

アトピー性皮膚炎 (AD) モデルマウス (NC/Nga) を用いた同種骨髄移植に基づく病態解析と治療法の検討

木村英嗣 辰巳陽一 宮里 肇 山田秀和 金丸昭久

近畿大学医学部第3内科学教室 *近畿大学医学部奈良病院皮膚科

抄 録

アトピー性皮膚炎(AD)は難治性の慢性皮膚疾患であり、病因として各種抗原に対する免疫系が関与することが知られているが、その詳細には不明な点が多く、特に重症例に対しては明確な治療指針はない。我々はADの病因の一翼が骨髄幹細胞レベルで担われており、骨髄幹細胞移植により病態の改善が認められるのではないかと考え、AD発症(AD⁺)及びAD未発症(AD⁻) NC/NgaマウスとBALB/cマウスをはじめとする各種マウス間で相互に骨髄移植を行い、AD発症メカニズムについて検討を加えた。その結果、AD⁻ NC/Nga → BALB/c及びAD⁻ NC/Nga → C57BL/6の系ではAD様皮膚炎が発症したが、BALB/c → AD⁺ NC/Ngaでは病変の著明な改善を認めた。この結果、血清IgEレベルがAD⁺ NC/Nga → BALB/cにおいて高値を示しBALB/c → AD⁺ NC/Ngaでは低下すると言う事実やRT-PCR法によるサイトカイン発現の検討でAD⁺ NC/Ngaマウスに認められたIL-4, IL-5, IL-18の高発言がBALB/c → AD⁺ NC/Ngaでは改善するという事実からも支持されるように、NC/NgaマウスではADの発症が骨髄幹細胞レベルで制御されていることを示すと考えられ、今後骨髄幹細胞移植は重症ADに対して治療の選択肢となり得ると考えられた。

Key words: NC/Nga, atopic dermatitis, bone marrow transplantation, IL-18, Th1/Th2

緒 言

アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis: AD)はしばしば喘息やアレルギー性鼻炎に合併し湿疹病変を生じるアレルギー性皮膚疾患である。ADの病態には、Th2系のサイトカインであるIL-4, IL-5, IL-13などが主役を演じており、リンパ球, 好酸球, 肥満細胞, ケラチノサイトなどの関与が重要であると考えられている¹。しかし、現在のところADの組織学的, 免疫学的に明確な定義は確立されているとは言い難い。一方、臨床的な治療方針についても除去食療法などの抗原回避療法¹, 抗ヒスタミン薬(H1ブロッカー)¹, 抗アレルギー薬¹, ステロイド薬¹, FK506などの免疫抑制薬^{2,3}, 紫外線療法(主にPUVA療法)⁴, INF- γ ¹, 最近では柿の葉抽出物⁵など多くが治療法として試みられているが、特に重症ADに対し明確な効果が期待できる治療法は今のところないのが現状である。

我々は、急性白血病患者の治療に同種骨髄幹細胞

移植(Allo-BMT)を施行した際、ADを有するドナーからの移植後、レシピエントにADを発症した症例を2例経験した。また、文献的にもAD⁶⁻⁸をはじめ気管支喘息患者^{9,10}, NIDDM⁹のドナーからの移植例などで同様の報告が認められる。この事実はADが造血幹細胞レベルで規定されている事を示唆するものと考えられるが、今までこれを実験的に証明した報告は認められない。AD以外の良性疾患に対する骨髄移植モデルとして多くの自己免疫疾患モデルマウスに対する造血幹細胞移植の効果が報告されているが¹¹⁻¹⁴, AD研究においては、AD自然発症マウスが存在しなかったためにADの骨髄移植による病態解析, 治療モデルの検討などは困難であった。しかし、近年AD自然発症マウスNC/Ngaが松田らによって報告され、その遺伝的, 免疫学的解析, 臨床的解析がなされるようになってきた¹⁵⁻²²。

NC/Ngaマウスは日本に生息するニシキネズミから樹立された近交系マウスである。このマウスは系統が確立された当初から顔面, 頭部, 耳介部にか

けてびらん、皮膚炎を発症することが知られていたが、本格的な病態やその発症機序について明らかではなかった。その後、松田らにより、このマウスは SPF 環境下では皮膚炎を発症しないが、conventional 環境下では生後約 4 週から血清 IgE 高値を示すようになり、生後約 7 週から AD に酷似した皮膚炎を自然発症することが明らかになった¹⁵⁻²²。さらに同グループにより皮膚炎発症例では、血清 IgE が症状増悪に比例して上昇し、病変部に表皮の過形成、マスト細胞と好酸球およびリンパ球の浸潤と活性化など AD と酷似する所見を認める事が明らかにされるに至り、NC/Nga マウスはアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして注目されるようになってきた¹⁵⁻²²。前述したヒト BMT 例や NC/Nga マウスが遺伝的に AD を発症するという事実から、我々は AD の病因の 1 つが骨髄幹細胞あるいはそれに由来する免疫担当細胞のレベルで規定されており、骨髄幹細胞移植により AD 治療が可能ではないかと考え、NC/Nga マウスを用いた骨髄移植実験を行いこれらの点について検討を加えるとともに、骨髄幹細胞移植後発症した AD 様皮膚炎の病態について検討した。

材料と方法

動物

NC/Nga マウスは東京農工大学農学部松田浩珍教授から供与された 7 週齢の雄マウスを使用した。BALB/c 雄マウス (日本エスエルシー株式会社)、C57BL/6J 雄マウス (日本クレア株式会社)、C3H/HeJ 雄マウス (日本クレア株式会社) は各 7 週齢を購入した。これらのマウスの飼育は一定の温度 (23 ± 1.0°C)、湿度 (50 ± 5%)、光 (12 時間周期) の条件で行い、飼料は日本クレア株式会社から購入した固形飼料 CL-2 を用い、飲料水は水道水を用いた。飼料及び水は自由摂取とした。SPF マウスはクリーンラック (CL-5413 CLEA Japan, INC) 内にアイソレーターを各ケージに用い飼育し、conventional マウスはクリーンラック外でアイソレーター無しで飼育した。移植後マウスは基本的に移植直後はクリーンラック内でアイソレーターを使用して飼育し、2 週目以後はクリーンラック外でアイソレーター無しで飼育した。また感染の影響を考慮する目的で BALB/c → BALB/c, BALB/c → NC/Nga の組み合わせの移植マウスでも、皮膚炎および他の感染症が無いことを確認した。またアトピー非発症 NC/Nga マウス (AD⁻ NC/Nga) は 4 ~ 6 週齢の SPF 環境下で飼育したマウスを、アトピー発症 NC/Nga マウス (AD⁺ NC/Nga) は conventional 環境下で飼

育したマウスのうち皮膚炎を発症した 7 ~ 30 週齢のマウスを選択して使用した。

皮膚臨床所見の評価

NC/Nga マウスの顔面、頸部、背部には AD の典型的臨床所見である湿疹形成、痂皮、皮膚乾燥、肥厚が確認される。NC/Nga マウス及び BMT マウスの皮膚臨床所見を、ヒトの AD の臨床症状の評価基準に基づき 1) そう痒症, 2) 発赤・出血, 3) 浮腫, 4) 擦過創・組織欠損, 5) 痂皮形成・乾燥の 5 項目について無症状, 軽度, 中等度, 重度の 4 段階に分類しそれぞれを 0 ~ 3 点として評価し, その合計を皮膚臨床重症度とした^{22,24}。

骨髄移植

アルコール消毒したドナーマウスの皮膚を除去し、大腿骨及び脛骨を分離し、それぞれの骨端部を切除したのち骨髄腔に 24 ゲージ注射針を挿入し清潔な PBS を注入して無菌的に骨髄を採取した。採取したチューブ状の骨髄はホモジナイズの後、清潔な金属メッシュとナイロンメッシュで濾過し骨片や結合組織の除去を行った。採取後は trypan blue stain (GIBCO BRL, NY, USA) にて細胞数と生存率の計測を行い、生存率 98% 以上の骨髄液を使用した。事前に放射線照射の線量を 11 Gy, 10 Gy, 9 Gy の組合せを各種マウスに施行し 11/10 Gy が致死線量であることを確認した上で、採取した骨髄液を RPMI1640 にて 1 匹あたり 1.5×10^7 個/200 μ l に調節し、11 Gy の放射線照射を受けたレシピエントマウスの尾静脈あるいは眼底静脈から注入した。GVHD の影響を検討するため、AD⁻ NC/Nga → BALB/c, AD⁻ NC/Nga → C57BL/6, AD⁻ NC/Nga → C3H/HeJ, BALB/c → AD⁺ NC/Nga, C57BL/6 → AD⁺ NC/Nga, C3H/HeJ → AD⁺ NC/Nga, AD⁻ NC/Nga → AD⁻ NC/Nga, BALB/c → BALB/c, C57BL/6 → C57BL/6, C3H/HeJ → C3H/HeJ の相互間で骨髄移植実験を行った。移植骨髄の生着は移植マウス末梢血リンパ球を antimouse H-2D^d, anti-mouse H-2K^b/H-2D^b 抗体 (PharMingen, San Diego, USA) を用いて染色し、FACSCallibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA) を用いて解析し、レシピエントのハプロタイプ以外の MHC が存在することを確認した。データ取込みと解析は添付ソフトの CELLQuest Ver. 3.0.1 を用いた。

組織学的検討 (皮膚)

移植後 2 週, 4 週, 6 週のマウス各 10 匹からの標

本を実験に使用した。バリカンにて除毛の後、代表的な AD 発症部である耳介、頸部から後背部を採取、ホルマリン固定標本を作成し HE 染色を行い検鏡した。一部はコンゴレッド、レルイジンプルーにより染色し検鏡を行った。

ELISA (血清 IgE) 測定

ELISA plate (Corning, NY, USA) に Purified anti-mouse IgE (R35-72, PhaMingen) 2 μ g/ml を 50 μ l/well 加え室温にて 6 時間コーティングし PBS/Tween-20 添加 PBS で 3 回洗浄した。

PBS3%BSA を 100 μ l/well 加え 2 時間ブロッキングを行い PBS/Tween-20 添加 PBS で 3 回洗浄した。マウス血清または陽性対象のマウス IgE (PhaMingen) を加え 4°C で一晩反応させ、PBS/Tween-20 添加 PBS で 4 回洗浄し、2 次抗体として horseradish peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Amersham, LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, UK) を 2 μ g/ml に希釈し 100 μ l/well で添加の後、45 分室温で反応させ PBS/Tween-20 添加 PBS で 4 回洗浄した。Peroxidase Substrate Kit (BIORAD, CA, USA) を 100 μ l/well 添加し青緑色に発色後、2% 蔞酸溶液 100 μ l を加え反応を停止し 415 nm の OD を測定した。

Semi-Quantitative RT-PCR 法によるサイトカイン定量

Th2 細胞の対照としての EL-4 細胞と、各系統のマウス脾細胞 5 \times 10⁶/ml を無刺激あるいは PMA 10 μ g/ μ l, ionomycin 0.5 μ g/ml を添付した 10% FCS 加 RPMI1640 中で 48 時間及び 72 時間培養し、ISOGEN-LS (ニッポンジーン, 富山) を用いて RNA を抽出した。RNA は Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解し、260/280 nm における吸光度を基に RNA 濃度を算出した。抽出した RNA 1 μ g を 1M M-MLV reverse transcriptase (GIBCO, BRL, NY, USA) と 2.5 mM oligo d (T) primer (GIBCO) を含有した反応液計 20 μ l で 37°C, 1 時間インキュベートし cDNA を作成した。RT 反応により得られた cDNA 産物と 2.5 U の Taq polymerase (TAKARA SHUZO CO., LTD, Shizuoka, Japan) を使用し GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, NJ, USA) にて PCR 反応を行った。PCR の条件については事前に検討を加え、PCR 産物の輝度が linear phase になるように設定した。PCR 反応は 94°C 30 秒, 54°C 30 秒, 74°C 30 秒で行い、 β -actin, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ は 30 サイクル, IL-18 については 27 サイクルで施行した。使用した各

プライマーの sequence を以下に示す。IL-18 については Gene Fischer software を使用し得られた cDNA 配列のプライマーを BEX (BEX CO., LTD, Tokyo, Japan) から購入した。これ以外のプライマーは Strategene (STRATEGENE, CA, USA) から購入した。マウス IL-4 プライマーは、5'-ACG-GAGATGGATGTGCCAAACGTC, 3'-CGAGTAATCCATTTGCATGATGC, マウス IL-5 プライマーは、5'-GCCATGGAGATCCCCATGAGCACA, 3'-GCCTTCCATTGCCACTCTATAC, マウス IL-18 プライマーは、5'-CAACCGCAGTAATACGGAA, 3'-CATCTTGTTGTGTCTCTGGA, マウス β -Actin プライマーは、5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG, 3'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC, マウス IL-2 プライマーは、5'-GTCAACAGCGCACCCACTTCAAGC, 3'-GCTTGTTGAGATGATGCTTTGACA, マウス INF γ プライマーは、5'-TACTGGCACGGCACAGTCATTGAA, 3'-GCAGCGACTCCTTTCCGCTTCCT である。得られた PCR 産物は ethidium-bromide 添加 1.5% アガロースゲルにて泳動した後、紫外線照射により可視化し、得られたバンドは Lane and spot Analyzer 5.0 (アトー株式会社, 東京) にて輝度を計測し数値化した。

成 績

NC/Nga マウスの自然経過

SPF 環境下, conventional 環境下を問わず, NC/Nga マウスは生後 4 週間後までは皮膚炎, 下痢などの症状は認められない (図 1 a, d)。SPF 環境下においては, NC/Nga マウスは AD を発症せず加齢による皮膚の変化もほとんど認めなかった (図 1 b, c)。一方, conventional 環境下では, 生後約 7 週から搔破行動を開始し, 耳介, 後頭部を中心に AD 皮膚炎を発症し, その症状は週齢とともに増悪した。個体差はあるものの約 30 週頃には耳介, 後頭部の皮疹は更に悪化傾向を示し (以下 AD⁺ NC/Nga マウス) (図 1 e, f), 個体によっては腸炎の合併を認め始めた。AD⁺ NC/Nga マウスでは搔破行動が続くため耳介の創傷は完治せず, AD の重傷度の基準として使用した (図 1 e, f)。

NC/Nga マウスにおける皮膚変化

皮膚 HE 染色による病理所見は, 松田らの報告と同様に AD⁺ NC/Nga マウスでは表皮の肥厚, 皮下組織のリンパ球, 肥満細胞, 好酸球などの炎症細胞浸潤, コラーゲン繊維の肥厚を認め, 週齢に比例して炎症所見の増悪を認め, 約 50 週齢では皮膚組織の

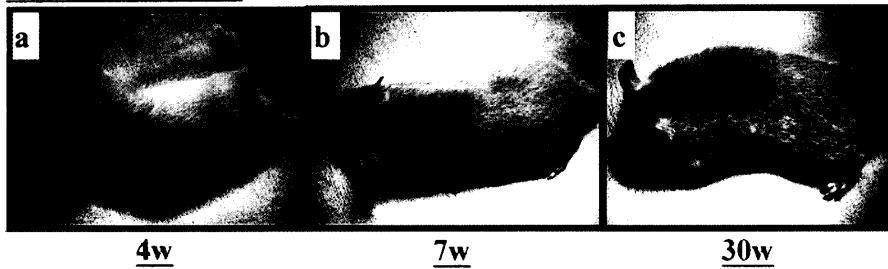
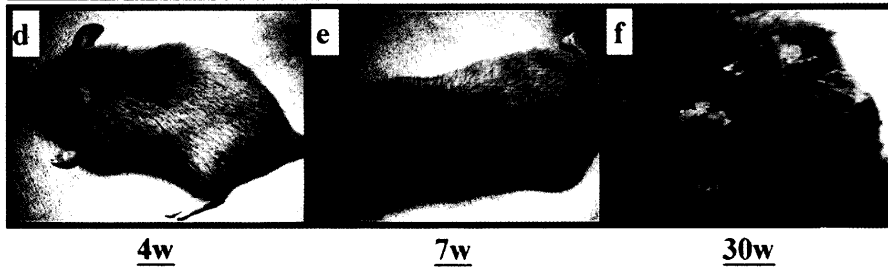
SPF Environment**Conventional Environment**

図1
NC/Nga マウスの皮膚所見と経時的変化。
SPF 環境下 (図1 a, b, c), Conventional 環境下 (図1 d, e, f) で飼育された NC/Nga マウスの 4 週齢 (図1 a, d), 7 週齢 (図1 b, e), 30 週齢 (図1 c, f) 皮膚所見像を示す。矢印 (図1 f) は皮膚炎症部位。

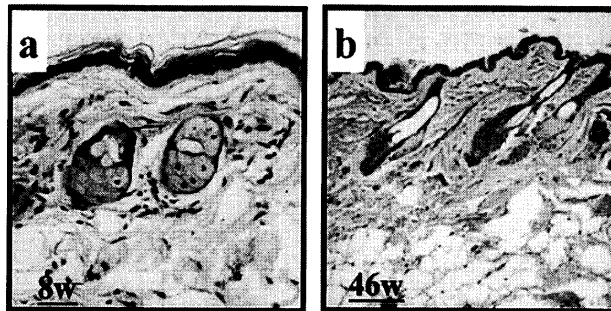
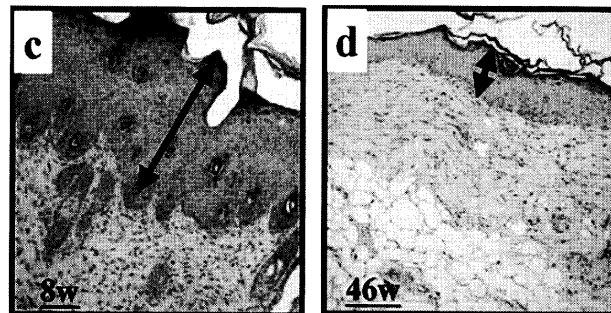
SPF Environment**Conventional Environment**

図2
NC/Nga マウスの皮膚病理所見
SPF 環境下で飼育された NC/Nga マウス (図2 a, b) と conventional 環境下で飼育された NC/Nga マウス (図2 c, d) の 8 週齢 (図2 a, c) と 46 週齢 (図2 b, d) の皮膚組織所見 (HE 染色×100) を示す。矢印 (図2 c, d) は肥厚した表皮を示す。

著しい変化を呈するようになった¹⁸ (図2 c, d)。好酸球, 肥満細胞については, それぞれコンゴレッド染色, トルイジンブルー染色にて組織への浸潤を確認した (data not shown)。一方で, SPF 環境下の AD⁻ NC/Nga マウスでは, 表皮構造は正常マウス本来の 2-3 層を示し皮脂腺等の付属器も保たれており, 明らかな炎症細胞浸潤は 30 週齢, 50 週齢のいずれにおいても認めなかった (図2 a, b)。

AD に対する骨髄幹細胞移植の影響

NC/Nga マウスは, 前述の如く多彩な病型を示

す。そこで我々は, 骨髄由来細胞の AD 発症に対する影響と骨髄幹細胞移植の AD 皮膚炎への治療応用の可能性を検討する目的で, Nc/Nga マウスを用いた骨髄幹細胞移植実験を行った。先に示したように AD⁺ NC/Nga マウスでは, 約 7 週齢以降に AD 様皮膚所見を呈するようになる (図3 a)。BALB/c マウスに NC/Nga マウスの骨髄を移植した系 (NC/Nga → BALB/c) では, ドナーの AD 非発症 (AD⁻ NC/Nga → BALB/c) (図3 b), 発症 (AD⁺ NC/Nga → BALB/c) (図3 c) にかかわらず移植後 4-6 週から, 掻破行動とともに AD 様皮膚炎の

出現を認めた。さらに付け加えると、AD⁻ NC/Nga をドナーとした系では、16匹中7匹に全身に非常に重度の皮膚炎を認め(図3 b)、これらのマウスは最終的にすべて死亡した。生き残った移植マウスは比較的軽度なAD所見を認め、20週齢まで追跡したが皮膚炎にそれ以上の増悪は認めなかった (data not

shown)。また、AD⁻ NC/Nga → C57BL/6Jにおいても8匹中3匹に同様の搔破行動と後頭部から耳介周囲の皮膚炎を認めた (図3 e)。一方で、BALB/cマウスの骨髄をAD⁺ NC/Ngaマウスに移植した系(BALB/c → AD⁺ NC/Nga : 図3 d)では、10例中8例に搔破行動の消失、耳介部の治癒、皮膚炎の改善を認め、C57BL/6J → AD⁺ NC/Ngaマウスにおいても同様の皮膚炎の消失を5例中4例に認めた(図3 f)。また、データは示さないがC3H/HeJを用いた系では、これをドナー、レシピエントのいずれに用いた場合でも著明なAD所見を認めず軽度の皮膚の変化を認めるのみであった。

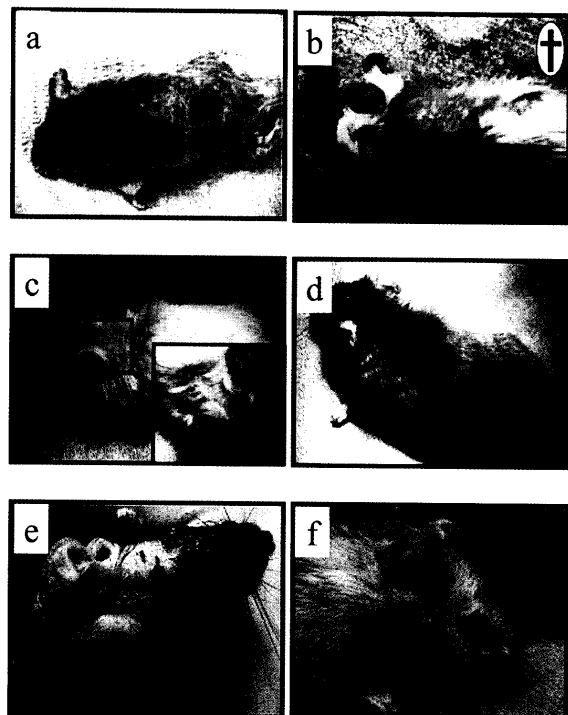


図3 骨髄幹細胞移植後マウスの皮膚所見の変化 AD⁺NC/Nga マウス(図4 a), AD⁻NC/Nga → BALB/c (図4 b), AD⁺NC/Nga → BALB/c (図4 c), BALB/c → AD⁺NC/Nga (図4 d), AD⁻NC/Nga → C57BL/6J (図4 e), C57BL/6J → AD⁺NC/Nga (図4 f) を示す。

皮膚臨床所見の評価

前述のマウス骨髄移植実験の結果を客観的に比較検討する目的で、松田らの方法に従って骨髄移植マウスの皮膚症状を重症度別に数値化した^{23,24} (図4)。その結果重症皮膚炎を発症したAD⁻ NC/Nga → BALB/c (H-2d) マウスは、重傷度13点でAD⁺ NC/Ngaマウスと同等であった。一方、AD⁺ NC/NgaマウスにBALB/cマウスの骨髄を移植したBALB/c → AD⁺ NC/Ngaについては1点であり、明らかに骨髄幹細胞移植の後AD所見の改善を認めた。この現象はNC/NgaマウスとC57BL/6 (H-2b) マウスを用いても同様で、AD⁻ NC/Nga → C57BL/6Jでは5点と高値を示し、C57BL/6J → AD⁺ NC/Ngaでは1点であり骨髄幹細胞移植によりAD症状の改善を認めた。

骨髄幹細胞移植モデルにおける皮膚組織の病理学的検討

骨髄幹細胞移植がADに及ぼす影響を組織学的

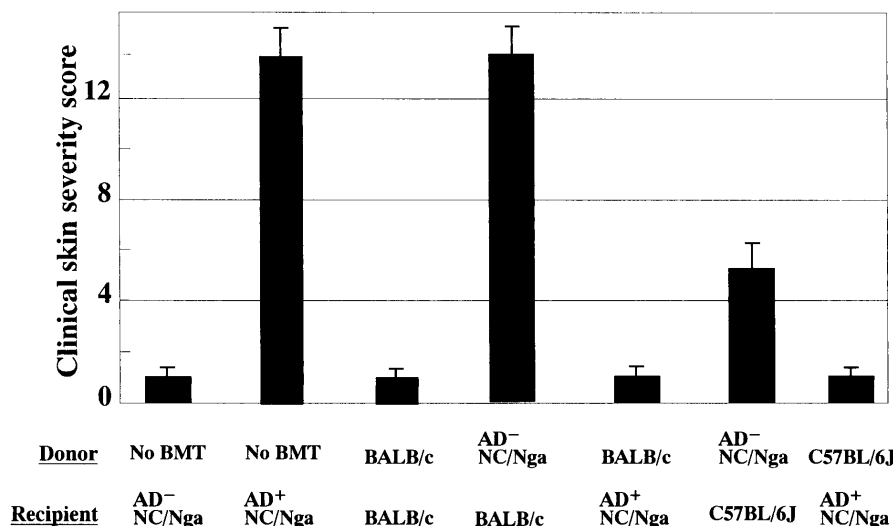


図4 骨髄幹細胞移植後マウスの Clinical Skin Severity Score

に検討する目的で、各移植マウスの皮膚組織を HE 染色し組織構造の変化を AD⁻ NC/Nga → BALB/c, BALB/c → AD⁺ NC/Nga, AD⁻ NC/Nga → C57BL/6, C57BL/6 → AD⁺ NC/Nga について比較検討した。AD⁻ NC/Nga マウスをドナーとした系の皮膚所見では (図 5 a, c), 表皮の著明な肥厚, 皮下組織のリンパ球浸潤, 表皮内潰瘍など AD⁺ NC/Nga マウス同様の皮膚所見を認めた。一方 AD⁺ NC/Nga マウスをレシピエントとした系で

は, BALB/c → AD⁺ NC/Nga, C57BL/6J → AD⁺ NC/Nga のいずれの場合も表皮の著明な肥厚, 皮下組織のリンパ球浸潤など皮膚炎の所見が改善し AD⁻ NC/Nga マウスあるいは BALB/c マウスと同様の皮膚所見を呈した (図 5 b, d)。

骨髓幹細胞移植マウスの末梢血 IgE 濃度

AD のマーカーの一つである血清 IgE 濃度に対する骨髓幹細胞移植の影響を ELISA 法で測定検討した。IgE 高産生群と低産生群の分類は, 松田らに従い 9.0μg/ml をその境界として判定した¹⁶。松田らの結果と同様に AD⁺ NC/Nga マウスでは IgE の高値を認めたが, BALB/c マウス, AD⁻ NC/Nga マウス, C57BL/6 → BALB/c マウス, さらに BALB/c → BALB/c マウス (data not shown) では低値を示した。また, AD⁻ NC/Nga → BALB/c マウスでは, 前述の皮膚所見から予想されたように, AD⁺ NC/Nga マウスと同様の高い血清 IgE 濃度を示した。一方で BALB/c → AD⁺ NC/Nga マウスの血清 IgE 値はレシピエントの AD⁺ NC/Nga マウスの血清 IgE 値と比較して著明に低値を示した。この血清 IgE レベルはコントロールの BALB/c マウスや BALB/c → BALB/c, C57BL/6J → BALB/c とほぼ同等であった (図 6)。

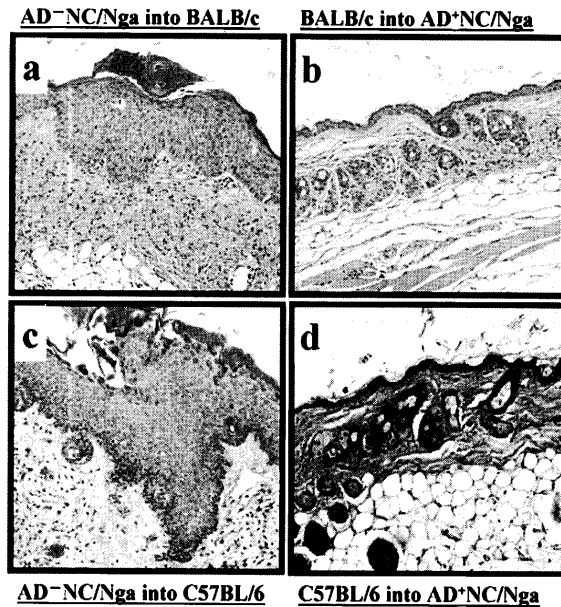


図 5 骨髓幹細胞移植後マウスの皮膚病理所見
移植後 4 週の BMT マウスの皮膚組織所見 (HE 染色×100)。
AD⁻NC/Nga → BALB/c (図 6 a), BALB/c → AD⁺NC/Nga (図 6 b), AD⁻NC/Nga → C57BL/6J (図 6 c), C57BL/6J → AD⁺NC/Nga (図 6 d) を示す。

RT-PCR 法による培養脾細胞のサイトカイン発現解析

松田らによる NC/Nga マウスに関する報告では, AD 発症 NC/Nga マウスでは皮膚組織を用いた免疫染色法および RT/PCR 実験により, IL-4, IL-5 産生能の亢進と INFγ の低下を認め, Th2 への分化亢進が強く示唆されている¹⁵⁻²²。一方で, 血清 IgE

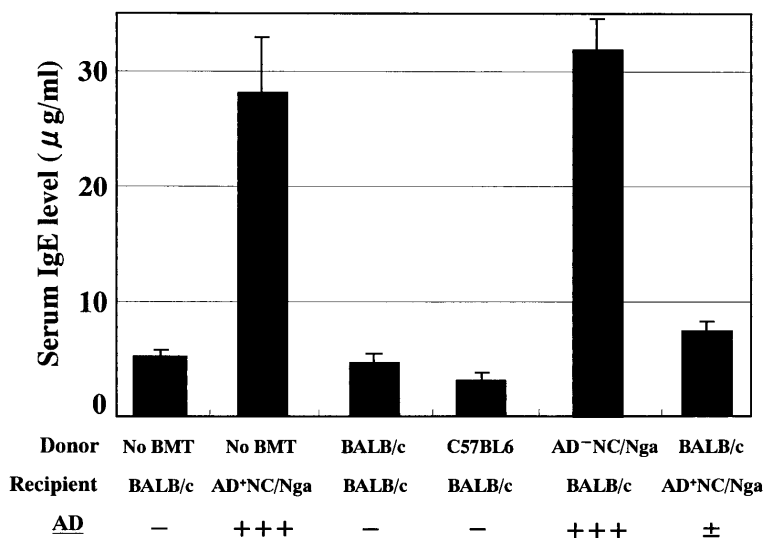


図 6 骨髓幹細胞移植後マウスの末梢血 IgE 濃度 (ELISA)

の高値, NC/Nga マウス脾細胞の Th2 サイトカイン産生能の亢進の報告が認められ⁵, AD のサイトカインの不均衡は皮膚局所のみならず全身性の病態であるとも考えられる²⁶. また, 最近になって接触性皮膚炎モデルにおいて, IL-4, IL-5 に加え IL-18 の上昇の報告があり, IL-18 が IFN- γ 産生を促すと共に, Th2 サイトカイン産生へと誘導していると言う報告がされている²⁷. そこで我々は NC/Nga マウスおよび骨髓幹細胞移植マウスの脾細胞から total RNA を抽出し IL-2, INF γ , IL-4, IL-5 および IL-18 について semiquantitative RT-PCR を施行した. 得られたバンドは densitometry で測定数値化し骨髓幹細胞移植マウスの Th1/Th2 バランスについて検討した(図 7). その結果, Th2 細胞の対照で

ある EL-4 は IL-4, IL-5 mRNA の強発現を認め, IFN- γ , IL-18 の mRNA レベルは低かった. BALB/c マウス脾細胞では定常的には IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 mRNA の発現は認めなかったが, IL-18 mRNA については低発現ながら明らかに定常的に発現を認めた. また, AD⁺ NC/Nga においては IFN- γ の軽度の発現と, IL-4, IL-5 の発現を認めたが, 特に IL-18 は強発現であった. 一方 BALB/c \rightarrow AD⁺ NC/Nga マウスではレシピエントである AD⁺ NC/Nga マウスと比較して IL-4, IL-5 mRNA の発現はほぼ認められなくなり, IL-18 発現も低下傾向を示した. また予備実験ながら, AD⁺ NC/Nga マウスおよび BALB/c \rightarrow AD⁺ NC/Nga マウスの皮膚組織を用い同様の実験を行なった結果, AD⁺ NC/Nga マウス皮膚組織では松島らと同様に IL-4, IL-5 の発現を認め²¹, BALB/c \rightarrow AD⁺ NC/Nga マウスでは, 組織像での細胞浸潤の状態から予想されたようにいずれのサイトカインの産生も認められなかった (data not shown).

考 察

AD の診断基準としては, 現在世界的に受け入れられている Hanifin & Rajka の診断基準²⁵ や本邦における日本皮膚科学会の診断基準²³ が存在する. どちらにおいても 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, 特徴的な皮膚所見に加え末梢血好酸球増多, IgE の上昇, 特異的 IgE 抗体の出現により診断され, 患者の多くはアトピー性素因をもつと定義されている. アトピー性素因とは気管支喘息, アレルギー鼻炎, 結膜炎, アトピー性皮膚炎や IgE 抗体を生産しやすい遺伝性の素因を意味する. しかし, AD の発症メカニズムや病勢の推移に関しては IgE の産生調節機構, B/T 細胞や抗原提示細胞との相互作用, サイトカイン, 接着因子など免疫アレルギー的な要因やセラミド等バリアー機構, ロイコトリエンやプロスタグランディンなどの化学伝達物質の役割など種々の要因に左右されるため詳細はまだ明らかとなっていない. また AD に対しては, 確定的な治療法はなく, ましてや重篤な症状の AD に対する有効療法は定かではない.

AD 治療のモデルマウスとしては, 以前から接触性皮膚炎モデルであるハプテン反復外用マウス²⁸⁻³⁰, 抗 DNP-IgE 投与マウス³³⁻³⁵ が存在したが前者はハプテンを後者は DNFB の刺激を必要とした. 我々が実験に使用した NC/Nga マウスは 1997 年に松田らが AD モデルとして報告した新種マウスであり, conventional な環境下では生後約 7 週より顔面から頭部耳介部にかけて脱毛, 出血, 痂皮形

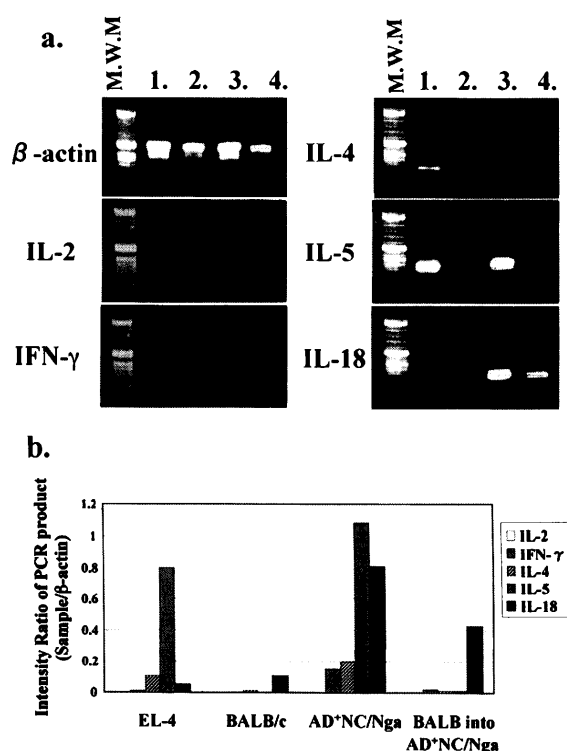


図 7 骨髓幹細胞移植によるマウス脾細胞のサイトカイン量の変化
BALB/c マウス, AD⁺NC/Nga マウス, BALB/c into AD⁺NC/Nga マウスの脾細胞 (1×10^7) を採取し, IL-2, INF γ , IL-4, IL-5, IL-18 mRNA 発現について RT-PCR 法を用いて定量し比較検討した. Th2 細胞のコントロールとしては ionomycin/PMA 刺激後の EL-4 を使用した. 図 8 a は各サイトカイン別の PCR 産物の電気泳動より得られたバンドパターンを示した (レーン 1: EL-4, レーン 2: BALB/c, レーン 3: AD⁺NC/Nga, レーン 4: BALB/c \rightarrow AD⁺NC/Nga). 図 8 b は PCR 産物のバンドの輝度を数値化し, サイトカイン/ β -actin PCR 産物の比を示した.

成を認める病変が多発し、搔破行動による耳介の欠失、潰瘍形成を特徴とする。皮膚病理所見上皮組織内マスト細胞の脱顆粒、好酸球の著明な浸潤、表皮の過形成、真皮へのリンパ球、マクロファージ、好酸球浸潤、マスト細胞の増加、活性化が観察される。またヒトのADでは約80%に高IgE血症を伴うがNC/Ngaマウスにおいても約4週から血清IgEの上昇を認め約12週でピークとなることが知られている。このIgE上昇には、ヒトAD同様に、B細胞のCD40 LigandとIL-4に対する感受性の増強とそれによるJAK3-Kinaseのリン酸化によるところが大きく関与している事が報告されている²⁰。さらにセラミドの減少や気管支喘息を示すとの報告もあり現在ではアトピー疾患モデルマウスとして注目されつつある³⁴。

骨髄幹細胞移植(BMT)は、本来造血器腫瘍などの悪性疾患に対して骨髄破壊的治療を行った場合や再生不良性貧血などの造血幹細胞に異常のある疾患に対して正常幹細胞を移植することにより造血機能を回復させる方法である。我々は、ADを有するドナーからの移植後、レシピエントにADを発症した症例を経験しており、文献的にもAD⁶⁻⁸をはじめ気管支喘息患者^{9,10}、NIDDM⁹のドナーからの移植例などで同様の報告が認められる。この事実はADの発症が造血幹細胞レベルで規定されている事を示唆するものと考えられるが、実験的に証明した報告は今のところ認められない。

そこで我々は、重症ADに対する治療として同種BMTが応用可能か否か、またAD発症の原因に骨髄幹細胞が強く関与しているのかを検討する目的で、NC/Ngaマウスを用いた骨髄幹細胞移植実験を行った。NC/NgaマウスのMHCは組換え型のホモ(H2K^d, H2D?)であり、皮膚炎症状が単にGVHDの結果であるという疑問について検討する必要がある。これに対してはNC/Ngaマウスに加えBALB/cマウス(H2^d)、C57BL/6(H2^b)、C3H/HeJマウス(H2^k)を用い相互間で骨髄移植実験を施行し、その組織学的、免疫学的特徴について検討を加えた。

骨髄移植実験の結果として、AD発症(AD⁺NC/Nga)マウスをドナーとした場合のみならず、ADが未発症である“AD⁻NC/Ngaマウス”をドナーとした系においても、レシピエントの組み合わせを問わず全身性にAD様皮膚炎の発症を移植後約4-5週間で認めた。このうち重症皮膚炎発症マウスは最終的に約8-12週で死亡したが、一方で生き残った移植マウスは比較的軽度なAD所見を認め、20週齢まで追跡したものの皮膚炎にそれ以上の増悪は認めな

った。この事実は、肥満細胞、好酸球、リンパ球などが活性化されたAD⁺NC/Ngaマウス骨髄細胞のみならず、これらの細胞が活性化されていないと考えられるAD⁻NC/Ngaマウスの骨髄細胞においても、正常レシピエントにADの発症を誘導可能である事を意味し、AD発症の少なくとも一部は骨髄レベルで制御されているものと考えられた。また、データは示さないがNC/Nga→C3H/HeJのグループでは、著明なAD所見を認めず比較的軽度な皮膚炎を認めるのみであった。C3H/HeJマウスはLPS locusにmutationを持ちLPS刺激に耐性であることが知られており、最近の報告では、C3H/HeJマウスマクロファージでのIRF-1、IRF-2機能に異常を認め、ConA刺激に低反応性であることいわれている^{35,36}。C3H/HeJマウスの結果から、Tリンパ球反応性の修飾、LPSあるいはLPS類似分子群が、AD発症に関与している可能性が示唆されたが、この点については今後詳細な検討を要する。

興味深いことに、AD⁺NC/NgaマウスにBALB/c(H-2^d)、又はC57BL/6(H-2^b)マウス骨髄細胞を移植した系において、AD症状の消失、皮膚組織所見の改善を認め、活性化エフェクター細胞を多く含まないと考えられるAD⁻NC/Ngaマウスの骨髄をBALB/cに移植した系においてAD様皮膚炎の発症を認めた。これらの結果は、NC/NgaマウスのAD様皮膚炎発症メカニズムが、骨髄幹細胞レベルで制御されていることを示唆するとともに、AD治療に対する骨髄移植の有用性を強く支持すると考えられた。付け加えると7週のAD⁻NC/NgaマウスにBALB/cマウス、C57BL/6Jマウス、C3H/HeJマウスの骨髄を移植し、骨髄生着後、一部をconventionalな環境下へ移しても、やはりAD様皮膚炎の発症は認めなかった(data not shown)。

ADの臨床マーカーのうち最も重要なものに血清IgE値があるが、この値はTh2細胞と産生されるサイトカイン、CD23⁺B細胞、CD40/CD40L反応など多岐にわたる因子に制御されている。NC/Ngaマウスを用いた骨髄幹細胞移植実験における血清IgEをELISA法で測定した結果、AD⁻NC/Nga→BALB/cマウスではAD⁺NC/Ngaマウスと同等に高い血清IgE値を示した。これに対しBALB-c、BALB/c→BALB/c、C57BL/6→BALB/cマウスでは、松田らの報告の高血清IgE値の基準である9μg/ml以下であり、BALB/c→AD⁺NC/Ngaマウスにおいてもやはり9μg/ml以下であった。この事実はNC/Ngaマウス由来の骨髄幹細胞が他のストレインのマウスに移植されても高IgE血症とAD皮膚炎を発症可能であり、逆に骨髄幹細胞移植によ

りこれらが治療可能である事を示唆するものであった。

先に述べたように、アレルギー疾患などでの血清 IgE の上昇時にサイトカインレベルでは、IL-4, IL-5, IL-13 等が強く関与していることが知られている。NC/Nga マウスでも皮下リンパ球の免疫組織染色, RT-PCR によるサイトカイン発現の検討において Th2 優位である事が報告されている。それによると NC/Nga マウス皮下リンパ球では、IL-4, IL-5, IL-13 の産生亢進に加え INF γ の発現を認めるとされ、これらはマスト細胞, リンパ球に由来するとされている¹⁶。また、NC/Nga 脾細胞もやはり Th2 サイトカイン産生に傾いているとの報告がある⁵。これらの事実は、血清 IgE 値が NC/Nga マウスにおいて著明に高値を示すと言う事実に符合するのではないかと考えられた。そこで、我々が施行した NC/Nga マウス骨髓幹細胞移植実験におけるサイトカインプロファイルについても、脾細胞の semi-quantitative RT-PCR を行うことにより検討した。マウス Th2 細胞のコントロールである EL-4 細胞では、IL-4, IL-5 の強発現を認め IL-18 は低発現であり、INF γ , IL-2 に関しては検出困難であった。これは、EL-4 で IL-2 を検出するには CHX 処理し super induction をかける必要があると言う報告と符合するものと考えた^{37,38}。一方で、未刺激の AD⁺ NC/Nga マウス脾細胞では、松田らによる NC/Nga 皮下リンパ球の免疫組織学的検討の報告¹⁶と同様、やはり IL-4, IL-5 の強発現が認められたが、興味深い事に IL-18 の発現量は、これらのサイトカインよりさらに顕著であった。加えて Th1 サイトカインである INF γ 軽度ながら明らかに認められた。また、AD⁻ NC/Nga \rightarrow BALB/c マウスの脾細胞で、同様にサイトカインの発現量について検討したところ AD⁺ NC/Nga マウス脾細胞と同様のサイトカインパターンが得られた (data not shown)。先に述べたように AD⁻ NC/Nga \rightarrow C3H/HeJ マウスでは AD の発症が軽度であったが、その原因については、IL-18 の主産生細胞が肝マクロファージである事から想像すると C3H/HeJ における LPS に対するマクロファージの低応答性, IRF 機能低下がその一因である可能性が想像された。

中西らによると、IL-18 は、接触性皮膚炎マウスの皮膚浸潤リンパ球で上昇しており、helper T 細胞を Th2 方向へ分化誘導するとされている^{27,39-41}。これらの結果は、NC/Nga マウス脾細胞においても IL-18 の発現が、IL-4, IL-5 の発現あるいは発現増強を導き Th2 方向への分化に関与している可能性を示唆している。一方で IL-18 mRNA の発現レベルは

BALB/c マウス脾細胞でも低発現ながら定常的に認められていたが、IL-4, IL-5 の発現プロファイルから考えて、この IL-18 分子は 18 kD の活性化 IL-18 ではなく、interferon converting enzyme (ICE : Caspase-1) にプロセスを受ける前の、未熟型 IL-18 分子であると考えられた⁴²。

特筆すべき事に BALB/c \rightarrow AD⁺ NC/Nga マウスにおける INF γ , IL-4, IL-5 mRNA レベルは、未発生マウスコントロールである BALB/c マウスと同程度に低下しており、IL-18 レベルの低下も同様に認められた。これらの結果から、全身状態や皮膚所見に加え AD 関連サイトカインレベルも骨髓幹細胞移植により改善されることが明らかになった。脾臓においては、おそらくマクロファージが IL-18 の産生細胞であると想像される事から、X-線感受性の肝マクロファージ細胞が移植時に一担除去され BMT 後再構築されることが、骨髓幹細胞移植モデルにおける AD 治療に際しての主要メカニズムの一つであると推測された。

我々は、NC/Nga マウス骨髓幹細胞移植モデルを用い、AD に対する骨髓幹細胞移植適応の可能性について検討を加えるとともに、AD 発症のメカニズムについて若干の検討を加えた。造血幹細胞移植によって AD の病態を正常マウスに再現できることから、他の多くの自己免疫疾患同様 AD も造血幹細胞レベルで規定されていること、さらに移植によって AD 症状、皮膚病理所見、血清 IgE, AD 関連サイトカインレベルのいずれもの改善を認めたことから、重症 AD が、骨髓幹細胞移植の適応疾患へと拡大される可能性を考える上で、本研究は有用な情報を与えるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、NC/Nga マウスをご提供下さり御助言頂いた東京農工大学・松田教授、ならびに実験に多大のご協力を頂きました第 3 内科教室・知念洋子研究助手、日下明美研究助手、同教室各兄に心から感謝いたします。

文 献

1. 田中洋一, 山本憲嗣, 吉田彦太郎 (1998) アトピー性皮膚炎, 監修宮本昭正, 臨床アレルギー学 (改訂第 2 版), 東京, 南江堂, pp376-384
2. Marone G (1998) Tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *N Engl J Med* 339: 1788-1789
3. 中川秀己 (2000) アトピー性皮膚炎に対する FK506 軟膏 (タクロリムス軟膏) 使用ガイドライン. *臨床皮膚科* 54: 93-97
4. 吉池高志 (1999) 紫外線治療の実際, 編集古江増隆, 宮地良樹, 瀧川雅浩, 皮膚科診療プラクティス 6 アトピー性皮膚炎, 東京, 文光堂, pp128-139
5. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W,

- Suemura M, Kishimoto T, Tanaka T (2000) Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin Immunol* 106: 159-166
6. Bellou A, Kanny G, Fremont S, Moneret-Vautrin DA (1997) Transfer of atopy following bone marrow transplantation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 78: 513-516
 7. Yamada H, Chihara J, Hamada K, Matsukura M, Yudate T, Maeda K, Tubaki K, Tezuka T (1997) Immunohistology of skin and oral biopsies in graft-versus-host disease after bone marrow transplantation and cytokine therapy. *J Allergy Clin Immunol* 100: 73-76
 8. Chalmers RJ, Ford GP, Kelsey P (1985) Atopy after bone marrow transplantation. *Br Med J* 290: 792
 9. Hirayama M, Azuma E, Kumamoto T, Qi J, Kobayashi M, Komada Y, Inui T, Miyake M, Mugishima H, Hamazaki M, Sakurai M (1998) Late-onset unilateral renal dysfunction combined with non-insulin-dependent diabetes mellitus and bronchial asthma following allogeneic bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in a child. *Bone Marrow Transplant* 22: 923-926
 10. Agosti JM, Sprenger JD, Lum LG, Witherspoon RP, Fisher LD, Storb R, Henderson WR Jr (1988) Transfer of allergen-specific IgE-mediated hypersensitivity with allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 319: 1623-1628
 11. Ikehara S, Good RA, Nakamura T, Sekita K, Inoue S, Oo MM, Muso E, Ogawa K, Hamashima Y (1985) Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2483-2487
 12. Ikehara S, Ohtsuki H, Good RA, Asamoto H, Nakamura T, Sekita K, Muso E, Tochiko y, Ida T, Kuzuya H, Imura H, Hamashima Y (1985) Prevention of type I diabetes in non-obese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7743-7747
 13. Yasumizu R, Sugiura K, Iwai H, Inaba M, Makino S, Ida T, Imura H, Hamashima Y (1987) Treatment of type I diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transplantation of allogeneic bone marrow and pancreatic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6555-6557
 14. Ikehara S, Yasumizu R, Inaba M, Izui S, Hayakawa K, Sekita K, Toki J, Sugita K, Iwai H, Nakamura T, Muso E, Hamashima Y, Good RA (1989) Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3306-3310
 15. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C (1997) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9: 461-466
 16. Tsudzuki M, Watanabe N, Wada A, Nakane Y, Hiroi J, Matsuda H (1997) Genetic analyses for dermatitis and IgE hyperproduction in the NC/Nga mouse. *Immunogenetics* 47: 88-90
 17. Hiroi J, Sengoku T, Morita K, Kishi S, Sato S, Ogawa T, Tsudzuki M, Matsuda H, Wada A, Esaki K (1998) Effect of tacrolimus hydrate (FK506) ointment on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Jpn J Pharmacol* 76: 175-183
 18. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Mitsuishi K, Hikasa Y, Matsuda H (1999) IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J Immunol* 162: 1056-1063
 19. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C (1999) NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 120: 70-75
 20. Vestergaard C, Yoneyama H, Matsushima K (2000) The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol Med Today* 6: 209-210
 21. Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K (1999) Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 104: 1097-1105
 22. 松田浩珍, 紺野克彦 (1997) アトピー性皮膚炎モデルマウス. *臨床* 51: 41-45
 23. 日本皮膚科学会学術委員会: 日本皮膚科学会 (1994) アトピー性皮膚炎の診断基準. *日医会誌* 104: 1210-1201
 24. Leung DY, Hirsch RL, Schneider L, Moody C, Takao R, Li SH, Meyerson LA, Mariam SG, Goldstein G, Hanifin JM (1990) Thymopentin therapy reduces the clinical severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 85: 927-933
 25. Hanifin J, Rajika G (1980) Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 92: 44-47
 26. Charlesworth EN (1999) Atopic eczema and the allergist. *Allergy Asthma Proc* 20: 305-310
 27. Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, E. Paul W, Nakanishi K (2000) IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nature Immunology* 1: 132-137
 28. Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, Hayakawa K, Shiohara T (1995) Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J Invest Dermatol* 105: 749-755
 29. Kitagaki H, One N, Hayakawa K, Kitazawa T, Watanabe K, Shiohara T (1997) Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol* 159: 2484-2491
 30. Kitagaki H, Kimishima M, Teraki Y, Hayakawa J, Hayakawa K, Fujisawa S, Shiohara (1999) T Distinct in

- vivo and in vitro cytokine profiles of draining lymph node cells in acute and chronic phases of contact hypersensitivity: importance of a type 2 cytokine-rich cutaneous milieu for the development of an early-type response in the chronic phase. *J Immunol* 163: 1265-1273
31. Katayama I, Tanei R, Yokozeki H, Nishioka K, Dohi Y (1990) Induction of eczematous skin reaction in experimentally induced hyperplastic skin of Balb/C mice by monoclonal anti-DNP IgE antibody: possible implications for skin lesion formation in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 93: 148-154
 32. Katayama I, Otoyama K, Yokozeki H, Nishioka K (1996) Effect of mast cell modulators on IgE-mediated murine biphasic cutaneous reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 109: 390-397
 33. Katayama I, Igawa K, Minatohara K, Nishioka K (1997) Topical glucocorticoid augments IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis in Balb/C mice and mast cell deficient WBB6F1 v/v mice. *Clin Exp Allergy* 27: 1477-1483
 34. 小原夕紀, 米川博道, 松田浩珍, (1999), アトピー性皮膚炎, 編集森脇和郎, 樋野興夫, 自然発症疾患モデル動物, 東京, 中山書店, pp11-14
 35. Barber SA; Fultz MJ; Salkowski CA; Vogel SN (1995) Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-hyporesponsive macrophages. *Infect Immun* 63: 601-608
 36. Watanabe T; Ohara J (1981) Functional nuclei of LPS-nonresponder C3H/HeJ mice after transfer → LPS-responder C3H/HeN cells by cell fusion. *Nature* 290: 58-59
 37. Hyun J L, Matsuda I, Naito Y, Yokota T, Arai N, Arai K (1994) Signals and nuclear factors that regulate the expression of interleukin-4 and interleukin-5 genes in helper T cells. *J Allergy Immunol* 94: 594-604
 38. Hyun J L, Kayano Nakagawa N, Naito Y, Nishida J, Arai N, Arai K, Yokota T (1993) cAMP Activates the IL-5 Promoter Synergistically with Phorbol Ester through the Signaling Pathway Involving Protein Kinase A in Mouse Thymoma Line EL-4. *J Immunol* 151: 6135-6142
 39. 柏村信一郎, 岡村春樹 (1998) 新しいインターロイキン (IL) の受容体研究の動向. *日本臨床* 56: 152-160
 40. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH (1998) Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28: 3231-3239
 41. Xu B, Aoyama K, Yu S, Kitani A, Okamura H, Kurimoto M, Matsuyama T, Matsushita T (1998) Expression of interleukin-18 in murine contact hypersensitivity. *J Interferon Cytokine Res* 18: 653-659
 42. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997) Activation of interferon-gamma-inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275: 206-209