

アトピー性皮膚炎の痒みの発症機序に関する研究

山田 佳史

2017年

目次

緒論	3
第1章 ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルのプロファイル	
第1節 緒言	7
第2節 実験材料および方法	9
第3節 結果	15
第4節 考察	26
第2章 ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの搔痒行動のメカニズム	
第1節 緒言	29
第2節 実験材料および方法	31
第3節 結果	34
第4節 考察	44
第3章 ダニ抗原刺激によるケラチノサイトからの痒み関連因子の産生	
第1節 緒言	49
第2節 実験材料および方法	51
第3節 結果	54
第4節 考察	64
総括および結論	67

謝辭	70
引用文献	71
略語一覽	84

緒論

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、患者の多くはアトピー素因を持つ」と定義されている (1)。AD の罹患率は小児では 10~20%、成人では 1~3%と報告され (2)、特に先進国ではここ 30 年間で罹患率が 2~3 倍に増加しており、都市部において罹患率が高い傾向にある (3)。このように生活環境によって罹患率に差があることから、AD の発症には環境要因が関与すると考えられている。また、AD は一般的に乳幼児・小児期に発症し、加齢とともにその患者数は減少し、一部の患者が成人型 AD に移行する (4, 5)。

AD の病態形成には角層の異常に起因する皮膚の生理機能異常と環境抗原に対するアレルギー反応が関与する (6, 7)。皮膚は外界からの様々な刺激や細菌などの外敵から体を守るとともに、体内の水分が蒸散しないようにして生体の恒常性を維持する。皮膚の中でも、表皮は物理的および化学的バリアとしての皮膚の機能に必須であり、そのバリア機能を担っているのが表皮の最外層である角質層である (8)。AD 患者の皮膚は病変部だけでなく、非病変部でも経皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) が多く (9)、細胞間脂質であるセラミドの合成経路の異常に起因するセラミド量の低下により角質層の水分保持量が少なくなり、ドライスキン状態になる (10, 11)。また、表皮の接着構造に関与する酵素発現の変化や角質層中のプロテアーゼ活性の上昇と AD 患者の皮膚バリア機能異常との関連も示唆されている (12-14)。さらに、バリア機能の形成や水分保持に重要なタンパク質をコードするフィラグリン遺伝子の変異が AD 患者で認められる (15, 16)。このような皮膚バリアの異常は、外界からのアレルゲン (ハウスダスト、ダニ、細菌、食物など) の皮膚内への侵入を容易にするとともに、種々の物理刺激 (搔破、衣服の擦れなど) あるいは化学刺激 (石鹸、シャンプーなど) に過敏な状態を引き起こす結果、AD の発症・増悪を誘導する。

上述したような皮膚バリアの機能異常により皮膚内に侵入したアレルゲンに対して生体

はそれを排除するために免疫反応を誘導する。AD 患者では T 細胞やランゲルハンス細胞といった免疫細胞の異物に対する反応が亢進しており、各種サイトカインやケモカインが過剰に産生されて皮膚炎を引き起こす (7, 17)。また、T 細胞の皮膚への遊走は慢性炎症に関与するメディエーターの複雑なネットワークによって起こる。病変部における炎症性細胞およびケラチノサイトはケモカインを高発現しており (17, 18)、ケラチノサイトから産生された thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は樹状細胞を介して T 細胞の分化を誘導するとともに、樹状細胞からの thymus and activation-regulated chemokines や macrophage-derived chemokine の産生を誘導し (19, 20)、局所への T 細胞の遊走を促進することで、皮膚炎は増悪・維持される。

これまでに報告された多くのアレルゲンの中で、特にハウスダストに含まれるダニは生活環境に広く存在し、アレルギーの主な原因と考えられている。室内塵中のダニの中ではチリダニ科のヒョウヒダニが最も多く生息しており、その中でもコナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farirnae*) とヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) が代表的である (21-23)。ダニの虫体破片や排泄物の中には非常に多くのアレルゲンが含まれており (24, 25)、コナヒョウヒダニおよびヤケヒョウヒダニ由来のアレルゲンは非常に高い相同性を有している (25)。ダニによる室内環境の汚染の程度を寝具塵中におけるダニアレルゲンの検出率で比較すると、ダニアレルゲンの検出率は米国や欧州よりも日本で高く、日本ではほぼ全家屋から検出される (26)。AD 患者では血中のダニ特異的 immunoglobulin E (IgE) が高値を示し (27)、皮疹の重症度とダニ特異的 IgE の検出率が相関すること (28)、ダニ特異的な T 細胞が AD 患者の血中で検出されること (29)、AD 患者の多くがパッチテストでダニに対して陽性反応を示すこと (30) から、ダニは AD の主要なアレルゲンであると考えられている。また、数種のダニアレルゲンはプロテアーゼ活性を有し (25)、TEWL の上昇やバリア機能回復の遅延を誘導する (31, 32)。これは AD の原因、増悪因子であるダニがアレルギー反応を誘導するだけでなく、皮膚バリア機能の破壊にも関与する可能性を

示唆している。

AD は遺伝的素因も含んだ多病因性の疾患であるが、その治療は病態に基づいて、皮膚の生理機能異常に対するスキンケア（保湿）と炎症反応の抑制を目的としたステロイド外用剤あるいはタクロリムス軟膏による薬物療法が基本となる。また、外用剤に加えて、止痒作用および一部抗炎症作用を期待して、補助的に抗ヒスタミン薬あるいは抗アレルギー薬の内服が行われる。AD 患者の多くがステロイド外用剤とタクロリムス軟膏の使用により炎症をコントロールできるが、皮膚萎縮や灼熱感などの副作用のため、両薬剤の使用が制限される場合がある (33-36)。また、抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬もその効果が弱く、掻痒を十分コントロールできない場合がある (37)。したがって、AD の治療現場においては十分な薬効を示し、副作用のない新規治療薬が求められており、新規治療薬の薬理作用の解析には AD の病態を反映した動物モデルが必要となる。

AD の動物モデルとしては、ovalbumin、ダニ抗原または oxazolone などの感作物質の塗布により皮膚炎を発症させるモデル、interleukin (IL) -4、IL-31 または TSLP などのサイトカインを過剰発現あるいはアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン E などを欠損させた遺伝子改変モデル、NC/Nga や DS-Nh マウスなど皮膚炎を自然発症するモデルがこれまでに報告されている (38)。これら動物モデルはいずれも AD に類似した病態を形成するものの、各研究においてはそれぞれの特徴を踏まえて動物モデルが選択される (39, 40)。例えば、抗原を塗布するモデルは、簡便かつ短期間に再現性のよい皮膚炎を作製でき、マウスの系統や外的因子の種類により表現型をコントロールし易いという特徴を有する。遺伝子改変モデルは、単一因子に起因する病態であることから、AD の発症・増悪に関わる分子の同定に利用されるが、入手が難しいなどの問題点がある。自然発症モデルは、人為的な操作を加えていないため、病態の経時的な変化の究明に利用できるが、一般的に皮膚炎の発症に要する期間が長く、飼育環境により発症率にばらつきが生じる。上述した動物モデルの中でも、NC/Nga マウスは AD 患者の主要なアレルギーであるダニによって皮膚炎を発症する

ことから、AD 患者の病態に即した動物モデルとして様々な検討に用いられている。

そこで、本研究は NC/Nga マウスの AD 様皮膚炎の解析を通し、AD の病態解明、特に痒みの発症機序の解明を目的とした。第 1 章では、NC/Nga マウスモデルの免疫学的、組織学的特徴を明らかにするとともに、掻痒行動回数の経時変化について検討した。第 2 章では、モデル動物の掻痒行動の機序を明らかにするため、種々の薬物を用いて、より詳細な検討を実施した。第 3 章では、ヒト由来のケラチノサイトを用いて、AD の痒みの発症機序に対するケラチノサイトの関与について検討した。

第1章 ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルのプロファイル

第1節 緒言

ADの動物モデルとして汎用されるNC/Ngaマウスは、specific pathogen-free (SPF) 環境下では皮膚炎を発症せず、conventional 環境下で飼育すると、生後6~8週でADに類似した皮膚炎を自然発症し、血中IgE値の上昇および真皮への炎症性細胞の浸潤とともに激しい掻痒行動が認められる(41-43)。また、このマウスの皮膚にダニ抗原抽出物を反復経皮投与あるいは皮内投与することで、SPF環境下においても短期間に再現良く掻痒を伴う皮膚炎を発症させることができる(44-46)。さらに、コナヒョウヒダニ(*D. farinae*)虫体由来成分を含有するダニ抗原含有軟膏の反復塗布でも、同様の皮膚炎が発症すると報告されている(47, 48)。ダニ抗原含有軟膏に含有されるコナヒョウヒダニはAD患者の主要なアレルゲンであることから、ダニ抗原含有軟膏の反復塗布によって誘導される皮膚炎モデル(本モデル)はADの病態解明に有用な動物モデルであると考えられる。

本モデルに関しては、NC/Ngaマウスの自然発症モデルと同様、これまでにAD様の皮膚炎の発症とともに、血中IgE値の上昇や病変部皮膚における炎症性細胞の浸潤、リンパ節におけるT helper (Th) 1 サイトカイン(interferon (IFN) γ) およびTh2 サイトカイン(IL-5、IL-13) 発現や掻痒行動回数の増加が報告されている(47, 48)。しかしながら、その他のTh1/Th2 サイトカインの産生やダニ抗原含有軟膏の塗布によって誘導される掻痒行動回数の経時変化については不明なままである。そこで、本モデルにおけるTh1/Th2/Th17 サイトカインの産生プロファイル、掻痒行動回数の経時変化および病変部皮膚における神経伸長について明らかにするために、腋窩リンパ節におけるTh1/Th2/Th17 サイトカイン(IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A および tumor necrosis factor (TNF) α) 産生量、ダニ抗原含有軟膏塗布直後から24時間の掻痒行動回数、皮膚における神経伸長因子および神経退縮因

子の発現変化について検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1 実験動物

実験には7週齢の雌性NC/Ngaマウス（Charles River Laboratories Japan, Kanagawa, Japan）を使用した。動物は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、12時間ごとの明暗サイクル（照明時間 7:00～19:00）による人工照明の環境下で飼育し、放射線滅菌固型飼料 CRF-1（Oriental Yeast, Tokyo, Japan）および紫外線滅菌した水道水を自由摂取させた。また、明暗サイクルを逆転（照明時間 19:00～7:00）させ、搔痒行動回数に対する明暗サイクルの影響を検討した。すべての動物実験はマルホ株式会社動物実験倫理委員会の承認を受け、動物実験実施規程に準拠して実施した。

2.2 皮膚炎の惹起

AD様の皮膚炎は山本らの報告（47, 48）に従い、NC/Ngaマウスの背部に発症させた。すなわち、day 0に、イソフルラン吸入麻酔下で、動物の背部全面をバリカンで毛刈りし、除毛クリームを10分間塗布した。その後、除毛クリームを拭き取り、直ちにダニ抗原含有軟膏（Biostir® AD, Biostir, Kobe, Japan）100 mgを背部に塗布して感作した。Day 3、7および10にはまず、イソフルラン麻酔下で4 w/v% sodium dodecyl sulfate（SDS）水溶液150 μL を背部に塗布し、ドライヤーの冷風で乾燥させ、2時間以上放置した後、ダニ抗原含有軟膏100 mgを同部位に均一に塗布して皮膚炎を惹起した。対照動物にはダニ抗原含有軟膏の代わりに親水ワセリン（Nikko Pharmaceutical, Gifu, Japan）を同様に塗布した。

Day 14には、2.3に示す皮膚炎スコアの判定基準に基づき、I. 出血・痂皮形成、II. 乾燥およびIII. 皮膚肥厚・丘疹のスコアの合計が5以上の動物を慢性皮膚炎モデルとして選別した。その後、4 w/v% SDS水溶液およびダニ抗原含有軟膏を塗布した。また、day 17にも同様の処置を繰り返した。さらに、自発的な搔痒行動回数を測定するため、day 21または

22 までマウスを飼育した。

2.3 皮膚炎スコアの判定

イソフルラン吸入麻酔下で、表 1 に示す皮膚炎スコアの判定基準に従い、背部の I. 出血・痂皮形成、II. 乾燥および III. 皮膚肥厚・丘疹の程度をそれぞれ採点した。それらの合計を、各個体の皮膚炎スコアとした（最高評点 9）。皮膚炎スコアの判定日は、day 0、3、7、10、14 および 17 とし、各日の除毛後または SDS 水溶液塗布前に実施した。

表1 皮膚炎スコアの判定基準

I. 出血・痂皮形成（背部の出血および痂皮形成を観察する）

0	無症状	背部に出血および痂皮が認められない状態
1	軽度	背部に小さな点状出血あるいは痂皮が局所的に認められる状態
2	中等度	背部に点状出血あるいは痂皮が散在的に認められる状態
3	重度	背部に点状出血あるいは痂皮が全体的に認められるか、大きな出血が認められる状態

II. 乾燥（背部の乾燥症状を観察する）

0	無症状	背部に乾燥症状なし
1	軽度	背部に細かな角質の剥離が認められる状態
2	中等度	背部に明らかな角質剥離があり、白色化が認められる状態
3	重度	背部に明らかな角質剥離があり、重度の白色化が認められる状態

III. 皮膚肥厚・丘疹（背部皮膚の肥厚および丘疹を観察する）

0	無症状	触診にて背部に厚みが感じられない状態
---	-----	--------------------

1 軽度	触診にて背部にわずかな厚みを感じられる、あるいは数個の丘疹が認められる状態
2 中等度	触診にて背部に明らかな厚みを感じられる、あるいは丘疹が散在的に認められる状態
3 重度	触診にて背部に明らかな厚みがあり、硬さも感じられる、あるいは連続的な丘疹形成が認められる状態

2.4 血漿中総 IgE 値の測定

Day 0、7 および 13 にマウスの尾動脈よりヘパリン処置したパスツールピペットを用いて血液を採取した。採取した血液をチューブへ移し、遠心（5,000×g, 10 分間, 4°C）により血漿を分取し、超低温下（-80°C 以下）で保管した。総 IgE 値の測定は Mouse IgE enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) のマニュアルに従い、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA）で測定した。

2.5 組織学的検討

ダニ抗原含有軟膏の最終塗布翌日（Day 18）に背部皮膚を採取し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液中で室温、一晚固定した。固定したサンプルのパラフィンブロックを作製し、4 μm の厚さで薄切した。薄切した組織をスライドガラスに展開し、乾燥させた。最後に、脱パラフィン、ヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin and eosin, HE）またはトルイジンブルー（toluidin blue, TB）染色した後、脱水・透徹、エンテラン封入を行った。

作製した HE 染色標本を用いて、表皮厚を測定した（倍率 100 倍）。任意に選択した 5 カ所を顕微鏡デジタルカメラで撮影し、各写真からさらに任意に選択した 3 カ所の表皮厚を画像解析（cellSens imaging software, Olympus, Tokyo, Japan）により測定した（1 標本につき 15 カ所測定）。これら測定値の平均値を各個体の表皮厚とした。

作製した TB 染色標本を用いて、肥満細胞数を測定した（倍率 200 倍）。任意に選択した

10カ所を顕微鏡デジタルカメラで撮影し、各視野における真皮中の肥満細胞数を測定した。これら測定値の平均値を1視野あたりの肥満細胞数とした。

2.6 掻痒行動の測定

マウスの掻痒行動回数は無人環境下で MicroAct (Neuroscience, Tokyo, Japan) を用いて測定した。Day 8 または 9 に、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの両後肢皮下（甲側）に掻痒測定用マグネット（直径 1 mm, 長さ 3 mm）を埋め込んだ。Day 14 では、ダニ抗原含有軟膏の塗布（塗布時刻 12:00）直後から掻痒行動回数を 24 時間測定した。なお、掻痒行動回数の測定前には、マウスをスクラッチ測定ユニット（直径 11 cm, 高さ 18 cm）内で 1 時間以上馴化した。また、自発的な掻痒行動回数を測定するため、day 21 または 22 に掻痒行動回数を 24 時間測定した。

2.7 免疫染色

Day 18 に採取した皮膚サンプルを 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液中で 4°C、3 時間以上固定した後、30% sucrose を含有する phosphate-buffered saline (PBS) で 4°C、一晩浸漬した。翌日、OCT コンパウンド (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋し、薄切するまで超低温下 (-80°C 以下) で保管した。クリオスタット (CM1950, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、20 μm の厚さで薄切した後、切片をスライドガラスに張り付け、超低温下 (-80°C 以下) で保管した。

薄切した切片を 0.3% Triton X-100 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 含有 PBS で洗浄した後、1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 含有 PBS でブロックし、rabbit anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibody (100 倍希釈, UltraClone, Isle of Wight, UK) とともに室温で 2 時間インキュベートした。その後、0.3% Triton X-100 含有 PBS で洗浄し、Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit antibody (100 倍希釈, Molecular Probes, Eugene, OR,

USA) とともに室温で 1 時間インキュベートした。染色切片の画像は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) を用いて撮影し、表皮における神経線維の面積を Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA) で測定した。

2.8 皮膚中 nerve growth factor (NGF) および semaphorin 3A (Sema3A) 量の測定

Day 18 に採取した皮膚サンプル(直径 5 mm)に protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem, San Diego, CA, USA) を含有する PBS 150 μ L を加え、シェイクマスター (Biomedical Sciences, Tokyo, Japan) でホモジネートした後、遠心分離 (10,000 \times g, 10 分間, 4 $^{\circ}$ C) した。上清を分離し、NGF および Sema3A 量をそれぞれ ChemiKineTM NGF Sandwich ELISA kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA) および mouse Sema3A ELISA kit (Cusabio, Wuhan, China) を用いて測定した。

2.9 腋窩リンパ節細胞数、増殖能、サイトカイン産生量の測定

Day 14 に腋窩リンパ節を採取し、シリンジの内筒を用いて組織を破碎し、リンパ節細胞を得た。細胞懸濁液を 70 μ m セルストレイナーに通し、遠心分離 (1,300 rpm, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C) した。上清を除去した後、リンパ節細胞を 10% fetal bovine serum (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)、55 μ M β -mercaptoethanol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、100 U/mL penicillin および 100 μ g/mL streptomycin (Nacalai Tesque) を含有する RPMI-1640 培地 (Life Technologies) に再懸濁し、コールターカウンター (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて細胞数をカウントした。その後、リンパ節細胞を 4×10^5 cells/well で 96 well マイクロプレートに播種し、ダニ抗原抽出物 (終濃度 10 μ g/mL, Biostir) で刺激し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養終了後に上清を回収し、各種サイトカインの測定まで超低温下 (-80 $^{\circ}$ C 以下) で保管した。

ダニ抗原刺激後のリンパ節細胞数は、Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を用いて、細胞の WST-8 還元能を指標に測定した。すなわち、上清を回収した後、RPMI-1640 培地および Cell Count Reagent SF を添加して、2 時間培養した。その後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光値 (OD₄₅₀₋₆₅₀) を測定した。

回収した培養上清中の TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A および IFN- γ 量は mouse Th1/Th2/Th17 cytometric bead array kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) および FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて測定した。

2.10 統計解析

データは平均 \pm 標準誤差で示した。皮膚炎スコアは 2 群間で Wilcoxon の順位和検定を行った。その他の 2 群間の比較では F 検定を行い、等分散の場合は Student's *t*-検定、不等分散の場合は Aspin-Welch's *t*-検定を行った。統計学的有意水準は 5%未満とした ($P < 0.05$, 両側検定)。

第3節 結果

3.1 皮膚炎スコアおよび血漿中総 IgE 値

ダニ抗原含有軟膏の塗布で day 3 より乾燥に次いで、出血・痂皮形成および肥厚・丘疹が認められ、皮膚炎スコアは徐々に上昇した。一方、親水ワセリンを塗布した対照動物では皮膚炎スコアはほとんど変化しなかった (Fig. 1a)。Fig. 1b に親水ワセリンまたはダニ抗原含有軟膏を塗布した背部皮膚 (day 17) の写真を示す。また、モデル動物の血漿中総 IgE 値は対照動物と比較し、day 13 に有意に上昇した (Fig. 2)。

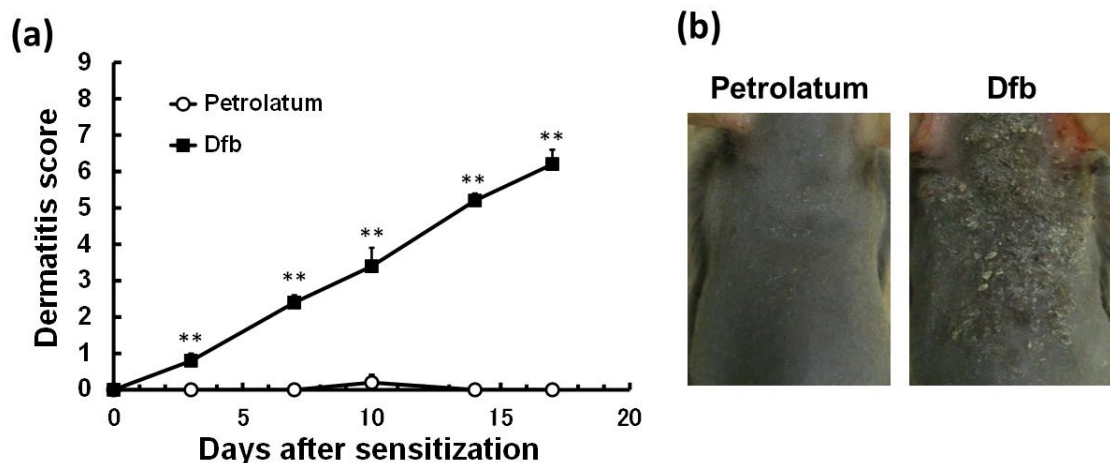


Figure 1 Time course of dermatitis score after repeated topical application of an ointment containing *Dermatophagoides farinae* body (Dfb) extract in NC/Nga mice.

Dfb ointment (100 mg) was applied topically on the dorsal skin after disruption of the skin barrier with a depilatory cream on day 0 and with 4% SDS (150 μ L) on days 3, 7, 10, 14 and 17. Control animals (petrolatum) were treated with hydrophilic petrolatum instead of Dfb ointment. (a) Dermatitis score. ** $P < 0.01$, compared with control mice (petrolatum). (b) Representative skin features on day 17. Each data represents the mean \pm SEM (n=5).

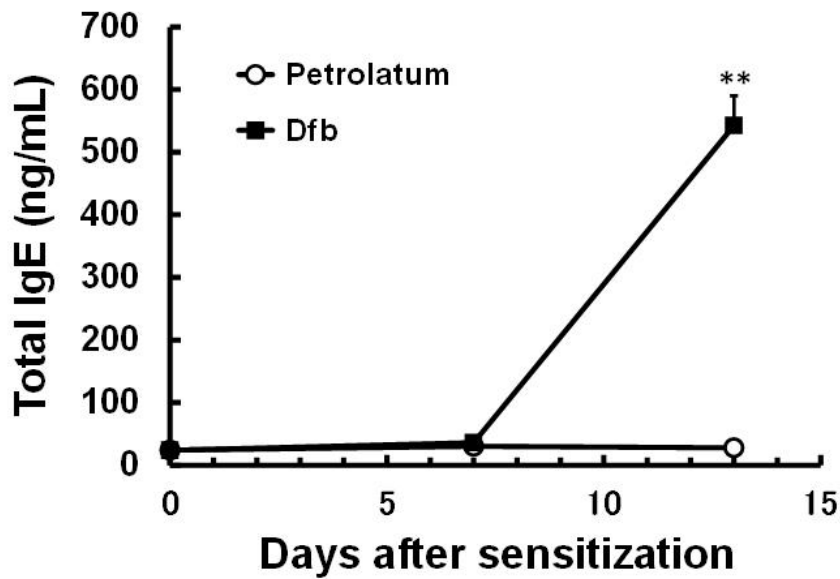


Figure 2 Time course of plasma total IgE level after repeated topical application of Dfb ointment in NC/Nga mice.

Dfb ointment (100 mg) was applied topically on the dorsal skin after disruption of the skin barrier with a depilatory cream on day 0 and with 4% SDS (150 μ L) on days 3, 7, 10, 14 and 17. Control animals (petrolatum) were treated with hydrophilic petrolatum instead of Dfb ointment. Total IgE levels in plasma were measured by ELISA. Each data represents the mean \pm SEM (n=8-9). **P < 0.01, compared with control mice (petrolatum).

3.2 病変部皮膚の組織学的評価

モデル動物では表皮の肥厚および真皮における炎症性細胞（リンパ球、好酸球）の浸潤が認められた（Fig. 3a）。対照動物と比較し、病変部皮膚では表皮厚が有意に増加した（Fig. 3b）。また、真皮における肥満細胞数の有意な増加が認められた（Fig. 3c, d）。

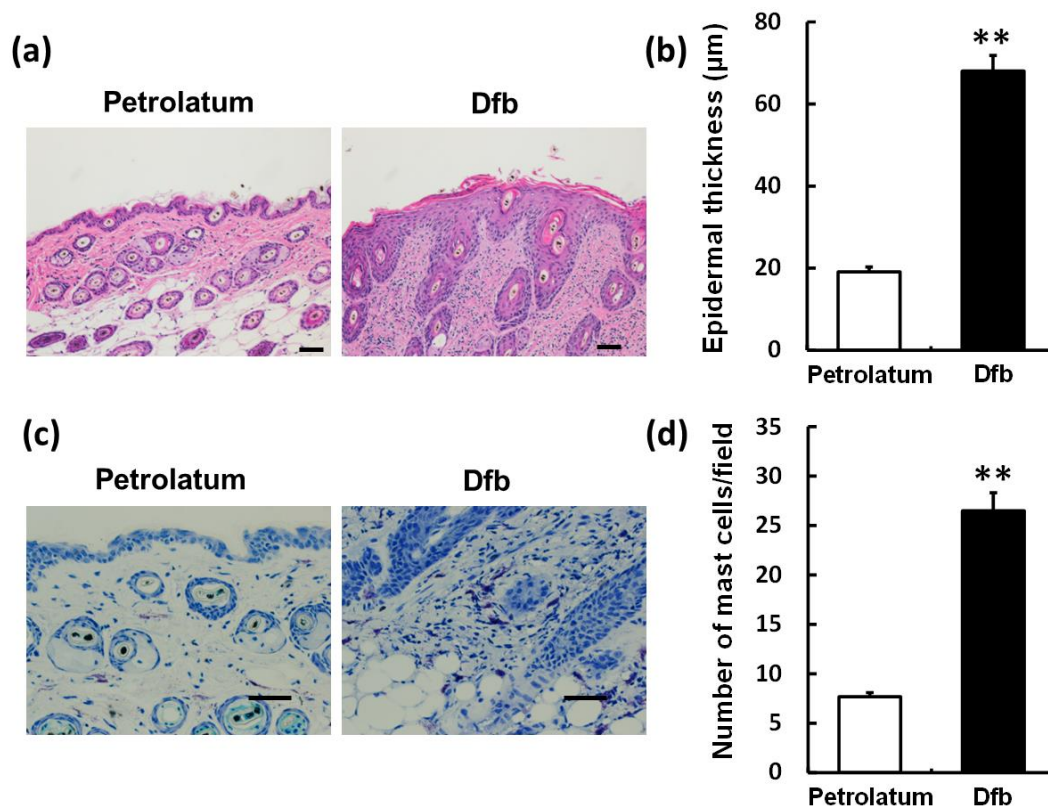
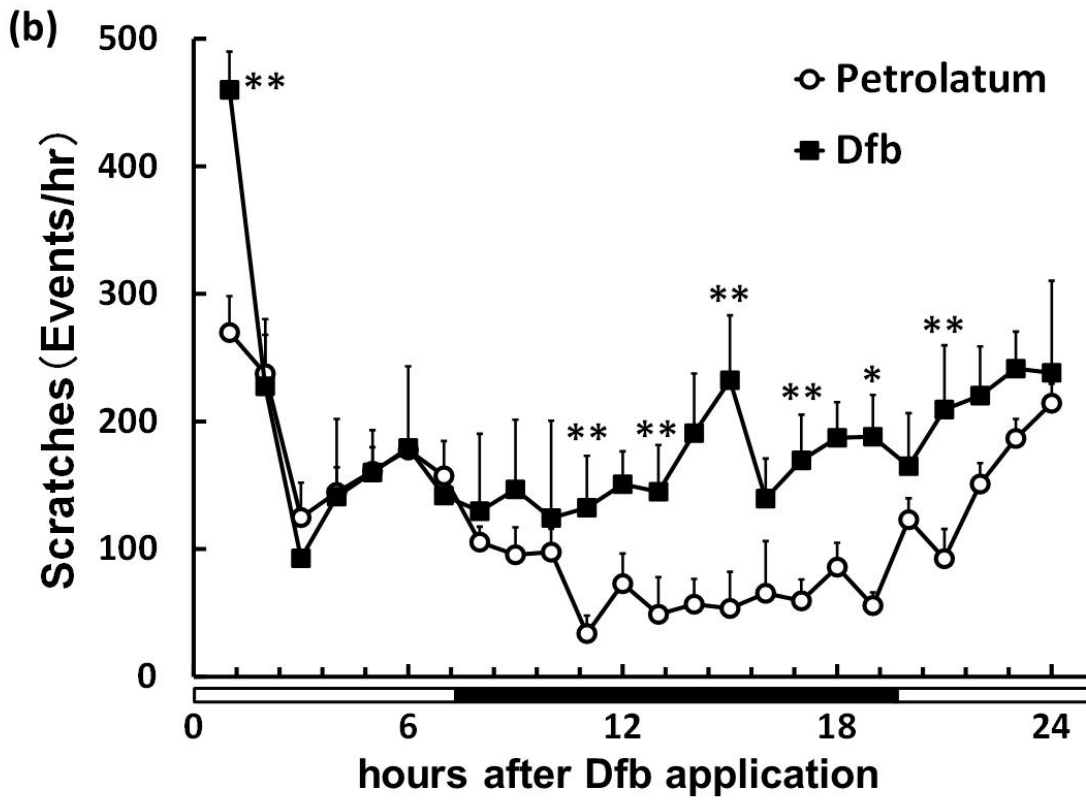
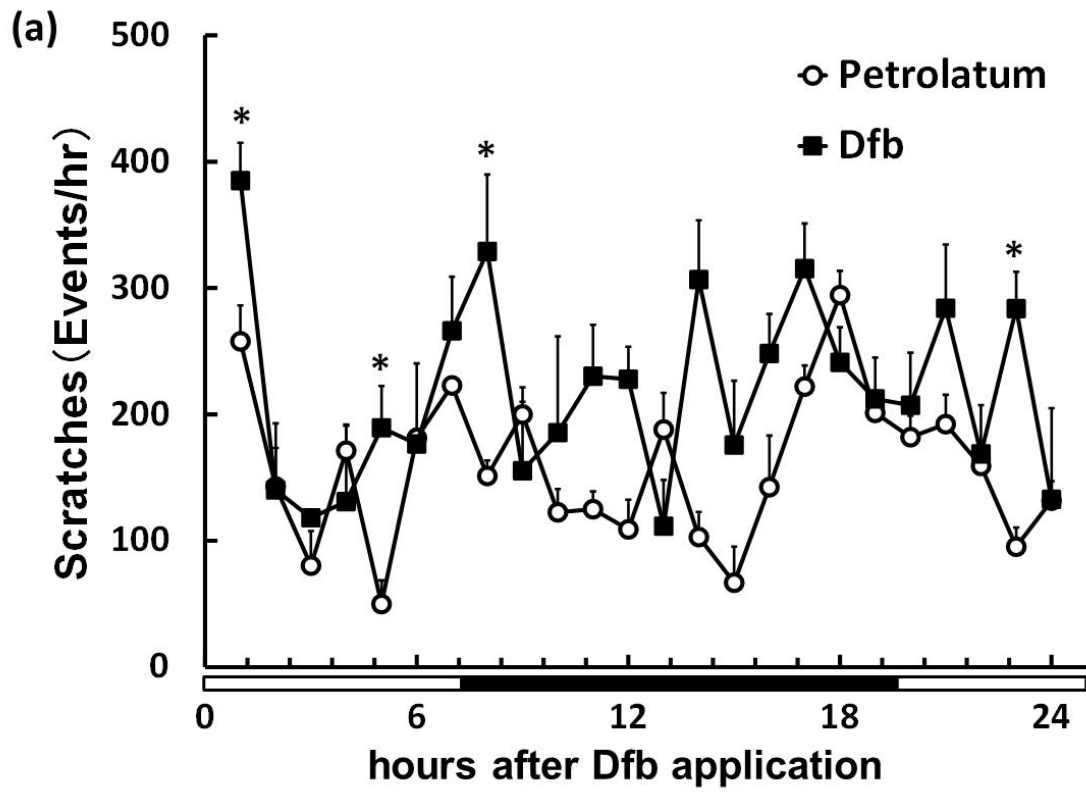


Figure 3 Histological changes of the dorsal skin after repeated topical application of Dfb ointment in NC/Nga mice.

Dfb ointment (100 mg) was applied topically on the dorsal skin after disruption of the skin barrier with a depilatory cream on day 0 and with 4% SDS (150 µL) on days 3, 7, 10, 14 and 17. Control animals (petrolatum) were treated with hydrophilic petrolatum instead of Dfb ointment. The dorsal skin excised on day 18 was stained with (a) HE and (c) TB. Bars in photographs: 50 µm. (b) Epidermal thickness measured in HE-stained sections at a magnification of $\times 100$. (d) The number of mast cells counted in TB-stained sections at a magnification of $\times 200$. Each data represents the mean \pm SEM (n=5). **P < 0.01, compared with control mice (petrolatum).

3.3 掻痒行動

掻痒行動回数の経時推移を確認するため、12時間の明暗サイクル(照明時間 7:00~19:00)環境下でダニ抗原含有軟膏塗布(塗布時刻 12:00)後から24時間の掻痒行動回数を測定した。その結果、ダニ抗原含有軟膏塗布後に掻痒行動回数は2相性に増加した(Fig. 4a)。すなわち、ダニ抗原含有軟膏塗布1時間後に有意に増加し(1相目)、その後、一旦減少したが、4時間後付近より再び増加し、その増加は24時間後まで維持した(2相目)。また、明暗サイクルを逆転させた環境下(照明時間 19:00~7:00)においても、掻痒行動回数は2相性に増加した(Fig. 4b)。さらに、自発的な掻痒行動を測定するため、ダニ抗原含有軟膏を塗布せずに掻痒行動回数を24時間測定した。その結果、モデル動物で24時間通して慢性的に掻痒行動回数が増加していた(Fig. 4c)。



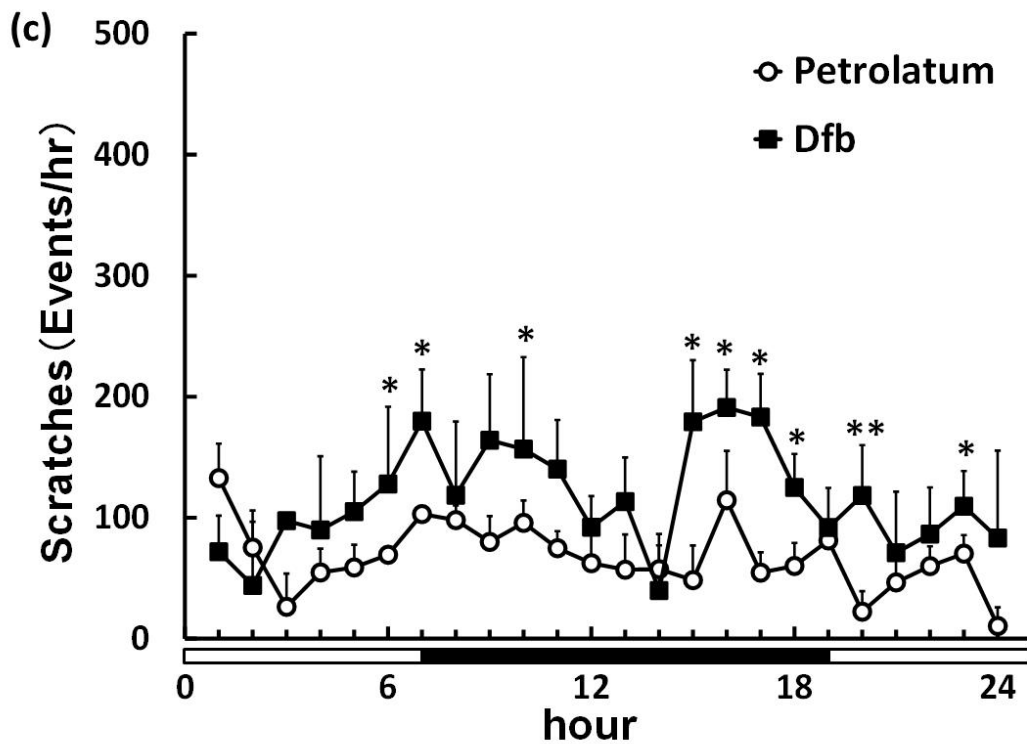


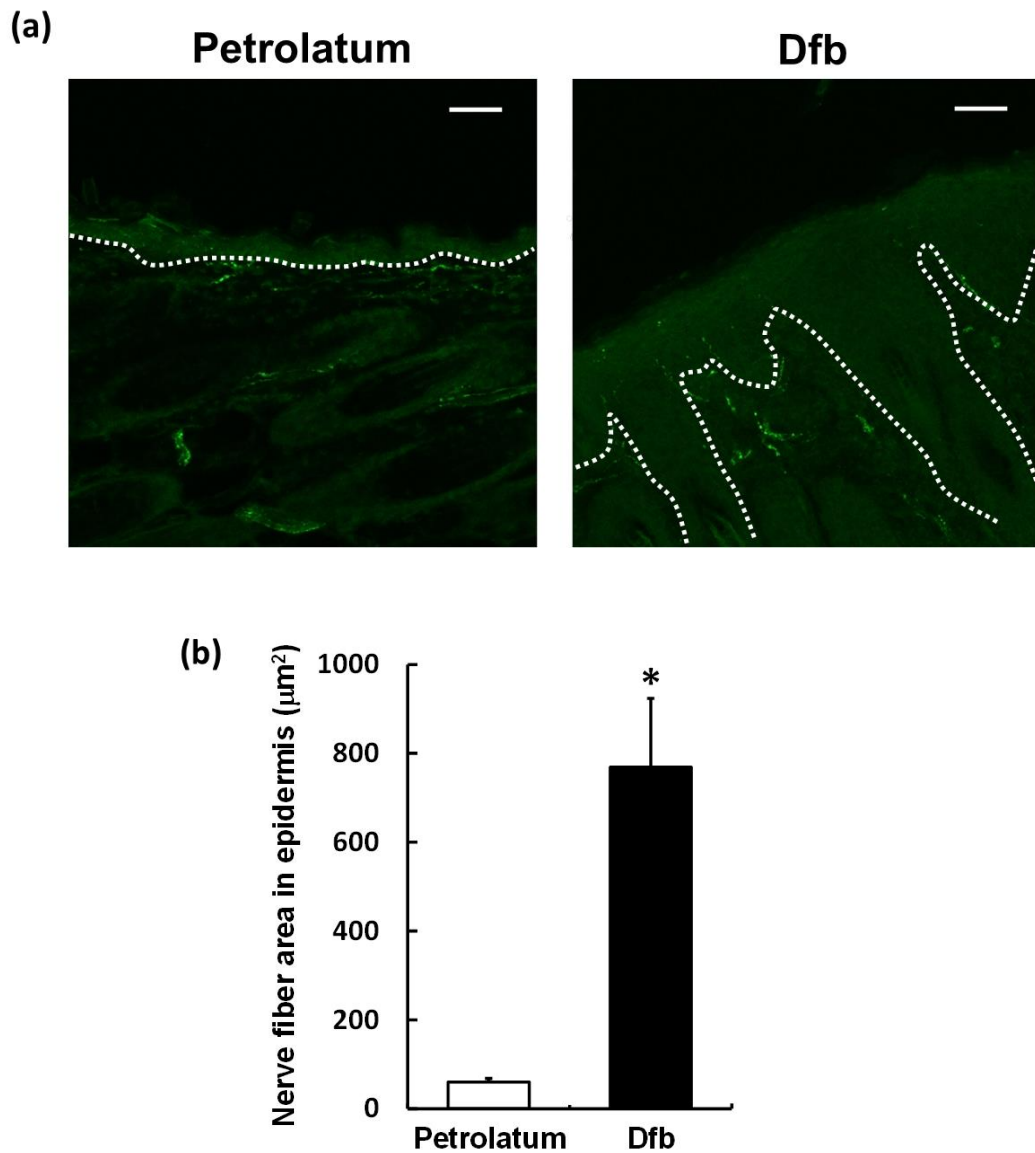
Figure 4 Time course of the number of scratching behavior in AD-like mice.

The number of scratching behavior (events) was measured for 24 hours from day 14 to day 15 after topical application of Dfb ointment (application time 12:00) under (a) a 12-hours light/dark cycle (lights on from 7:00 to 19:00) and (b) the reversed light/dark cycle (lights on from 19:00 to 7:00). (c) The number of spontaneous scratching behavior (events) was measured for 24 hours on day 21 or day 22 without application of the Dfb ointment. The white and black bars indicate the light and dark periods in the animal room, respectively. Each point represents the mean \pm SEM (n=4-8). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with control mice (petrolatum).

3.4 病変部皮膚における神経伸長

対照動物では PGP9.5 陽性神経はほとんど認められなかったのに対し、モデル動物では真皮における PGP9.5 陽性神経の増加および表皮への伸長が認められた (Fig. 5a)。また、表皮における PGP9.5 陽性神経の面積は有意に増加していた (Fig. 5b)。

対照動物と比較して、モデル動物で病変部皮膚における NGF 量の有意な増加および Sema3A 量の有意な減少が認められた (Fig. 5c, d)。



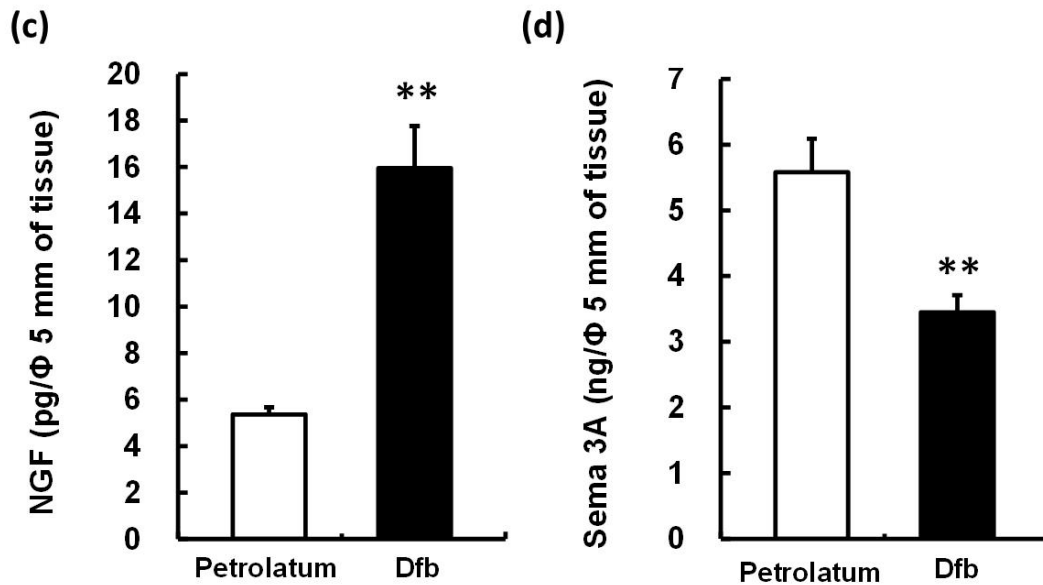
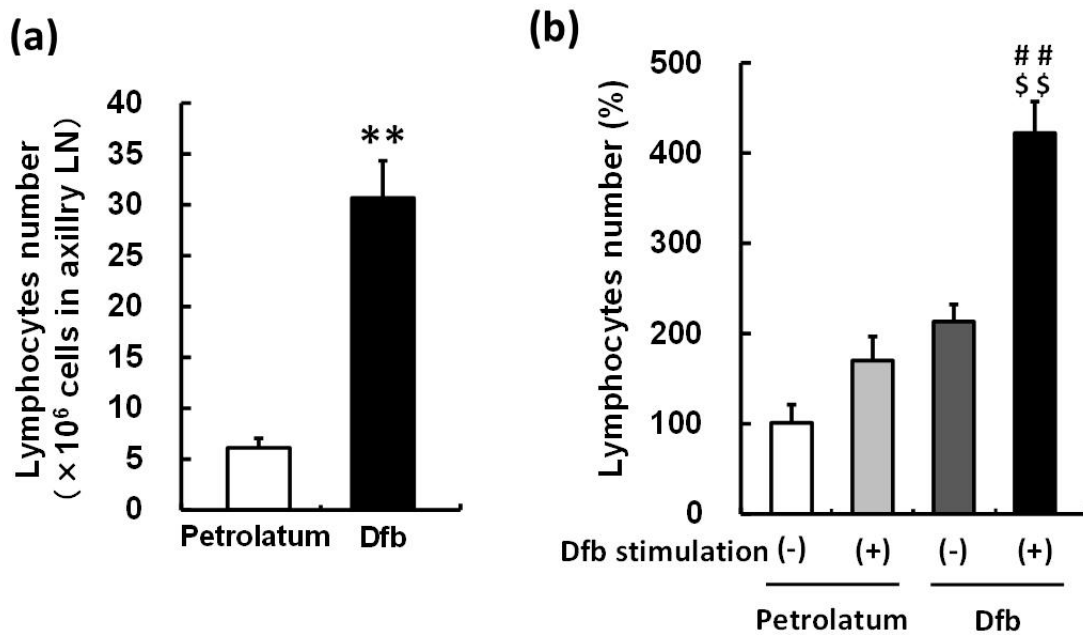


Figure 5 Increases in PGP9.5-positive nerve fibers and contents of NGF and Sema3A in the lesional skin of AD-like mice.

(a) The dorsal skin excised on day 18 was stained with anti-PGP9.5 antibody (original magnification, $\times 200$). White broken line indicates the border between the epidermis and dermis. Bar: 50 μm . (b) The area of PGP9.5-positive nerve fibers was quantified in the epidermis using image software. (c) NGF and (d) Sema3A levels in the skin on day 18 were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SEM ($n=5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control mice (petrolatum).

3.5 腋窩リンパ節細胞数、増殖能、サイトカイン産生量

モデル動物の腋窩リンパ節細胞数は、対照動物と比較して、有意に多かった (Fig. 6a)。また、モデル動物のリンパ節細胞では、非刺激時と比較して、ダニ抗原刺激で有意に高い細胞増殖が認められ、この細胞増殖は対照動物のリンパ節細胞のそれと比較しても有意に高かった (Fig. 6b)。また、モデル動物のリンパ節細胞をダニ抗原で刺激した結果、培養上清中の TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-17A および IFN- γ 量の増加が認められた (Fig. 6c)。一方、対照動物のリンパ節細胞では、これらサイトカインの増加は認められなかった。なお、培養上清中の IL-4 量はいずれのサンプルにおいても検出限界値未満であった。



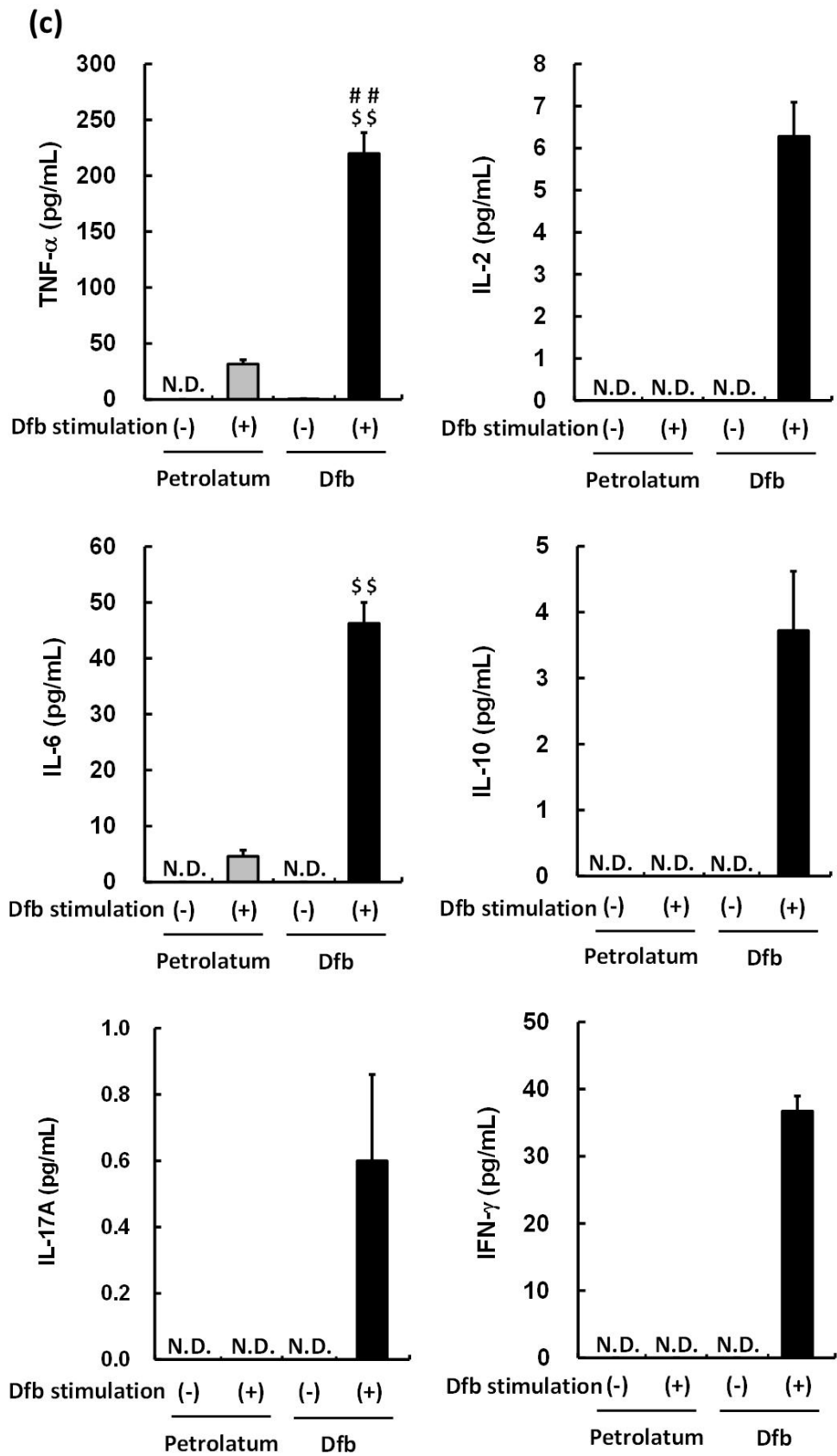


Figure 6 Increases in cell number, cell proliferation and cytokine levels in axillary lymph node cells isolated from AD-like mice.

Axillary lymph nodes were isolated on day 14 and homogenated to make a single cell suspension.

(a) The number of lymph node cells was counted using a Coulter counter. (b) The cell proliferation and (c) cytokine levels in the culture supernatant of the lymph node cells were measured 24 hours after stimulation with 10 µg/mL Dfb extract by WST-8 assay and cytometric bead assay, respectively.

The cell proliferation is expressed relative to those in the lymph node cells from control mice without stimulation with Dfb extract, which are normalized as 100%. Each column represents the mean ± SEM (n=5-6). **P < 0.01, compared with control mice (petrolatum). \$\$P < 0.01, compared with control mice (petrolatum) with Dfb stimulation. ##P < 0.01, compared with Dfb ointment-applied mice without Dfb stimulation. N.D.: Not detected.

第4節 考察

本章では、コナヒョウヒダニ虫体由来成分を含有するダニ抗原含有軟膏を NC/Nga マウスの背部皮膚に反復塗布することで皮膚炎を発症させ、本モデルの免疫学的、組織学的特徴を明らかにする目的で、腋窩リンパ節におけるサイトカインプロファイルおよび病変部皮膚における神経伸長因子・神経退縮因子の発現変化について検討した。また、ダニ抗原含有軟膏塗布後から 24 時間の搔痒行動を測定し、搔痒行動回数の経時変化について検討した。

まず、臨床的な特徴として、本モデルでは乾燥に次いで、出血・痂皮形成および肥厚・丘疹が認められ、モデル動物で血中 IgE 値が増加した。組織学的には、表皮の肥厚、真皮への炎症性細胞の浸潤、真皮における肥満細胞数の増加が認められた。

AD 患者では、皮膚バリア機能の指標の一つである TEWL が病変部だけでなく、非病変部でも増加しており、皮膚の乾燥が認められる (9)。また、AD における炎症は血中 IgE 値の上昇と表皮の肥厚、炎症性細胞の浸潤を伴う (7) ことから、本モデルは AD 患者の臨床的、組織学的特徴を反映したモデルであると考えられる。

本モデルの搔痒行動はダニ抗原含有軟膏塗布の 1 時間後および 4 時間後以降に 2 相性に増加した。2 相性の搔痒行動回数の増加は明暗サイクルを逆転させた環境下においても同様に認められたことから、この反応は動物のサーカディアン・リズムに依存しないと考えられる。また、モデル動物ではダニ抗原含有軟膏を塗布しなくても自発的に搔痒行動回数が増加していた。したがって、本モデルの搔痒行動回数は皮膚炎の発症後に慢性的に増加しており、ダニ抗原含有軟膏の塗布がさらなる搔痒行動回数の増加を誘導しているものと考えられる。

AD 患者の病変部皮膚では健常人と比較して、表皮への神経伸長が報告されており、これが末梢における痒み閾値の低下につながると考えられている (49-51)。また、神経伸長因子である NGF や神経退縮因子である Sema3A はケラチノサイトで産生される (52-54)。つま

り、皮膚における痒み過敏はケラチノサイトによって産生される NGF といった神経伸長因子と Sema3A といった神経退縮因子のアンバランスによって生じる (51)。本モデルでは病変部皮膚における NGF の増加と Sema3A の減少に伴う表皮への神経伸長が認められた。したがって、本モデルにおいても表皮への神経伸長による痒み感覚の異常が掻痒行動の増加に関与している可能性が示唆された。

環境抗原に対する T 細胞反応によって産生された Th1 および Th2 サイトカインは AD における炎症反応の惹起および維持に関与する。実際、AD 患者の末梢血単核細胞をダニ抗原で刺激すると、ダニ抗原特異的な T 細胞の増殖が誘導され、その程度は AD の重症度と相関する (55)。また、急性期の病変部皮膚では Th2 細胞優位であるのに対し、慢性期の病変部皮膚では Th1 および Th2 細胞の両方が存在する、あるいは Th1 細胞優位であると報告されている (56)。また、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-10) および Th1 サイトカイン (IFN- γ 、IL-2) の発現が同一患者の病変部皮膚で報告されている (57, 58)。Th17 サイトカインである IL-17 も AD の病態形成に関与すると考えられており、AD 患者の末梢血中における Th17 細胞の割合は AD の重症度と相関する (59)。さらに、健常人と比較し、AD 患者では血中 IL-2、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17A および IFN- γ 量が増加している (60)。本モデルでは腋窩リンパ節細胞数の増加、細胞増殖の亢進、サイトカイン (TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-17A および IFN- γ) 産生量の増加が認められ、モデル動物でリンパ節細胞からの IFN- γ 量が増加するという過去の報告 (47) と一致する結果が得られた。したがって、AD 患者と同様に、本モデルではダニ抗原特異的な T 細胞が Th1、Th2 および Th17 サイトカインの産生を介して慢性皮膚炎の発症および維持に関与すると考えられる。

以上の成績をまとめると、ダニ抗原含有軟膏の反復塗布により NC/Nga マウスの背部で AD 様の皮膚炎が誘導され、モデル動物の臨床的、組織学的、免疫学的な特徴は AD 患者のそれと類似していた。また、本モデルで掻痒行動回数は慢性的に増加し、ダニ抗原含有軟膏の塗布によって 2 相性に増加することを明らかにした。本モデルにおける掻痒行動のメ

メカニズムを解析することは、AD の病態解明だけでなく、新規治療薬の探索に繋がると考えられる。

第2章 ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの掻痒行動のメカニズム

第1節 緒言

AD は皮膚バリア機能障害と種々の環境抗原に対する免疫反応の異常によって特徴づけられる慢性炎症性皮膚疾患である (3)。多くの AD 患者が激しい掻痒感に苦しんでおり、掻痒は掻破を誘発して皮膚症状を悪化させ、さらに痒みが増強するという悪循環 (itch-scratch cycle) を招く (7)。また、健常人と比較して、AD 患者の皮膚では神経の伸長が認められるため、痒み閾値の低下が起こっており、僅かな刺激で掻痒が誘導されると考えられている (49, 50, 61)。経口抗ヒスタミン薬は 10 年以上に亘って AD に伴う掻痒に対して処方されているが、その効果は必ずしも十分でない (37)。したがって、神経ペプチド、神経伝達物質、サイトカイン、プロテアーゼ、アラキドン酸代謝物などの他の内因性起痒物質が AD の痒みに関与すると考えられている (61)。

Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) は G タンパク共役型受容体であり、プロテアーゼが作用すると細胞外の N 末端領域の特定部位が切断され、新しく露出した N 末端が自らの細胞外第 2 ループに結合して、細胞内に情報が伝達される (62, 63)。皮膚では特にケラチノサイトで PAR-2 の発現が認められる (63-65)。コナヒョウヒダニなどは AD の病態形成に関与する主要アレルゲンであり、プロテアーゼ活性を有する種々のアレルゲンを含有する (24, 25)。また、ダニ抗原由来セリンプロテアーゼはケラチノサイトに発現した PAR-2 を活性化し、サイトカイン産生を誘導する (66)。さらに、AD 患者の病変部皮膚では知覚神経における PAR-2 発現の増加が認められており、PAR-2 アゴニストの皮内投与は痒みを惹起することから、PAR-2 は AD 患者の痒みに関与すると考えられている (67)。上述の報告は、ダニ抗原由来のプロテアーゼが PAR-2 の活性化による皮膚炎の増悪と掻痒の誘導を介して AD の病態形成に関与する可能性を示唆している。

NC/Nga マウスはダニ抗原含有軟膏の反復塗布により、自発的な搔痒行動回数の増加、血中 IgE 値の上昇、病変部皮膚における炎症性細胞の浸潤、リンパ節細胞における Th1 および Th2 サイトカイン産生の増加を伴って、皮膚炎を発症する (47, 48)。第 1 章では、本モデルの臨床的、組織学的、免疫学的特徴は AD 患者のそれと類似しており、ダニ抗原含有軟膏塗布後に 2 相性に搔痒行動回数が増加することを確認した。しかしながら、1 相目および 2 相目の搔痒行動のメカニズムについては不明なままである。

そこで、第 2 章では、搔痒行動に関与するメディエーターを特定するために、ダニ抗原含有軟膏塗布 1 および 24 時間後の病変部皮膚における内因性痒み関連因子の産生量について検討した。また、本モデルの搔痒行動に対する即時型アレルギー反応および PAR-2 活性化の関与について検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1 実験動物

実験には7週齢の雌性NC/Ngaマウス（Charles River Laboratories Japan）を使用した。動物は室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、12時間ごとの明暗サイクル（照明時間 7:00～19:00）による人工照明の環境下で飼育し、放射線滅菌固型飼料 CRF-1（Oriental Yeast）および紫外線滅菌した水道水を自由摂取させた。すべての動物実験はマルホ株式会社動物実験倫理委員会の承認を受け、動物実験実施規程に準拠して実施した。

2.2 試薬

SDS および chlorpheniramine maleate（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）は超純水に溶解した。Evans blue dye（Nacalai Tesque）、cromoglycate（Sigma-Aldrich）、gabexate mesylate（Sigma-Aldrich）および anti-PAR-2 antibody（SAM-11, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）は生理食塩液に溶解した。

2.3 皮膚炎の惹起

第1章に示す方法で皮膚炎を惹起し、day 14 に慢性皮膚炎モデルを選別した。その後、4 w/v% SDS 水溶液およびダニ抗原含有軟膏を塗布した。また、day 17 にも同様の処置を繰り返した。

2.4 皮膚炎スコアの判定

第1章に示す方法で皮膚炎スコアを判定した。

2.5 掻痒行動の測定

第1章に示す方法で day 14 および 17 に、ダニ抗原含有軟膏の塗布直後から掻痒行動回数を 24 時間測定した。なお、掻痒行動回数の測定前には、マウスをスクラッチ測定ユニット内で 1 時間以上馴化した。

2.7 薬物投与

Chlorpheniramine (10 mg/kg, p.o.)、cromoglycate (100 mg/kg, s.c.)、gabexate (10 mg/kg, s.c.) および anti-PAR-2 antibody (0.2 mg/kg, i.v.) はそれぞれ day 17 の掻痒行動の測定の 60 分前、10 分前、30 分前および 60 分前に投与した。対照動物には溶媒を 10 mL/kg の容量で投与した。

2.8 血管透過性の評価

Day 17 の親水ワセリンまたはダニ抗原含有軟膏の塗布直前にイソフルラン吸入麻酔下で動物に 0.5% Evans blue 生理食塩溶液 0.25 mL を尾静脈内投与した。その 1 時間後にマウスを頸椎脱臼し、親水ワセリンまたはダニ抗原含有軟膏を塗布した背部皮膚を採取した。採取した皮膚片は細かく裁断しながら、1 N KOH 0.7 mL の入ったチューブに加え、37°C で一晩放置して組織を溶解させた。その後、9.3 mL のリン酸アセトン混液を加えて全量を 10 mL とし、激しく振盪した。析出した不溶物をセルストレイナーで濾去し、濾液の 620 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。Evans blue 含有 1 N KOH に同様の処置をして作製した検量線から、各個体の皮膚における色素漏出量 ($\mu\text{g}/\text{site}$) を算出した。

2.9 内因性痒み関連因子の測定

ダニ抗原含有軟膏の塗布 1 および 24 時間後に採取した皮膚サンプル (直径 5 mm) に protease inhibitor cocktail set III を含有する PBS 150 μL を加え、シェイクマスターでホモジネ

ートした後、遠心分離 (10,000×g, 10 分間, 4°C) した。上清を分取し、皮膚中の各種メディエーター量をヒスタミン、5-hydroxytryptamine (5-HT)、gastrin releasing peptide (GRP) (Cusabio Biotech)、substance P (SP) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)、IL-31 (USCN Life Science, Wuhan, China)、TSLP、prostaglandin (PG) E₂、endothelin (ET) -1、periostin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) の ELISA キットを用いて測定した。

2.10 免疫染色

Day 18 に採取した皮膚サンプルを 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液中で 4°C、3 時間以上固定した後、30% sucrose を含有する PBS で 4°C、一晚浸漬した。翌日、OCT コンパウンドに包埋し、クリオスタットを用いて、20 μm の厚さで薄切した後、切片をスライドガラスに張り付け、超低温下 (-80°C 以下) で保管した。

薄切した切片を 0.3% Triton X-100 含有 PBS で洗浄した後、1% bovine serum albumin 含有 PBS でブロックし、goat anti-PAR-2 antibody (50 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology) とともに室温で 2 時間インキュベートした。その後、0.3% Triton X-100 含有 PBS で洗浄し、rhodamine-conjugated anti-goat antibody (100 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology) とともに室温で 1 時間インキュベートした。染色切片の画像は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した。

2.11 統計解析

データは平均 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較では F 検定を行い、等分散の場合は Student's *t*-検定、不等分散の場合は Aspin-Welch's *t*-検定を行った。統計学的有意水準は 5% 未満とした ($P < 0.05$, 両側検定)。

第3節 結果

3.1 内因性痒み関連因子の変化

2相性の搔痒行動回数の増加に關与するメディエーターを探索するため、ダニ抗原含有軟膏塗布1または24時間後に背部皮膚を採取し、皮膚中の内因性痒み関連因子を測定した。

肥満細胞の脱顆粒によって分泌されるヒスタミンおよび5-HTはダニ抗原含有軟膏塗布の1時間後に病変部皮膚において有意に増加した。また、5-HT量の有意な増加は24時間後まで持続した (Fig. 7a, b)。知覚神経に含有される神経ペプチドであるSPおよびGRPは軟膏塗布1時間後に有意に増加した (Fig. 7c, d)。一方、IL-31はダニ抗原含有軟膏塗布24時間後に有意に増加した (Fig. 7e)。PAR-2の活性化によってケラチノサイトから産生されるTSLPおよびPGE₂量は軟膏塗布1および24時間後において有意に増加した (Fig. 7f, g)。また、ET-1およびperiostin量の有意な増加はいずれの時点においても認められた (Fig. 7h, i)。

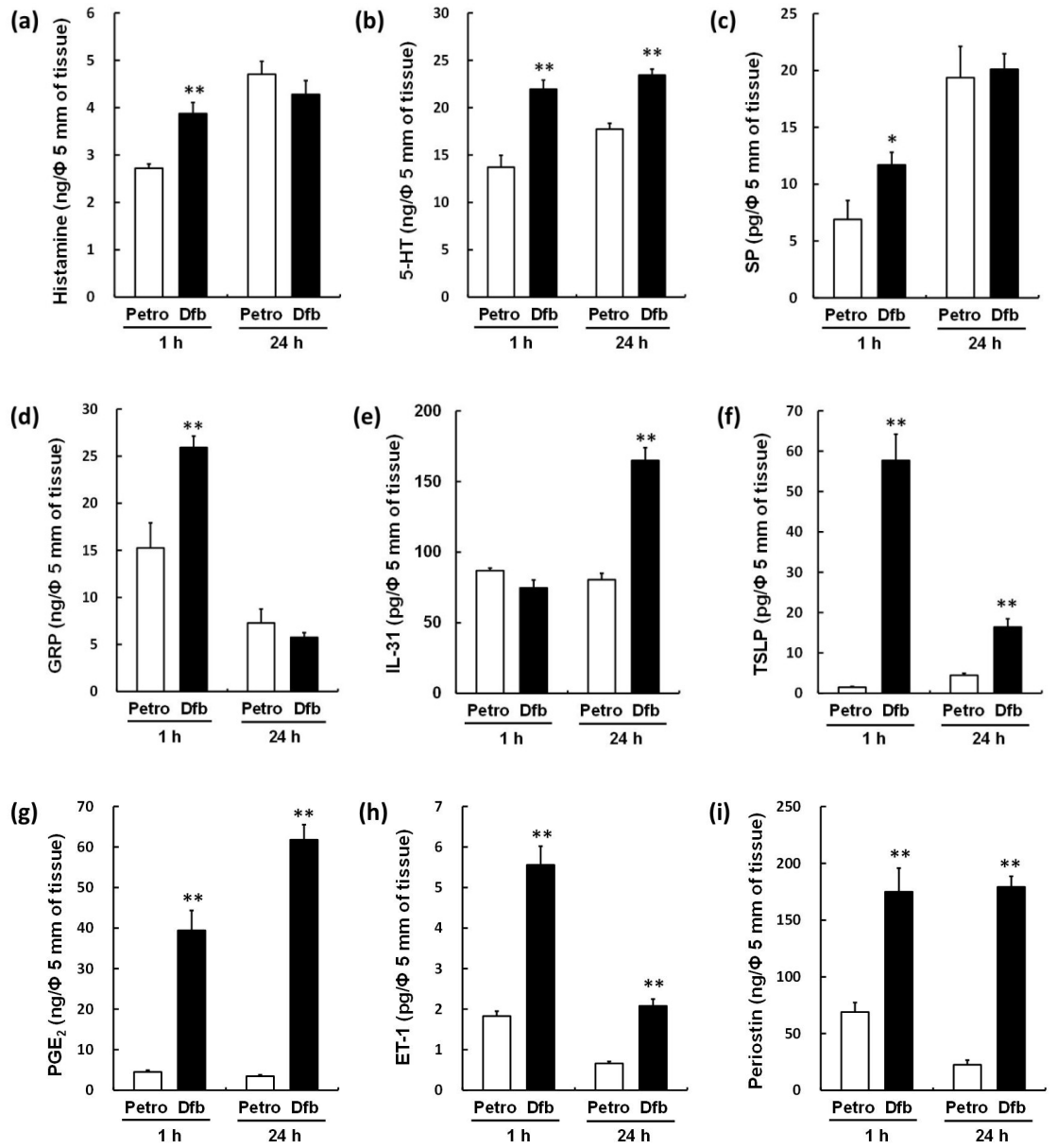


Figure 7 Increased contents of endogenous pruritogens in the lesional skin after topical application of Dfb ointment.

The dorsal skin was excised 1 or 24 hours after topical application of Dfb ointment. (a) histamine, (b) 5-HT, (c) SP, (d) GRP, (e) IL-31, (f) TSLP, (g) PGE₂, (h) ET-1 and (i) periostin contents in the skin were measured by ELISA. Each column represents the mean ± SEM (n=5-6). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with control mice (petrolatum) at each point.

3.2 搔痒行動に対する即時型アレルギー反応の関与

本モデルではダニ抗原含有軟膏の反復塗布により血漿中総 IgE 値の上昇が認められる。感作が成立した個体では、環境抗原の刺激によって肥満細胞は脱顆粒し、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが遊離される結果、抗原曝露から数分以内に血管透過性の亢進が誘導される。そこで、ダニ抗原含有軟膏塗布による血管透過性の亢進を指標に、本モデルにおける即時型アレルギー反応の関与について検討した。その結果、モデル動物に親水ワセリンを塗布した場合の色素漏出量は対照動物と比較して、有意に増加した (Fig. 8)。また、モデル動物にダニ抗原含有軟膏を塗布すると、親水ワセリンを塗布した場合と比較して、色素漏出量は有意に増加した (Fig. 8)。

次に、本モデルの搔痒行動における肥満細胞の関与を明らかにするため、chlorpheniramine (抗ヒスタミン薬) および cromoglycate (抗アレルギー薬) を投与し、ダニ抗原含有軟膏塗布後 24 時間の搔痒行動回数を測定した。その結果、chlorpheniramine および cromoglycate は 1 相目の搔痒行動回数の増加を抑制したが、2 相目の搔痒行動回数の増加には影響を及ぼさなかった (Fig. 9, 10)。

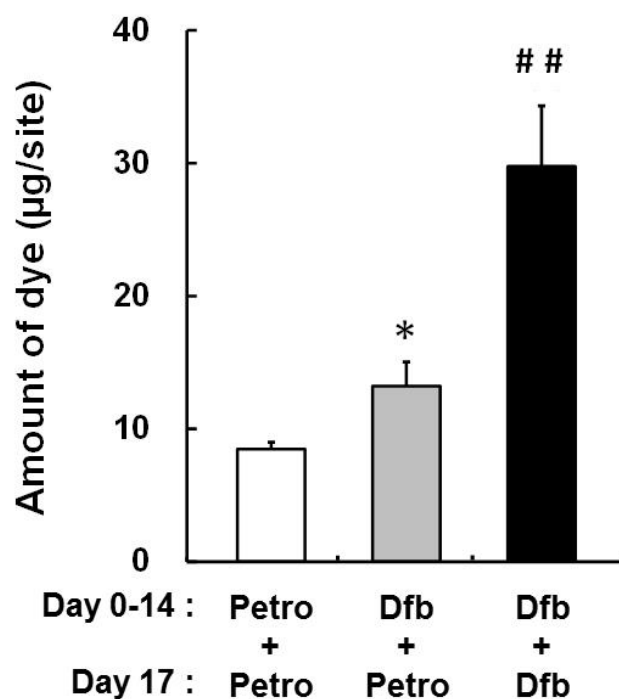


Figure 8 Vascular permeability increase in the lesional skin induced by topical application of Dfb ointment.

Dfb ointment (100 mg) was applied topically on the dorsal skin after disruption of the skin barrier with a depilatory cream on day 0 and with 4% SDS (150 µL) on days 3, 7, 10 and 14. Control animals were treated with hydrophilic petrolatum (Petro) instead of Dfb ointment. Evans blue solution was intravenously injected immediately before topical application of Dfb ointment or hydrophilic petrolatum on day 17. Increase in vascular permeability was evaluated by measuring the amount of extravasated Evans blue dye in the dorsal skin excised 1 hour after topical application of Dfb ointment. Each column represents the mean \pm SEM (n=5-6). *P < 0.05, compared with control mice treated with hydrophilic petrolatum. ##P < 0.01, compared with Dfb ointment-applied mice treated with hydrophilic petrolatum.

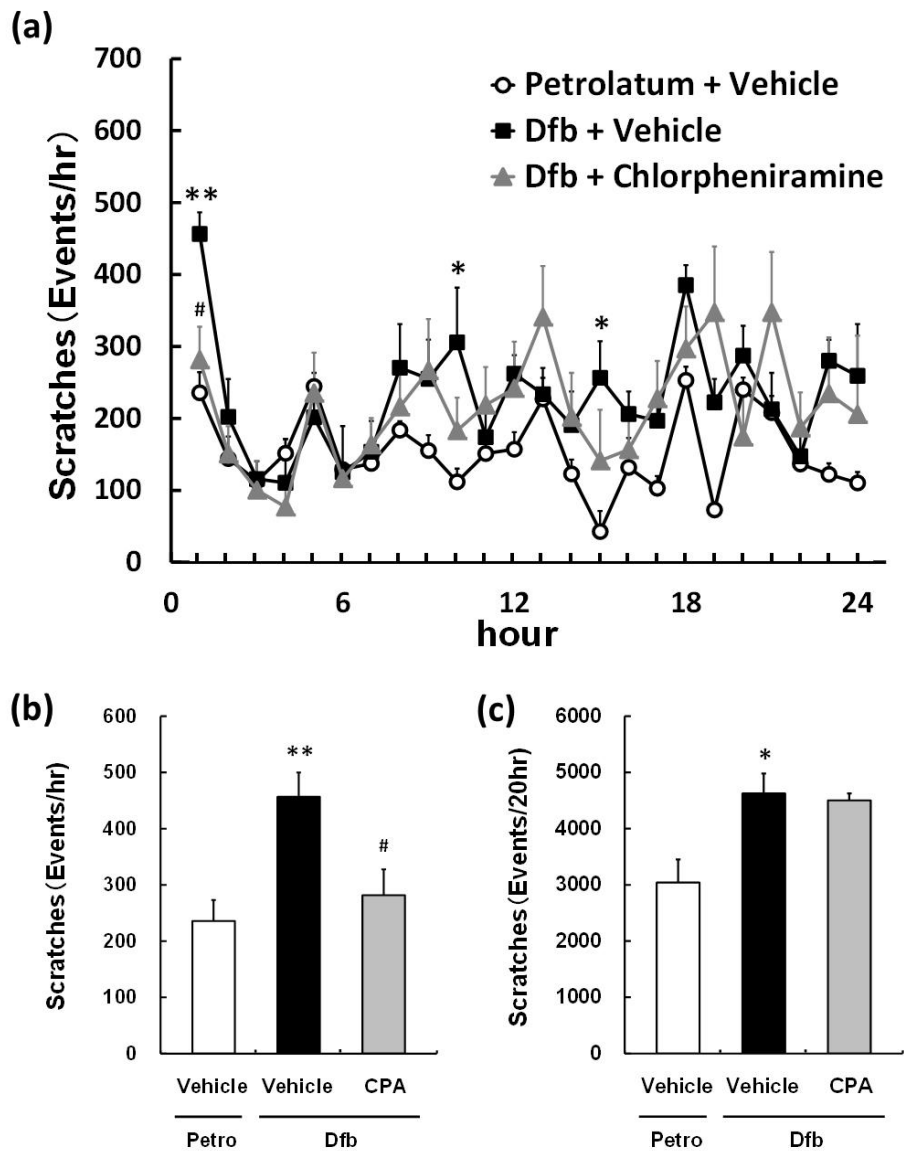


Figure 9 Effects of chlorpheniramine on scratching behavior in AD-like mice.

Chlorpheniramine (CPA; 10 mg/kg, p.o.) was administered 1 hour before the last topical application of Dfb ointment on day 17. The number of scratching behavior (events) was measured for 24 hours after topical application of Dfb ointment on day 17 (a). The total number of scratching behavior was counted in 0-1 hour (b) and 4-24 hours (c) after topical application of Dfb ointment. Each data represents the mean \pm SEM (n=5-6). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with petrolatum + vehicle groups. #P < 0.05, compared with Dfb + vehicle groups.

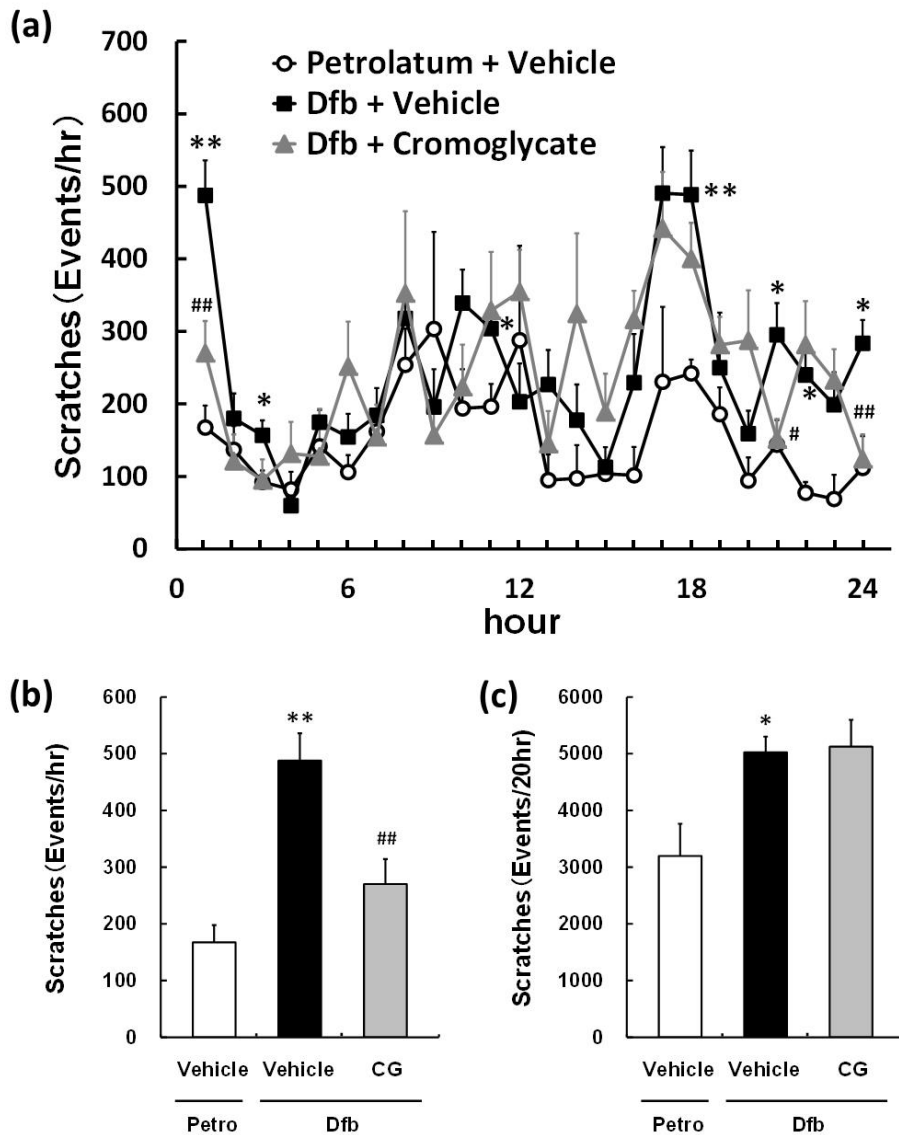


Figure 10 Effects of cromoglycate on scratching behavior in AD-like mice.

Cromoglycate (CG; 100 mg/kg, s.c.) was administered 10 minutes before the last topical application of Dfb ointment on day 17. The number of scratching behavior (events) was measured for 24 hours after topical application of Dfb ointment on day 17 (a). The total number of scratching behavior was counted in 0-1 hour (b) and 4-24 hours (c) after topical application of Dfb ointment. Each data represents the mean \pm SEM (n=5-6). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with petrolatum + vehicle groups. #P < 0.05, ##P < 0.01, compared with Dfb + vehicle groups.

3.3 掻痒行動に対する PAR-2 の関与

AD の主要アレルゲンであるコナヒョウヒダニは非常に多くのアレルゲンを含有しており、その多くはプロテアーゼ活性を有する酵素である。PAR-2 はプロテアーゼが細胞外 N 末端側ペプチド鎖を切断することで活性化される受容体である。したがって、ダニ抗原含有軟膏中のプロテアーゼによる PAR-2 の活性化が本モデルの掻痒行動に関与している可能性が考えられる。そこで、本モデルにおける PAR-2 の関与を明らかにするため、病変部皮膚における PAR-2 の発現を免疫染色で確認した。その結果、対照動物の表皮では PAR-2 の発現は弱かったのに対し、モデル動物の表皮では PAR-2 発現の増強が認められた (Fig. 11)。

次に、他の動物モデルにおいて掻痒行動を抑制する用量 (68, 69) の gabexate (セリンプロテアーゼ阻害薬) および anti-PAR-2 antibody を投与し、ダニ抗原含有軟膏塗布後 24 時間の掻痒行動回数を測定した。その結果、gabexate は 1 相目および 2 相目の掻痒行動回数の増加を抑制し、anti-PAR-2 antibody はこれらの掻痒行動に対して抑制傾向を示した (Fig. 12, 13)。

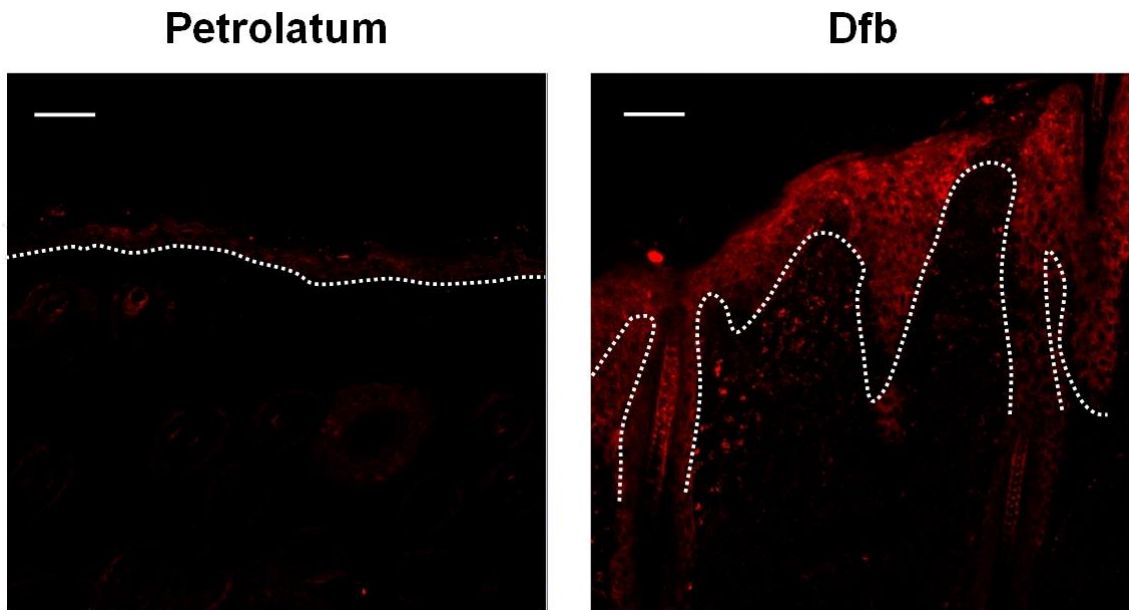


Figure 11 Increased PAR-2 expression in the lesional skin of AD-like mice.

The dorsal skin excised on day 18 was stained with PAR-2 antibodies (original magnification, $\times 200$).

White broken line indicates the border between the epidermis and dermis. Bar = 50 μm .

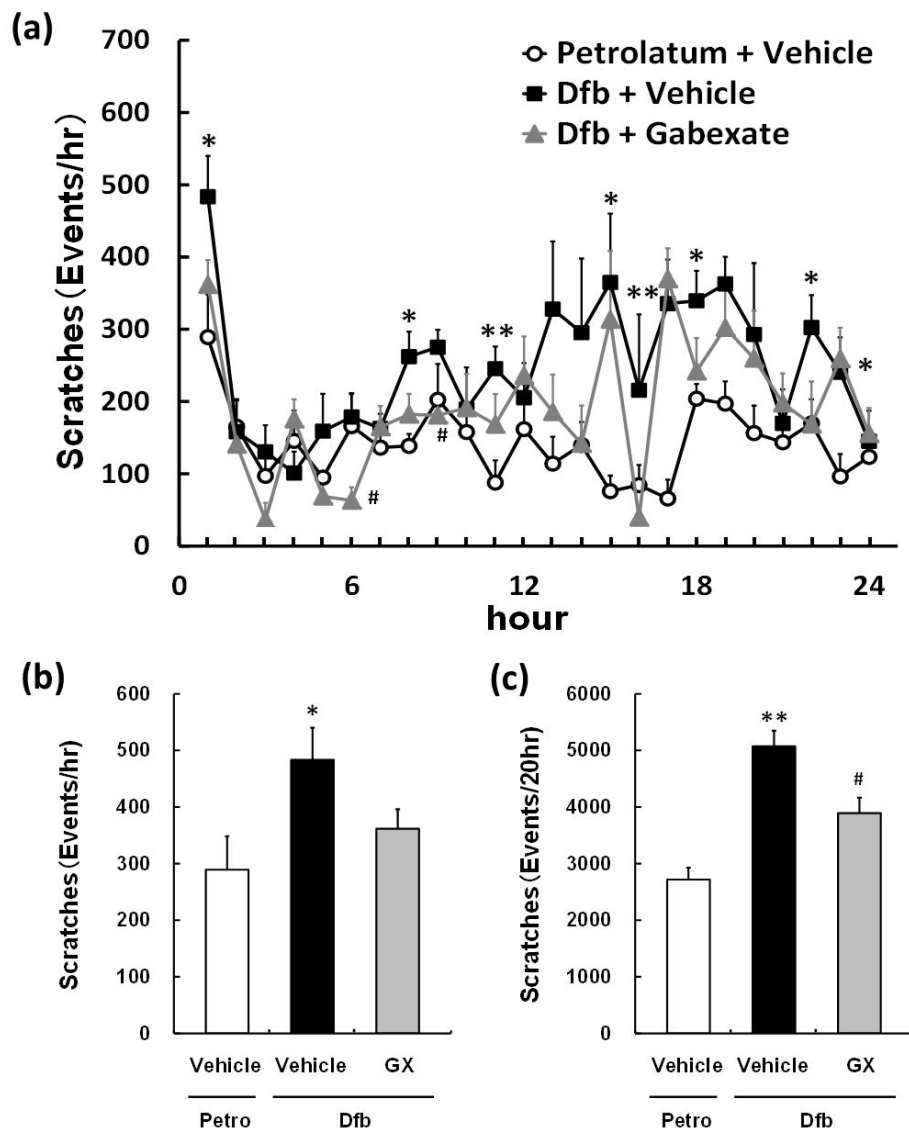


Figure 12 Effects of gabexate on scratching behavior in AD-like mice.

Gabexate (GX; 10 mg/kg, s.c.) was administered 30 minutes before the last topical application of Dfb ointment on day 17. The number of scratching behavior (events) was measured for 24 hours after topical application of Dfb ointment on day 17 (a). The total number of scratching behavior was counted in 0-1 hour (b) and 4-24 hours (c) after topical application of Dfb ointment. Each data represents the mean \pm SEM (n=5). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with petrolatum + vehicle groups. #P < 0.05, compared with Dfb + vehicle groups.

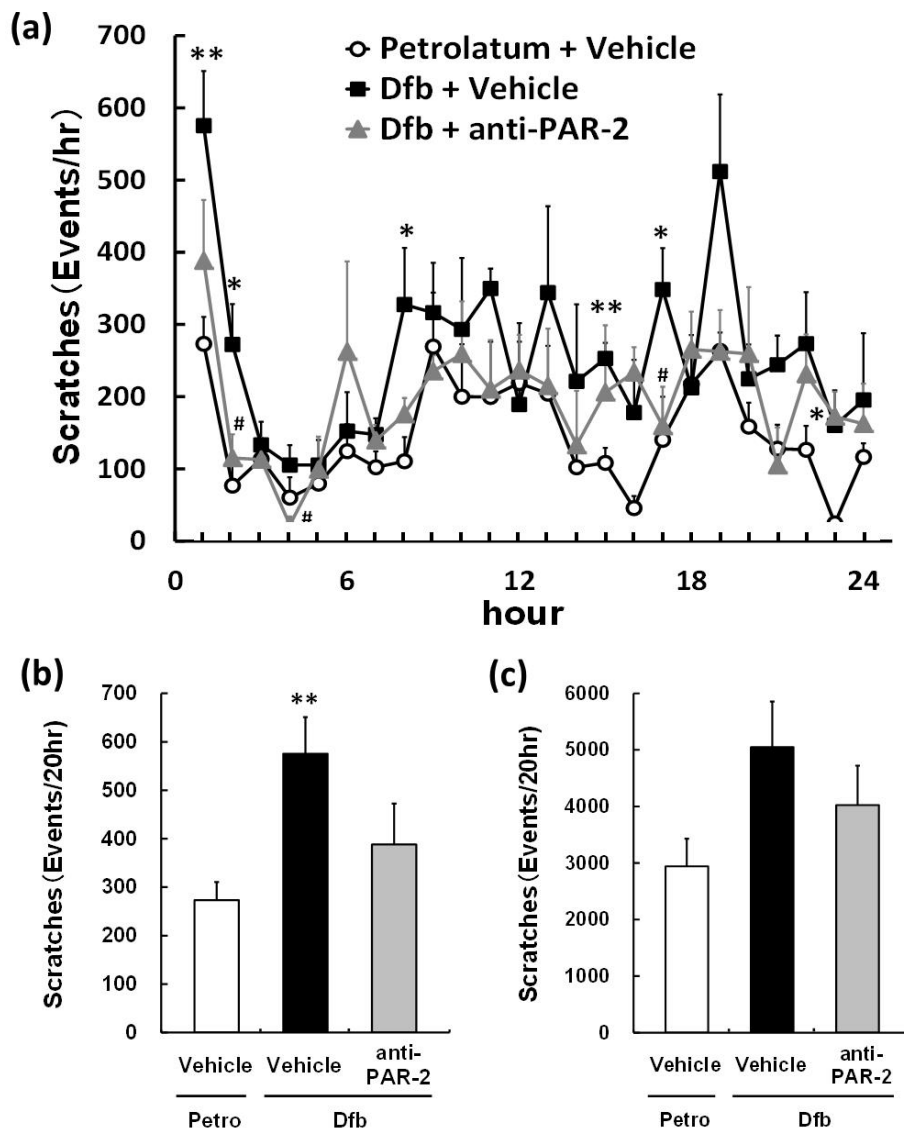


Figure 13 Effects of anti-PAR2 antibody on scratching behavior in AD-like mice.

anti-PAR-2 antibody (0.2 mg/kg, i.v.) was administered 1 hour before the last topical application of Dfb ointment on day 17. The number of scratching behavior (events) was measured for 24 hours after topical application of Dfb ointment on day 17 (a). The total number of scratching behavior was counted in 0-1 hour (b) and 4-24 hours (c) after topical application of Dfb ointment. Each data represents the mean \pm SEM (n=5). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with petrolatum + vehicle groups. #P < 0.05, compared with Dfb + vehicle groups.

第4節 考察

本章では、ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの病変部皮膚における内因性痒み関連因子の産生量およびダニ抗原含有軟膏塗布後に認められる 2 相性の搔痒行動のメカニズムについて検討した。

抗原が肥満細胞の表面に発現する high-affinity IgE receptors (FcεRI) に結合した IgE 抗体を架橋すると、FcεRI の凝集が誘導される。その結果、一連のシグナル伝達を介して肥満細胞の脱顆粒が起こり、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが遊離される。感作が成立した個体では、上記の即時型アレルギー反応は抗原曝露から数分以内に誘導され、血管拡張や血管透過性が亢進する (70)。第 1 章では、ダニ抗原含有軟膏の反復塗布により、本モデルでの血中 IgE 値の上昇と真皮における肥満細胞数の増加を確認した。第 2 章では、親水ワセリンまたはダニ抗原含有軟膏の塗布 1 時間後に組織中に漏出した色素量を測定した。その結果、対照動物と比較して、親水ワセリンを塗布したモデル動物の皮膚で色素漏出量の増加が認められたことから、モデル動物では抗原刺激しなくても病変部皮膚において血管透過性が亢進していると考えられる。また、モデル動物の皮膚では血管透過性の亢進による色素漏出量が親水ワセリンよりもダニ抗原含有軟膏の塗布で増加した。さらに、ダニ抗原含有軟膏塗布 1 時間後の皮膚でヒスタミンおよび 5-HT 量の増加が認められたこと、1 相目の搔痒行動回数の増加は即時型アレルギー反応の反応時間と一致して抗原塗布の 1 時間後に誘導されること、chlorpheniramine (抗ヒスタミン薬) および cromoglycate (抗アレルギー薬) が 1 相目の搔痒行動回数の増加を抑制したことから、1 相目の搔痒行動回数の増加には即時型アレルギー反応が関与すると考えられる。

これまでに PAR-2 が AD の痒みに関与する可能性が示唆されており、ケラチノサイトにおける PAR-2 の活性化は TSLP や PGE₂ の産生を誘導する (71, 72)。つまり、プロテアーゼ活性を有するアレルゲンは PAR-2 依存的なメカニズムを介して搔痒行動を誘導する可能性

が考えられる。AD 患者の表皮で PAR-2 が発現するという報告 (64, 65) と同様に、本モデルにおいても病変部の表皮で PAR-2 発現の増加が認められた。また、病変部で TSLP および PGE₂ 量は増加しており、gabexate (セリンプロテアーゼ阻害薬) は 1 相目および 2 相目の搔痒行動回数の増加を抑制し、anti-PAR-2 antibody はこれら搔痒行動回数の増加に対して抑制傾向を示した。

PAR-2 はケラチノサイト以外に肥満細胞や知覚神経に発現すると報告されており、PAR-2 アゴニストは肥満細胞からの起痒物質の遊離を促進する (73)。また、知覚神経における PAR-2 活性化も AD 患者の痒みの惹起に関与する (67, 74)。これら PAR-2 活性化による肥満細胞の脱顆粒あるいは知覚神経の活性化はダニ抗原含有軟膏の塗布直後に誘導されると考えられる。つまり、gabexate および anti-PAR-2 antibody によって搔痒行動回数が減少したことは、本モデルの 1 相目の搔痒行動回数の増加に PAR-2 の活性化が関与する可能性を示唆している。

近年、PAR-2 アゴニストである合成ペプチド (SLIGRL) は PAR-2 だけでなく、Mas-related G-protein-coupled receptor (Mrgpr) C11 も活性化し得ると報告されている (75)。また、SLIGRL は PAR-2 よりもむしろ MrgprC11 を介して搔痒行動を誘導する可能性が示唆されている (75)。一方、本モデルの皮膚炎惹起にはプロテアーゼ活性を有する複数のアレルゲンを含有するダニ抗原含有軟膏を使用した。さらに、ダニ抗原由来セリンプロテアーゼは PAR-2 の N 末端領域の特定部位を切断することが明らかになっている (76)。したがって、ダニ抗原含有軟膏に含まれるダニ抗原由来のプロテアーゼによる PAR-2 の活性化が本モデルの搔痒行動回数の増加に関与していると考えられる。

AD の痒みには神経ペプチド、神経伝達物質、サイトカイン、プロテアーゼ、アラキドン酸代謝物など種々のメディエーターが関与する (61)。本モデルの搔痒行動に関与するメディエーターを探索した結果、AD 患者と同様に病変部皮膚において内因性痒み関連因子の増加が認められた。本モデルにおいて皮膚中 SP および GRP 量はダニ抗原含有軟膏塗布の 1

時間後に増加していた。知覚神経から遊離される SP などの神経ペプチドは痒み感受性の亢進や神経原性炎症に関与すると考えられている (61, 77)。したがって、ダニ抗原含有軟膏が表皮に伸長した知覚神経を直接的もしくは他のメディエーターを介して間接的に活性化させた結果、神経末端から神経ペプチドが遊離され、1 相目の搔痒行動を引き起こしたと考えられる。GRP の皮内注射はマウスの搔痒行動を誘発するが、その反応には肥満細胞に発現する BB2 bombesin 受容体の活性化および肥満細胞の脱顆粒が関与すると考えられている (78)。近年、GRP 発現神経がヒトの皮膚で確認されており、その大部分が SP を共発現している (79)。これらの報告は知覚神経の末端から遊離した GRP が 1 相目の搔痒行動に関与する可能性を示唆している。

対照動物の皮膚ではヒスタミンや SP など数種の痒み関連因子の産生量が親水ワセリン塗布 1 時間後よりも 24 時間後で高値を示した。その原因は明確ではないが、対照動物においても親水ワセリンを背部に塗布することでわずかに搔痒行動回数が増加する。この搔痒行動回数の増加が対照動物の皮膚におけるヒスタミンおよび SP 産生量に影響を及ぼしたと推察される。

IL-31 はヒトにおいて皮膚プリックテストにより痒みを惹起すると報告されている (80)。また、IL-31 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは搔痒行動を伴う皮膚炎を発症する (81)。本モデルではダニ抗原含有軟膏塗布の 24 時間後に皮膚中 IL-31 量の増加が認められたことから、IL-31 は 2 相目の搔痒行動回数の増加に寄与している可能性が考えられる。

TSLP は胸腺、扁桃、気管、皮膚、消化管などの上皮細胞で産生されるサイトカインであり、AD 患者では特にケラチノサイトで TSLP の発現が増加している (19)。また、マウスのケラチノサイトに TSLP を過剰発現させると、AD 様の皮膚炎を発症する (82, 83)。近年、TSLP は知覚神経に直接作用し、搔痒行動を引き起こすと報告された (71)。また、PGE₂ も健常人および AD 患者において痒みを惹起する (84, 85)。ヒトに PGE₂ またはヒスタミンを皮内投与した時と比較して、PGE₂ とヒスタミン混合液の皮内投与で惹起される痒みの持続

時間は相乗的に増加することから、 PGE_2 はヒスタミンによる痒みを増悪させると考えられている (86)。ET-1 の皮内投与はヒトでヒスタミン非依存的なメカニズムを介して痒みを惹起する (87)。また、ET-1 はマウスで ET_A 受容体を介して濃度依存的に搔痒行動を誘導する (88)。本モデルではこれら TSLP、 PGE_2 および ET-1 量がダニ抗原含有軟膏塗布の 1 および 24 時間後の病変部皮膚において増加していた。したがって、これらメディエーター量の増加が 1 相目および 2 相目における搔痒行動回数増加の原因の一つであると考えられる。

Periostin は AD の増悪と慢性化において重要な役割を担う細胞外マトリックスタンパク質である。Th2 細胞から産生された IL-4 や IL-13 は線維芽細胞を刺激し、periostin が産生される。Periostin はインテグリンを介してケラチノサイトを刺激し、TSLP などのサイトカインの産生を誘導する結果、さらに Th2 型の免疫反応を増幅させる。このような悪循環が AD の慢性化、遷延化につながっていると考えられている (89)。本モデルにおける皮膚中 periostin 量はダニ抗原含有軟膏塗布の 1 時間後に増加し、24 時間後においても維持されていた。したがって、periostin は TSLP 産生を介して間接的に本モデルの搔痒行動回数の増加に関与すると考えられる。

これまでに、ヒスタミン、5-HT および compound 48/80 の皮内投与はマウスの搔痒行動を誘導すると報告されている (90, 91)。また、トリプシンまたはトリプターゼは PAR-2 の活性化を介して搔痒行動を誘導する (68, 92)。これらの起痒物質の皮内投与では 1 時間以内に搔痒行動回数が増加すると報告されているが、その後続く搔痒行動に関しては十分に検討されていなかった。また、肥満細胞の脱顆粒および PAR-2 活性化の両方が搔痒行動回数の増加に関与する慢性 AD モデルはこれまでに報告されていない。したがって、本モデルはダニ抗原含有軟膏の塗布によって 2 相性に搔痒行動回数が増加し、そのメカニズムに肥満細胞の脱顆粒と PAR-2 活性化が関与する初めての AD モデルである。

以上の成績をまとめると、第 2 章では AD のモデル動物における 2 相性の搔痒行動メカニズムを解析し、1 相目および 2 相目の搔痒行動回数の増加に関与すると考えられるメディエ

一ター量の変化を明らかにした。さらに、本モデルの搔痒行動に肥満細胞の脱顆粒による即時型アレルギー反応およびプロテアーゼによる PAR-2 活性化が関与する可能性を示した。

第3章 ダニ抗原刺激によるケラチノサイトからの痒み関連因子の産生

第1節 緒言

ケラチノサイトは表皮を構成する主な細胞であり、皮膚のバリア機能の維持において重要な役割を担っている。皮膚バリア機能の障害によりケラチノサイトは外的刺激に曝されることで、活性化される。活性化したケラチノサイトは種々のサイトカインおよびケモカインを産生することでADの病態形成に関与する(17, 18)。

ダニは室内塵中に存在する主要なアレルゲンであり、その機能や配列相同性、分子量に基づいて、10以上のグループに分類されている(24, 25)。ダニ由来アレルゲンの中でも、グループ1アレルゲンはシステインプロテアーゼ活性を、グループ3、6および9はセリンプロテアーゼ活性を有すると報告されている(24, 25)。

AD患者の病変部皮膚でPAR-2は表皮のいずれの層においても発現が増加している(64, 65)。ダニ抗原由来プロテアーゼはケラチノサイトに発現するPAR-2を活性化し、IL-8やgranulocyte-macrophage colony-stimulating factorといったサイトカインの産生を誘導する(66)。また、ケラチノサイトにおけるPAR-2の活性化は、知覚神経に直接作用して搔痒行動を引き起こすTSLPの産生を誘導する(71)。Matrix metalloproteinase (MMP)は細胞外マトリックスの分解により神経伸長に関与するメディエーターであるが、精製されたセリンプロテアーゼであるトリプシンはPAR-2の活性化を介してヒトのケラチノサイトからのMMP産生を誘導する(93)。これらの報告は、ダニ抗原由来プロテアーゼによるケラチノサイトのPAR-2活性化が炎症性サイトカインとともに内因性の痒み関連因子の産生を誘導し、AD患者における炎症の増悪と搔痒の惹起に関与する可能性を示唆している。しかしながら、AD患者の搔痒の惹起におけるケラチノサイトの役割については十分解明されていない。

ADにおいて痒みを惹起する種々のメディエーターがこれまでに報告されているが(61)、

ET-1 は 21 個のアミノ酸から成り、G タンパク質共役受容体である ET_A および ET_B 受容体を活性化する (94)。ET-1 は強力な血管収縮因子として同定されたが、その後の研究でヒトにおいて痒みを惹起することが明らかになった (87)。また、AD 患者の表皮では ET-1 の発現が増加している (95)。さらに、*in vitro* でヒトのケラチノサイトでの ET-1 の合成および遊離が確認されている (96)。これらの報告はケラチノサイトにおける ET-1 発現の増加が AD 患者の痒みの惹起に関与する可能性を示唆している。

MMP ファミリーに属する MMP-9 の産生は起痒物質やサイトカインで刺激したケラチノサイトで誘導される (97, 98)。アレルギー性接触皮膚炎患者の表皮や AD 患者病変部皮膚の洗浄液を解析した報告では、各サンプルにおける MMP-9 レベルの上昇が確認されている (99, 100)。また、MMP-9 は NGF による神経の伸長を促進する (101)。MMP-2 も同様に *in vitro* で表皮基底膜での神経伸長に関与する (102)。AD 患者の病変部皮膚では健常人と比較して、表皮への神経伸長が報告されており、これが末梢における痒み閾値の低下につながると考えられている (49-51)。これらの報告は MMP-2 および MMP-9 が AD 患者の病変部での神経伸長を促進し、痒みの惹起に関与している可能性を示唆している。

そこで、第 3 章では、AD の病態形成、特に痒みの惹起にケラチノサイトが関与するか明らかにするため、システインおよびセリンプロテアーゼ活性を有するアレルゲンを含有するコナヒョウヒダニ抽出物でケラチノサイトを刺激し、ET-1、MMP-2 および MMP-9 が産生されるか否かについて検討した。さらに、ケラチノサイトにおいて上記のメディエーター産生に PAR-2 が関与するか検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1 試薬

コナヒョウヒダニ (*D. farinae*) 抽出物 (house dust mite, HDM) の凍結乾燥品は COSMO BIO (Tokyo, Japan) から購入した。システインプロテアーゼ阻害薬およびセリンプロテアーゼ阻害薬として、それぞれ[(2S, 3S)-3-Carboxyoxirane-2-carbonyl]-L-leucine (4-guanidinobutyl) amide hemihydrate (E-64, Peptide Institute, Osaka, Japan) および 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF, Sigma-Aldrich) を使用した。ダニ由来セリンプロテアーゼ (mite-derived serine proteases, MDSP) および選択的 PAR-2 アンタゴニスト (ENMD-1068) はそれぞれ Indoor Biotechnologies (Charlottesville, VA, USA) および Enzo Life Sciences から購入した。

2.2 細胞培養

ヒト表皮角化細胞 (ケラチノサイト, Life Technologies) は 37°C、5% CO₂ の条件下で 10 µg/mL insulin、0.1 ng/mL human epidermal growth factor、0.67 µg/mL hydrocortisone hemisuccinate、50 µg/mL gentamicin、50 ng/mL amphotericin B および 0.4% bovine brain pituitary extract を含有する HuMedia-KG2 (Kurabo Industries, Osaka, Japan) で培養した。HuMedia-KG2 に浮遊させた細胞を 2×10⁴ cells/well となるように 24 well マイクロプレートに播種し、一晩培養した。翌日、gentamicin および amphotericin B を含有する HuMedia-KB2 (Kurabo Industries) に培地交換し、さらに一晩培養した。翌日、細胞を HDM (0.3, 1, 3 µg/mL) または MDSP (0.3, 3, 30 µg/mL) で 1、3、6、24 または 48 時間刺激した。培養終了後に培養上清を回収し、痒み関連因子の測定を行った。また、lipopolysaccharide (LPS) ELISA Kit (Cloud-clone Corp., Houston, TX, USA) を用いて、HDM および MDSP 中の LPS 含量は検出限界値未満であることを確認した。プロテアーゼ阻害薬を用いた検討では、HDM 中のプロ

テアーゼ活性を不活性化するために、HDM を E-64 (50, 500, 5000 μM) または AEBSF (5, 50, 500 μM) 存在下で 37°C、15 分間インキュベートした。また、PAR-2 アンタゴニスト (0.1, 1, 10 mM) は HDM 刺激の 6 時間前に添加した。

2.3 痒み関連因子の測定

2.2 で示した方法で回収した培養上清中の ET-1、MMP-2 および MMP-9 量を Quantikine ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。これら ELISA kit における ET-1、MMP-2 および MMP-9 の検出限界値はそれぞれ 0.087 pg/mL、33 pg/mL および 156 pg/mL であった。

2.4 細胞生存率

細胞生存率は生細胞のテトラゾリウム塩 (WST-8, 4-[3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt) 還元能を利用した比色定量法 (Cell Count Reagent SF, Nacalai Tesque) により評価した。

培養上清を回収した後、各 well に 10% WST-8 を含有する HuMedia-KB2 を添加し、CO₂ インキュベーター内で 30 分間培養した。また、ブランクとして、空 well に HuMedia-KB2 および WST-8 を同様に添加した。30 分後にマイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した。なお、各 well の吸光値は、ブランク well の平均吸光値を差し引いて求めた。

各 well の生存率 (%) を次式により算出した。各種刺激条件において生存率の平均値が 80%未満となった場合は、細胞障害性があると判断した。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{各 well の吸光値}}{\text{無刺激条件の平均吸光値}} \times 100$$

2.5 統計解析

データは平均 ± 標準偏差で示した。2 群間の比較では F 検定を行い、等分散の場合は Student's *t*-検定、不等分散の場合は Aspin-Welch's *t*-検定を行った。3 群以上の比較では Dunnett の多重比較検定を行った。統計学的有意水準は 5%未満とした ($P < 0.05$, 両側検定)。

第3節 結果

3.1 HDM 刺激によるケラチノサイトからの ET-1 および MMP-9 産生

HDM 刺激がケラチノサイトからの痒み関連因子の産生を誘導するか否か検討するため、ケラチノサイトを 0.3、1 および 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM で刺激し、48 時間後の培養上清中の ET-1、MMP-2 および MMP-9 量を測定した。その結果、MMP-2 産生量はいずれの刺激濃度においても検出限界値未満であった (data not shown)。一方、ET-1 産生量は、無刺激時と比較し、0.3 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激で有意かつ濃度依存的に増加したが、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激では ET-1 産生を誘導しなかった (Fig. 14a)。また、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激による MMP-9 産生量は無刺激時と比較して有意に高かったが、0.3 および 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激による MMP-9 産生の増加は認められなかった (Fig. 14b)。

細胞障害性は 0.3 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激では認められず、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激条件において細胞障害性が認められた (data not shown) ことから、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDM 刺激における ET-1 および MMP-9 産生量の低下は細胞障害性によるものと考えられる。したがって、以下の検討では HDM の刺激濃度を 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と設定した。

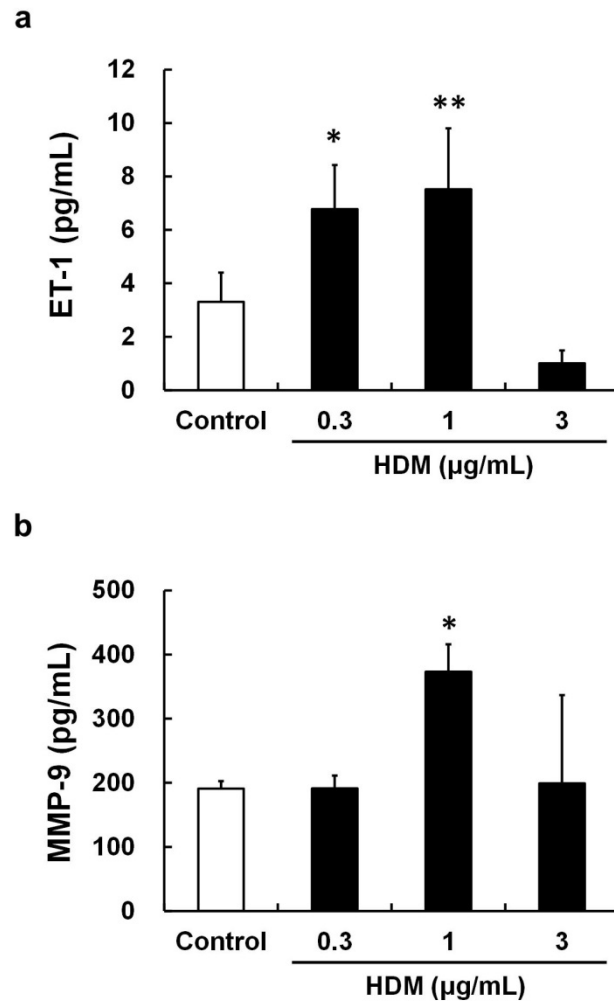


Figure 14 ET-1 and MMP-9 production after stimulation with HDM extract in human epidermal keratinocytes.

Human epidermal keratinocytes were stimulated by HDM extract for 48 hours. (a) ET-1 and (b) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SD (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01, compared with vehicle-treated cells (control).

3.2 HDM 刺激による ET-1 および MMP-9 産生量の経時変化

ケラチノサイトにおける ET-1 および MMP-9 産生量の経時変化を確認するため、ケラチノサイトを HDM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で刺激し、1、3、6、24 および 48 時間後の培養上清中の ET-1 および MMP-9 量を測定した。その結果、HDM 刺激による ET-1 産生量は刺激時間に依存して増加し、48 時間刺激で無刺激時と比較して、ET-1 産生量の有意な増加が認められた (Fig. 15a)。一方、HDM で 1、3 および 6 時間刺激した場合には、MMP-9 産生量が検出限界値未満であったのに対し、24 および 48 時間刺激では MMP-9 産生量が刺激時間に依存して増加し、無刺激時と比較して、48 時間刺激では有意な差が認められた (Fig. 15b)。

細胞障害性はいずれの刺激時間においても認められなかった (data not shown)。したがって、ケラチノサイトにおける ET-1 および MMP-9 産生のメカニズムを検討するために、HDM による刺激時間を 48 時間とした。

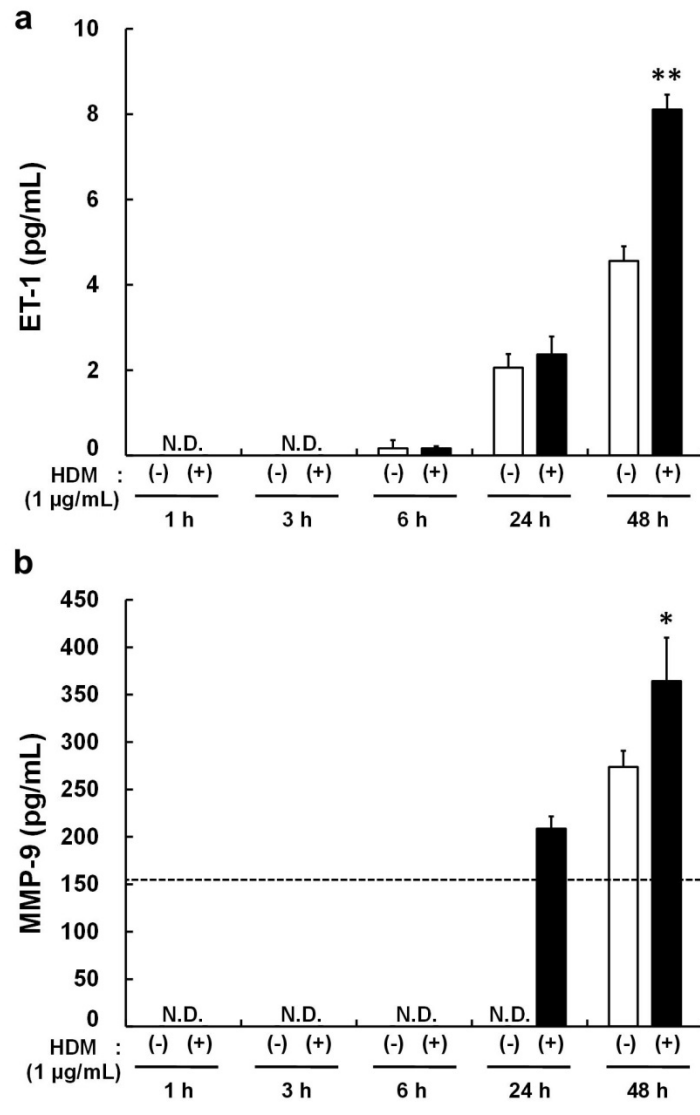


Figure 15 Time-course of ET-1 and MMP-9 production after stimulation with HDM extract in human epidermal keratinocytes.

Human epidermal keratinocytes were stimulated by HDM extract for 1, 3, 6, 24 or 48 hours. (a) ET-1 and (b) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SD (n=4). N.D.: not detected. The dotted line indicates the lower limit of detection (156 pg/mL) in MMP-9 ELISA kit. *P < 0.05, **P < 0.01, compared with vehicle-treated cells (control) at each point.

3.3 ET-1 および MMP-9 産生に対する HDM 中のプロテアーゼの関与

HDM 刺激によるケラチノサイトからの痒み関連因子の産生におけるプロテアーゼの関与を明らかにするために、E-64 (システインプロテアーゼ阻害薬) または AEBSF (セリンプロテアーゼ阻害薬) で前処置した HDM でケラチノサイトを 48 時間刺激した。その結果、E-64 による前処置は、HDM 刺激による ET-1 および MMP-9 産生量の増加に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 16a, b)。一方、AEBSF による前処置は、ET-1 産生量の増加を濃度依存的に減少させ、非前処置時と比較して、有意な差が認められた (Fig. 16c)。また、AEBSF による前処置は HDM 刺激による MMP-9 産生量の増加に対しても有意な抑制作用を示し、50 および 500 μM の前処置では MMP-9 産生量は検出限界値未満であった (Fig. 16d)。なお、いずれの培養条件においても細胞障害性は認められなかった (data not shown)。

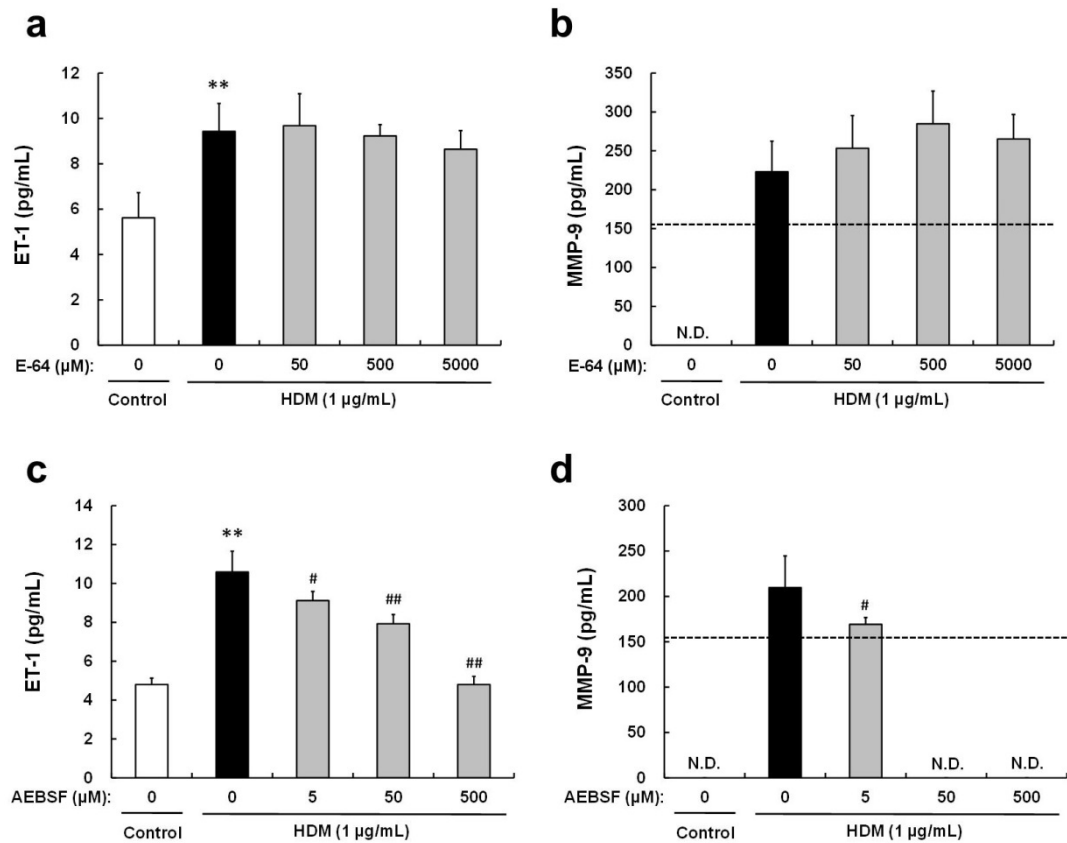


Figure 16 ET-1 and MMP-9 production after stimulation with HDM extract pre-treated with E-64 or AEBSF in human epidermal keratinocytes.

Human epidermal keratinocytes were stimulated by HDM extract pre-treated with (a, b) E-64 (cysteine protease inhibitor) or (c, d) AEBSF (serine protease inhibitor) for 48 hours. (a, c) ET-1 and (b, d) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SD (n=4). N.D.: not detected. The dotted line indicates the lower limit of detection (156 pg/mL) in MMP-9 ELISA kit. **P < 0.01, compared with vehicle-treated cells (control). #P < 0.05, ##P < 0.01, compared with HDM-stimulated cells (AEBSF, 0 μM).

3.4 ET-1 および MMP-9 産生に対するダニ抗原由来セリンプロテアーゼの関与

3.3 においてダニ抗原中のセリンプロテアーゼが ET-1 および MMP-9 産生に関与する可能性が示唆された。そこで、ダニ抗原由来セリンプロテアーゼがこれらのメディエーターの産生を誘導するか否かをより直接的に確認するため、ケラチノサイトを 0.3、3 および 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MDSP で刺激し、1、3、6、24 および 48 時間後の培養上清中の ET-1 および MMP-9 量を測定した。その結果、MDSP は刺激濃度および時間依存的に ET-1 および MMP-9 産生を誘導した (Fig. 17a-d)。なお、いずれの培養条件においても細胞障害性は認められなかった (data not shown)。

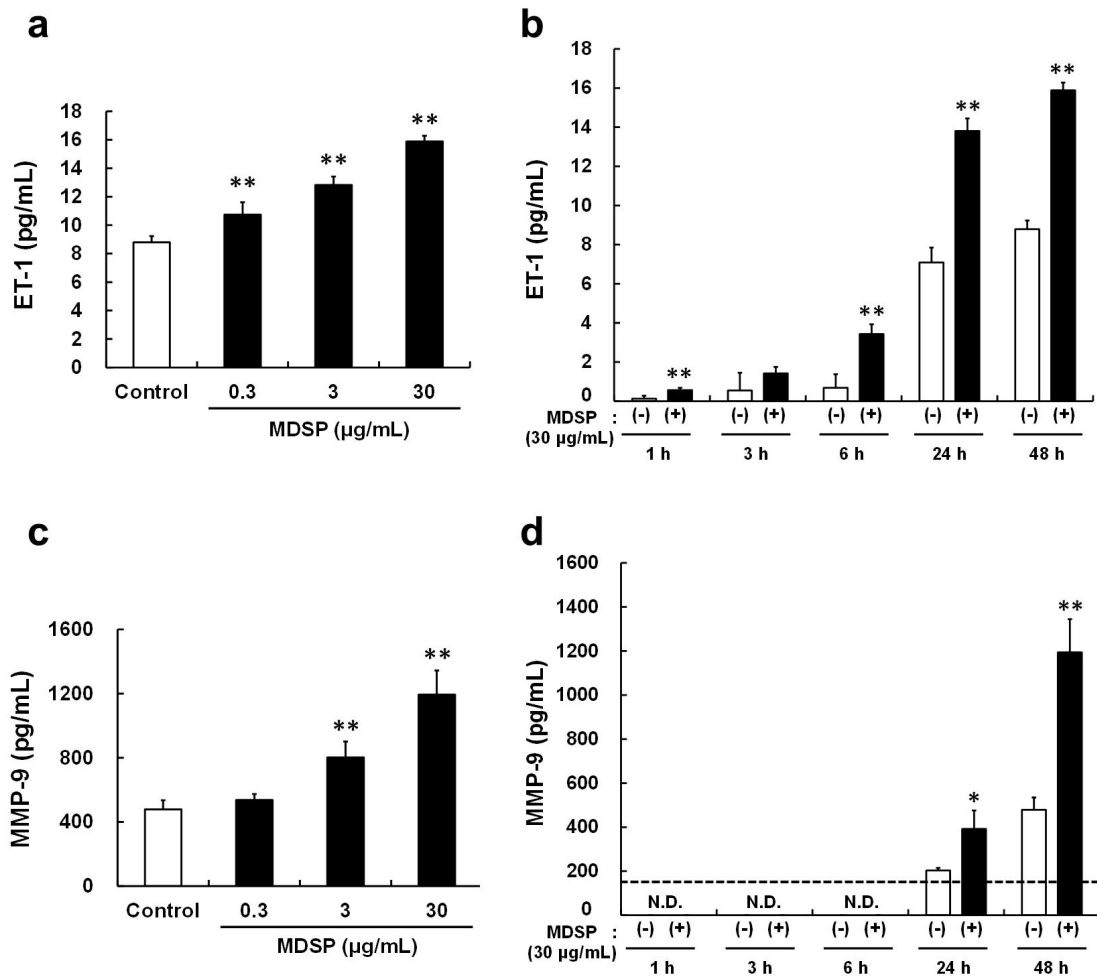


Figure 17 ET-1 and MMP-9 production after stimulation with mite-derived serine proteases (MDSP) in human epidermal keratinocytes.

Human epidermal keratinocytes were stimulated by MDSP for 48 hours, and (a) ET-1 and (c) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. ** $P < 0.01$, compared with vehicle-treated cells (control). Human epidermal keratinocytes were stimulated by MDSP for 1, 3, 6, 24 or 48 hours, and (b) ET-1 and (d) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SD ($n=4$). N.D.: not detected. The dotted line indicates the lower limit of detection (156 pg/mL) in MMP-9 ELISA kit. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle-treated cells (control) at each point.

3.5 ET-1 および MMP-9 産生に対する PAR-2 の関与

HDM 刺激による PAR-2 の活性化が ET-1 および MMP-9 産生に関与するか否かを検討するために、ケラチノサイトを ENMD-1068 (選択的 PAR-2 アンタゴニスト) 存在下で 6 時間培養した後、HDM で 48 時間刺激した。その結果、ENMD-1068 による前処置は、ET-1 および MMP-9 産生の増加をいずれも濃度依存的に抑制し、非前処置時と比較して、有意な差が認められた (Fig. 18a, b)。なお、いずれの培養条件においても細胞障害性は認められなかった (data not shown)。

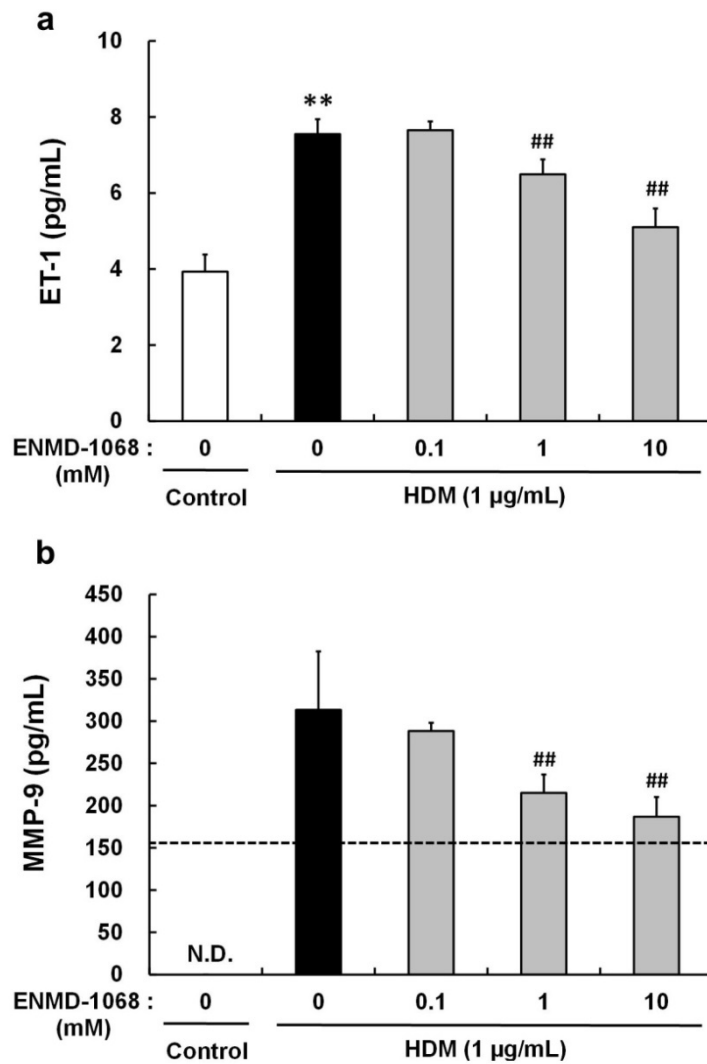


Figure 18 ET-1 and MMP-9 production after stimulation with HDM extract in human epidermal keratinocytes pre-treated with ENMD-1068.

Human epidermal keratinocytes were pre-treated with ENMD-1068 (PAR-2 antagonist) for 6 hours, and then stimulated by HDM extract for 48 hours. (a) ET-1 and (b) MMP-9 levels in the culture supernatants were measured by ELISA. Each column represents the mean \pm SD (n=4). N.D.: not detected. The dotted line indicates the lower limit of detection (156 pg/mL) in MMP-9 ELISA kit. **P < 0.01, compared with vehicle-treated cells (control). ##P < 0.01, compared with HDM-stimulated cells (ENMD-1068, 0 mM).

第4節 考察

本章では、HDM 抽出物が PAR-2 依存的なメカニズムを介してケラチノサイトにおける ET-1、MMP-2 および MMP-9 産生を誘導するか否かについて検討した。

ET-1 はヒトにおいてヒスタミン非依存的な痒みを惹起すると報告されている (87)。健常人と比較して、AD 患者の表皮では ET-1 発現の増加が認められる (95)。また、AD 患者の血中 ET-1 量は皮疹の重症度、痒みの程度および血中 IgE 値と相関する (103)。一方、MMP は細胞外マトリックスや基底膜を分解するタンパク質分解酵素である (104)。MMP による細胞外マトリックスの分解は細胞の遊走や組織リモデリングだけでなく神経伸長においても重要な役割を担っている。NGF による神経伸長は MMP-9 存在下で促進される (101) ことから、MMP-9 は NGF と協働して神経伸長に関与する可能性が考えられる。また、AD 患者の皮膚表面を洗浄したサンプル中で MMP-9 量の増加が報告されている (100)。さらに、健常人と比較して、AD 患者の血中でも MMP-9 量は増加している (105)。AD 患者の病変部皮膚では健常人と比較して、表皮への神経伸長が報告されており、これが末梢における痒み閾値の低下につながると考えられている (49-51)。これらの報告は ET-1 および MMP-9 が AD の病態形成、特に痒みの惹起に関与する可能性を示唆している。つまり、第3章で得られた結果はケラチノサイトが HDM 抽出物の刺激に対して ET-1 および MMP-9 を産生することで AD の病態形成に関与する可能性を示唆している。

一方、HDM 抽出物によるケラチノサイト刺激後の培養上清において MMP-2 は検出できなかった。アレルギー性接触皮膚炎の病変部皮膚では MMP-2 発現の増加が報告されているが、その発現は MMP-9 よりも弱いものである (99)。さらに、AD 患者と健常人で皮膚洗浄液中の MMP-2 量には差がない (100)。これらの報告はケラチノサイトでは MMP-9 と比較して MMP-2 産生能が低いことを示唆しており、今回の検討において MMP-2 が検出できなかった結果と一致する。

プロテアーゼ活性を有する HDM 由来アレルゲンはケラチノサイトに発現する PAR-2 の活性化を介してサイトカイン産生を誘導することで AD の病態形成に関与すると考えられている (66)。HDM 由来アレルゲンはシステインプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼ活性を有する (25)。そこで、内因性痒み関連因子の産生に HDM 由来プロテアーゼ活性が関与するか明らかにするために、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼおよび PAR-2 アンタゴニストの前処置がケラチノサイトにおける ET-1 および MMP-9 産生に影響を及ぼすか検討した。その結果、システインプロテアーゼ阻害薬は ET-1 および MMP-9 産生に対して影響を及ぼさず、セリンプロテアーゼ阻害薬は両メディエーターの産生を抑制した。さらに、MDSP は ET-1 および MMP-9 産生を誘導した。したがって、HDM 由来のセリンプロテアーゼがケラチノサイトにおける ET-1 および MMP-9 産生に関与すると考えられる。また、PAR-2 アンタゴニストは ET-1 および MMP-9 産生を抑制したことから、HDM 由来セリンプロテアーゼによる PAR-2 活性化が ET-1 および MMP-9 産生に関与する可能性が示唆された。ダニ由来セリンプロテアーゼであるグループ 3 および 9 アレルゲンは PAR-2 の N 末端領域の活性化部位を切断する (76)。したがって、今回使用した HDM 抽出物中のセリンプロテアーゼが PAR-2 の N 末端領域を切断した結果、PAR-2 の活性化を誘導したと推察される。

ET-1 はケラチノサイト自身が産生する自己分泌増殖因子としても知られている (106, 107)。したがって、HDM 抽出物刺激でケラチノサイトから ET-1 が産生されるという結果は、HDM 由来のアレルゲンが AD 患者の皮膚で認められるケラチノサイトの増殖亢進に関与する可能性を示唆している。さらに、過去の報告 (66, 108) から、PAR-2 活性化によって産生された IL-8 が MMP-9 産生を誘導すると考えられる。したがって、HDM 由来セリンプロテアーゼによる PAR-2 の活性化で産生されたサイトカインがケラチノサイトにおける MMP-9 産生に関与すると推察される。

PAR-2 の発現は炎症部位の肥満細胞においても増加している (109)。また、PAR-2 の活性

化は肥満細胞からのヒスタミンの遊離量を増加させる (73)。さらに、ヒスタミンはケラチノサイトにおける NGF 発現を誘導する結果、神経伸長を促進する (110, 111)。これらの報告は AD 患者の痒みに HDM 由来セリンプロテアーゼによる肥満細胞とケラチノサイトの PAR-2 活性化が寄与する可能性を示唆している。

ケラチノサイトは表皮を構成する細胞であり、HDM など種々の外的刺激によって活性化することから、AD の病態形成において重要な役割を担うと考えられている。第 3 章では、HDM 刺激によってケラチノサイトから ET-1 および MMP-9 が産生されること、その産生がセリンプロテアーゼ阻害薬および PAR-2 アンタゴニストによって抑制されることを示した。これは HDM 由来セリンプロテアーゼによるケラチノサイトの PAR-2 の活性化が ET-1 および MMP-9 産生を誘導し、AD の病態形成に関与する可能性を示唆するものである。

総括および結論

本研究では、AD の病態解明、特に痒みの発症機序を明らかにすることを目的に、AD の動物モデルであるダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの掻痒行動回数の経時変化、掻痒行動回数増加の機序を検討するとともに、ヒト由来のケラチノサイトを用いて、AD の痒みの発症機序に対するケラチノサイトの関与について検討した。

第 1 章では、ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの免疫学的、組織学的特徴を明らかにする目的で、腋窩リンパ節におけるサイトカインプロファイルおよび病変部皮膚における神経伸長・退縮因子の発現変化について検討した。また、ダニ抗原含有軟膏塗布後から 24 時間の掻痒行動を測定し、掻痒行動回数の経時変化について検討した。その結果、本モデルでは腋窩リンパ節細胞数の増加、細胞増殖の亢進、Th1/Th2/Th17 サイトカイン産生量の増加が認められた。また、病変部皮膚における NGF の増加と Sema3A の減少に伴う表皮への神経伸長が認められた。本モデルの掻痒行動はダニ抗原含有軟膏塗布の 1 時間後および 4 時間後以降に 2 相性に増加し、この反応は明暗サイクルの影響を受けなかった。また、ダニ抗原含有軟膏を塗布しない場合でも自発的に掻痒行動回数が増加していた。以上の成績より、モデル動物の臨床的、組織学的、免疫学的な特徴は AD 患者に類似し、皮膚炎の発症後に掻痒行動回数が慢性的に増加し、ダニ抗原含有軟膏の塗布によって 2 相性に増加することを明らかにした。

第 2 章では、ダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの掻痒行動のメカニズムを解析する目的で、ダニ抗原含有軟膏塗布 1 および 24 時間後の病変部皮膚における内因性痒み関連因子の産生量および本モデルの掻痒行動に対する即時型アレルギー反応および PAR-2 活性化の関与について検討した。その結果、ダニ抗原含有軟膏塗布 1 時間後の皮膚ではヒスタミン、5-HT、

SP、GRP、TSLP、PGE₂、ET-1 および periostin 量の増加が、ダニ抗原含有軟膏塗布 24 時間後の皮膚では 5-HT、IL-31、TSLP、PGE₂、ET-1 および periostin 量の増加が認められた。また、chlorpheniramine（抗ヒスタミン薬）および cromoglycate（抗アレルギー薬）は 1 相目の掻痒行動回数の増加を抑制した。一方、gabexate（セリンプロテアーゼ阻害薬）は 1 相目および 2 相目の掻痒行動回数の増加を抑制し、anti-PAR-2 antibody はこれら掻痒行動回数の増加に対して抑制傾向を示した。以上の成績より、1 相目および 2 相目の掻痒行動回数の増加に関与すると考えられるメディエーター量の変化を明らかにし、本モデルの掻痒行動に肥満細胞の脱顆粒による即時型アレルギー反応およびプロテアーゼによる PAR-2 活性化が関与する可能性を示した。

第 3 章では、AD の痒みに対するケラチノサイトの関与を明らかにする目的で、HDM 抽出物の刺激によってケラチノサイトから ET-1、MMP-2 および MMP-9 が産生されるか否かについて検討した。また、上記のメディエーター産生における PAR-2 の関与について検討した。その結果、ケラチノサイトで HDM 抽出物の刺激による MMP-2 産生は認められなかったが、ET-1 および MMP-9 産生量は HDM 抽出物の刺激濃度と刺激時間に依存して増加した。また、システインプロテアーゼ阻害薬は ET-1 および MMP-9 の産生に対して影響を及ぼさなかったのに対し、セリンプロテアーゼ阻害薬は両メディエーターの産生を抑制した。さらに、ダニ抗原由来のセリンプロテアーゼは ET-1 および MMP-9 産生を誘導した。また、PAR-2 アンタゴニストは ET-1 および MMP-9 産生を抑制した。以上の成績より、ケラチノサイトはダニ抗原由来セリンプロテアーゼによる PAR-2 の活性化を介して ET-1 および MMP-9 産生を誘導し、AD の痒みに関与する可能性を示した。

以上、本研究は AD の動物モデルであるダニ抗原誘発慢性皮膚炎モデルの掻痒行動およびヒト由来ケラチノサイトからの痒み関連因子産生のメカニズムの解析を通し、AD の痒みの

発症機序の一端を明らかにした。現在、ADの痒みに奏功する治療薬は存在しないことから、本研究はADの病態解明の一助になるとともに、新規治療薬探索への有用な情報を与えるものであり、AD患者の生活の質の向上に寄与すると考えられる。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究に際して、御指導と御鞭撻を賜りました恩師、岐阜薬科大学機能分子学大講座 薬理学研究室 稲垣 直樹 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に際して、御助言を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座 薬理学研究室 田中 宏幸 准教授ならびに山下 弘高 助教に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多大な御協力と御助言を賜りましたマルホ株式会社 開発研究部 松本 辰美 博士をはじめ、上田 勇輝 研究員、中村 あき 研究員、金山 翔治 研究員、田村 理絵 研究員、橋本 恵以 研究員、木戸 裕子 研究員、石井 律子 博士に心から感謝いたします。

参考文献

1. 加藤則人, 佐伯秀久, 中原剛士, 田中暁生, 椛島健治, 菅谷誠, 室田浩之, 海老原全, 片岡葉子, 相原道子, 江藤隆史. 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2016年版. 日皮会誌 2016; 126(2): 121-155.
2. Larsen FS, Hanifin JM. Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2002; 22(1): 1-24.
3. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361(9352): 151-160.
4. Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Grüber C, Niggemann B, Wahn U; Multicenter Allergy Study Group. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5): 925-931.
5. Sugiura H, Umemoto N, Deguchi H, Murata Y, Tanaka K, Sawai T, Omoto M, Uchiyama M, Kiriya T, Uehara M. Prevalence of childhood and adolescent atopic dermatitis in a Japanese population: comparison with the disease frequency examined 20 years ago. *Acta Derm Venereol* 1998; 78(4): 293-294.
6. Irvine AD, McLean WH. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2006; 126(6): 1200-1202.
7. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(5): 860-876.
8. Proksch E, Jensen JM, Elias PM. Skin lipids and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2003; 21(2): 134-144.
9. Seidenari S, Giusti G. Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm Venereol* 1995; 75(6): 429-433.

10. Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2000; 115(3): 406-413.
11. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 1991; 96(4): 523-526.
12. Vasilopoulos Y, Cork MJ, Murphy R, Williams HC, Robinson DA, Duff GW, Ward SJ, Tazi-Ahnini R. Genetic association between an AACC insertion in the 3'UTR of the stratum corneum chymotryptic enzyme gene and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2004; 123(1): 62-66.
13. Hansson L, Bäckman A, Ny A, Edlund M, Ekholm E, Ekstrand Hammarström B, Törnell J, Wallbrandt P, Wennbo H, Egelrud T. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol* 2002; 118(3): 444-449.
14. Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, Takehara K, Diamandis EP. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* 2007; 16(6): 513-519.
15. Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC, McLean WH. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3): 564-567.
16. Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, Nemoto-Hasebe I, Sakai K, Nagasaki A, Ota M, Hata H, Evans AT, Palmer CN, Shimizu H, McLean WH. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol*

- 2008; 128(6): 1436-1441.
17. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; 129(8): 1878-1891.
 18. Komine M. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: keratinocytes in atopic dermatitis - their pathogenic involvement. *J Pharmacol Sci* 2009; 110(3): 260-264.
 19. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002; 3(7): 673-680.
 20. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005; 202(9): 1213-1223.
 21. Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(3 Suppl): S406-413.
 22. Teplitzky V, Mumcuoglu KY, Babai I, Dalal I, Cohen R, Tanay A. House dust mites on skin, clothes, and bedding of atopic dermatitis patients. *Int J Dermatol* 2008; 47(8): 790-795.
 23. Riley G, Siebers R, Rains N, Crane J, Fitzharris P. House-dust mite antigen on skin and sheets. *Lancet* 1998; 351(9103): 649-650.
 24. Thomas WR. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol Int* 2015; 64(4): 304-311.
 25. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(1): 1-18.
 26. 安枝浩. ダニアレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患. *アレルギー* 2008; 57(7):

807-815.

27. Scalabrin DM, Bavbek S, Perzanowski MS, Wilson BB, Platts-Mills TA, Wheatley LM. Use of specific IgE in assessing the relevance of fungal and dust mite allergens to atopic dermatitis: a comparison with asthmatic and nonasthmatic control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6): 1273-1279.
28. Schäfer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann HE. Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6): 1280-1284.
29. Rawle FC, Mitchell EB, Platts-Mills TA. T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, Antigen P1: comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. *J Immunol* 1984; 133(1): 195-201.
30. Giusti F, Seidenari S. Reproducibility of atopy patch tests with *Dermatophagoides*: a study on 85 patients with atopic dermatitis. *Contact Dermatitis* 2004; 50(1): 18-21.
31. Jeong SK, Kim HJ, Youm JK, Ahn SK, Choi EH, Sohn MH, Kim KE, Hong JH, Shin DM, Lee SH. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol* 2008; 128(8): 1930-1939.
32. Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H. Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite major allergen Der f 1. *J Invest Dermatol* 2006; 126(12): 2719-2723.
33. Schoepe S, Schäcke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol* 2006; 15(6): 406-420.
34. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96(1): 23-43.
35. Reitamo S, Wollenberg A, Schöpf E, Perrot JL, Marks R, Ruzicka T, Christophers E, Kapp A,

- Lahfa M, Rubins A, Jablonska S, Rustin M. Safety and efficacy of 1 year of tacrolimus ointment monotherapy in adults with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 2000; 136(8): 999-1006.
36. Remitz A, Harper J, Rustin M, Goldschmidt WF, Palatsi R, van der Valk PG, Sharpe G, Smith CH, Dobozy A, Turjanmaa K. Long-term safety and efficacy of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in children. *Acta Derm Venereol* 2007; 87(1): 54-61.
37. Wahlgren CF, Hägermark O, Bergström R. The antipruritic effect of a sedative and a non-sedative antihistamine in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1990; 122(4): 545-551.
38. Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009; 129(1): 31-40.
39. 首藤剛. 新規ダニ誘発性掻痒自然発症モデルマウスの病態解析. *生化学* 2012; 84(5): 352-355.
40. 有村昭典, 吉岡健. アトピー性皮膚炎の動物モデル. *アレルギー・免疫* 2006; 13(10): 32-37.
41. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 1997; 9(3): 461-466.
42. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 1999; 104(8): 1097-1105.
43. Hashimoto Y, Takaoka A, Sugimoto M, Honma Y, Sakurai T, Futaki N, Arai I. Itch-associated scratching contributes to the development of dermatitis and hyperimmunoglobulinemia E in NC/Nga mice. *Exp Dermatol* 2011; 20(10): 820-825.
44. Sasakawa T, Higashi Y, Sakuma S, Hirayama Y, Sasakawa Y, Ohkubo Y, Goto T, Matsumoto M, Matsuda H. Atopic dermatitis-like skin lesions induced by topical application of mite antigens

- in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126(3): 239-247.
45. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, Arai M, Wang J, Oikawa Y, Ikeda T, Hirota N, Nakagawa H, Ishii A. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* 2003; 58(2): 139-145.
 46. 海野哲史, 須藤一, 吉池高志, 小川秀興, 羅智靖. NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎様皮疹の誘発－皮膚バリア機能低下の影響－. *アレルギー* 2001; 50(12): 1152-1162.
 47. Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Deguchi M, Arimura A. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with *Dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mice. *Allergol Int* 2007; 56(2): 139-148.
 48. Yamamoto M, Haruna T, Ueda C, Asano Y, Takahashi H, Iduhara M, Takaki S, Yasui K, Matsuo Y, Arimura A. Contribution of itch-associated scratch behavior to the development of skin lesions in *Dermatophagoides farinae*-induced dermatitis model in NC/Nga mice. *Arch Dermatol Res* 2009; 301(10): 739-746.
 49. Sugiura H, Omoto M, Hirota Y, Danno K, Uehara M. Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289(3): 125-131.
 50. Tobin D, Nabarro G, Baart de la Faille H, van Vloten WA, van der Putte SC, Schuurman HJ. Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90(4 Pt 1): 613-622.
 51. Tominaga M, Takamori K. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J Dermatol* 2014; 41(3): 205-212.
 52. Tominaga M, Ozawa S, Ogawa H, Takamori K. A hypothetical mechanism of intraepidermal neurite formation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2007; 46(3): 199-210.
 53. Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Decreased production of semaphorin 3A in the lesional

- skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2008; 158(4): 842-844.
54. Fukamachi S, Bito T, Shiraishi N, Kobayashi M, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2011; 61(2): 118-123.
 55. Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. Correlation of house dust mite-specific lymphocyte proliferation with IL-5 production, eosinophilia, and the severity of symptoms in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(1 Pt 1): 84-89.
 56. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1): 178-189.
 57. Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J, Jullien D, McHugh T, Nassif AS, Chan SC, Modlin RL. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 1995; 154(4): 1956-1963.
 58. Grewe M, Gyufko K, Schöpf E, Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 1994; 343(8888): 25-26.
 59. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; 128(11): 2625-2630.
 60. Batista DI, Perez L, Orfali RL, Zaniboni MC, Samorano LP, Pereira NV, Sotto MN, Ishizaki AS, Oliveira LM, Sato MN, Aoki V. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29(6): 1091-1095.
 61. Ständer S, Steinhoff M. Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Exp Dermatol* 2002; 11(1): 12-24.
 62. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors.

- Pharmacol Rev 2001; 53(2): 245-282.
63. Rattenholl A, Steinhoff M. Proteinase-activated receptor-2 in the skin: receptor expression, activation and function during health and disease. *Drug News Perspect* 2008; 21(7): 369-381.
 64. Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW. Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 1999; 8(4): 282-294.
 65. Buddenkotte J, Stroh C, Engels IH, Moormann C, Shpacovitch VM, Seeliger S, Vergnolle N, Vestweber D, Luger TA, Schulze-Osthoff K, Steinhoff M. Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* 2005; 124(1): 38-45.
 66. Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy* 2009; 64(9): 1366-1374.
 67. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* 2003; 23(15): 6176-6180.
 68. Costa R, Marotta DM, Manjavachi MN, Fernandes ES, Lima-Garcia JF, Paszcuk AF, Quintão NL, Juliano L, Brain SD, Calixto JB. Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice. *Br J Pharmacol* 2008; 154(5): 1094-1103.
 69. Tsujii K, Andoh T, Ui H, Lee JB, Kuraishi Y. Involvement of Tryptase and Proteinase-Activated Receptor-2 in Spontaneous Itch-Associated Response in Mice With Atopy-like Dermatitis. *J Pharmacol Sci* 2009; 109(3): 388-395.
 70. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;

454(7203): 445-454.

71. Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, Pellegrino M, Estandian DM, Bautista DM. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell* 2013; 155(2): 285-295.
72. Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE₂ and PGF_{2α} on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 2004; 122(5): 1214-1224.
73. Moormann C, Artuc M, Pohl E, Varga G, Buddenkotte J, Vergnolle N, Brehler R, Henz BM, Schneider SW, Luger TA, Steinhoff M. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126(4): 746-755.
74. Nakagawa H, Hiura A. Four Possible Itching Pathways Related to the TRPV1 Channel, Histamine, PAR-2 and Serotonin. *Malays J Med Sci* 2013; 20(4): 5-12.
75. Liu Q, Weng HJ, Patel KN, Tang Z, Bai H, Steinhoff M, Dong X. The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci Signal* 2011; 4(181): ra45.
76. Sun G, Stacey MA, Schmidt M, Mori L, Mattoli S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol* 2001; 167(2): 1014-1021.
77. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 2003; 139(11): 1479-1488.
78. Andoh T, Kuwazono T, Lee JB, Kuraishi Y. Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice. *Peptides* 2011; 32(10): 2098-2103.
79. Timmes TR, Rothbaum R, Kirti, Silva CY, Bhawan J, Cummins DL, Wolpowitz D.

- Gastrin-releasing peptide-expressing nerves comprise subsets of human cutaneous A δ and C fibers that may sense pruritus. *J Invest Dermatol* 2013; 133(11): 2645-2647.
80. Hawro T, Saluja R, Weller K, Altrichter S, Metz M, Maurer M. Interleukin-31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge. *Allergy* 2014; 69(1): 113-117.
 81. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin SD, LeCiel C, Waggle K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J, Gross JA. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 752-760.
 82. Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* 2005; 202(4): 541-549.
 83. Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(41): 14795-14800.
 84. Hägermark O, Strandberg K. Pruritogenic activity of prostaglandin E2. *Acta Derm Venereol* 1977; 57(1): 37-43.
 85. Neisius U, Olsson R, Rukwied R, Lischetzki G, Schmelz M. Prostaglandin E2 induces vasodilation and pruritus, but no protein extravasation in atopic dermatitis and controls. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47(1): 28-32.
 86. Hägermark O, Strandberg K, Hamberg M. Potentiation of itch and flare responses in human skin by prostaglandins E2 and H2 and a prostaglandin endoperoxide analog. *J Invest Dermatol*

- 1977; 69(6): 527-530.
87. Kido-Nakahara M, Buddenkotte J, Kempkes C, Ikoma A, Cevikbas F, Akiyama T, Nunes F, Seeliger S, Hasdemir B, Mess C, Buhl T, Sulk M, Müller FU, Metze D, Bunnett NW, Bhargava A, Carstens E, Furue M, Steinhoff M. Neural peptidase endothelin-converting enzyme 1 regulates endothelin 1-induced pruritus. *J Clin Invest* 2014; 124(6): 2683-2695.
 88. McQueen DS, Noble MA, Bond SM. Endothelin-1 activates ETA receptors to cause reflex scratching in BALB/c mice. *Br J Pharmacol* 2007; 151(2): 278-284.
 89. Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, Takeuchi S, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* 2012; 122(7): 2590-2600.
 90. Takubo M, Ueda Y, Yatsuzuka R, Jiang S, Fujii Y, Kamei C. Characteristics of scratching behavior induced by some chemical mediators in hairless mice. *J Pharmacol Sci* 2006; 100(4): 285-288.
 91. Inagaki N, Igeta K, Kim JF, Nagao M, Shiraishi N, Nakamura N, Nagai H. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 2002; 448(2-3): 175-183.
 92. Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharmacol* 2006; 530(1-2): 172-178.
 93. Bhagwat SS, Larsen AK, Winberg JO, Seternes OM, Bang BE. Salmon and king crab trypsin stimulate interleukin-8 and matrix metalloproteinases via protease-activated receptor-2 in the skin keratinocytic HaCaT cell line. *Food Chem Toxicol* 2014; 69: 303-311.
 94. Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(4): 219-224.

95. Aktar MK, Kido-Nakahara M, Furue M, Nakahara T. Mutual upregulation of endothelin-1 and IL-25 in atopic dermatitis. *Allergy* 2015; 70(7): 846-854.
96. Yohn JJ, Morelli JG, Walchak SJ, Rundell KB, Norris DA, Zamora MR. Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol* 1993; 100(1): 23-26.
97. Gschwandtner M, Purwar R, Wittmann M, Bäumer W, Kietzmann M, Werfel T, Gutzmer R. Histamine upregulates keratinocyte MMP-9 production via the histamine H1 receptor. *J Invest Dermatol* 2008; 128(12): 2783-2791.
98. Purwar R, Kraus M, Werfel T, Wittmann M. Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol* 2008; 128(1): 59-66.
99. Giannelli G, Foti C, Marinosci F, Bonamonte D, Antonaci S, Angelini G. Gelatinase expression at positive patch test reactions. *Contact Dermatitis* 2002; 46(5): 280-285.
100. Harper JI, Godwin H, Green A, Wilkes LE, Holden NJ, Moffatt M, Cookson WO, Layton G, Chandler S. A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis. *Br J Dermatol* 2010; 162(2): 397-403.
101. Shubayev VI, Myers RR. Matrix metalloproteinase-9 promotes nerve growth factor-induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro. *J Neurosci Res* 2004; 77(2): 229-239.
102. Tominaga M, Kamo A, Tengara S, Ogawa H, Takamori K. *In vitro* model for penetration of sensory nerve fibres on a Matrigel basement membrane: implications for possible application to intractable pruritus. *Br J Dermatol* 2009; 161(5): 1028-1037.
103. Tsybikov NN, Petrisheva IV, Kuznik BI, Magen E. Plasma endothelin-1 levels during exacerbation of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Proc* 2015; 36(4): 320-324.
104. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue

- remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3): 221-233.
105. Devillers AC, van Toorenenbergen AW, Klein Heerenbrink GJ, Muldert PG, Oranje AP. Elevated levels of plasma matrix metalloproteinase-9 in patients with atopic dermatitis: a pilot study. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(3): 311-313.
106. Tsuboi R, Sato C, Shi CM, Nakamura T, Sakurai T, Ogawa H. Endothelin-1 acts as an autocrine growth factor for normal human keratinocytes. *J Cell Physiol* 1994; 159(2): 213-220.
107. Sah SK, Kim BH, Park GT, Kim S, Jang KH, Jeon JE, Shin J, Kim TY. Novel isonahocol E(3) exhibits anti-inflammatory and anti-angiogenic effects in endothelin-1-stimulated human keratinocytes. *Eur J Pharmacol* 2013; 720(1-3): 205-211.
108. Khurram SA, Bingle L, McCabe BM, Farthing PM, Whawell SA. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 regulate oral cancer cell behaviour. *J Oral Pathol Med* 2014; 43(9): 667-674.
109. Carvalho RF, Nilsson G, Harvima IT. Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. *Exp Dermatol* 2010; 19(2): 117-122.
110. Kanda N, Watanabe S. Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 121(3): 570-577.
111. Kinkelin I, Mötzing S, Koltzenburg M, Bröcker EB. Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema. *Cell Tissue Res* 2000; 302(1): 31-37.

略語一覧

5-HT	5-hydroxytryptamine
AD	atopic dermatitis
CG	cromoglycate
CPA	chlorpheniramine
Dfb	<i>Dermatophagoides farinae</i> body
ET	endothelin
FcεRI	high-affinity IgE receptors
GRP	gastrin releasing peptide
GX	gabexate
HDM	house dust mite
HE	hematoxylin and eosin
IFN	interferon
IgE	immunoglobulin E
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
MMP	matrix metalloproteinase
Mrgpr	Mas-related G-protein-coupled receptor
MSDS	mite-derived serine proteases
NGF	nerve growth factor
PAR-2	proteinase-activated receptor-2
PBS	phosphate-buffered saline
PG	prostaglandin

PGP 9.5 protein gene product 9.5
Sema3A semaphorin 3A
SDS sodium dodecyl sulfate
SP substance P
SPF specific pathogen-free
TB toluidin blue
TEWL transepidermal water loss
Th T helper
TNF tumor necrosis factor
TSLP thymic stromal lymphopoietin