

皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による 皮膚バリア機能増強とアトピー・アレルギーの発症予防

徳島大学先端酵素学研究所

木戸 博

Enhancement of skin barrier function by activation of granular layer cells and restoration of tight junction are important for the prevention of atopic and allergic dermatitis. We recently established a highly sensitive method for detection of allergen specific immunoglobulin class switching by the densely carboxylated protein (DCP) chip microarray. DCP chip provides sensitive quantitative measurement of allergen-specific IgGs, IgA and IgE by using limited amount of serum and also provides allergen-affinity of each immunoglobulins. By using the DCP chip, we measured the enhancement of skin barrier function after sensitization of allergen from skin. We analyzed the effects of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) inhibitor on activation of mitochondria in the granular layer cells of skin. Treatment of PDK4 inhibitor from the skin effectively inhibited dinitrochlorobenzene-induced skin inflammation and proliferated granular layer cells. Treatment of PDK4 inhibitor also block skin sensitization of ovomucoid. These results suggest that PDK4 inhibitor plays a role for prevention and/or treatment of allergy induced by skin-sensitization.

1. 緒言

アレルギー・アトピーの発症病理学的研究の中で、抗原経皮感作の重要性に関する目覚ましい研究成果が近年相次いで発表され、これまで有効な予防と治療法がなかったアレルギー・アトピー領域が注目されている。その発端となった日本の研究者グループによる2報の論文が注目される。1つは、国立成育医療センターグループのHorimukai等による“Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis”¹⁾で、生後32週間保湿剤によるスキンケアをすることで、アトピーの発症が32%抑制されたことを記載した画期的な論文である。他は、慶応大学医学部皮膚科学教室のグループによる“Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis”²⁾で、アトピー性皮膚炎では抗原提示細胞の突起がタイトジャンクションの間隙を介して伸展して、抗原提示に関与する機序についての論文である。この2報は、アトピーの発症とタイトジャンクション崩壊、保湿剤による角質層とタイトジャンクション保護との関係を示唆している。

我々は、国立成育医療センターグループとの前記の共同研究論文において、各種抗原特異的抗体価を測定して発表してきたが、続いて行った最近の乳児コホート研究から、胎盤を介して母子移行したIgG抗体が乳児の体内から

消える生後4ヶ月以後に、湿疹を介して抗原が経皮感作されると、乳児の食物アレルギーの発症に繋がることを明らかにした(Manuscript in preparation)。このように微量抗原の経皮感作によって、体内免疫系が大きく影響されることから、これを高感度に感知して予防と対策を講ずる必要がある。本プロジェクトでは、食物アレルギーの予防と治療のために、1)低侵襲性にしかも高感度に抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAを測定する検査システムを開発するとともに、2)抗原の経皮感作を防ぐ皮膚のバリア機能を増加させる方法の一つとして、細胞間を繋ぐタイトジャンクションがミトコンドリア機能に密接に依存していることに注目して、ミトコンドリア機能活性化剤を皮膚に塗布した場合の抗原感作抑制効果を検討した。なお、申請者等のグループは、血管内皮細胞の透過性をコントロールするタイトジャンクションの修復の重要性をこれまでに明らかにしており³⁾、これらの研究を遂行する基盤を有している。

2. 実験方法

2.1. 高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 測定システム

高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA測定システムとして、我々はこれまでに開発してきたDensely carboxylated Protein (DCP)-chipを用いた^{4,5)}。このデバイスは、僅か20-50 µLの血清で、10～33種類の抗原特異的抗体のクラススイッチパターンと、約100 µLの血清で抗原親和性の測定が可能なデバイスである。図1に、抗原蛋白質を共有結合で高密度に固定化するDCPチップの概要を示す。DCPチップは、シリコン基板にDiamond-like carbon (DLC)コート後、静電層カルボキシル基修飾を施したチップと、ガラススライドに静電層カルボキシル基修飾を施したチップ (IgSensor AMERIC®)



Enhancement of skin barrier function by activation of granular layer cells and restoration of tight junction, and prevention of atopic and allergic dermatitis

Hiroshi Kido

Institute for Enzyme Research,
Tokushima University

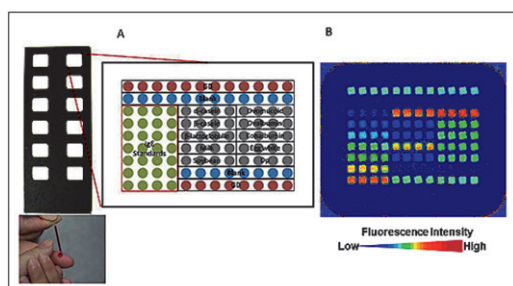
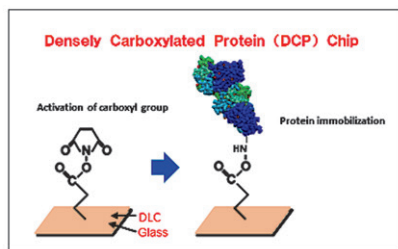


図1 DCPチップを用いた高感度、低侵襲性抗原特異的抗体価定量の概要

があり、性能はほぼ同等で現在10-36種類のアレルゲンを搭載したチップが汎用されている。本研究ではDCPチップとして、当研究室で開発したガラススライド基板のIgSensor AMERIC[®]が使用された。

図2にこのアレルゲンチップの特色を示す。このアレルゲンチップIgSensor AMERIC[®]は、これまでにない極微量検体で、抗原特異的各種抗体価を定量測定が可能である。そのため低侵襲的に乳児の抗体価の測定が可能となった。このシステムでは、1人分の枠内に各種食物抗原や環境中の経気道感作抗原、各種リコンビナント単一抗原が搭載されており、同時に33種類の抗原に対する特異抗体価の定

量が可能である。さらにアレルギーの発症と予防の観点から抗原特異的抗体の抗原親和性が注目されている⁶⁾が、抗原親和性を抗原のIC₅₀値で測定可能な唯一のデバイスとなっている。

2.2. 抗原経皮感作をモニターするモデルシステム

実験動物としてマウスを使用して抗原経皮感作をモニターするモデルシステムとして、これまで広く使用されてきたDinitrochlorobenzene (DNBC, Sigma-Aldrich)で誘導したアトピー・皮膚炎モデル⁹⁾と、皮膚を金ブラシで機械的に搔破することで比較的的自然に近い穏やかな皮膚炎を起こす2系統のモデルを用いて、抗原感作とミトコンドリア活性化剤による感作ブロックを検討した。DNBCは皮膚蛋白質と共有結合する比較的強力な化学修飾薬剤で短時間に激しい皮膚炎を生じる。6週齢のBALB/C雌マウスを脱毛した後、エタノールに溶解した2%DNBCを朝、夕の1日2回、3日間塗布して皮膚炎を誘発した。その後皮膚顆粒細胞のミトコンドリアを標的にしたPyruvate Kinase 4 (PK4)阻害剤を皮膚ローションに溶解して1日2回の塗布を7日間実施し、実験開始から11日目にマウスを屠殺して、皮膚組織の状態を観察した。

一方、皮膚を機械的に搔破した群では、初日に金ブラシで30回搔破した後、翌日よりPK4阻害剤添加(+、-)の皮膚ローションを1日2回、7日間塗布し皮膚の治療を実施した。1週間の治療後、卵白抗原のOvomucoid (OVM) 1mg/60μL 4% SDS溶液を1日1回、10日間塗布することで、抗原の経皮感作を実施した。金ブラシでの皮膚搔破から3週間後、即ち経皮抗原感作の4日後に、OVMの経口ブースト感作を実施して、血液中のOVM抗原特異的IgE抗体誘導を2週間モニターした。

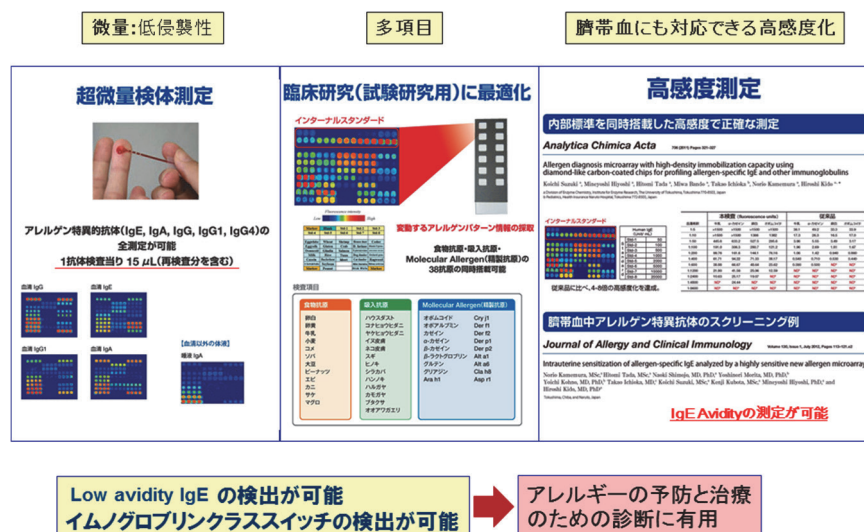


図2 高感度 DCP チップの特徴

3. 結果と考察

3. 1. 高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 測定システムの開発

IgSensor AMERIC[®]を用いた出生時の母体血、臍帯血、新生児血の鶏卵、ミルク抗原、杉抗原 (Cedar pollen)、ハウスダストと2種類のダニ抗原 (Dp, Df) に対する抗原特異的IgEの感作パターンを図3に示す。胎盤を通過できるIgG、IgG4は、母体血、臍帯血、新生児血間で相違は見られず、同一の感作パターンを示した。一方で胎盤を通過できないIgAとIgEでは、母体血と臍帯血、新生児血間に大きな違いが観察された。胎児及び新生児ではIgA産生が見られないことから、臍帯血、新生児血では抗原特異的抗体は全く観察されない。しかし抗原特異的IgEの場合、母体血と臍帯血、新生児血間で違いのあることが観察された。胎児期より胎児は抗原特異的IgEを産生するが、その抗原の由来は、胎盤を通過して胎児にもたらされる母体のIgG・抗原複合体に由来する主に食物抗原で、この抗原に対するIgE抗体が産生される。食物抗原以外の環境抗原によって感作される頻度の高い母体血との違いが生じると推定している。以上の結果は、胎児と臍帯血で見られる抗原特異的IgEは胎児由来であり、母体血が混入した結果見られるIgEではないことが明らかになった。一方、胎児はIgEを産生しているが、胎児期にアレルギーの発症がない理由として、胎児と臍帯血で見られる抗原特異的IgEは、抗原との親和性が低くヒスタミン遊離を誘発しない低親和性IgE抗体であることが判明している¹⁰⁾。

出生後0-6ヶ月までの乳児期の乳児を対象として、ミルク抗原特異的イムノグラブリンクラススイッチのモニターが行われた。特に乳児期の湿疹、アトピー性皮膚炎が食物アレルギーの発症の原因になることが明らかにな

ってきたことから^{11, 12)}、今後本研究課題と密接に関連した解析研究が望まれている。人工乳と混合栄養児の場合、乳児は牛ミルクの特異的抗原、Beta-lactoglobulin (BLG) に対する抗体を産生する。しかも乳児にとっては唯一の食物栄養源であることから、大量のミルク抗原に経口感作されることになる。一方、母乳栄養児の場合は、BLGに対する抗体産生は見られなかった。図4に示すように、乳児はイムノグラブリンクラススイッチのルールに従って、出生後0ヶ月から6ヶ月までの間に経時的に、IgG3→IgG1→IgG2→IgG4とIgG1→IgEへのクラススイッチの順番で進んでいることが判る。IgMから最初に行える抗体がIgG3であるが、IgG3は速やかにIgG1にクラススイッチされ、乳児は異物反応として大量のIgG1抗体を産生する。その後、アレルギー発症抑制に関与するIgG1→IgG2→IgG4へのクラススイッチが進む(この図ではIgG2が省略されている)とともに、アレルギーの発症に関与するIgG1→IgEへのクラススイッチが進む。

上記の高感度イムノグラブリンクラススイッチの測定系ができたことから、今後経皮感作によるIgG1→IgEへクラススイッチの高感度モニターが期待される。

3. 2. 抗原経皮感作をモニターするモデルシステムの開発

上記のように高感度イムノグラブリンクラススイッチの測定系ができたことから、抗原経皮感作をブロックする薬剤のスクリーニングが可能になった。本研究は、これまでに我々が実施してきた研究からの仮説、「細胞間のタイトジャンクション機能がミトコンドリア機能に密接に関係しており、ミトコンドリア機能の低下がタイトジャンクション機能の低下や、皮膚バリア機能の低下を引き起こし、逆にミトコンドリア機能の上昇がタイトジャンクション機能

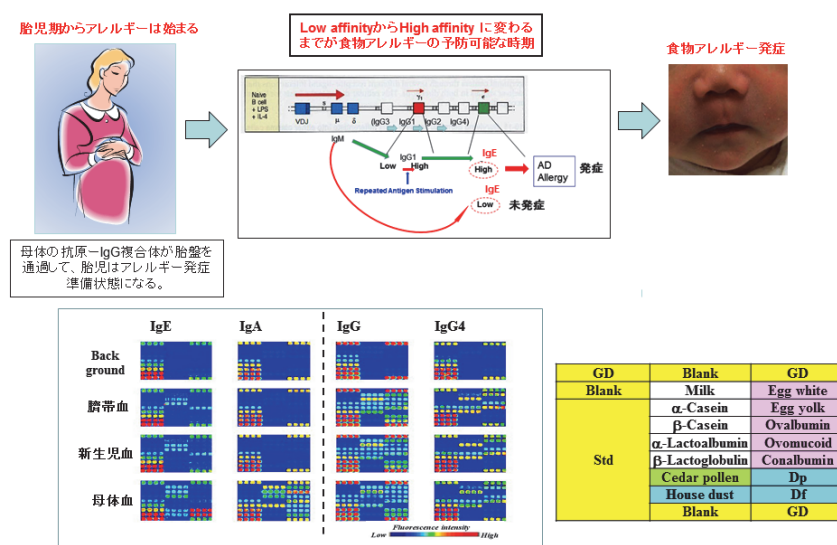


図3 母体血と臍帯血、新生児血間の抗原特異的各種イムノグロブリンの比較

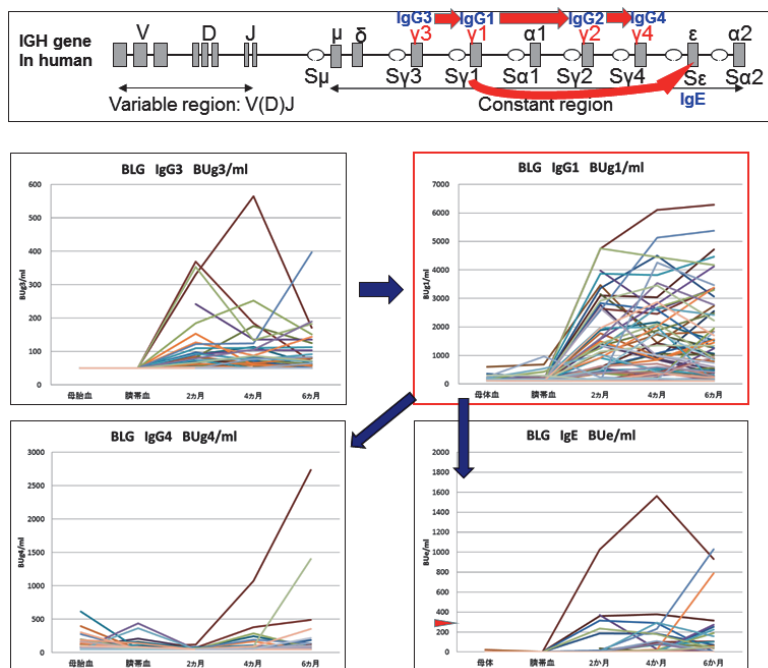


図4 母体血と出生後の0ヶ月から6ヶ月までのミルク抗原の経口感作とイムノグロブリンクラススイッチ

を増加させる」に基づいて実施された。図5は、この仮説の基になったこれまでの研究成果である^{4, 13)}。種々の病原体は体内の防御システムを活性化して各種サイトカインの産生を促す。サイトカインは生体防御系の発動に不可欠であるが、過剰のサイトカインの産生（サイトカインストーム）は、体内の各臓器が微量産生している trypsin（異所性 trypsin）の発現を増加させ、そのレセプターの PAR-2 を介して細胞内の Ca^{2+} の異常増加とそれに伴うタイトジャンクションの崩壊を導く。サイトカインの増加は、体内代謝の中でもミトコンドリアのエネルギー代謝に深く関係しており、ミトコンドリア機能の低下と ATP クライシス、細胞機能の低下を引き起こす。この一連のシグナル伝達の中でサイトカインの増加は、エネルギー代謝の主役を担う糖代謝の調節因子、PDK4 の著しい増加を誘導することが判明した¹³⁾。PDK4 の増加は、その基質である PDH (Pyruvate dehydrogenase) をリン酸化して、PDH 活性を低下させる。PDH は、Glucose 代謝の key enzyme で、ミトコンドリアへの糖代謝の流れを調節している酵素である。即ち PDH の活性低下は Glucose のミトコンドリアへの輸送量の低下を招き、その結果 ATP 産生の低下、ミトコンドリア機能の低下と細胞機能の低下を引き起こす。このような観点から、PDK4 阻害剤の開発研究が進んでいる。

図6は、2% DNBC を3日間塗布することによって誘発されたアトピー・皮膚炎モデルの結果である。DNBC 塗布による皮膚炎を通常のローション基材のみで1週間治療した群では、DNBC を塗布しなかったマウスの皮膚に比べて、皮膚顆粒層が厚くなるとともに、角質層が薄く変化してい

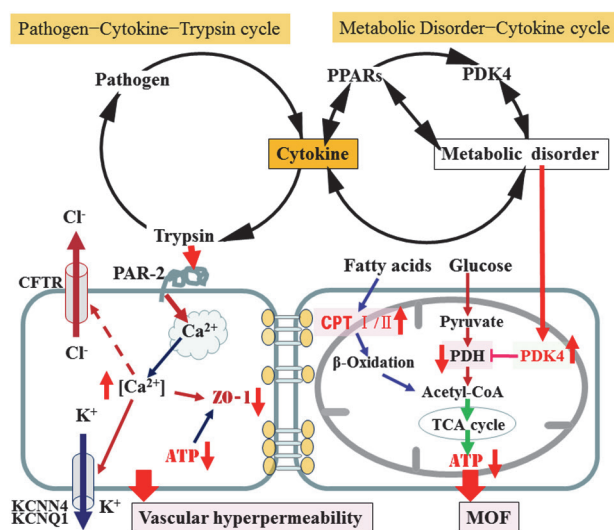


図5 細胞間タイトジャンクションの機能に関与するミトコンドリアのエネルギー代謝と、これに影響を与える病原体-サイトカイン-代謝不全サイクル

PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PAR-2, protease activated receptor 2; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; KCNN4, potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4; KCNQ1, potassium channel, voltage dependent, KCNQ1(IPR005827); ZO-1, zonular occludens-1.

た。これに対して、PDK4 阻害剤を添加したローションで治療した群では、明らかに皮膚顆粒層の肥厚が抑制されると共に、角質層の厚みが比較的良く保たれていた。これら

のことは、PDK4 阻害剤の有効性を示唆している。

一方、皮膚を機械的に搔破した温和な経皮感作実験系では、高感度IgSensor AMERIC[®]を使用することで、OVM 抗原特異的IgE抗体の産生がモニターされた。実験系を図7に示す。初回の皮膚搔破の後、1週間皮膚の治療が行われたが、その皮膚治療の効果をOVMの抗原経皮感作と、抗原の経口ブースト感作でOVM特異的IgE産生を増幅誘

発してモニターした。この実験系では、初回の経皮感作(10日間の経皮感作)のみでは、OVM特異的IgE抗体産生は観察されず、その後の比較的大量の経口抗原ブースト感作することで、図8に示すようにIgE抗体は14日目に急速な増加を見た。一方、機械的搔破後にPDK4 阻害剤を添加したローションで1週間治療した群では、その後の経皮抗原感作によってもIgE抗体産生の程度は弱く、経口抗原ブー

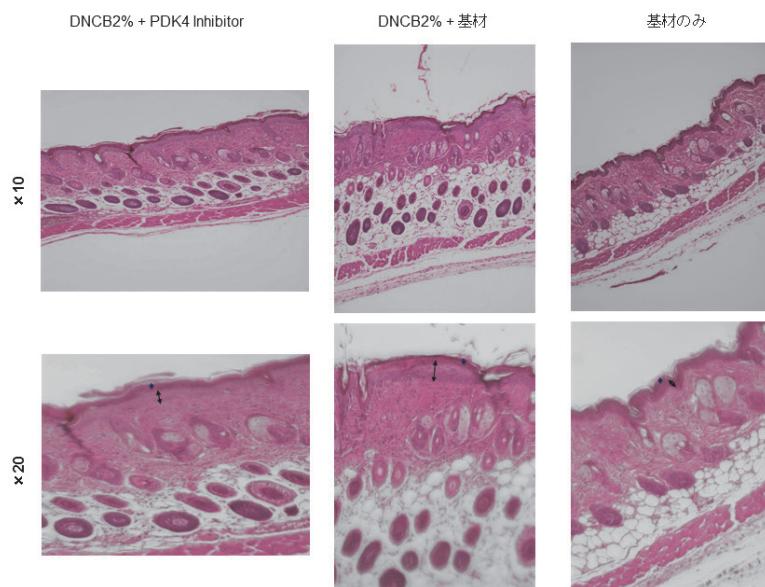


図6 DNBC 皮膚炎モデルにおける PDK4 阻害剤の皮膚顆粒層と角質層の保全効果
皮膚顆粒層(←→)と顆粒層の上部に位置する角質層(→)を示す。

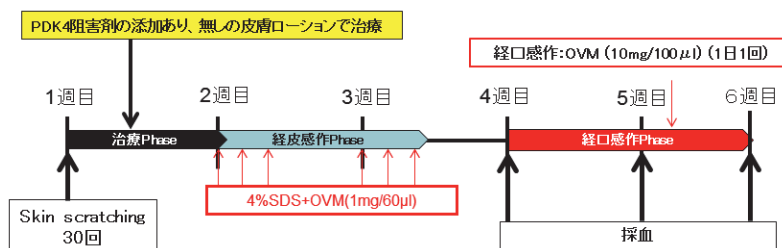


図7 皮膚搔破とその治療、これに続く経皮抗原感作スケジュール

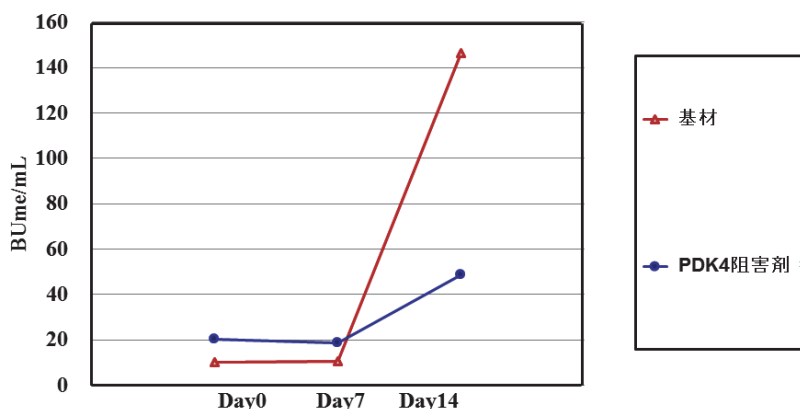


図8 OVM 経皮感作による OVM 特異的 IgE 抗体の産生と、これを抑制する PDK4 阻害剤添加皮膚ローションの効果

スト感作によるIgE産生が抑制されていた。

4. 総 括

「皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強とアトピー・アレルギー皮膚炎の発症予防」を目指して研究が行われた。そのため、高感度抗原特異的抗体のクラススイッチモニター系の確立と、このシステムを用いたタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強効果の検証が、PDK4 阻害剤を候補薬剤として検討された。その結果、PDK4 阻害剤は、タイトジャンクション修復に効果のあることが証明された。今後皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復に適したさらなるPDK4 阻害剤のスクリーニングが求められる。また今後イムノグラブリンクラススイッチを高感度にモニターすることで、経皮感作を効果的に防止する最適な薬剤使用の時期を示すバイオマーカーが見いだされると期待している。

(引用文献)

- 1) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitagawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 824-830, 2014.
- 2) Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, Amagai M. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 856-83064, 2014.
- 3) Wang S, Le TQ, Kurihara N, Chida J, Cissé Y, Yano M, and Kido H. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis* 202(7):991-1001, 2010.
- 4) Kido H. Influenza virus pathogenicity regulated by host cellular proteases, cytokines and metabolites, and its therapeutic options. *Proc Jpn Acad Ser B* 91: 351-368, 2015.
- 5) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Yao D, Yao M, Chida J and Yano M. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 1824(1): 186-194, 2011.
- 6) Suzuki K, Hiyoshia M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N, and Kido H. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Anal Chim Acta* 706(2): 321-327, 2011.
- 7) Kamemura N, Tada H, Shimojo N, Morita Y, Kohno Y, Ichioka T, Suzuki K, Kubota K, Hiyoshi M and Kido H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly-sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 130:113-121, 2012.
- 8) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, and Kido H. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol* 133(3): 904-905, 2014.
- 9) Zhang EY, Chen AY, Zhu BT. Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: Role of specific antibodies in pathogenesis. *PLoS one* 4, e7703, 2009.
- 10) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol* 133(3): 904-905, 2014.
- 11) Flohr C, Perkin M, Logan K, Marrs T, Radulovic S, Campbell LE, et al. atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J Invest Dermatol* 134:345-50, 2014.
- 12) Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1187-1197, 2012.
- 13) Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yomamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorder and multiorgan failure in severe influenza. *PLoS One* 9(5):e98032, 2014.