

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870739

研究課題名(和文) 難治性アトピー性皮膚炎に対する新規治療方法(FTY720外用療法)の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for intractable dermatitis using immunomodulator FTY720 (fingolimod) ointment

研究代表者

辻 琢己(Tsui, Takumi)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：90454652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の多くは乳幼児期に発症し、ほとんどが成人に至るまでに軽快する。治療薬も副腎皮質ステロイドの外用薬や抗アレルギー薬など、選択肢も多い。しかし、最近では成人に至っても症状の改善がみられない難治症例も増加している。本申請課題では、難治症例にも有効な治療法方を構築するため、ダニ抗原で皮膚炎を誘導したNC/Ngaマウスを用いてFTY720軟膏による外用療法の有用性を調べた。その結果、FTY720軟膏による治療はステロイドの外用療法と比較して、皮膚炎を有意に改善した。さらに、皮膚バリア機能に重要なフィラグリンの発現および経表皮水分蒸散量も改善できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the therapeutic efficacy of immunomodulator FTY720 ointment (fingolimod) for mite-induced intractable AD using an NC/Nga mouse model. Female NC/Nga mice that developed severe AD were divided into four groups: (1) FTY720, (2) tacrolimus, (3) betamethasone and (4) ointment base, all of which received treatment six times per week. Therapeutic efficacy after two weeks was evaluated in terms of AD severity, histochemical observations, transepidermal water loss (TEWL) and epidermal barrier function. In the FTY720 group, AD improved significantly compared with the ointment base group, as did epidermal hypertrophy, mast cell accumulation, and CD3+ T cell infiltration. Furthermore, in the FTY720 group, TEWL decreased significantly compared with the ointment base group, and filaggrin expression significantly increased compared with the betamethasone and ointment base groups. FTY720 ointment is a promising candidate for treatment of intractable AD.

研究分野：病態医科学

キーワード：FTY720 アトピー性皮膚炎 皮膚バリア機能

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) の多くは、副腎皮質ステロイドの外用療法により軽快するが、必ずしも良好な治療効果が得られる訳ではなく、以下のような臨床的課題がある。

- 1) 首から下の病変部位に対するタクロリムス水和物軟膏の治療効果は低い。
- 2) 思春期、成人期に至っても軽快せず、慢性化する症例が増加している。
- 3) シクロスポリンは、日和見感染や腎障害等の有害事象を引き起こす。

このような背景で、難治症例にも有効な治療方法の開発には強い医学的および社会的要請がある。申請者は、既に、ステロイドによる外用療法に抵抗するADを効果的に治療する新しい治療戦略を構築する目的で、ダニ抗原を用いて皮膚炎を誘発したモデル動物(NC/Ngaマウス)に対するFTY720の経口投与とベタメタゾン軟膏を用いた併用療法の有用性を明らかとしている(Tsujii, T, et al., *Jap. J. Allergol.* 61(7), 948-958, 2012)。本申請課題では、この研究をさらに発展させ、FTY720の外用療法の有用性を調べた。具体的には、全身作用を示さない濃度のFTY720軟膏(0.001%)を調製し、FTY720が炎症局所で免疫抑制作用を発揮すること。およびFTY720が皮膚バリア機能に与える影響を調べた。

なお、FTY720は、冬虫夏草類縁菌から単離されたISP-1に構造活性修飾を加えた免疫調節薬であり、藤多らによって発見された。既存の免疫抑制薬(シクロスポリンやタクロリムス水和物など)は、T細胞のインターロイキン-2の産生・分泌を抑制して免疫抑制作用を示すが、FTY720はB細胞およびT細胞の活性や増殖に影響を与えることなく免疫抑制作用を示す。FTY720は生体内のスフィンゴシンキナーゼによってリン酸化を受けFTY720リン酸(FTY720-P)となる。FTY720-Pはスフィンゴシン1-リン酸受容体に作用して、受容体を内在化させる。その結果、成熟リンパ球が血中や末梢組織から2次リンパ器官や胸腺に隔離され、免疫応答が終結する。ただし、本申請課題で用いたFTY720軟膏の濃度(0.001%)は全身作用(血中のリンパ球現象)を示さないため、本研究で得られた成果は、FTY720の新しい作用(局所作用)と考えられる。

## 2. 研究の目的

ADの多くは、乳児期に発症し、多くが成人に至るまでに軽快する。治療薬の選択肢も、副腎皮質ステロイドの外用薬、抗アレルギー薬など多岐にわたり、選択肢も広い。しかし、上述のように、成人に至っても症状の改善がみられない難治症例も少なくない。そこで、本申請課題では、難治症例にも有効な治療方法を構築するため、ダニ抗原で皮膚炎を誘導したNC/Ngaマウスを用

いて、FTY720軟膏の有用性を調べた。また、近年、ADの治療のターゲットとして、皮膚のバリア機能が注目されている。そこで、FTY720が皮膚のバリア機能に与える影響についても調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物および倫理

NC/Ngaマウス(9週齢、雌)は日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入した。マウスはSPF(Specific-Pathogen Free)環境下で飼育し、餌(CRF-1(ガンマ線照射飼料,オリエンタル酵母工業株式会社,東京))および水は自由摂取させた。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議:2006年6月1日)および摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した。

### (2) FTY720, タクロリムス水和物軟膏およびベタメタゾン軟膏

2-Amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol 塩酸塩(FTY720(Fingolimod))は吉富製薬株式会社(現、田辺三菱製薬株式会社,東京)から恵与された。タクロリムス水和物軟膏(プロトピック軟膏,0.1%)およびベタメタゾン吉草酸エステル軟膏(リンデロン<sup>®</sup>-V軟膏,0.12%)はそれぞれ、アステラス製薬株式会社(東京)および塩野義製薬株式会社(大阪)から購入した。

### (3) 皮膚炎の誘導

皮膚炎モデルは、Yamamotoらの方法(Yamamoto, M, et al., *Allergol. Int.* 56, 139-148, 2007)に従って作製した。コナヒョウヒダニ(*Dermatophagoides farinae*; Df)エキス(株式会社エル・エス・エル,東京)を親水ワセリン(丸石製薬株式会社,大阪)と混和し、Df抽出物の濃度を2.5 mg/gとした(ダニ軟膏)。NC/Ngaマウスの背部を剃毛し、4%SDSを塗布後、ダニ軟膏100 mgを週2回4週間塗布し皮膚炎を発症させた。

### (4) 皮膚炎の病勢判定

皮膚炎の程度は、1日1回肉眼的に観察し、次のようにスコア化(ADスコア)した。すなわち、紅斑、乾燥、浮腫/丘疹および掻破痕の程度を0:所見なし,1:軽度,2:中等度,3:重度の4段階で判定した。各所見のスコアの和をADスコアとした。例えば、紅斑が重度(スコア:3),乾燥が中等度(スコア:2),浮腫/丘疹がなし(スコア:0),掻破痕がなし(スコア:0)の場合、その個体のADスコアを5とした。なお、ADスコア3以上の継続を2週間確認し、治療を開始した。

### (5) 試験プロトコール

(3)に記載の方法で皮膚炎を発症させ

た NC/Nga マウスを以下の 4 群に分け、2 週間治療し、病勢の推移を観察した。

FTY720 群 (n=8, 0.001%FTY720 軟膏, 週 6 回塗布)

タクロリムス群 (n=8, 0.1%プロトピック軟膏, 週 6 回塗布)

ベタメタゾン群 (n=8, 0.12%ベタメタゾン-V 軟膏, 週 6 回塗布)

基剤群 (n=8, 軟膏基剤, 週 6 回塗布)

皮膚炎の程度は、(4)に記載した方法で毎日スコア化した。なお、0.001%FTY720 軟膏の塗布によって末梢血リンパ球 (CD3 陽性 T 細胞)は減少しないことを確認した。

#### (6) 血清中 IgE 抗体濃度の測定

治療前、治療後 7 日および 14 日の血清を用いて IgE 抗体濃度を測定した。なお、測定には、2 点結合酵素免疫測定法 (Mouse IgE ELISA MAX™ Standard Set (BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA))を用いた。

#### (7) 組織学的解析

##### 表皮の肥厚

治療が終了したマウスを抱水クロラール (ナカライテスク株式会社, 京都)麻酔下で致死させ、皮膚炎が最も重症であった部位の皮膚を採取した。これを 10%中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬株式会社, 大阪)で固定した後、厚さ 3-5  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を作成した。作製した切片をキシレン層 (2 層), 100%アルコール層 (2 層), 70%アルコール層 (1 層)の順に 5 分間浸し、パラフィンを取り除いた。次に、流水で 4 分間水洗し、マイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬株式会社)で 10 分間核染色した。過剰な色素の除去および核の色出しのために流水で 15 分間水洗し、エオジン液 (和光純薬株式会社)で 2 分間染色した後、流水で 5 秒間水洗した。続いて、70%、80%および 90%アルコール層の順にそれぞれ 5~10 回浸し、100%アルコール層 (3 層)に 20 回ずつ浸し脱水した。最後に、キシレン層 (4 層)に 15 回ずつ浸し、カナダバルサム (和光純薬株式会社)で封入した。この組織を顕微鏡 (BX50, オリンパス株式会社, 東京)下で観察し、表皮の厚さを測定した。

##### マスト細胞数

上記と同様の方法でパラフィンを除去した皮膚切片を、0.05%トルイジンブルー溶液 (和光純薬株式会社)で 5 分間染色した。染色された組織を水層に 5~10 回浸し、70%アルコールで 3 分間分別した。続いて、上述の方法で封入し、顕微鏡下で観察し、マスト細胞数をカウントした。マスト細胞数は、Image J ソフトウェア (Ver. 1.43u, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>)を用いて単位面積 ( $\text{mm}^2$ )当たりの個数として算出した。

##### CD3 陽性 T 細胞数

上記と同様の方法でパラフィンを除去した皮膚切片を、1 mM EDTA, pH 8.0 に浸し、電子レンジで抗原を賦活化した (750W, 5 分, 3 回)。室温まで冷却した後、PBS で洗浄した (5 分, 2 回)。内因性のペルオキシダーゼ活性を失活させるため、0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$  および 0.1% $\text{NaN}_3$  を含むメタノール溶液に浸し、室温にて 10 分間保温した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、緩衝液 A (0.1%ウシ血清アルブミン (ナカライテスク株式会社) および 0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.0) に浸し、室温にて 45 分間保温した。続いて、緩衝液 A で 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように希釈したヤギ由来抗マウス CD3 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) を滴下し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて 60 分間保温後、4  $^{\circ}\text{C}$  で終夜保温した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、緩衝液 A で 400 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ由来抗ヤギ IgG 抗体 (株式会社医学生物学研究所, 名古屋) を滴下し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて 60 分間保温した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、0.005% $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM  $\text{NaN}_3$  および 1 mg/mL diaminobenzidine (株式会社同仁化学研究所, 熊本)を含む PBS を滴下し、37  $^{\circ}\text{C}$  にて 15 分間保温した。水洗した後、マイヤーヘマトキシリン溶液で 3 分間核染色し、上述の方法で封入した。顕微鏡下で CD3 陽性 T 細胞数をカウントし、Image J ソフトウェアを用いて単位面積 ( $\text{mm}^2$ )当たりの個数として算出した。

##### フィラグリニン染色

治療が終了したマウスを抱水クロラール麻酔下で致死させ、皮膚炎が最も重症であった部位の皮膚を採取した。これを 4%パラホルムアルデヒド溶液 (和光純薬株式会社)で固定した後、厚さ 10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、PBS で 0.2%となるように調製した TritonX-100 溶液に浸した (10 分)。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、PBS で 3%となるように調製したウシ血清アルブミン溶液 (緩衝液 B)に浸し、室温にて 30 分間保温した。続いて、緩衝液 B で 100 倍希釈したウサギ由来抗フィラグリニンポリクローナル抗体 (Covance, Inc., Princeton, USA) を滴下し、室温にて 60 分間保温した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、緩衝液 B で 500 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies, Carlsbad, USA) を滴下し、室温にて 60 分間保温した。PBS で洗浄 (5 分, 2 回)後、Hoechst 33342 (Lonza Group Ltd., Walkersville, USA) で 1 分間核染色し、顕微鏡下で観察した。なお、フィラグリニンの発現は Image J ソフトウェアを用いて蛍光強度として算出した。

( 8 ) 経表皮的水分蒸散量 (TEWL)

治療前, 治療後 7 日および 14 日の各個体の TEWL を TEWA meter (TM 120; Courage and Khazaka, Koln, Germany) を用いて測定した。

4. 研究成果

( 1 ) FTY720 軟膏の治療効果

ベタメタゾン群では, 治療前後で有意な皮膚炎の改善はみられなかった (AD スコア; 治療前:  $6.3 \pm 1.2$ , 治療後:  $4.1 \pm 1.2$ ). このことから, 本モデルの皮膚炎はステロイド抵抗性であることが示唆された. タクロリムス群の治療効果は部分的であり, 基剤群と比較して有意な皮膚炎の改善はみられなかった (AD スコア; 治療前:  $6.0 \pm 1.3$ , 治療後:  $2.8 \pm 1.0$ ). 一方, FTY720 群の皮膚炎は, ベタメタゾン群および基剤群と比較して有意に改善した (AD スコア; 治療前:  $5.9 \pm 1.0$ , 治療後:  $1.8 \pm 1.3$ ) ( 図 1 ).

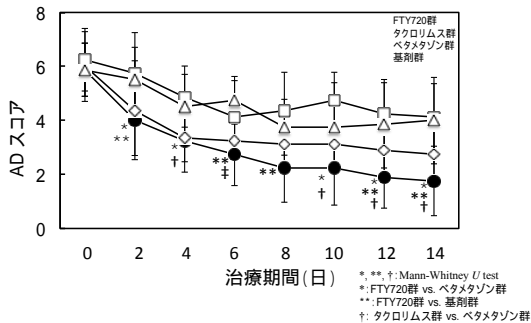


図 1 FTY720 軟膏の治療効果

( 2 ) 血清中 IgE 抗体濃度

各群の治療前後の血清中 IgE 抗体レベルを測定した結果, 発症に伴って IgE 抗体レベルが顕著に上昇するアトピー病態を示すことが確認された. しかし, 軽快個体 (群) であっても, IgE 抗体レベルの顕著な低下は観察されず, 治療効果は IgE 抗体レベルと相関しないことが示された ( 図 2 ).

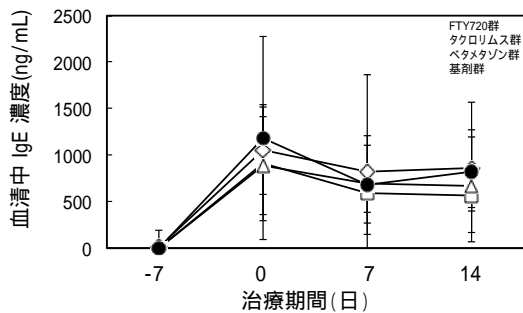


図 2 血清中 IgE 濃度

( 3 ) 組織学的解析

タクロリムス群, ベタメタゾン群および基剤群の表皮の肥厚に改善はみられなかったものの, FTY720 群では未発症個体レベルまで改善した ( 図 3 ). また, FTY720 群の浸潤マスト細胞数は, 未発症個体と同程度

であり, ベタメタゾン群および基剤群と比較して有意に低値であった ( 図 4 ). 浸潤 CD3 陽性 T 細胞数は, 基剤群でのみ高値であり, FTY720 群, タクロリムス群およびベタメタゾン群ともに未発症個体レベルまで減少していた ( データ非表示 ).

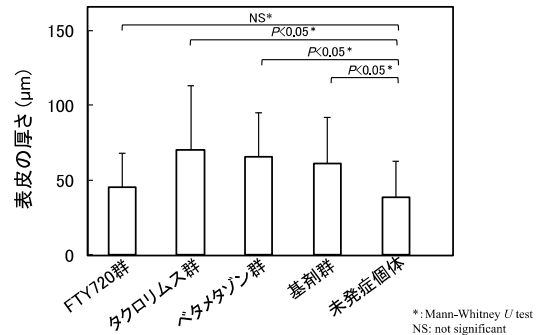


図 3 表皮の肥厚の程度

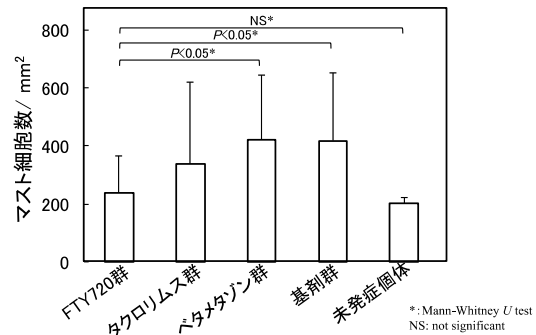


図 4 浸潤マスト細胞数

( 4 ) 皮膚バリア機能

FTY720 群およびタクロリムス群の TEWL は, 治療により有意 ( $P < 0.05$ ) に改善した (FTY720 群; 治療前:  $60 \pm 12$  g/m<sup>2</sup>/h 治療後:  $26 \pm 14$  g/m<sup>2</sup>/h, タクロリムス群; 治療前:  $63 \pm 10$  g/m<sup>2</sup>/h 治療後:  $45 \pm 14$  g/m<sup>2</sup>/h). さらに, 治療 14 日後の FTY720 群の TEWL は, タクロリムス群, ベタメタゾン群 ( $59 \pm 30$  g/m<sup>2</sup>/h) および基剤群 ( $48 \pm 14$  g/m<sup>2</sup>/h) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に改善し, 未発症個体 ( $28 \pm 23$  g/m<sup>2</sup>/h) と同等であった ( 図 5 ). さらに, FTY720 群のフィラグリンの相対的な発現強度は, ベタメタゾン群および基剤群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値であった ( 図 6 a, b ).

また, フィラグリンを天然保湿因子 (NMF) に分解する酵素であるカスパーゼ-14 の発現強度に各群間で有意な差はみられなかったが, FTY720 群のカスパーゼ-14 の発現部位は他の群と比較して表皮付近 (フィラグリンの発現部位) に集積しているという結果を得つつある. 即ち, FTY720 群ではフィラグリンが効率的に NMF へ分解され, 皮膚バリア機能を改善している可能性が考えられる. 今後, 皮膚バリア機能に関与する他のタンパク質 (オクルディン, ZO-1) についても詳細に調べる予定である.

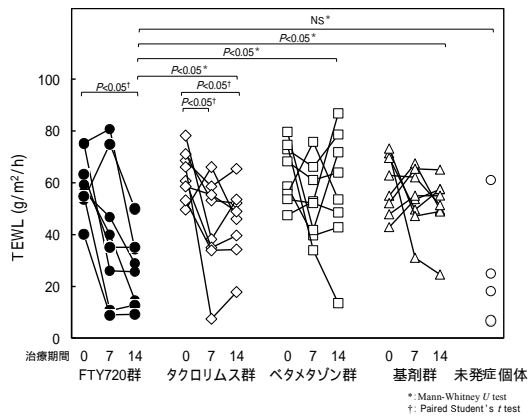


図5 TEWLの推移

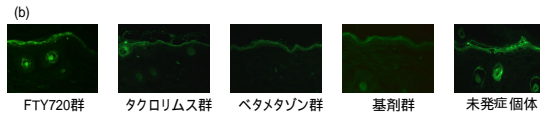
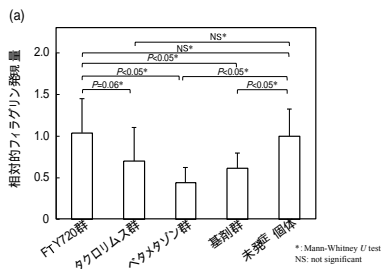


図6 フィラグリンの発現量

## 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 1件)

Takumi Tsuji, Satoshi Okuno, Ayano Kuroda, Junya Hamazaki, Takuma Chikami, Sakura Sakurai, Yuya Yoshida, Rie Banno, Tetsuro Fujita, Takeyuki Kohno: Therapeutic approach to mite-induced intractable dermatitis using novel immunomodulator FTY720 ointment (fingolimod) in NC/Nga mice. *Allergology International*, **65**, 172-179, 2016. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2件)

櫻井さくら, 千頭拓馬, 黒田綾乃, 濱崎淳哉, 辻琢己, 吉田侑矢, 坂野理絵, 藤多哲朗, 河野武幸: フィンゴリモド(FTY720)軟膏がアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚バリア機能に与える影響 -第2報- ,日本薬学会1第136年会, 2016.3.27(横浜)

濱崎淳哉, 奥野聡之, 黒田綾乃, 櫻井さくら, 千頭拓馬, 辻琢己, 吉田侑矢, 坂野理絵, 藤多哲朗, 河野武幸: フィンゴリモド(FTY720)軟膏がアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚バリア機能に与える影響, 第64回日本薬学会近畿支部大会 2014.10.11(京都)

〔その他〕

ホームページ等  
 摂南大学薬学部  
 病態医科学研究室ホームページ  
 (<http://www.setsunan.ac.jp/~p-rinsho/>)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 琢己 (TSUJI Takumi)

摂南大学 薬学部 薬学研究科 講師

研究者番号: 90454652