

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) 免疫アレルギー疾患等実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Allergic Diseases and Immunology
- 研究開発課題名： (日本語) 表皮を標的としたアトピー性皮膚炎の治療の最適化を目指す新規薬剤の開発
(英語) Drug discovery for atopic dermatitis by targeting epidermis
- 研究開発担当者 (日本語) 京都大学・医学研究科・教授 梶島健治
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Professor, Kenji Kabashima
- 実施期間： 平成26年4月1日～平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 候補化合物のアトピー性皮膚炎への効果のin vivoでの検証
- 開発課題名： (英語) Evaluate the effect of possible candidates on cutaneous immune responses
- 研究開発分担者 (日本語) 京都大学医学研究科皮膚科学 教授 梶島健治
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Professor, Kenji Kabashima
- 分担研究 (日本語) 皮膚バリアのプロテオミクスを用いた評価
- 開発課題名： (英語) Evaluation of skin barrier by proteomics
- 研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 医学部 皮膚科学講座 教授 戸倉新樹
所属 役職 氏名： (英語) Hamamatsu Medical School, Professor, Yoshiki Tokura
- 分担研究 (日本語) 喘息・アレルギーマーチに関する研究
開発課題名： (英語) Analysis on asthma and allergic march

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 呼吸管理睡眠制御学講座 准教授 小賀徹
所属 役職 氏名: (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Associate Professor, Tohru Oga

分担研究 (日本語) アトピー性皮膚炎動物モデルを用いた表皮由来かゆみ因子の探索
開発課題名: (英語) Search for itch mediator using atopic dermatitis models

研究開発分担者 (日本語) 富山大学大学院医学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) Toyama University, Associate Professor, Tsugunobu Andoh

分担研究 (日本語) プロテアーゼ活性により表皮で誘導される分子の網羅的探索
開発課題名: (英語) Evaluation of the effect of proteases on the skin

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 講師 大日輝記
所属 役職 氏名: (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Associate Professor, Teruki Dainichi

分担研究 (日本語) IgE の生体内誘導メカニズムの解明
開発課題名: (英語) Mechanism how to induce IgE

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 講師 鬼頭昭彦
所属 役職 氏名: (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Associate Professor, Akihiko Kitoh

分担研究 (日本語) 末梢神経の可視化と表皮及び免疫細胞との構造的評価と起痒因子阻害化合物、神経成長因子阻害化合物のスクリーニング
開発課題名: (英語) Analysis the relation between epidermis/immune cells and peripheral nerves

研究開発分担者 (日本語) 京都大学医学部皮膚科学 准教授 大塚篤司
所属 役職 氏名: (英語) Kyoto University, Faculty of Medicine, Associate Professor, Atsushi Otsuka

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

皮膚、特に表皮は外界に面する生体防御の最前線であり、水分の喪失や外来異物による物理化学的な刺激からの防御といったバリア機能を有する。表皮は、外層から角層、顆粒層、有棘層、基底層の4層に分類され、基底層を形成する基底層細胞が外層に向かって分裂・分化し、最終的に垢としての脱落を繰り返す(ターンオーバー)ことでバリア機能は正常に維持されて

いる。アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis; AD）は慢性的な痒みを伴う炎症性皮膚疾患であり、多くの患者で皮膚の乾燥とバリア機能の破綻が認められる。2006年に、表皮角化細胞に発現するフィラグリン遺伝子の変異とAD有病率に相関関係があることが報告され、以来、フィラグリンはバリア機能とADの発症にかかわる重要因子として注目を浴びている。

興味深いことに、フィラグリン遺伝子変異を有さないAD患者でもフィラグリンやNMF量が減少していることが報告されており、多くのAD患者の病態にフィラグリンは関与していると考えられる。Howell等は培養表皮細胞におけるフィラグリンの発現がTh2サイトカインであるIL-4とIL-13存在下で減少することを報告した⁴⁾。これらの知見から、AD皮膚ではTh2サイトカインが表皮細胞に作用し、結果、フィラグリンやその分解産物であるNMF産生を低下させていると考えられている。

多くのサイトカインは、細胞表面のサイトカイン受容体に結合し下流のJAK-STAT経路の活性化を介してその生理作用を発現させる。サイトカインシグナルを阻害するJAK阻害薬は強力な抗炎症作用を示し、関節リウマチをはじめとする免疫・炎症性疾患の新薬として期待されている。一方で、これまでJAK阻害薬の表皮に対する作用は検討されておらず、バリア機能への効果は不明である。

我々は、表皮角化細胞におけるバリア機能亢進と免疫制御化合物の*in vitro*での探索し、JAK阻害薬を候補化合物として見出した。そして、表皮角化細胞のフィラグリン産生および皮膚バリア機能に対する新規JAK阻害薬（JTE-052）の効果について検討を行った。3次元培養角化細胞を用いた検討の結果、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-13（IL-4/IL-13）は、フィラグリンを含む表皮分化関連遺伝子の発現を低下させることが明らかとなった。JTE-052を添加することによって、これら遺伝子発現の低下は改善された。さらに、ウエスタンブロッティング法を用いた検討から、JTE-052はTh2サイトカイン添加により低下したプロフィラグリンタンパクおよびフィラグリン単体の産生を促進することが明らかとなった。これらの結果から、JTE-052はTh2サイトカインによって抑制される表皮分化を改善させ、フィラグリンタンパクの産生を促進することが示された。

次に動物ADモデルを用いてJTE-052の生体での作用についての検討を行ったところ、JTE-052塗布により、マウスAD様皮膚炎は改善した。ラマン分光光度計を用いて同マウスの表皮NMF量を解析したところ、JTE-052塗布群では皮膚炎発症群と比較してNMFの回復が認められ、バリア機能の改善も認められた。さらにJTE-052の経皮投与は、免疫不全マウスに移植したヒト皮膚組織に対してもフィラグリン産生を促進することが示された。これらの結果から、JTE-052は表皮角化細胞に作用し、AD患者での低下した皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。

経皮感作による他臓器へのアレルギーの進展として知られるアレルギーマーチの概念の検証と、その治療への応用を図った。我々はダニ抗原による経皮感作が気道アレルギーの発症に関与している事を見出し、アレルギーマーチの概念の検証に成功した。さらに、皮膚のpHを弱酸性に保つ事により、皮膚のプロテアーゼ活性を抑制させ、皮膚炎を制御することが可能であること、そして気道アレルギーの発症をも制御できる事を見出した。

現在臨床においてもアトピー性皮膚炎におけるJTE-052の効果の検討は、Phase IIの臨床試験が終了したところである。

英文

The presence of congenitally impaired skin barrier followed by atopic dermatitis (AD) is an initial step in the atopic march. The maintenance of acidic pH in the stratum corneum (SC) has been suggested as a therapeutic or preventive strategy for barrier impairment caused by skin inflammation. To determine whether an AD murine model, flaky tail mice, with inherited filaggrin deficiency could develop airway inflammation by repeated topical application followed by nasal inhalation of house dust mite (HDM) antigen (defined as a novel "atopic march animal model"), and whether maintenance of an acidic SC environment by continuous application of acidic cream could interrupt the following atopic march. During the course of HDM treatment, acidic cream (pH2.8) or neutral cream (pH7.4) was applied to flaky tail mice twice daily. Repeated applications and inhalations of HDM to flaky tail mice induced AD skin lesions followed by respiratory allergies. Maintenance of SC acidity inhibited the occurrence of respiratory allergic inflammation as well as AD-like skin lesions. Collectively, a novel atopic march model could be developed by repeated epicutaneous and nasal applications of HDM to flaky tail mice, and that the acidification of SC could prevent the atopic march from AD to respiratory allergy.

Barrier disruption and the resulting continuous exposure to allergens are presumed to be responsible for the development of atopic dermatitis (AD). However, the mechanism through which skin barrier function is disrupted in patients with AD remains unclear.

Taking into account the fact that the TH2 milieu impairs keratinocyte terminal differentiation, we sought to clarify our hypothesis that the Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway plays a critical role in skin barrier function and can be a therapeutic target for AD.

We analyzed the mechanism of keratinocyte differentiation using a microarray and small interfering RNA targeting STATs. We studied the effect of the JAK inhibitor JTE-052 on keratinocyte differentiation using the human skin equivalent model and normal human epidermal keratinocytes. We applied topical JAK inhibitor onto NC/Nga mice, dry skin model mice, and human skin grafted to immunocompromised mice.

IL-4 and IL-13 downregulated genes involved in keratinocyte differentiation. STAT3 and STAT6 are involved in keratinocyte differentiation and chemokine production by keratinocytes, respectively. Topical application of the JAK inhibitor suppressed STAT3 activation and improved skin barrier function, permitting increases in levels of terminal differentiation proteins, such as filaggrin, and natural moisturizing factors in models of AD and dry skin and in human skin.

STAT3 signaling is a key element that regulates keratinocyte differentiation. The JAK inhibitor can be a new therapeutic tool for the treatment of disrupted barrier function in patients with AD.

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 0 件、国際誌 17 件）

1. Yasuda T, Fukada T, Nishida K, Nakayama M, Matsuda M, Miura I, Dainichi T, Fukuda S, Kabashima K, Nakaoka S, Bin BH, Kubo M, Ohno H, Hasegawa T, Ohara O, Koseki H, Wakana S, Yoshida H. 2016. Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis. *J Clin Invest* 126: 2064-76
2. Saito K, Kitoh A, Hanakawa S, Nomura T, Miyachi Y, Kabashima K. 2016. Percutaneous exposure to high-dose hapten induces systemic immunosuppression through the inhibition of dendritic cell migration. *J Dermatol Sci* 81: 136-40
3. Saeki H, Nakahara T, Tanaka A, Kabashima K, Sugaya M, Murota H, Ebihara T, Kataoka Y, Aihara M, Etoh T, Katoh N, Committee for Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis of Japanese Dermatological A. 2016. Clinical Practice Guidelines for the Management of Atopic Dermatitis 2016. *J Dermatol* 43: 1117-45
4. Otsuka A, Nonomura Y, Kabashima K. 2016. Roles of basophils and mast cells in cutaneous inflammation. *Semin Immunopathol* 38: 563-70
5. Nomura T, Kabashima K. 2016. Advances in atopic dermatitis in 2015. *J Allergy Clin Immunol* 138: 1548-55
6. Nemoto O, Furue M, Nakagawa H, Shiramoto M, Hanada R, Matsuki S, Imayama S, Kato M, Hasebe I, Taira K, Yamamoto M, Mihara R, Kabashima K, Ruzicka T, Hanifin J, Kumagai Y. 2016. The first trial of CIM331, a humanized antihuman interleukin-31 receptor A antibody, in healthy volunteers and patients with atopic dermatitis to evaluate safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Dermatol* 174: 296-304
7. Kuroda E, Ozasa K, Temizoz B, Ohata K, Koo CX, Kanuma T, Kusakabe T, Kobari S, Horie M, Morimoto Y, Nakajima S, Kabashima K, Ziegler SF, Iwakura Y, Ise W, Kurosaki T, Nagatake T, Kunisawa J, Takemura N, Uematsu S, Hayashi M, Aoshi T, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ. 2016. Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1alpha Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation. *Immunity* 45: 1299-310
8. Honda T, Otsuka A, Kabashima K. 2016. Novel insights into cutaneous immune systems revealed by in vivo imaging. *Allergol Int* 65: 228-34
9. Honda T, Kabashima K. 2016. Novel concept of iSALT (inducible skin-associated lymphoid tissue) in the elicitation of allergic contact dermatitis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 92: 20-8
10. Egawa G, Kabashima K. 2016. In Vivo Imaging of Cutaneous DCs in Mice. *Methods Mol Biol* 1423: 269-74
11. Egawa G, Kabashima K. 2016. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 138: 350-8 e1
12. Amano W, Nakajima S, Yamamoto Y, Tanimoto A, Matsushita M, Miyachi Y, Kabashima K. 2016. JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by downmodulating T cell activation and differentiation. *J Dermatol Sci* 84: 258-65
13. Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, Galus R, Etoh T, Mihara R,

- Yoshida H, Stewart J, Kabashima K, Group XS. 2017. Anti-Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 376: 826-35
14. Rerknimitr P, Tanizaki H, Yamamoto Y, Amano W, Nakajima S, Nakashima C, Nonomura Y, Wititsuwannakul J, Miyachi Y, Otsuka A, Kabashima K. 2017. Decreased Filaggrin Level May Lead to Sweat Duct Obstruction in Filaggrin Mutant Mice. *J Invest Dermatol* 137: 248-51
15. Lee HJ, Lee NR, Kim BK, Jung M, Kim DH, Moniaga CS, Kabashima K, Choi EH. 2017. Acidification of stratum corneum prevents the progression from atopic dermatitis to respiratory allergy. *Exp Dermatol* 26: 66-72
16. Egawa G, Kabashima K. 2017. Visualization of the T Cell Response in Contact Hypersensitivity. *Methods Mol Biol* 1559: 53-62
17. Brunner PM, Silverberg JI, Guttman-Yassky E, Paller AS, Kabashima K, Amagai M, Luger TA, Deleuran M, Werfel T, Eyerich K, Stingl G, Councilors of the International Eczema C. 2017. Increasing Comorbidities Suggest that Atopic Dermatitis Is a Systemic Disorder. *J Invest Dermatol* 137: 18-25

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

- 1, 免疫反応の可視化, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 第 60 回 日本リウマチ学会総会・学術集会, 横浜, 平成 28 年 4 月 21 日, 国内
- 2, Recent advances in the pathogenesis and treatment of atopic dermatitis, Kenji Kabashima, Kyoto University Graduate School of Medicine Department of Dermatology, International Eczema Council at the SID meeting May 12.2016, 国外
- 3, Cutaneous immune responses to external antigen, Kenji Kabashima, Kyoto University Graduate School of Medicine Department of Dermatology, AAI meeting in Seattle, May 16.2016, 国外
- 4, 皮膚免疫と表皮バリアのクロストーク, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 日本皮膚科学会総会イブニングセミナー, 京都, 平成 28 年 6 月 4 日, 国内
- 5, アトピー性皮膚炎の原因を探る, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 日本皮膚科学会総会京都モーニングセミナー, 京都, 平成 28 年 6 月 4 日, 国内
- 6, アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン発現異常と創薬, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 第 65 回 日本アレルギー学会, 東京, 平成 28 年 6 月 17 日, 国内
- 7, アトピー性皮膚炎の発症機序に基づく治療戦略, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 第 37 回 日本炎症・再生医学会, 京都, 平成 28 年 6 月 17 日, 国内
- 8, アレルギー疾患 update 「皮膚アレルギーにおけるサイトカインの役割」, 梶島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 日本アレルギー学会 総会, 東京, 平成 28 年 6 月 18 日, 国内
- 9, Live imaging of skin immune responses, Kenji Kabashima, Kyoto University Graduate School of Medicine Department of Dermatology, IgE and Allergy: 50 Years and Onward FASEB Meeting, West Perm Beach, Florida, USA, July 24-29th, 2016, 国外
- 10, アトピー性皮膚炎の病態から考えた治療戦略, Kenji Kabashima, Kyoto University, Graduate School of Medicine Department of Dermatology, 第 137 回 日本薬学会, 仙台 2017 年 3 月 26 日, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

- 1, 皮膚アレルギーの魅力, 椛島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 160531 清風南海高校の学生へのレクチャレクチャー, 京都大学, 国内
- 2, 皮膚と健康, 椛島健治, 京都大学医学研究科皮膚科学, 清交社 203 回 健康懇話会, 大阪, 平成 29 年 1 月 31 日, 国内

(4) 特許出願

出願番号	公開番号	出願人 (特許権者)	発明の名称	出願日
2013-092378		日本たばこ産業株式会社、 <u>椛島健治</u>	皮膚バリア機能改善剤	2013 年 4 月 25 日
2007-330025	5297389	国立大学法人富山大学、 <u>安東嗣修</u> ら	アレルギー性疾患のバイオマーカーおよびその利用	2007 年 12 月 19 日