

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460238

研究課題名(和文)皮膚常在菌とランゲルハンス細胞を同時標的にしたアトピー性皮膚炎治療の提案

研究課題名(英文) A proposal of treatment of atopic dermatitis targeted at the skin microflora and Langerhans cells

研究代表者

松井 勝彦 (Matsui, Katsuhiko)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20257140

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)：本研究では、マクロライド系抗生物質のジョサマイシンが、ランゲルハンス細胞に直接作用してTh1細胞およびTh2細胞分化を阻害すること、そしてジョサマイシンの局所塗布が、Nc/Ngaマウスに誘導されたアトピー性皮膚炎の皮膚重症度スコアの上昇を顕著に抑制することを明らかにした。さらに、アトピー性皮膚炎患者から分離された黄色ブドウ球菌は、ジョサマイシンに対して高感受性であった。したがって、黄色ブドウ球菌の定着を伴うアトピー性皮膚炎患者へのジョサマイシンの局所塗布は、皮膚炎の制御に有益であり、ステロイド薬よりも適していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that josamycin, a macrolide antibiotic, inhibited the development of Th1 and Th2 cells mediated by Langerhans cells and topical treatment with josamycin significantly suppressed the increase in the skin severity score in NC/Nga mice. Furthermore, Staphylococcus aureus strains isolated from skin lesions of patients with atopic dermatitis were highly susceptible to josamycin. Therefore, topical application of josamycin to atopic dermatitis lesions colonized by S. aureus would be beneficial for control of dermatitis and preferable to steroids.

研究分野：感染免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 黄色ブドウ球菌 ランゲルハンス細胞 IgE Th1細胞分化 Th2細胞分化 ジョサマイシン アレルギー炎症

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、アトピー性皮膚炎(AD)患者の皮膚病変部における黄色ブドウ球菌の検出率が 96%以上と健常人皮膚におけるそれ(10%未満)に比べて極めて高いこと、また検出率のみではなく、皮膚病変部 10 cm²あたりの菌数も健常人や同一患者の非病変部のそれらに比べると著しく高いことを明らかにした(Matsui et al. *Microbiol. Immunol.* 2000)。また、皮膚病変部における黄色ブドウ球菌の定着は、AD に特徴的な炎症像の形成にも関与しており(Matsui et al. *Clin. Exp. Allergy* 2002、Matsui et al. *Clin. Exp. Allergy* 2005、Matsui et al. *Clin. Exp. Allergy* 2007)、さらにランゲルハンス細胞を刺激することで Th2 細胞分化も促進することを明らかにした(Matsui et al. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2012)。AD は Th2 免疫応答が過剰になった免疫疾患としての側面を持っているため、その原因療法には皮膚病変部に定着している黄色ブドウ球菌の除去と同時に、Th2 細胞分化の促進を食い止めることが必須条件となるが、ステロイドやタクロリムスによる治療はその条件を満たしていない。

本研究は、皮膚病変部に黄色ブドウ球菌を定着させており、しかもそれがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)ではない場合の患者に対する個別医療として、特定の抗生物質を用いた積極的な外用抗菌療法を施すことが、新たな AD 治療戦略になることを臨床サイドに向けて情報提供するものである。

2. 研究の目的

本研究は、ランゲルハンス細胞をターゲットにした抗生物質による Th2 細胞分化の制御法を確立し、AD 治療への臨床応用を展開するための基盤を築くことを目的とする。研究期間内には以下のことを明らかにする。

(1) 黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性および免疫系への制御作用を期待して、テトラサイクリン系、マクロライド系、ニューキノロン系抗生物質の中から、ランゲルハンス細胞に直接作用することで Th2 細胞分化を抑制する薬物を見出す。

(2) Th2 細胞分化の誘導とその抑制に関与する因子をランゲルハンス細胞側に求め、サイトカインとしての IL-10、IL-12 産生や細胞表面分子としての B7 分子発現、CD40 発現、Notch リガンド発現、OX40L 発現、TIM-4 発現などを解析する。

(3) 選択された抗生物質の臨床分離株に対する抗菌活性を測定する。

(4) AD モデルマウスである NC/Nga マウスに AD 様炎症を発症させ、選択された抗生物質の病変部への塗布とその治療効果をステロイドおよびタクロリムスのそれと比較する。

(5) NC/Nga マウスの AD 様炎症に対する候補抗生物質、ステロイドおよびタクロリムスの外用剤での治療効果と Th2 細胞分化抑制との相関性を評価する。

3. 研究の方法

(1) ランゲルハンス細胞の分化誘導：研究代表者はこれまでマウス表皮からランゲルハンス細胞を分離して実験に用いてきたが、本研究を遂行するための十分な細胞数が得られない。そこでマウス骨髄細胞より GM-CSF、IL-4、TGF-βを用いてランゲルハンス細胞を分化誘導し、実験に用いる。

(2) ランゲルハンス細胞を介する Th2 細胞分化誘導とその抑制薬の探索：マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗生物質を用いて、ランゲルハンス細胞を介する Th2 細胞分化誘導への影響は明らかにする。ランゲルハンス細胞に各抗生物質と Ovalbumin 由来ペプチド(OVA ペプチド; 323-ISQAVHAAHAEINEAG R-339)を 18 時間パルスした後、DO11.10 TCR Tg マウスの両足蹠(足の裏)に皮内投与することで膝裏の膝窩リンパ節において Th1/Th2 細胞分化を誘導する。5 日後、リンパ節細胞を取り出して T 細胞上の CD3/CD28 分子を *in vitro* 刺激し、Th1/Th2 サイトカインの産生量を比較することで各抗生物質の Th2 細胞分化抑制の程度を明らかにする。

(3) Th2 細胞分化抑制の機構の解明：選択された抗生物質がどのような機序で Th2 細胞分化を抑制するのかを明らかにするために、ランゲルハンス細胞の細胞表面分子(CD40、B7 分子(CD80、CD86)、Notch リガンド(Jagged1、Jagged2、Delta1、Delta3、Delta4)、TIM-4、OX40L)および産生サイトカイン(IL-10、IL-12 p40、IL-12 p70)に焦点を当てて調べる。

(4) AD 患者由来の黄色ブドウ球菌株に対する各抗生物質の抗菌活性の測定：選択された抗生物質の臨床分離株(33 株; MRSA 2 株を含む)に対する抗菌活性を微量液体希釈法による MIC 測定により調べる。

(5) AD 治療における Th2 細胞分化抑制薬の治療効果：ハプテン誘導により NC/Nga マウスに誘導された AD 様皮膚炎に対して、選択された抗生物質の治療効果を判定する。抗生物質は適当な軟膏基剤 1 g 中に 1 mg を含有するように調整する。陰性コントロールとして軟膏基剤のみを、陽性コントロールとしてプロトピック軟膏およびリンデロン VG 軟膏を

所見	スコア		
	0	1	2
発赤・掻破痕	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)
浮腫・苔癬化・肥厚	なし	1/3未満の面積にあり	1/3以上の面積にあり
出血・痂皮形成	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)
糜爛	なし	1/3未満の面積にあり	1/3以上の面積にあり
落屑	なし	1/3未満の面積にあり(散在)	1/3以上の面積にあり(散在)

左右耳および頸背部についてそれぞれ以下のスコア付けをし、その合計を総スコアとする。
(2点×5項目×3部位=30点満点)

用いる。各軟膏を 50 mg/body で 1 日 1 回、頸背部および両耳介に 4 週間塗布する。0, 1, 8, 15, 22, 29 日目に上記のスコア表に基づいて、皮膚炎スコアを算出し、両コントロールのスコアと比較することで、その治療評価を行なう。皮膚炎スコアが陰性コントロールを下回った場合、その効果が Th2 細胞分化抑制と関連しているか否かを確認するために、評価後のマウス皮膚における Th2 細胞浸潤の程度および血中 IgE 濃度と、脾臓細胞中のヘルパー T 細胞を刺激した後の Th1/Th2 サイトカイン産生量から Th2 細胞分化抑制の程度を評価する。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞から分化させたランゲルハンス細胞にマクロライド系抗生物質(8種)、テトラサイクリン系抗生物質(5種)、ニューキノロン系抗生物質(9種)、また併せて免疫抑制剤(2種)を作用させた後、マウスに移入して Th1/Th2細胞分化を誘導した。その結果、ジョサマイシン、スピラマイシン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、ジメチルクロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、ノルフロキサシン、レボフロキサシン、ベタメサゾンの10薬剤が Th2細胞分化を抑制することを確認した。さらにこのうち、テトラサイクリン系抗生物質を除く5薬剤が、Th2細胞分化抑制に加えてTh1細胞分化も抑制した。Th2細胞分化抑制の程度は、ジョサマイシン、ジメチルクロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、ベタメサゾンが他の薬剤よりも優れていた。また、14員環マクロライド系抗生物質および15員環マクロライド系抗生物質は、Th1細胞分化を抑制するが、逆にTh2細胞分化を増強した。以上の結果は、特定の抗生物質をランゲルハンス細胞に作用させることでステロイド薬と同程度にTh1/Th2細胞分化を制御できることを示した。

(2) マクロライド系抗生物質(7種)の中では、ジョサマイシンとスピラマイシンがランゲルハンス細胞の T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein (TIM)-4発現の抑制によりTh2細胞分化を阻害することを確認した。また両薬剤は、ランゲルハンス細胞のCD86発現の抑制によるTh1細胞分化阻害能も有していた。しかし、AD患者の病変部から分離された黄色ブドウ球菌株は、スピラマイシンよりもジョサマイシンに対して強い感受性を示した。テトラサイクリン系抗生物質(5種)もTIM-4発現の抑制によるTh2細胞分化阻害を誘導したが、Th1細胞分化阻害能は有していなかった。患者由来の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は、ドキシサイクリンが最も優れており、ジョサマイシンのそれに匹敵していた。ニューキノロン系抗生物質(9種)は、ノルフロキサシンのみがTh2細胞分化阻害能を有しており、ランゲルハンス細胞における

TIM-4発現の抑制も伴っていた。また、CD40発現の抑制によるTh1細胞分化阻害能も有していた。しかし、患者由来の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は、ジョサマイシンに劣っていた。以上の結果に基づき、AD治療のための第一候補薬物としてジョサマイシンを選択し、NC/NgaマウスのAD様皮膚病変部に対する治療効果を検討した。その結果、ジョサマイシンはベタメタゾンと同等の治療効果を発揮し、その効果は局所リンパ節におけるTh1/Th2細胞分化阻害とIgE産生の抑制を伴っていた。

(3) テトラサイクリン系の抗生物質であるドキシサイクリンを用いてNC/NgaマウスのAD様皮膚病変部に対する治療効果を検討した。その結果、ドキシサイクリンは急性期の皮膚炎に対してステロイド薬であるベタメタゾンと同等の治療効果を示したが、慢性期の皮膚炎に対する治療効果は、ベタメタゾンに劣っていた。そこで、局所リンパ節におけるTh1/Th2細胞分化を調べたところ、ベタメタゾンはTh1細胞分化およびTh2細胞分化の両方を抑制したが、ドキシサイクリンはTh2細胞分化のみを抑制した。このことは、ベタメタゾンとドキシサイクリンによるIgE産生抑制がTh2細胞分化抑制に基づくこと、そしてドキシサイクリンが慢性期の炎症を十分にコントロールできなかったのは、Th1細胞分化を阻害できなかったことに基づくことを示唆した。

(4) 研究期間全体を通じて、本研究ではマクロライド系抗生物質のジョサマイシンがNC/NgaマウスのAD様皮膚病変部に対して最も優れた治療効果を示すことを明らかにした。また、その治療効果は、ランゲルハンス細胞を介する二次リンパ組織でのTh1/Th2細胞分化阻害に基づくものであることを明らかにした。さらに、ジョサマイシンはAD患者の皮膚病変部から分離された黄色ブドウ球菌に対して優れた抗菌活性を示したため、黄色ブドウ球菌の定着を伴うAD皮膚病変の治療には、ステロイド薬よりも優れた治療効果を発揮することが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Matsui K, Tachioka K, Onodera K and Ikeda R: Topical application of josamycin inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 20, 38-47 (2017) 査読あり

DOI: 10.18433/J3GW3D

松井勝彦: マクロライド系抗生物質を用いたアトピー性皮膚炎治療の提案、アレルギーの臨床、36、592-596 (2016) 査読あり

松井勝彦: 皮膚常在菌とランゲルハンス

細胞を同時標的にしたアトピー性皮膚炎治療の提案、アレルギーの臨床、36、362-366 (2016) 査読あり

Matsui K, Tamai S and Ikeda R: Effects of macrolide antibiotics on Th1 cell and Th2 cell development mediated by Langerhans cells, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 19, 357-366 (2016) 査読あり

DOI: 10.18433/J3Z32F

Matsui K, Tamai S and Ikeda R: Betamethasone, but not tacrolimus, suppresses the development of Th2 cells mediated by Langerhans cell-like dendritic cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 1220-1223 (2016) 査読あり

DOI: 10.1248/bpb.b16-00075

Matsui K, Mori A and Ikeda R: Langerhans cell-like dendritic cells stimulated with an adjuvant direct the development of Th1 and Th2 cells *in vivo*, *Clin. Exp. Immunol.*, 182, 101-107 (2015) 査読あり

DOI: 10.1111/cei.12671

〔学会発表〕(計 10 件)

松井勝彦、立岡幹太、小野寺けい、池田玲子、NC/Nga マウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変に対するジョサマイシン軟膏の治療効果について、日本薬学会第137年会(仙台)3/24-3/27/2017.

松井勝彦、池田玲子、Topically applied josamycin suppresses development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, 第90回日本細菌学会総会(仙台)3/19-3/21/2017.

松井勝彦、池田玲子、Effects of topical application of josamycin on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, 第45回日本免疫学会学術集会(那覇)12/5-12/7/2016.

中村翠、尾花典子、池田玲子、松井勝彦、黄色ブドウ球菌の皮膚定着とアトピー性皮膚炎の痒みについて、日本薬学会第136年会(横浜)3/26-3/29/2016.

松井勝彦、玉井咲、池田玲子、ランゲルハンス細胞様樹状細胞を介するTh1/Th2細胞分化に対するマクロライド系抗生物質の影響、日本薬学会第136年会(横浜)3/26-3/29/2016.

松井勝彦、池田玲子、Effects of macrolide antibiotics on Th1 cell and Th2 cell development mediated by Langerhans cell-like dendritic cells, 第89回日本細菌学会総会(大阪)3/23-3/25/2016.

松井勝彦、池田玲子、Effects of 16-membered macrolides against Th1/Th2 cell development induced by Langerhans cell-like dendritic cells, 第44回日本免疫学会学術集会(札幌)11/18-11/20/2015.

Matsui K, Tamai S, Ikeda R: Betamethasone suppresses Th2 cell development induced by Langerhans cell like dendritic cells. World Allergy Congress 2015 (Seoul, Korea, October 14-17, 2015).

松井勝彦、池田玲子、Langerhans cell-like dendritic cells stimulated with an adjuvant direct Th1/Th2 development, 第88回日本細菌学会総会(岐阜)3/26-3/28/2015.

松井勝彦、森晃子、池田玲子、アジュバント刺激によるランゲルハンス細胞様樹状細胞のTh1/Th2細胞分化誘導について、日本薬学会第135年会(神戸)3/25-3/28/2015.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.my-pharm.ac.jp/%7Ekansen/type2/matsui.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松井 勝彦 (MATSUI, Katsuhiko)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20257140

(2)研究協力者

日野 由美 (HINO, Yumi)