細胞傷害性を MTT アッセイにて評価した。

(2) 治療デバイスの構造評価

候補物質 A と低分子化合物の凍結乾燥品を、レーザーラマン分光光度計 RMP-300 (JASCO, 励起光源: 531.9 nm レーザー, スリット幅: 10 µm, レーザー) を使用して、物性評価を実施した。

(3) AD マウスモデルを用いた候補物質の有効性評価

高 IgE を表現型とする NC/Nga マウス (♂) を

SPF 環境下で飼育し実験に用いた。背部を剃毛し、代表的なアレルゲンであるダニ抗原を 2 回週の間隔で 4 週間塗布することで AD 様病態を惹起した。その後 4 週間のステロイド外用剤治療を行い、ステロイド停止後さらに 4 週間の経過観察を行った。ステロイド治療期間およびステロイド停止期間では候補治療デバイスの噴霧も行い、以下の各項目の評価法を実施して有効性を評価した。

耳介厚計測

観察期間中の各点において、耳介部の肥厚の程度をシクネスゲージにて計測した。

背部皮膚症状評価

背部を目視で観察し、SCORAD (European Task Force on Atopic Dermatitis による Severity Scoring of Atopic Dermatitis) に準じて皮膚症状 6 種を抽出し、各種 3 点 (計 18 点満点) で採点、評価した。

掻破行動解析

SCLABA®-Real (NOVELTEC) を用いて、60 分間に行った掻破行動 (秒) を計測した。

組織学的解析

AD モデルマウスの病変部における皮膚切片を採取して組織切片を作製し、Haematoxylin-Eosin (HE) 染色 および Toluidine-Blue (TB) 染色を行った。

(4) 候補治療デバイスにおける炎症抑制効果解析

マウスマクロファージ細胞 (RAW26.7) に LPS (リポポリサッカライド) で処理することで炎症を惹起し、候補デバイス存在下で TNF-α 産生が抑制されるかを ELISA (R & D systems) によって測定した。

4. 研究成果

(1) 候補物質の皮膚バリア機能の有効性評価

皮膚傷害性を有する各 NSAID (Non-steroidal anti-inflammatory drug; インドメタシン、ジクロフェナク、イブプロフェン、ピロキシカム) と候補化合物 A を凍結乾燥し

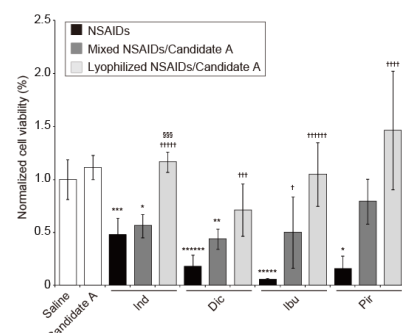


図1 候補化合物による皮膚細胞傷害抑制効果

Mixed は両者を単純に混合したものの、Lyophilized は両者を凍結乾燥したものである。Ind: indomethacin, Dic: diclofenac, Ibu: ibuprofen, Pir: piroxicam,

て三次元培養皮膚 LSE-high に塗布して細胞傷害性を評価したところ、NSAID 単独で塗布した場合と比較して、有意に細胞増殖活性の低下が抑制されていた (図 1)。NSAID 外用薬は接触性皮膚炎を生じることがまれではないため、AD 治療における適用範囲は狭いとされている。本研究において、候補化合物 A によってその皮膚傷害性を大きく低減させることが出来ることが示され、AD 治療における NSAIDs の適用の範囲を広げさせる可能性が示唆された。

(2) 治療デバイスの構造評価

低分子化合物 (aspirin) と候補化合物 A との凍結乾燥品の物性をラマン分光法によって解析した。この凍結乾燥品のラマンスペクトルは、両者のスペクトルの単純な重ね合わせや両者の凍結乾燥を経ない単純混合品のスペクトルとよく似ていたが、いくつかのラマンバンドにおいて明確な差異が見られた (図 2)。この結果は、凍結乾燥操作を経ることで、候補化合物 A と低分子化合物との間に水素結合などの分子間相互作用が生じたことを示唆している。

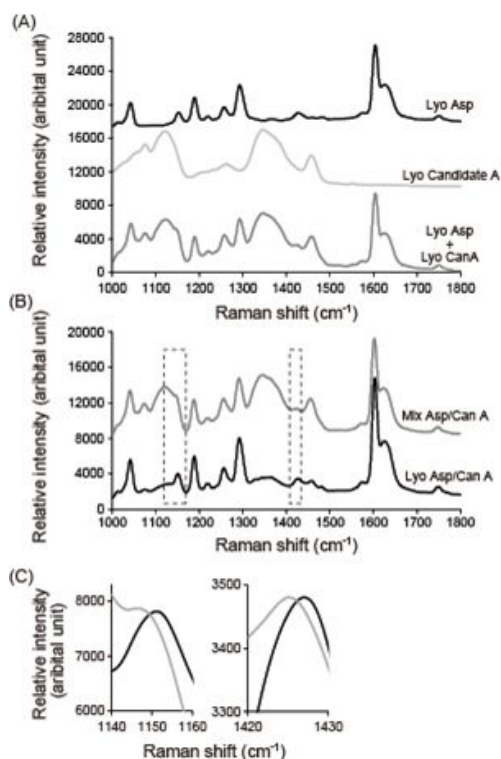


図 2 ラマン分光法による候補化合物 A の物性評価 (A) Lyo Asp: アスピリンの凍結乾燥品のスペクトル, Lyo Candidate A: 候補化合物 A の凍結乾燥品のスペクトル, Lyo Asp + Lyo Can A: 両者のスペクトルの重ね合わせたもの (B) 単純混合品 (Mix Asp/Can A) および凍結乾燥品 (Lyo Asp/Can A) のスペクトル (C) (B) における点線部の拡大図

(3) AD マウスモデルを用いた候補物質の有効性評価

耳介厚計測

耳介部の肥厚を計測したところ、惹起期間は 4 週間で十分であるが、ステロイド単独塗布、治療デバイスとステロイド併用群のいずれにおいても、治療効果については有意な効果は見られなかった。この結果は、特に長期に渡る耳介部の炎症病態では軟骨の過形成など器質的な不可逆病変が起こっていることが原因と考えられた。治療効果の評価には耳介部の肥厚計測は適さない可能性があることが示唆された。

背部皮膚症状評価

SCORAD に準じた形で背部皮膚症状を評価したところ、ステロイド単独治療群では有意な治療効果は見られなかったが、治療デバイス併用群では治療期 1 の終了時において有意な治療効果を示し、治療期 2 の終了時では無処置群と同程度にまで改善していた。この結果から、アトピー性皮膚炎治療において重要な問題の一つである皮膚の炎症症状の改善は、ステロイドだけでは達成することができず、治療デバイスを併用することのみ行うことが明らかとなった。

掻破行動解析

掻破行動は個体差が大きく、いずれの群でもしきりに掻破する個体が見られ、同一時点における治療法ごとの効果の有意な差は見られなかった。しかしながら、ステロイドと治療デバイスを併用した群では治療期終了時に掻破行動は減少したが、ステロイド単独での治療を行った群ではむしろ掻破行動が増加する傾向 (半数以上の個体) が見られ、ステロイド塗布の停止によってこの傾向は解除された。この結果により、ステロイド単独での治療においては、掻痒感を抑制することが難しく、本治療デバイスを併用することで抑制できる可能性があることが示唆された。

組織学的解析

HE 染色による解析の結果、未治療群では、表皮肥厚 (過角化・錯角化)、真皮肥厚、表皮、乳頭の深部到達、浮腫、細胞浸潤の亢進などが観察された。一方で、ステロイド治療を行った全ての群で治療デバイスの有無に関わらず表皮・真皮の肥厚が改善されており、この結果はステロイドによる効果と考えられた。

TB 染色による解析により、未治療群では、異染色性顆粒を含む細胞の真皮乳頭部への浸潤を多数観察し、HE 染色の結果と同様にステロイドの治療効果も確認された。

今回の動物モデルを用いた解析により、ステロイド剤の薬理作用は組織レベルでは有効だが、皮膚スコアや掻破行動といったアトピー性皮膚炎の主訴となる症状を改善するには至らないこともあることがわかった。特に、掻破行動に関してはそれが顕著であり、

一部増悪する個体も見られた。これを治療デバイスとの併用で抑制することができることが判明し、最終的な治療効果の向上を見込めることが明らかとなった。従って、本治療デバイスをステロイド治療の助剤として併用することは、治療効果向上の観点からも有用であるといえる。今後は、メカニズムの解明と安全性の確認を行い、実用化に向けて開発を続けていく。

(4) 候補治療デバイスにおける炎症抑制効果解析

RAW26.7 に LPS 処理をして炎症を惹起させると、TNF- α 産生は強く昂進するが、候補デバイス存在下では、その産生の昂進は抑制された。この結果から、候補デバイスには炎症抑制効果があることが示唆された。

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 4 件)

1. Lin, L-S., Kayasuga, Y, Nakamura, S., Shimohata, N., Sakai, T., Akagi, Y., Suzuki, S., Chung, U-I, Sasaki, N. and Mochizuki, M. (2016) Co-lyophilized Aspirin with Trehalose Causes Less Injury to Human Gastric Cells and Gastric Mucosa of Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, in press. (査読あり) DOI: 10.1292/jvms.12-0502
2. 下畑宣行 (2016) 皮膚バリア機能障害の改善を目的としたアトピー性皮膚炎の予防・治療研究, **アレルギーの臨床**, 36(4) : 78-81, 北隆館 (査読あり)
3. 下畑宣行 (2016) アトピー性皮膚炎における皮膚バリア機能修復を主眼とした治療戦略 ~アトピー性皮膚炎と皮膚バリア機能障害~, *BIO Clinica*, 31(2): 88-91, 北隆館 (査読なし)
4. Kayasuga-Kariya, Y., Iwanaga, S., Fujisawa, A., Lin, L-S., Suzuki, S., Chung, U-I., Sasaki, N., Shimohata, N. and Mochizuki, M. (2013) Dermal Cell Damage Induced by Topical Application of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Is Suppressed by Trehalose co-lyophilization in *Ex Vivo* Analysis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75 (12): 1619-1622. (査読あり) DOI: 10.1292/jvms.12-0502

[学会発表](計 3 件)

1. 下畑宣行、藤澤彩乃、鄭雄一、早野俊哉 セラミド類似ポリマーを用いた新規アトピー性皮膚炎鎮静剤の開発 第37回日本バイオマテリアル学会大会 京都テルサ 京都 2015年11月9日
2. 藤澤彩乃、下畑宣行、鄭雄一、佐々木伸雄 マウスモデルを用いたアトピー性皮膚炎モデルにおけるステロイド剤誘発性

の痒み抑制の検討 第158回日本獣医学会学術集会 北里大学 青森 2015年9月8日

3. 藤澤彩乃、下畑宣行、鄭雄一 生体親和性ポリマー材料によるアトピー性皮膚炎鎮静の試み 第36回日本バイオマテリアル学会 タワーホール船堀 東京 2014年11月17日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

下畑 宣行 (SHIMOHATA, Nobuyuki)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号 : 30419709