

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬基盤推進研究事業
(英語) Research on Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 新しいコンセプトに基づく掻痒抑制物質探索のための
新規アトピー性皮膚炎モデルの開発とその応用
(英語) Development and application of a new mouse model for atopic dermatitis
toward identification of therapeutic target for controlling itch

研究開発担当者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所 教授 福井 宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor,
Yoshinori Fukui

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究(1) (日本語) モデルマウスの開発・解析とそれを用いた IL-31 の産生制御機構
開発課題名： (英語) Development and analysis of a mouse model for elucidation of the
mechanism controlling IL-31 induction

研究開発分担者 (日本語) 九州大学生体防御医学研究所 教授 福井 宣規
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Professor,
Yoshinori Fukui

分担研究(2) (日本語) 臨床サンプルを用いた解析
開発課題名： (英語) Analyses of human samples
研究開発分担者 (日本語) 九州大学皮膚科学分野 教授 古江 増隆
所属 役職 氏名： (英語) Department of Dermatology, Kyushu University, Professor, Masutaka Furue

分担研究(3) (日本語) IL-31 の感知機構
開発課題名： (英語) Sensing mechanism of IL-31

研究開発分担者 (日本語) 富山大学大学院医学医薬学研究部 応用薬理学 准教授 安東 嗣修
所属 役職 氏名: (英語) Department of Applied Pharmacology, Graduate School of Medicine and
Pharmaceutical Sciences, Toyama University, Associate Professor,
Tsugunobu Andoh

分担研究(4) (日本語) 新たな創薬標的の同定とその validation
開発課題名: (英語) Target identification and validation in drug discovery for
atopic dermatitis

研究開発分担者 (日本語) 株式会社 塩野義製薬 創薬疾患研究所 主幹研究員 形山 和史
所属 役職 氏名: (英語) Drug Discovery & Disease Research Laboratory, SHIONOGI & CO., LTD.
Associate Principal Scientist, Kazufumi Katayama

II. 成果の概要 (総括研究報告)

アトピー性皮膚炎は国民の7~15%が罹患している国民病であり、「痒み」に伴い生活の質が著しく損なわれることから、その対策は急務となっている。IL-31は、アトピー性皮膚炎発症に重要な痒み物質で、主にヘルパーT細胞から産生されるが、その産生制御機構は不明であった。私達は、DOCK8を欠損した患者さんが重篤なアトピー性皮膚炎を発症することに着目し、このタンパク質の機能を解析した。その結果、DOCK8が発現できないように遺伝子操作したマウス (mutDOCK8 マウス) では、IL-31の産生が著しく亢進し、重篤な皮膚炎を自然発症することを見いだした。このマウスにおいて、IL-31受容体に対する抗体を投与したり、その発現を遺伝的に欠損させると、搔破行動が有意に抑制された。このことから、IL-31が疾患発症に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

mutDOCK8マウスのヘルパーT細胞を詳細に解析したところ、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、IL-31産生を誘導していることを発見した。EPAS1はARNTという分子と協調して低酸素応答を制御することが知られているが、EPAS1によるIL-31の産生誘導にARNTは必要ではなく、別のSP1という分子が関与していた。一方、EPAS1は細胞質から核に移行して機能するが、DOCK8はMST1という分子を介して、EPAS1の核への移行を抑制していることを突き止めた。このことから、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、EPAS1がIL-31産生に重要な役割を演じることが明らかになった。

そこで、ヒトヘルパーT細胞におけるEPAS1の重要性につき検討を行った。アトピー性皮膚炎患者さんの血清では、健常者に比べてIL-31の濃度が高値であり、患者さんのヘルパーT細胞を刺激すると、大量のIL-31が産生される。しかしながら、このIL-31の産生は、EPAS1の発現を抑制することで、著減した。以上より、EPAS1およびそれに至る経路は、アトピー性皮膚炎の痒みを根元から断つための新たな創薬標的になることが期待される。一方、IL-31の痒みの伝達機構に関しても、gastrin-releasing peptide (GRP)が脊髄後角において痒みの伝達に関与することを見出すといった成果をあげた。

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease, and its prevalence reaches to 7~15% in Japan. As AD-associated itch severely impairs quality of life, drug development for controlling itch is important. Interleukin-31 (IL-31) is a cytokine implicated in AD-associated itch, yet the mechanism controlling IL-31 production in CD4⁺ T cells remains unknown. DOCK8 mutations in humans cause severe AD. We found that mice lacking DOCK8 spontaneously develop severe AD-like disease with scratching behavior, when crossed with transgenic mice expressing T-cell receptor with a particular antigen specificity (designated mutDOCK8 mice). Upon stimulation, CD4⁺ T cells from mutDOCK8 mice produced large amounts of IL-31. In addition, skin disease development in mutDOCK8 mice was cancelled when they were crossed with IL-31 receptor KO mice or treated anti-IL-31 receptor antibody. Thus, IL-31 production in mutDOCK8 mice is important for development of AD-like skin disease.

By analyzing CD4⁺ T cells from mutDOCK8 mice, we found that IL-31 production critically depends on the transcription factor *Epas1*. Although EPAS1 is known to form a complex with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and control hypoxic responses in various biological settings, EPAS1-mediated IL-31 promoter activation occurred independently of ARNT, but in collaboration with SP1. Mechanistically, we found that DOCK8 acts as an adaptor and negatively regulates nuclear translocation of EPAS1. Thus, EPAS1 acts downstream of DOCK8 and plays a key role in IL-31 induction in CD4⁺ T cells.

We then examined the role of EPAS1 in human CD4⁺ T cells from healthy and AD patients. TCR stimulation-induced expression of *IL31* was much higher in CD4⁺ T cells from AD patients than those from healthy controls. Importantly, induction of *IL31* gene expression was also cancelled when *EPAS1* gene expression was knocked down in CD4⁺ T cells from AD patients. These results indicate that EPAS1 could be a molecular target for controlling chronic itch associated with AD. On the other hand, we revealed that gastrin-releasing peptide (GRP) is involved in the spinal transmission of IL-31-induced itch. Thus, we also obtained several important findings regarding the mechanism of production and sensing of IL-31.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 10 件)

1. Yamamura K, Uruno T, Shiraishi A, Tanaka Y, Ushijima M, Nakahara T, Watanabe M, Kido-Nakahara M, Tsuge I, Furue M, Fukui Y. The transcription factor EPAS1 links DOCK8 deficiency to atopic skin inflammation via IL-31 induction. **Nature Commun.** 2017, 8:13946.
2. Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, Galus R, Etoh T, Mihara R, Yoshida H, Stewart J, Kabashima K. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. **N Engl J Med.** 2017, 376:826-835.
3. Uryu M, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Chiba T, Furue M. Epidermal p16INK4a expression is more frequently and intensely upregulated in lichen planus than in eczema, psoriasis, drug eruption and graft-versus-host disease. **J Dermatol.** 2017, 44:343-344.

4. Reich A, Chatzigeorgkidis E, Zeidler C, Osada N, Furue M, Takamori K, Ebata T, Augustin M, Szepietowski JC, Ständer S. Tailoring the Cut-off Values of the Visual Analogue Scale and Numeric Rating Scale in Itch Assessment. **Acta Derm Venereol.** 2017, in press.
5. Furue M, Chiba T, Tsuji G, Ulzii D, Kido-Nakahara M, Nakahara T, Kadono T. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. **Allergol Int.** 2017, in press
6. Andoh T, Harada A, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ released from keratinocytes in itch-associated response induced by interleukin-31 in mice. **Acta Dermato-Venereologica.** 2017, in press.
7. Kido-Nakahara M, Furue M, Ulzii D, Nakahara T. Itch in Atopic Dermatitis. **Immunol Allergy Clin North Am.** 2017, 37:113-122.
8. Esaki H, Takeuchi S, Furusyo N, Yamamura K, Hayashida S, Tsuji G, Takemura M, Hayashi J, Furue M. Levels of immunoglobulin E specific to the major food allergen and chemokine (C-C motif) ligand (CCL)17/thymus and activation regulated chemokine and CCL22/macrophage-derived chemokine in infantile atopic dermatitis on Ishigaki Island. **J Dermatol.** 2016, 43:1278-1282.
9. Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, Mitoma C, Furue M. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. **J Dermatol Sci.** 2017, 85:36-43.
10. Chiba T, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Yokomizo T, Uchi H, Furue M. The leukotriene B₄ receptor BLT2 protects barrier function via actin polymerization with phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 in human keratinocytes. **Exp Dermatol.** 2016, 25:532-536.
11. 中原剛士, 森本宏, 村上尚史, 古江増隆. アトピー性皮膚炎治療におけるタクロリムスの新たな役割—最近の話題— 西日本皮膚科 2016, 78:468-474.
12. 中原剛士, 古江増隆. 思春期・成人期アトピー性皮膚炎. 日本臨床(別冊), 日本臨床社 2016, 108-13
13. Andoh T, Harada A, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B₄ released from keratinocytes in itch-associated response induced by interleukin-31 in mice. **Acta Dermato-Venereologica.** 2017, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 免疫システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構, 口頭, 福井宣規, 細胞生物学会シンポジウム, 2016/6/16, 国内.
2. 生体防御システムにおける DOCK ファミリー分子の機能とその制御機構, 口頭, 福井宣規, 生体防御学会シンポジウム, 2016/7/8, 国内.
3. アレルギー性皮膚炎による搔痒と創薬ターゲット, 口頭, 安東嗣修, 生体機能と創薬シンポジウム 2016, 2016/8/25, 仙台, 国内.
4. In vivo パッチクランプ法を用いた中枢へのアトピー性皮膚炎による痒み情報伝達のメカニズムの解明, 口頭, 歌 大介, 安東嗣修, 井本敬二, 古江秀昌, 第 67 回日本薬理学会北部会,

2016/9/30, 札幌, 国内.

5. 外用ステロイド忌避と疾患重症度は、アトピー性皮膚炎におけるかゆみの知覚に影響する, 口頭, 竹内聡, 大場純奈, 江崎仁一, 古江増隆, 第 26 回国際痒みシンポジウム. 2016/10/8, 国内.
6. Analysis of itch-related responses evoked by cutaneous interleukin-31 administration in mice, 口頭, Daisuke Uta, Yuki Magoshi, Yasushi Kuraishi, Tsugunobu Andoh, The 26th International Symposium of Itch, 2016/10/8, Tokyo, 国内.
7. アトピー性皮膚炎患者のかゆみの感じ方—潜在的外用ステロイド忌避及び重症度との関連からの解析, 口頭, 竹内聡, 大場純奈, 江崎仁一, 古江増隆 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学. 2016/11/5, 国内.
8. Interleukin-31 による痒み反応発生への脊髄伝達機構に関する解析, 口頭, 間越祐貴, 歌大介, 安東嗣修, 第 128 回日本薬学会北陸支部例会, 2016/11/27, 金沢, 国内. (優秀発表賞受賞)
9. Immune regulatory functions of DOCK8 in health and diseases, 口頭, Fukui Y, 11th International Symposium of The Institute Network “Frontiers in Biomedical Sciences”, 2017/1/27, 国内.
10. 脊髄後角における interleukin-31 による痒み情報伝達機構に関する解析, 口頭, 間越祐貴, 歌大介, 安東嗣修, 生理学研究所痛み研究会 2016, 2017/1/31, 岡崎, 国内.
11. アトピー性皮膚炎の病態と治療、新規治療法も含めて, 口頭, 中原剛士 古江増隆, 第 25 回九州アレルギー講習会, 2017/2/17, 国内.
12. IgE とアトピー性皮膚炎, 口頭, 中原剛士 古江増隆 第 80 回日本皮膚科学会東京支部総会 IgE 報告 50 周年記念シンポジウム 2017/2/12/, 国内.
13. アトピー性皮膚炎の本質に迫る, 口頭, 中原剛士 古江増隆, 第 20 回記念日本獣医皮膚科学会学術大会・総会 2017/3/12, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アトピー性皮膚炎発症に関わる痒み物質の産生に重要なタンパク質を発見—新しい痒み治療薬の開発に期待—, 福井宣規, プレス発表, 2017/1/10, 国内.
2. アトピー性皮膚炎 中原剛士, 古江増隆, 第 23 回アレルギー週間記念講演会, 2017/2/17, 国内
3. 皮膚における痒みの発生機序, 口頭, 安東嗣修, 池田模範堂株式会社講演会, 2016/9/2, 富山, 国内.

(4) 特許出願

公開を希望するものはない。