

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 13 年度採択研究代表者

中西 憲司

(兵庫医科大学 教授)

「IL-18 を標的とした自然型アトピー症の治療戦略」

1. 研究実施の概要

当該研究は、アレルゲン特異的な Th2 細胞分化と IgE 産生を伴わないアレルギー疾患が、微生物感染を契機に発症することをマウスモデルを新規作製することで実証し、ついで、この微生物起因性アレルギー疾患の分子病態を解明し、さらに、病態に即した治療方法を確立することを目的とする。当初、ケラチノサイトから過剰に IL-18 を分泌するように遺伝子操作したマウスは、Th2 細胞分化や IgE 応答を欠落しても、アトピー性皮膚炎に罹患することから、「自然型」アトピー性皮膚炎モデルと提唱した。アトピー性皮膚炎や気管支喘息を代表とするアレルギー疾患は、皮膚局所における黄色ブドウ球菌感染や気道感染を契機に発症或いは増悪することは临床上、周知である。この点に着目し、「感染増悪型」の気管支喘息マウスモデルを作製した。「感染増悪型」の気管支喘息マウスモデルでは、内因性の IL-18 が T 細胞からの IFN- γ と IL-13 の産生を誘導し、その結果、それぞれ、気道抵抗上昇と気道周囲の炎症・再構築を促し、重篤な気管支喘息が誘発されることを明らかにした。ついで、「炎症型」のアトピー性皮膚炎マウスモデルを作製した。皮膚バリアを破壊後、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A (SpA) を塗布すると、マウスは血中ヒスタミン値の上昇とマスト細胞・好酸球浸潤を伴う、アトピー性皮膚炎の定義を満たす掻痒性慢性皮膚炎を呈する。当該アトピー性皮膚炎マウスモデルでは、所属リンパ節 CD4⁺ T 細胞は IFN- γ をはじめとする Th1 サイトカインを産生するだけでなく IL-3 や IL-13 も産生した。このような Th 細胞を Super Th1 細胞と提唱した。さらに、上記「感染増悪型」気管支喘息の場合と同様、IL-18 中和抗体の投与により、「炎症型」アトピー性皮膚炎は回避された。このように、いずれの疾病も IL-18 を標的とした治療が有用であることを証明した。

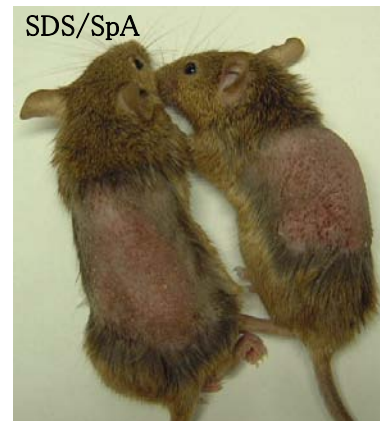
2. 研究実施内容

当該研究期間では、黄色ブドウ球菌菌体成分塗布によるアトピー性皮膚炎モデルの作成、分子病態解明と治療方法の確立を実施した。

(1) アトピー性皮膚炎モデルの作成

皮膚バリアが正常な BALB/c、C57BL/6、並びに皮膚バリア不全のある NC/Nga マウスを用いた。

これらのマウスの背部を剃毛後、皮膚バリアを破壊するために、SDS を塗布し、ついで黄色ブドウ球菌由来の SpA を塗布した。これを連日施行し、皮膚臨床病変を、アトピー性皮膚炎スコアを用いて評価した。その結果、右の図に示すように、NC/Nga マウスは SDS



による表皮バリア破壊だけでは、慢性皮膚炎は惹起されなかった。しかし、表皮バリアを破壊後 SpA を塗布すると、掻痒性の慢性皮膚炎が惹起された。また、NC/Nga マウスが、最も SpA 誘導性皮膚炎に感受性が高かった。BALB/c マウスは軽度の感受性を示したが、C57BL/6 マウスは抵抗性であった。このように、ヒトの場合と同様、本アトピー性皮膚炎でも、遺伝素因の重要性が判明した。

(2) SpA 誘導性アトピー性皮膚炎の特徴

- ・ 血清 IgE 値は上昇しない。又、所属リンパ節の CD4⁺ T 細胞は Th2 細胞分化を示さなかった。このことから、本アトピー性皮膚炎は、ヒトの内因性皮膚炎モデルであることが判明した。
- ・ IgE 濃度が上昇しないにも関わらず血漿ヒスタミン値は上昇することから、IgE 非依存性の肥満細胞活性化経路が作動する可能性が示唆された。
- ・ 表皮の肥厚と真皮の炎症像が組織学的に観察された。特に、好酸球、好中球、肥満細胞の浸潤が顕著に認められた。また、T 細胞の集積も認められた。
- ・ 血清 IL-18 濃度が上昇した。
- ・ SpA/SDS を塗布したマウスの所属リンパ節は IL-12 を発現した。
- ・ アトピー性皮膚炎と呈するマウスの所属リンパ節から分離した CD4⁺ T 細胞は、固相化抗 CD3 刺激により、IFN- γ をはじめとする Th1 サイトカインと、IL-13をはじめとする Th2 サイトカイン並びに IL-3 を産生した。また、CCR5 と CXCR3 の発現を認めた。このユニークな細胞を Super Th1 細胞と命名した。
- ・ 病変局所は、CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10, CXCL11 の発現増強が観察された。
- ・ 病変局所には、IFN- γ , IL-13 並びに IL-3 の発現増強が認められた。

(3) SpA 誘導性アトピー性皮膚炎の IL-18 を標的とした治療

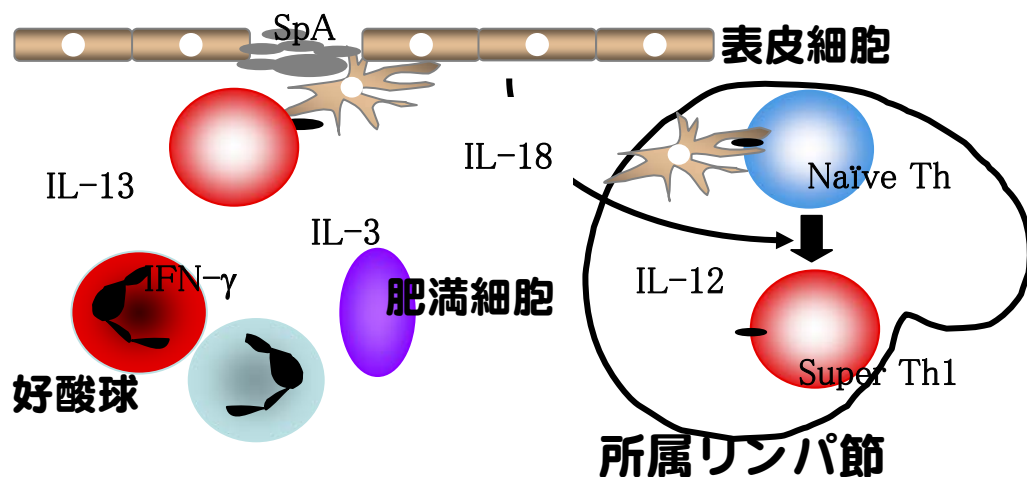
- ・ IL-18 中和抗体を投与することで、当該アトピー性皮膚炎は、臨床的にも、組織学的にも、完全に回避された。同時に、所属リンパ節 CD4⁺ T 細胞の Super Th1 細胞への分化も回避された。
- ・ IFN- γ 中和抗体を投与すると、Super Th1 細胞分化は回避され、アトピー性皮膚炎の発症も阻止

された。

- IL-3 中和抗体を投与することで、病変局所における肥満細胞の集積が軽減し、アトピースコアも軽快した。
- IL-13 の働きを抑制すると、皮膚局所の CCL11 の発現は低下したが、アトピースコアは軽減しなかった。

以上の結果から、SpA 誘導性アトピー性皮膚炎は下図に示すようなメカニズムにより惹起される可能性が強く示唆された。

皮膚バリアを破壊したマウスに SpA を塗布すると、既に報告しているように、表皮細胞から IL-18 が分泌される。皮膚樹状細胞は、SpA/SDS 塗布後、抗原を補足して所属リンパ節に集積し、IL-12 を分泌する。IL-12 と IL-18 の作用により、ナイーブ CD4⁺ T 細胞は抗原特異的な Super Th1 細胞に分化すると同時に、ケモカイン受容体を発現する。一方、SpA/SDS を塗布すると、皮膚局所のケモカイン発現が増強する。その結果、Super Th1 細胞は皮膚局所に集積し、抗原刺激下に、Super Th1 サイトカインを産生する。その結果、好酸球、好中球、肥満細胞が局所に集積・活性化され、慢性皮膚炎が惹起されると考えられる。また、IL-18 は Super Th1 細胞由来の IL-3 と協働して、肥満細胞の増殖と活性化を促進することで、ヒスタミン濃度の上昇をもたらす。IL-18 を中和することで、本皮膚炎の本体である Super Th1 細胞分化誘導が抑制され、その結果、下流の炎症性サイトカインの集積が阻止されて治療効果を発揮すると考える。



3. 研究実施体制

「中西」グループ

- ①研究分担グループ長：中西 憲司（兵庫医大免疫・医動物、教授）
- ②研究項目：自然型気管支喘息モデルと自然型アトピー性皮膚炎モデルの作製と解析

「水谷」グループ

- ①研究分担グループ長：水谷 仁（三重大皮膚科、教授）
- ②研究項目：自然型アトピー性皮膚炎モデルの作製と解析

「岡村」グループ

- ①研究分担グループ長：岡村 春樹（兵庫医大先端医研、教授）
- ②研究項目：自然型気管支喘息モデルの作製と解析

「杉村」グループ

- ①研究分担グループ長：杉村 和久（鹿児島大工学、教授）
- ②研究項目：ヒト一本鎖抗体ライブラリーを用いた、ヒト IL-18 並びにヒト IL-18 受容体に対する抗体の単離

「山西」グループ

- ①研究分担グループ長：山西 清文（兵庫医大皮膚科、教授）
- ②研究項目：ヒト臨床材料を用いた、IL-18 相関性アトピー性皮膚炎の解析

「筒井」グループ

- ①研究分担グループ長：筒井 ひろ子（兵庫医大病原微生物、教授）
- ②研究項目：微生物、あるいは微生物産生物を用いた、皮膚炎モデルの細胞機構・分子機構の解明。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Terada, M., Tsutsui, H., Imai, Y., Yasuda, K., Mizutani, H., Yamanishi, K., Kubo, M., Matsui, K., Sano, H. and Nakanishi, K. Contribution of interleukin-18 to atopic dermatitis-like skin inflammation induced by *Staphylococcus aureus* product in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. in press. 2006.
- Ishikawa, Y., Yoshimoto, T. and Nakanishi, K. Contribution of IL-18-induced innate T cell activation to airway inflammation with mucus hypersecretion and airway hyperresponsiveness. Int. Immunol., In press. 2006.

- **Murakami, T., Yamanaka, K., Tokime, K., Kurokawa, I., Tsutsui, H., Nakanishi, K. and Mizutani, H.** Topical supplanting of IPD ameliorates Th2 cytokine-mediated dermatitis in caspase-1 transgenic mice by downregulating interleukin-4 and interleukin-5, *Br. J. Dermatol.*, in press. 2006
- **Yamanaka, K.,** Clark, R., Dowgiert, R., Hurwitz, D., Shibata, M., Rich, B. E., Hirahara, K., Jones, D.A., Eapen, S., Mizutani, H. and Kupper, T. S. Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 12, 376-382. 2006.
- **Yamanaka, K.,** Clark, R., Rich, B., Dowgiert, R., Hirahara, K., Hurwitz, D., Shibata, M., Mirchandani, N., Jones, D.A., Goddard, D.S., Eapen, S., **Mizutani, H.** and Kupper T.S. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma, *Blood*, 107, 2440-2445. 2006.
- Oh, K., Iimuro, Y., Takeuchi, M., Kaneda, Y., Iwasaki, T., Terada, N., Matsumoto, T., **Nakanishi, K.** and Fujimoto, J. Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 288: G729-35. 2005.
- Suzuki, T., **Nakanishi, K., Tsutsui, H.,** Iwai, H., Akira, S., Inohara, N., Chamaillard, M., Nunez, G. and Sasakawa C. A novel caspase-1/Toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic *Shigella* in infected macrophages. *J Biol Chem.* 280, 14042-14050. 2005.
- Yamaguchi, N., Fujimori, Y., Fujibayashi, Y., Kasumoto, I., **Okamura, H., Nakanishi, K.** and Hara, H. Interferon-gamma production by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. *Annals of Hematology*, 84, 423-8. 2005.
- Fujii, H., Seki, S., Kobayashi, S., Kitada, T., Kawakita, N., **Adachi, K., Tsutsui, H., Nakanishi, K.,** Fujiwara, H., Ikarashi, Y., Taniguchi, M., Mitchell, K., Ikemoto, M., Nakajima, Y., Arakawa, T. and Kaneda, K. A murine model of NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide/ d-galactosamine. *Virchows Archiv.* 446, 663-673. 2005.
- Kyo, F., Futani, H., **Matsui, K., Terada, M., Adachi, K.,** Nagata, K., Sano, H., Tateishi, H., **Tsutsui, H. and Nakanishi, K.** Endogenous IL-6 but not TNF- α contributes to the development of TLR4/MyD88-mediated acute arthritis in mice. *Arthritis & Rheum.* 52, 2530-2540. 2005.
- **Sasaki, Y., Yoshimoto, T.,** Maruyama, H., Tegoshi, T., Ohta, N., Arizono, N. and **Nakanishi, K.** IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. *J. Exp. Med.* 202, 607-616. 2005.
- Sekiyama, A., **Ueda, H., Kashiwamura, S.,** Sekiyama, R., Takeda, M., Rokutan, K. and

- Okamura, H.** A stress-induced, superoxide-mediated caspase-1 activation pathway causes plasma IL-18 upregulation. *Immunity*, 22, 669-677, 2005.
- Nakatani-Okuda, A., **Ueda, H., Kashiwamura, S.**, Sekiyama, A., Kubota, A., Fujita, Y., Adachi, S., Tsuji, Y., Tanizawa, T. and **Okamura, H.** Protection against bleomycin-induced lung injury by IL-18 in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 289, L280-287, 2005.
 - Yamada, N., Tsujimura, T., **Ueda, H.**, Hayashi, S., Ohyama, H., **Okamura, H.** and Terada, N. Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony-stimulating factor. *Cytokine*, 21, 288-297, 2005.
 - Ueno, N., **Kashiwamura, S., Ueda, H., Okamura, H.**, Tsuji, N.M., Hosohara, K., Kotani, J., Marukawa, S. Role of interleukin 18 in nitric oxide production and pancreatic damage during acute pancreatitis. *Shock*. 2, 564-570. 2005.
 - Sekiyama, A., **Ueda, H., Kashiwamura, S.**, Nishida, K., Kawai, K., Teshima-Kondo, S., Rokutan, K., and **Okamura, H.** IL-18; a cytokine translates a stress into medical science. *J. Med. Invest.*, 52, Suppl:236-239. 2005.
 - Kawasaki, D., Tsujino, T., Morimoto, S., Masai, M., Masutani, M., Ohyanagi, M., **Kashiwamura, S.I., Okamura, H.** and Masuyama, T. Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Coron Artery Dis.*, 16, 437-441. 2005.
 - Sekiyama, A., **Ueda, H., Kashiwamura, S.**, Nishida, K., Yamaguchi, S., Sasaki, H., Kuwano, Y., Kawai, K., Teshima-Kondo, S., Rokutan, K. and **Okamura, H.** A role of the adrenal gland in stress-induced up-regulation of cytokines in plasma. *J. Neuroimmunol.*, 171, 38-44. 2006.
 - **Hamasaki, T., Hashiguchi, S., Ito, Y., Kato, Z., Nakanishi, K., Nakashima, T. and Sugimura, K.** Human Anti-human IL-18 antibody recognizing the IL-18-binding site 3 with IL-18 signaling blocking activity, *J. Biochem.* 138, 433-442. 2005.
 - **Shen, C., Tsuda, T., Fushiki, S., Mizutani, H. and Yamanishi, K.** The Expression of p63 during Epidermal Remodeling in Psoriasis, *Journal of Dermatology*, 32, 4, 236-242, 2005.
 - Matsuno, K., Yamada, H., Iwata, K., Jin, D., Katsuyama, M., Matsuki, M., Takai, S., **Yamanishi, K.**, Miyazaki, M., Matsubara, H., Yabe-Nishimura, C. Nox1 Is Involved in Angiotensin II-mediated Hypertension — A Study in Nox1-deficient mice, *Circulation* 112, 17, 2677-2685, 2005.
 - **梅田幸嗣, 水谷 仁.** アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける音響学的解析: 掻破行動への抗ヒスタミン薬の影響, *アレルギー・免疫*, 12, 70-78. 2005.
 - 八杉由美, 宮田明子, 平野愛, 南祥一郎, 伊藤孝明, 夏秋優, **山西清文.** パモ酸ヒドロ

キシジンによる Acute Generalized Exanthematous Pustulosis の 1 例.皮膚の科学,4,1,26-30,2005.

- 津田達也, 西村啓介, 山西清文, 水谷仁. 乳輪部に生じた単発型グロムス腫瘍の1例. 臨床皮膚科, 59, 10, 1008-1009, 2005.
- 定延直哉, 夏秋 優, 山西清文, 杉本 直. Acral pseudolymphomatous angiokeratoma of children. 皮膚病診療, 27S, 103-106, 2005.
- 松本晴子, 宮本園子, 石川真奈美, 朝倉麻紀子, 林 義明, 南祥一郎, 伊藤孝明, 夏秋 優, 山西清文、原 直樹、上紺屋憲彦. 頬部の皮下腫瘍で発見された肝細胞癌の 1 例. 皮膚の科学, 4, 267-270, 2005.
- 平野 愛, 夏秋 優, 宮田明子, 山西清文. サルコイドーシスの皮膚病変に荊芥連翹湯が有効であった 1 例. 皮膚の科学, 4,366-369, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：4 件（CREST 研究期間累積件数：10 件）