

インターロイキン 31 を標的とした
アトピー性皮膚炎の制御に関する研究

2015

齊藤 恵子

目次

	頁
要旨	4
略語	7
序論	8
本論	
第 1 章 IL-31 投与により誘発される搔痒の解析	11
1-1. 背景・目的	12
1-2. 方法	14
1-2-1. マウス	14
1-2-2. マウス IL-31 の調製	14
1-2-3. 抗マウス IL-31RA モノクローナル抗体、BM095 の創製	14
1-2-4. BM095 の中和活性評価	14
1-2-5. 搔痒行動評価	15
1-2-6. IL-31 の持続投与	15
1-2-7. 薬剤の投与	16
1-2-8. 統計	16
1-3. 結果	17
1-3-1. IL-31 持続投与による搔痒行動の誘発	17
1-3-2. IL-31 単回投与による搔痒行動の誘発	19
1-3-3. IL-31 レセプター中和抗体による IL-31 反応の抑制	21
1-3-4. 既存薬による IL-31 誘発搔痒への影響	23
1-4. 考察	24

第2章 IL-31の皮膚に対する作用	26
2-1. 背景・目的	27
2-2. 方法	28
2-2-1. マウス	28
2-2-2. IL-31 持続投与による皮膚病変の評価	28
2-2-3. HaCaT 細胞の IL-31RA 発現解析	28
2-2-4. IL-31 による HaCaT 細胞のアポトーシス誘導	29
2-3. 結果	30
2-3-1. IL-31 持続投与による脱毛の発症	30
2-3-2. IL-31 持続投与により認められる皮膚病変の解析	31
2-3-3. IL-31 によるケラチノサイトの caspase 3/7 活性の誘導	33
2-4. 考察	35
第3章 皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果	37
3-1. 背景・目的	38
3-2. 方法	39
3-2-1. マウス	39
3-2-2. 急性の接触性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の評価	39
3-2-3. 慢性のアトピー性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の評価	39
3-2-4. 統計	40
3-3. 結果	41
3-3-1. 急性の接触性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果	41
3-3-2. 慢性のアトピー性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果	42

3-4. 考察.....	46
総括.....	48
謝辞.....	50
引用文献.....	51

要旨

アトピー性皮膚炎は、掻痒のある湿疹を主病変とする慢性炎症性疾患であり、角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能障害を伴い、抗原物質に対する免疫反応やその他の機械的刺激が引き金となって発症する。掻破により皮膚が機械的障害を受けてバリア機能が低下し、表皮を通過して侵入した外来抗原により炎症反応が増強されて、皮膚炎の悪化および掻痒の増悪をきたす。このような掻破－皮膚炎悪化－掻痒悪化の悪循環は *itch-scratch-cycle* と呼ばれ、病態の慢性化につながるということが知られている。

最近、インターロイキン 31 (IL-31)が掻痒を誘発するサイトカインとして注目されており、患者サンプルにおける IL-31 の発現と臨床スコアが相関するなど、アトピー性皮膚炎の病態における IL-31 の関与を示唆する報告がなされている。しかしながら、IL-31 がアトピー性皮膚炎の *itch-scratch-cycle* および病態の慢性化にどのように関与し、機能しているかは明らかになっていない。そこで本研究では、IL-31 をマウスに投与したときに誘発される掻痒並びに皮膚病変の解析を行い、アトピー性皮膚炎の病態における IL-31 の役割について検討した。

1. IL-31 投与により誘発される掻痒の解析

IL-31 により、投与ルート（静脈内、皮下、皮内）に関係なく、投与後 4-6 時間をピークとする持続的な掻痒行動が誘発された。従って、IL-31 は神経に発現するレセプターに結合して神経を刺激するといった直接的機序とは異なる別の作用を介して掻痒を誘発する可能性が示唆された。そこで、IL-31 による掻痒誘発を介在する因子や機序を解析する目的で、動物モデルや臨床において掻痒抑制効果が示されている既存薬による影響を調べた。その結果、IL-31 誘発の掻痒はこれらの薬剤によって抑制されなかったことから、IL-31 誘発の掻痒には、既存薬とは異なる新規のメカニズムが介在することが

明らかとなった。

2. IL-31 の皮膚に対する作用

IL-31 を持続投与したマウスの皮膚では、表皮の肥厚と皮脂腺細胞の増加が認められ、肥厚した表皮では、単細胞壊死や有糸分裂像を示す細胞が顕著に増加していた。従って、IL-31 を投与したマウスの皮膚では、ターンオーバーが早まり、未分化な角質層を形成しやすい状態であることが示唆された。さらに、ケラチノサイト細胞株を用いた検討において、IL-31 が IFN- γ 共存下 caspase 3/7 活性を誘導することが明らかとなった。急性および慢性炎症時の皮膚では、IFN- γ の作用によりアポトーシスが惹起されることが知られており、IL-31 は IFN- γ と協調して、皮膚のバリア機能低下に寄与している可能性が示唆された。

3. 皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果

慢性のアトピー性皮膚炎モデルにおいて、IL-31 レセプター中和抗体は病態悪化を有意に軽減し、さらには、病態成立後に投与した場合にも皮膚炎の治療効果を示した。

以上、本研究の結果より、IL-31 はアトピー性皮膚炎の掻痒および皮膚炎の治療における新規の治療ターゲットとなる可能性が示され、IL-31 レセプターのブロックが現在の治療では十分に掻痒のコントロールができない患者の治療オプションになると考えられた。

本論文は、以下の原著論文に基づいたものである。

K Kasutani, E Fujii, S Ohyama, H Adachi, M Hasegawa, H Kitamura and N Yamashita

Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating
itch and dermatitis in mice

British Journal of Pharmacology 171: 5049-5058 (2014)

略語

IL-31	interleukin 31
AD	atopic dermatitis
QOL	quality of life
IL-31RA	IL-31 receptor A
OSMR	oncostatin M receptor
CHO	chinese hamster ovary
Ab	antibody
DEX	dexamethasone
TAC	tacrolimus
NAL	naloxone hydrochloride
NS	not significant
LLS	long-lasting scratching
VEGF	vascular endothelial growth factor

序論

アトピー性皮膚炎(AD)は、掻痒のある湿疹を主病変とする慢性炎症性疾患であり、角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能障害を伴い、抗原物質に対する免疫反応やその他の機械的刺激が引き金となって発症する[1, 2]。角層のバリア機能障害は、ADの発症および病態を考える上で重要である。角層は、内側からの水分蒸発を阻止するとともに、外界からのダニや花粉などの侵入を防ぐといったバリアとしての機能を発揮している。皮膚バリアに機能不全があると、外来からアレルゲンや異物が皮膚内に容易に侵入してアレルギー反応が起こり、AD発症へとつながる[3-5]。皮膚バリアの機能低下は、掻破による機械的障害の他にも、角層の水分保持やバリア機能に重要なタンパクであるフィラグリン[6, 7]の遺伝子変異によっても起こり、ADの発症要因となることが報告されている[8, 9]。そのため、バリア機能障害による経皮感作の亢進がAD発症・増悪の重要なリスクファクターとして注目されており、現在ADの一般的な治療法として、バリア障害の改善と炎症抑制を目的に、保湿を主とするスキンケアとステロイドなどの外用薬による薬物治療が行われている。

掻痒に伴う掻破は、皮疹を悪化させる増悪因子であることが知られている[3, 10]。掻破により皮膚が機械的障害を受けてバリア機能が低下し、表皮を通過して侵入した外来抗原により炎症反応が増強され、皮膚炎の悪化および掻痒の増悪をきたす。このような掻破－皮膚炎悪化－掻痒悪化の悪循環は *itch-scratch-cycle* と呼ばれ、病態の慢性化につながる事が知られている[11, 12]。また、ADに伴う掻痒は患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる不快な感覚である。米国と欧州7カ国の中等症から重症のAD患者およびその保護者2,002人を対象に行った調査によると、患者は年平均67日、重症患者に限定すると年平均162日、掻痒のために睡眠が妨げられると報告されている[13]。患者が小児の場合は、患児のみならず保護者の負担も大きく、中等症ないし重症の患児の保護者は、毎日3時間を

治療処置に費やし、1～2時間の睡眠時間が損なわれている[14]。従って、ADにおいては、皮膚のバリア機能の維持および炎症への対処と同様に、掻痒のコントロールがQOL向上および皮膚炎改善のために非常に重要であるといえる。

しかしながら、ADに付随する掻痒行動を誘発する因子の解析は、未だ十分に進んではいない。ヒスタミンはヒトにおいて急性の掻痒を誘発することが知られており[15, 16]、現在本邦では、抗ヒスタミン剤がADの掻痒に対して多用されているが、効果が必ずしも十分ではないというのが現状であり、補助療法に位置づけられている。ヒスタミン以外にも、ニューロペプチドやプロテアーゼ、キニン、サイトカイン類が慢性の掻痒誘発に重要な働きをすることが報告されている[12, 17-19]が、その中でも最近、IL-31が掻痒誘発因子として注目されている[20-23]。IL-31は、主に活性化したT細胞から産生されるサイトカインであり[20]、AD患者の皮膚生検サンプルでIL-31 mRNA発現の亢進が報告されている[21, 23, 24]。また、AD患者を紫外線照射で治療することによって有意な臨床スコアの改善とともに皮膚のIL-31 mRNA発現の減少が認められること[25]、IL-31遺伝子のハプロタイプがintrinsic ADと関連していること[26]など報告があり、ADの病態へのIL-31の関与が示唆されている。臨床サンプルで見られるのと同様に、マウスにおいても、IL-31を過剰発現させたトランスジェニックマウスがAD様の皮膚炎や著しい掻破行動を示すこと[20]、AD様の症状を自然発症するNC/NgaマウスにおいてIL-31レベルと掻破行動が相関すること[27, 28]などから、IL-31のAD並びに掻痒発生への関与が動物実験レベルでも示されている。

しかしながら、IL-31がADのitch-scratch-cycleおよび病態の慢性化にどのように関与し、機能しているかは不明であり、さらに、IL-31のブロックがADの病態に治療効果を有するかについては明らかになっていない。そこで本研究では、IL-31をマウスに投与した時に誘発される掻痒、並びに皮膚病変の解析を行い、AD病態におけるIL-31の作用機序について検討した。また、IL-31レセプター中和抗体の慢性ADモデルにおける治療効

果についても評価した。

本論

第1章 IL-31 投与により誘発される搔痒の解析

1-1. 背景・目的

2004年にDillonらが、IL-31を充填したmini-osmotic pumpを皮下に挿入することによりIL-31をマウスに持続投与した結果、激しい搔痒行動が誘発されることを報告し[20]、IL-31が搔痒誘発因子として注目されている。

搔痒を誘導または増悪することが知られている因子の中には、搔痒受容器に結合することにより直接的に働く因子と、感覚神経を活性化する他の因子を誘導するなどして間接的に働く因子が知られている[29]。IL-31のレセプターは、IL-31 receptor A (IL-31RA)とオンコスタチンMレセプター(OSMR)からなるヘテロダイマーであり[30]、感覚神経が集まる後根神経節、並びにかゆみの感覚をつかさどることが知られている脊髄や皮膚の1次感覚神経に高い発現が認められる[23, 31]。そのため、IL-31が神経に発現するIL-31レセプターに結合して、直接的に神経を刺激している可能性が考えられる。一方で、IL-31RAは皮膚表皮細胞や好酸球、肥満細胞、単球やマクロファージにも発現していることが知られており[20, 32-35]、免疫反応や細胞増殖など幅広い生体機能を担っていることが報告されている[36, 37]。従って、IL-31が「直接的に神経を刺激する」といった機序とは異なる別の作用を介して搔痒を誘発する可能性もあり、IL-31がADのitch-scratch-cycleにどのように関与し、機能しているかは興味深い。

搔痒を誘発する因子として、ヒスタミンがよく知られている[15]。抗ヒスタミン剤は慢性の搔痒に対して一般的に用いられている薬剤であり、ヒスタミンH1レセプターアンタゴニストであるterfenadineは肥満細胞の脱顆粒を抑制し、ヒスタミンの放出を阻害する[38]。Glucocorticoidやカルシニューリン阻害剤であるtacrolimus、pimecrolimusはADに対し治療効果を有する[39, 40]とともに、AD動物モデルにおいて搔痒抑制効果を有することが報告されている[41, 42]。カルシニューリン阻害剤は、サイトカイン産生を抑制してT細胞活性化を阻害するだけでなく、肥満細胞の脱顆粒阻害[43]やニューロペプチドの産生抑制[44]作用があることも知られている。一方、肥

満細胞に依存しない経路としては、コデインなどのオピオイドによる搔痒誘発がある。オピオイドにより誘発される搔痒は μ -opioid receptor の活性化を介しており、 μ -opioid receptor antagonist がヒト[45, 46]やマウス[42, 47]において搔痒の感覚や行動を抑制することが報告されている。

IL-31 による搔痒誘発機序を調べる目的で、IL-31 をマウスに投与した時の搔痒行動について経時的に調べるとともに、動物モデルや臨床で搔痒抑制効果を有することが示されている上記既存薬により IL-31 誘発の搔痒が影響を受けるか検討した。

1-2. 材料・方法

1-2-1. マウス

5-6 週令の雌性 BALB/c マウスを日本チャールスリバーより購入し、6-10 週令で使用した。設定照明時間が 12 時間（午前 7 時～午後 7 時）、設定温度が 20-26°C、設定湿度が 35-75%の飼育環境でマウスを飼育した。固形飼料および飲水は自由接種とした。

1-2-2. マウス IL-31 の調製

マウス IL-31 を安定発現させた chinese hamster ovary (CHO)細胞株を作製した。その培養上清を用いて、hydroxyapatite column、Q-sepharose/FF anion-exchange column、Superdex75 gel filtration column を用いた連続クロマトグラフィーにより精製した。精製したマウス IL-31 の活性は、Ba/F3 細胞株にマウス IL-31RA とマウス OSMR を強制発現してマウス IL-31 依存性の増殖を示すようになったトランスフェクタントを用いて確認した。

1-2-3. 抗マウス IL-31RA モノクローナル抗体、BM095 の創製

ヒト抗体ファージライブラリーから、先述の IL-31 レセプター発現 Ba/F3 トランスフェクタントの増殖を指標に、マウス IL-31RA の機能を阻害する single chain Fv 抗体の発現クローンを得た。この抗体の heavy chain および light chain をそれぞれマウス IgG2a、マウスλ鎖の定常領域と連結したキメラ抗体を発現する発現ベクターを構築し、CHO 細胞株にトランスフェクションして、BM095 を恒常的に発現する細胞株を樹立した。この培養上清を用いて、BM095 を protein A column および陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

1-2-4. BM095 の中和活性評価

精製した BM095 の中和活性の評価は、先述の IL-31 レセプター発現 Ba/F3 トランスフェクタントの IL-31 依存性増殖を指標に行った。6×10³/well の細胞と 2 ng/mL のマウス IL-31、各濃度の BM095 を 96 well plate に播種して 2 日間培養後、細胞の増殖を Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories)を用いて吸光度を測定することにより評価した。

1-2-5. 搔痒行動評価

マウスの両側後肢の甲の皮下部分に直径1 mm、長さ3 mm のコーティング付測定用磁石(SCT-MAGSP-TF, Neuroscience)を吸入麻酔下、外科的に埋め込んだ。その直後、外科処置の鎮痛のためレペタン注（大塚製薬）を1 µg/100 µL/head で皮下投与し、麻酔から覚醒後、ケージに戻した。搔痒行動の測定は、術後3日目以降に、自動搔痒測定システム(Micro Act, Neuroscience)を用いて行った[47, 48]。解析条件は、Threshold: 0.05 V、Event Gap: 0.1 sec、Max Freq: 20 Hz、Min Freq: 5 Hz、Min Duration: 0.3 sec とした。馴化のため、測定用チャンバーにマウスを2時間入れた後、測定を開始した。測定期間内の連続する搔痒動作の頻度（搔痒頻度：Events）および搔痒動作中の掻き動作の総数（搔痒回数：Beats）が群間で差を認めないよう、試験前に無作為に動物を各群に割付けた。Events および Beats が極端に多いまたは少ない個体は、割り付け時に試験より除外した。各試験における搔痒行動の測定は、15-17時頃より開始した。IL-31を静脈内または皮下、皮内に単回投与する試験においては、IL-31投与を15-17時頃に行い、投与直後より搔痒行動の測定を開始した。

1-2-6. IL-31 の持続投与

IL-31 の持続投与には、osmotic pump (Alzet, model 2001)を用いた。IL-31 は 0, 0.1, 1, 10 µg/24 µL/day 投与となるよう 0.1%BSA 含有 PBS を用いて調製した。調製

した IL-31 を osmotic pump に充填し、吸入麻酔下外科的にマウス背部皮下に埋め込んだ。投与開始後 7 日目に、新しく調製した IL-31 を充填した osmotic pump に置き換え、14 日間持続投与した。

1-2-7. 薬剤の投与

Dexamethasone, terfenadine, naloxone hydrochloride は Sigma-Aldrich より購入した。Tacrolimus (Prograf®)は Astellas Pharma より購入した。Dexamethasone, tacrolimus, terfenadine の溶媒は、5%の polyoxyethylene sorbitan monooleate を用い、naloxone の溶媒には生理食塩水を、BM095 の溶媒には PBS を用いた。

各種薬剤は、IL-31 を静脈内投与する 1 時間前に投与した。Dexamethasone, tacrolimus, terfenadine は腹腔内にそれぞれ 3 mg/kg, 0.1 mg/kg, 30 mg/kg の用量で投与した。Naloxone は 10 mg/kg で皮下に、BM095 は 300 または 350 mg/kg で静脈内に投与した。薬剤の投与ルートおよび投与量は、臨床で一般的に使用されている用量やマウス搔痒モデルで搔痒抑制効果を示している既報の用量を参考に決定した[42, 49]。投与した用量の薬剤で鎮静効果は認められなかった。

試験の対照群には、薬剤の溶媒または自社（中外製薬株式会社）で作製したコントロール抗体(mouse IgG against keyhole limpet haemocyanin)を投与した。

1-2-8. 統計

統計学的解析は SAS version 8.02 (SAS 前臨床パッケージ) を使用した。搔痒行動の経時変化に対する統計解析には、2 群の投与群間差の時点ごとの多重比較を用いた。12 時間累計の搔痒行動回数の比較には、Dunnett 型多重比較の解析を行った。

1-3. 結果

1-3-1. IL-31 持続投与による搔痒行動の誘発

Osmotic pump を用いて、IL-31 を 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/day}$ で持続投与し、MicroAct 搔痒測定装置により経時的に搔痒行動を測定した。その結果、IL-31 投与量依存的な搔痒行動の増加が認められ、投与 1 日目より有意な搔痒行動の増加が検出可能であった (Figure 1A, 1B)。また、IL-31 の投与を終了した 14 日目以降においても数日間搔痒行動が持続した (Figure 1A)。

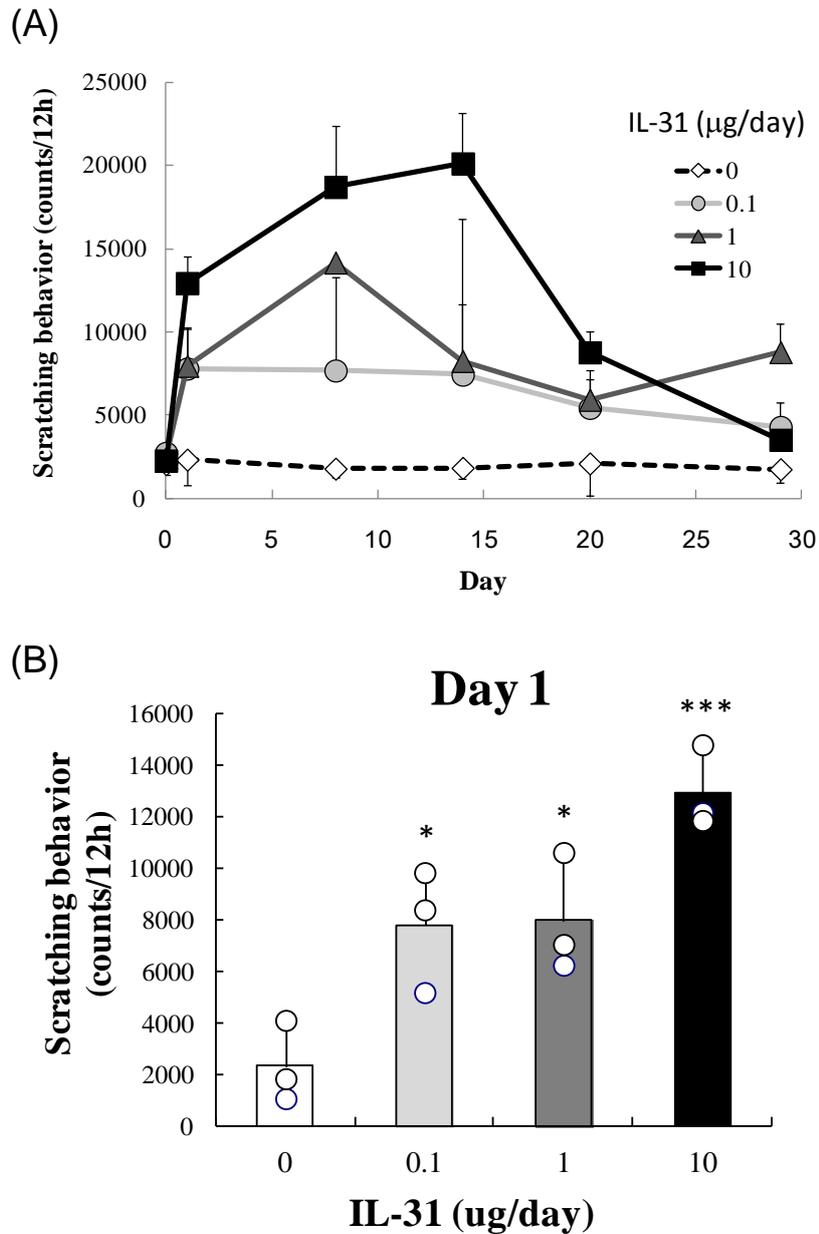


Figure 1 IL-31 持続投与による搔痒行動の誘発

Osmotic pump を用いて、IL-31 を 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/day}$ で 14 日間持続投与した。各測定ポイントにおける 12 時間累計の搔痒回数を示した ((A) Day 29 までの経時変化、(B) Day 1)。(A)図のポイントおよび(B)図のカラムは 3 匹のマウスの搔痒回数の平均値 \pm 標準偏差を示す。* $p<0.5$, *** $p<0.001$ versus the vehicle group.

1-3-2. IL-31 単回投与による搔痒行動の誘発

1-3-1.の結果、投与開始 1 日目より有意な搔痒行動の増加が認められたことから、MicroAct 搔痒測定装置を用いることにより、IL-31 単回投与によっても搔痒行動が検出可能か検討した。0-10 μg の IL-31 を静脈内または皮下、皮内に投与した結果、投与濃度依存的な搔痒行動の増加が認められた(Figure 2)。また、いずれの投与ルートによっても、IL-31 投与後 4-6 時間をピークとする同様の持続的な搔痒行動が認められた(Figure 2)。

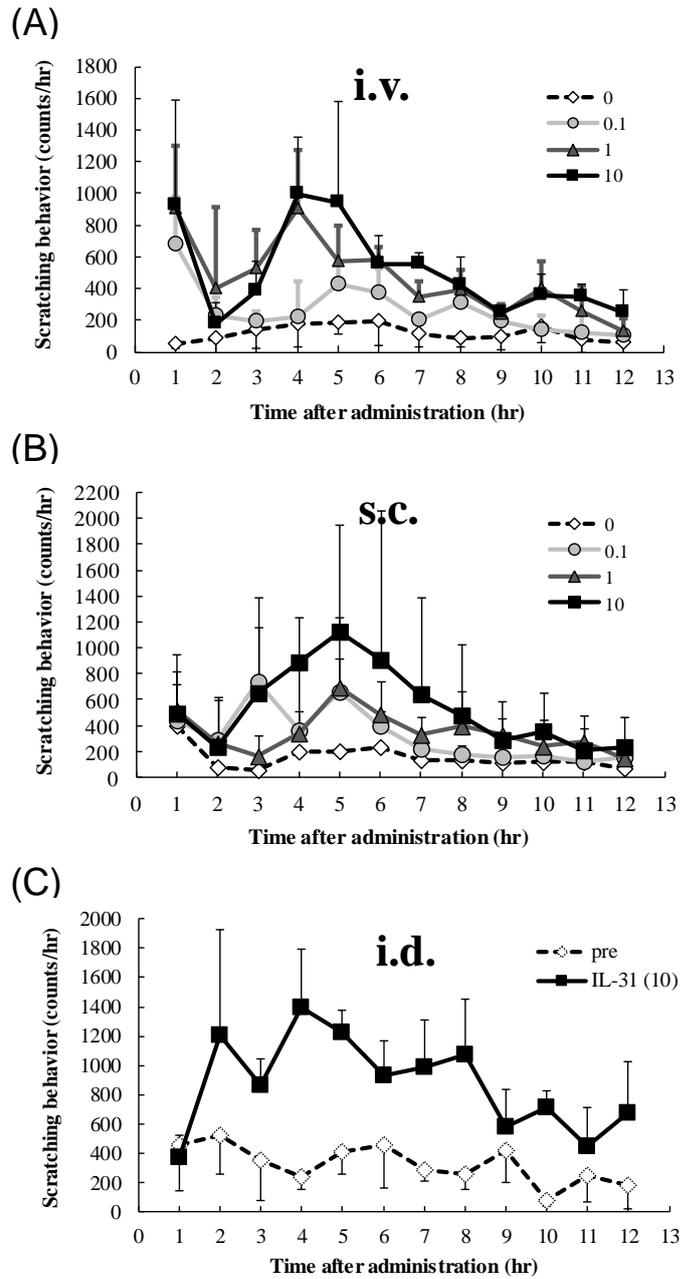


Figure 2 IL-31 誘発搔痒の投与ルートによる違い

IL-31 を 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{shot}$ で静脈内(A)または皮下(B)に投与した。投与直後から 12 時間の搔痒回数を測定し、1 時間ごとの解析結果を示した。また、10 $\mu\text{g}/\text{shot}$ の IL-31 を皮内投与した時の搔痒行動回数を投与前値と比較した(C)。図のポイントは 3 匹のマウスの搔痒回数の平均値±標準偏差を示す。

1-3-3. IL-31 レセプター中和抗体による IL-31 反応の抑制

創製した IL-31 レセプター中和抗体、BM095 の活性を、マウス IL-31RA とマウス OSMR を強制発現させた Ba/F3 トランスフェクタントのマウス IL-31 依存性増殖を指標に検討した。2 ng/mL の IL-31 によるトランスフェクタントの細胞増殖を BM095 は濃度依存的に阻害し、500 ng/mL でほぼ完全に抑制した(Figure 3)。

また、10 μ g の IL-31 を静脈内に投与したときに誘導される搔痒行動を、350 mg/kg の BM095 はほぼ完全に抑制した(Figure 4A)。この阻害効果がイムノグロブリン投与による非特異的な効果ではないことを、コントロール抗体を用いた試験により確認した(Figure 4B)。

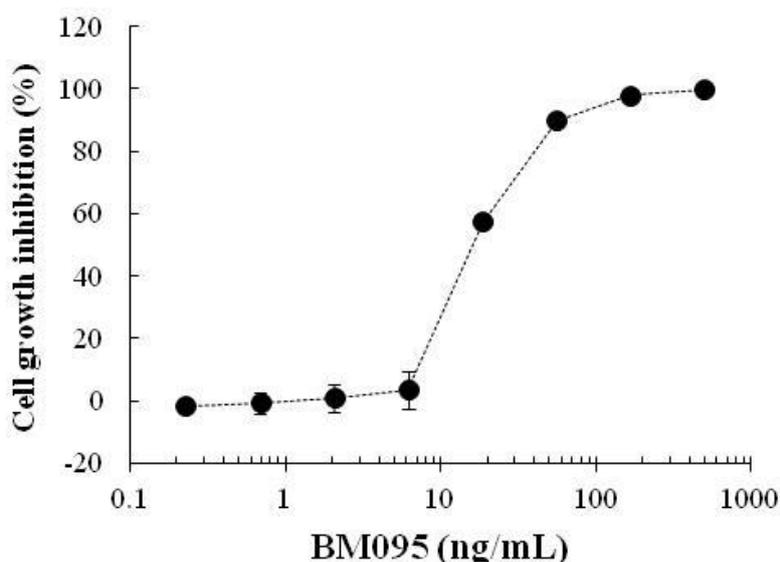


Figure 3 IL-31 レセプター中和抗体による IL-31 依存性細胞増殖の阻害

IL-31 レセプター中和抗体、BM095 の中和活性をマウス IL-31RA とマウス OSMR を発現させた Ba/F3 トランスフェクタントの細胞増殖を指標に評価した。図は 2 ng/mL の IL-31 による細胞増殖を 100%とした時の阻害率を表し、ポイントは 3-6 ウェルの阻害率の平均値±標準偏差を示す。

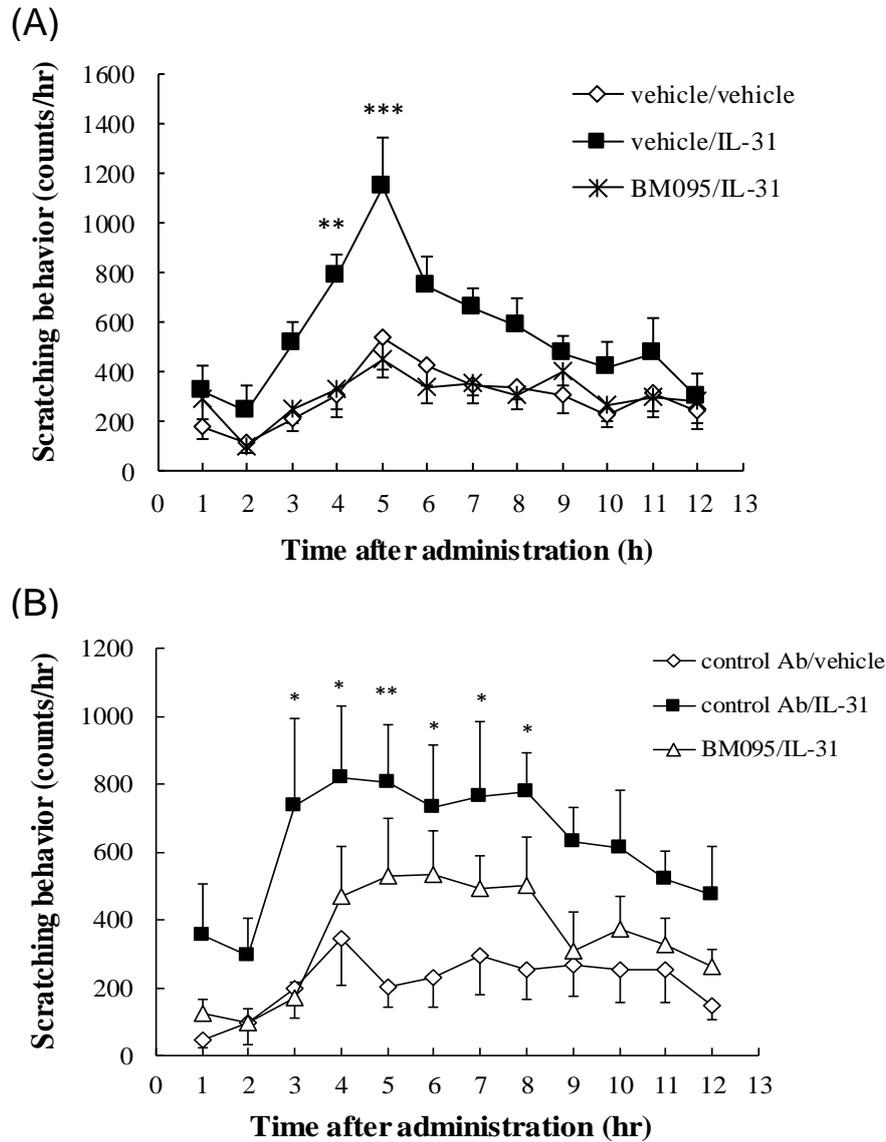


Figure 4 IL-31 レセプター中和抗体による IL-31 誘発搔痒の抑制

IL-31 (10 μ g, i.v.)投与の1時間前に、BM095 (350 (A) or 300 (B) mg/kg)または vehicle (A)、コントロール抗体(300 mg/kg) (B)を静脈内に投与した。IL-31 投与直後から 12 時間の搔痒回数を測定し、1 時間ごとの解析結果を示した。図のポイントは 7-8 匹のマウスの搔痒回数の平均値±標準誤差を示す。

* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the vehicle group (A) or the control antibody (Ab)/ vehicle group (B) at the corresponding time point.

1-3-4. 既存薬による IL-31 誘発搔痒への影響

抗ヒスタミン剤である terfenadine を IL-31 投与の 1 時間前に腹腔内投与したところ、terfenadine は IL-31 誘発の搔痒行動を抑制しなかった(Figure 5)。従って、ヒスタミンは IL-31 により誘発される搔痒には関与しないと考えられた。同様に、dexamethasone や tacrolimus、 μ -opioid receptor antagonist である naloxone によっても IL-31 誘発の搔痒は抑制されなかった(Figure 5)。従って、既存薬とは異なる新規のメカニズムにより、IL-31 は搔痒を誘発すると考えられた。

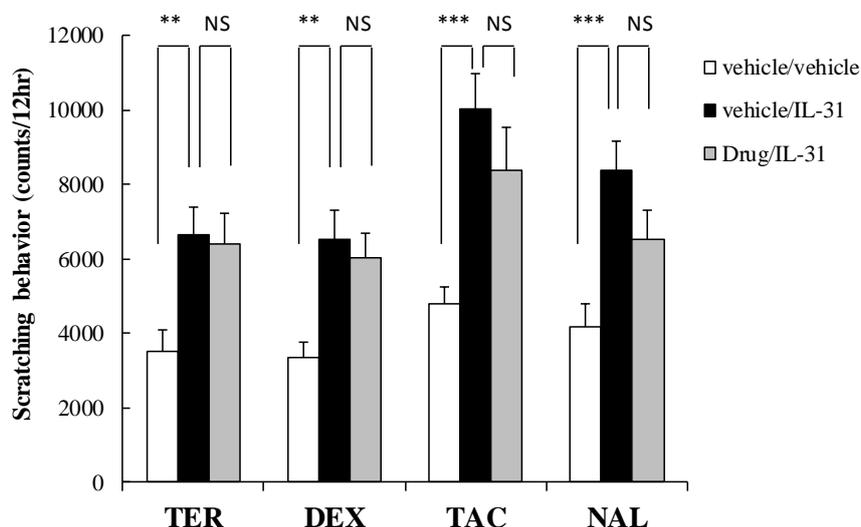


Figure 5 IL-31 誘発搔痒に対する抗ヒスタミン剤並びに dexamethasone、tacrolimus、 μ -opioid receptor antagonist の影響

Terfenadine (TER) (30 mg/kg, i.p.)または dexamethasone (DEX) (3 mg/kg, i.p.)、tacrolimus (TAC) (0.1 mg/kg, i.p.)、naloxone (NAL) (10 mg/kg, s.c.)、それぞれの薬剤の溶媒を IL-31 投与の 1 時間前に投与した。IL-31 投与直後から 12 時間の搔痒回数を測定し、12 時間のトータルカウントで示した。図のカラムは 7-8 匹のマウスの搔痒回数の平均値±標準誤差を示す。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the untreated group (vehicle/IL-31). NS, not significant.

1-4. 考察

本研究において、IL-31 誘発の搔痒を経時的に定量解析することにより、IL-31 誘発の搔痒が、投与ルートに関係なく、投与後 4-6 時間をピークとする持続的な反応であることが明らかとなった。このことから、IL-31 が搔痒を誘発するメカニズムとして、IL-31 が神経のレセプターに結合して神経を刺激するといった直接的作用とは異なるメカニズムが想定された。最近、ヒトやマウスに IL-31 を投与して誘発される搔痒を解析した結果が報告され、IL-31 誘発の搔痒はヒスタミンやセロトニンでみられるような即時反応ではなく、オンセットの遅い持続的反応であることが示された[50, 51]。本研究の結果はこれらの報告と一致する結果である。一方、IL-31 レセプターは、感覚神経が集まる後根神経節、並びにかゆみの感覚をつかさどることが知られている脊髄や皮膚の 1 次感覚神経に高い発現が認められており[23, 31]、IL-31 により即時的に誘発される搔痒行動は、感覚神経に発現する IL-31 レセプターへの IL-31 の結合により惹起される可能性がある。実際、2014 年の報告で、神経においては IL-31RA が transient receptor potential cation channel vanilloid subtype 1 と共発現しており、培養した 1 次感覚神経において Ca²⁺の放出や extracellular signal-regulated kinase 1/2 のリン酸化を IL-31 が誘発することが示されている[52]。しかしながら、IL-31 により誘発される搔痒行動のピークは投与後数時間であったこと、コンベンショナル環境下で AD 様の病態を自然発症することが知られる NC/Nga マウスにおいて 1.5 秒以上続く long-lasting scratching (LLS)が増加しており、同様の LLS が IL-31 によって投与後数時間から誘導されるとの報告がある[50]ことから、AD の病態においては、IL-31 が誘発する持続的な搔痒が重要な役割を果たしていると考えられた。

IL-31 により誘発される搔痒反応を介在している因子や機序を解析する目的で、動物モデルや臨床において搔痒抑制効果が示されている既存薬が IL-31 誘発の搔痒に影響を及ぼすか検討した。その結果、検討したどの薬剤によっても IL-31 誘発の搔痒は抑制さ

れなかったことから、IL-31 は既存薬とは異なる新規のメカニズムにより掻痒を誘発することが示唆された。そのメカニズムについて未だ詳細は明らかになっていないが、想定される作用機序として、IL-31 が掻痒誘発に寄与するセカンドメディエーターを誘導する可能性が考えられた。例えば、IL-31 がヒトのケラチノサイトに作用して vascular endothelial growth factor (VEGF)を誘導することが報告されており [53]、また最近、抗 VEGF 抗体である bevacizumab が痒疹のかゆみに奏効することが示された [54] ことから、IL-31 が誘導するセカンドメディエーターの候補の 1 つに VEGF があげられるであろう。また、VEGF 以外にも、様々な刺激に応答してケラチノサイトから炎症や掻痒に寄与するメディエーターが放出されることが知られており [55]、IL-31 レセプター発現部位の 1 つであるケラチノサイトに IL-31 が作用してセカンドメディエーターを放出する可能性も考えられる。今後の解析が期待される。

本論

第2章 IL-31 の皮膚に対する作用

2-1. 背景・目的

IL-31 レセプターの発現は、感覚神経や肥満細胞、単球、マクロファージの他に、皮膚表皮細胞に高い発現が認められることが報告されている[56]。AD 患者の表皮細胞ではより高い IL-31RA の発現が認められており[35]、AD 患者の皮膚では、IL-31 への反応性が亢進している可能性がある。また、第 1 章の IL-31 を持続投与した実験において、IL-31 の投与終了後も数日間搔痒行動が持続したことから(Figure 1A)、IL-31 が皮膚のバリア機能に影響して質的な変化を誘導し、AD の病態や慢性の搔痒に寄与している可能性が考えられた。

これまでに、ヒトケラチノサイトを用いた *in vitro* の試験において、IL-31 レセプターの発現が細胞の分化や INF- γ 刺激により変化すること[56]、IL-31 刺激によりケラチノサイトからのケモカインや VEGF 産生が増加すること[53]、IL-31 がケラチノサイトの分化・増殖を阻害すること[37]が報告されているが、それらの作用と AD 病態との関連は明確ではない。そこで本章では、IL-31 を投与したマウスの皮膚、並びに IL-31 で刺激したヒトケラチノサイトの解析を行い、AD 病態における IL-31 の役割について検討した。

2-2. 材料・方法

2-2-1. マウス

5-6 週令の雌性 BALB/c マウスを日本チャールスリバーより購入し、6-10 週令で使用した。マウスは設定照明時間が 12 時間（午前 7 時～午後 7 時）、設定温度が 20-26°C、設定湿度が 35-75%の飼育環境で飼育した。固形飼料および飲水は自由接種とした。

2-2-2. IL-31 持続投与による皮膚病変の評価

マウス IL-31 の持続投与は、1-2-6.記載の方法で実施した。投与後 14 日目に麻酔下放血により安楽死処置を行い、頸背部および側腹部の皮膚を病理組織学的解析用に採材した。皮膚は 10%ホルマリンで固定後パラフィンに包埋し、厚さ約 5 μm に薄切してヘマトキシリン・エオシン染色を行った。単細胞壊死および有糸分裂像を示す細胞の評価は、一組織あたり 6-21 視野を 40 倍の対物レンズで顕微鏡観察し、1 視野あたりの細胞数として示した。

2-2-3. HaCaT 細胞の IL-31RA 発現解析

ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞は Dr. Norbert Fusenig より供与いただいた。HaCaT 細胞は 10% FBS 含有 DMEM (Invitrogen)培地を用い、播種した翌日に 0 または 100 ng/mL の recombinant human IFN- γ (hIFN- γ) (Peprotech)を含む FBS フリー培地に交換して一夜培養した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞を溶解し、RNA を精製した。SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)を用いて RNA から cDNA を合成後、Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)と TaqMan Gene Expression Assays, IL-31RA probe (Applied Biosystems, Hs00371172_m1)または TaqMan Gene Expression Assays, GAPDH

probe (Applied Biosystems, Hs99999905_m1) を用いて IL-31RA および GAPDH 測定用にそれぞれ反応液を調製した。ABI Prism 7900HT により、50°C で 2 分、95°C で 2 分保温の後、94°C で 15 秒、60°C で 30 秒のサイクルで 40 回の PCR を行った。IL-31RA の発現量は、内部標準の GAPDH 量で補正した値を算出し、無刺激での発現量を 1 としたときの相対値として示した。

2-2-4. IL-31 による HaCaT 細胞のアポトーシス誘導

ルミノクプレート(96-well flat bottom plate, Thermo Fisher Scientific)に、 1×10^4 cells/well で HaCaT 細胞を播種し、CO₂インキュベーターに静置した。翌日、FBS フリーの培地に交換し、更に一夜培養した後、0-100 ng/mL の hIFN- γ と 0-500 ng/mL の human IL-31 (hIL-31) (R&D systems) を含む FBS フリーの培地に交換し、CO₂インキュベーターに静置した。4日間培養後、CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) または CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて蛍光または発光強度を測定し、cell viability の指標とした。また、Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いて発光強度を測定し、caspase 3/7 活性とした。Caspase-Glo 3/7 Assay を用いて得られた発光強度を CellTiter-Blue Cell Viability Assay または CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて得られた蛍光又は発光強度で除することにより caspase 3/7 活性を補正し、相対値として表した。

2-3. 結果

2-3-1. IL-31 持続投与による脱毛の発症

IL-31 を osmotic pump を用いて持続投与した結果、投与 2 日目頃より脱毛がみられ、14 日目には全身性に脱毛が認められた(Figure 6)。

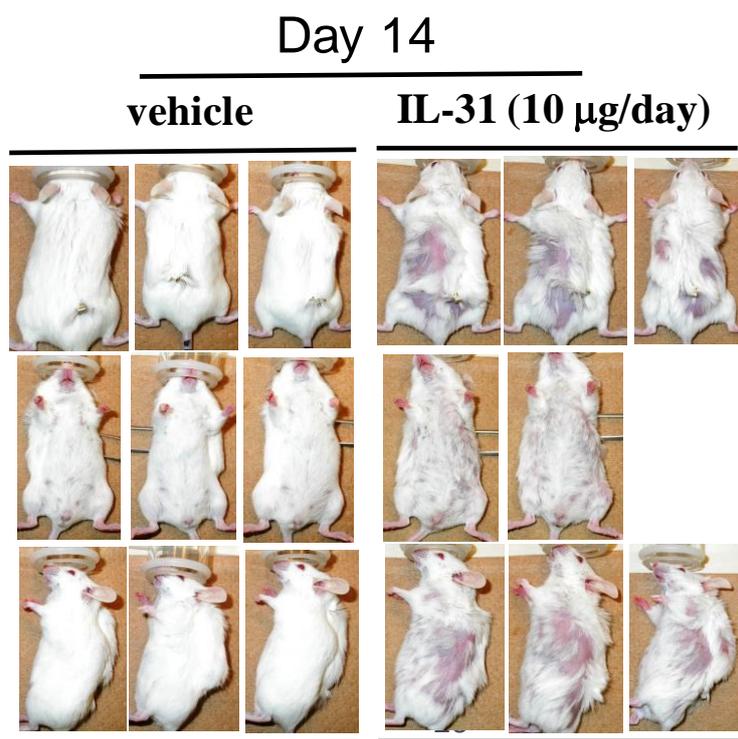


Figure 6 IL-31 投与により誘発された脱毛

IL-31 を 0 (vehicle) または 10 μ g/24 μ L/day で osmotic pump を用いて持続投与した。投与後 14 日目の写真を示す。

2-3-2. IL-31 持続投与により認められる皮膚病変の解析

Osmotic pump を用いて IL-31 を持続投与したマウスの 14 日目の皮膚（頸背部および側腹部）について病理組織学的解析を行った。その結果、IL-31 を投与したマウスの皮膚では、顕著な表皮の肥厚と皮脂腺細胞の増加が認められた(Figure 7)。また、肥厚した表皮では、単細胞壊死や有糸分裂像を示す細胞が顕著に増加していた(Figure 8)。一方で、炎症性細胞の浸潤は認められなかった(Figure 7)。

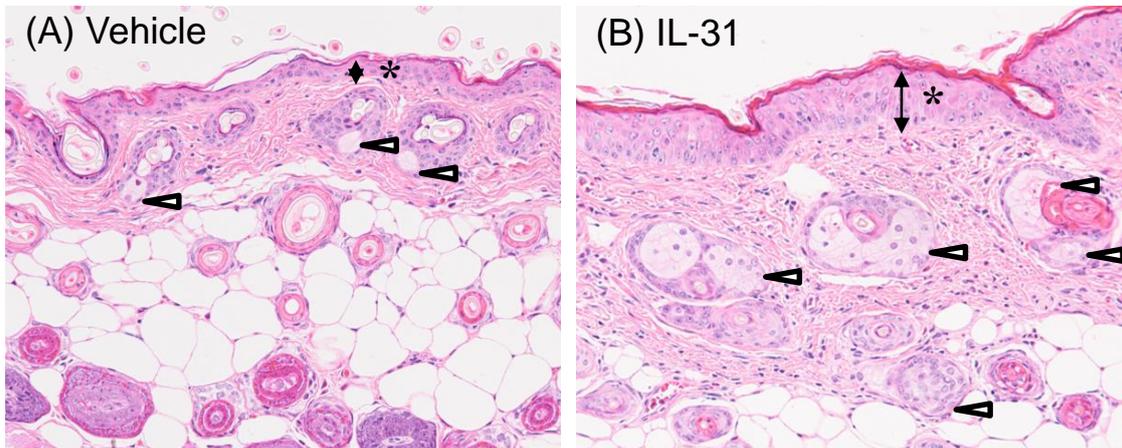


Figure 7 IL-31 投与マウスの皮膚の組織学的解析

Osmotic pump により 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ で IL-31 を持続投与し、投与 14 日目の頸背部および側腹部の皮膚について病理組織学的解析を行った。Vehicle 投与群(A)および IL-31 投与群(B)それぞれの代表的な写真を示した。Vehicle 投与群(A)と比較して IL-31 投与群(B)では表皮の肥厚(*)と皮脂腺細胞の増加（白矢頭）が認められた。

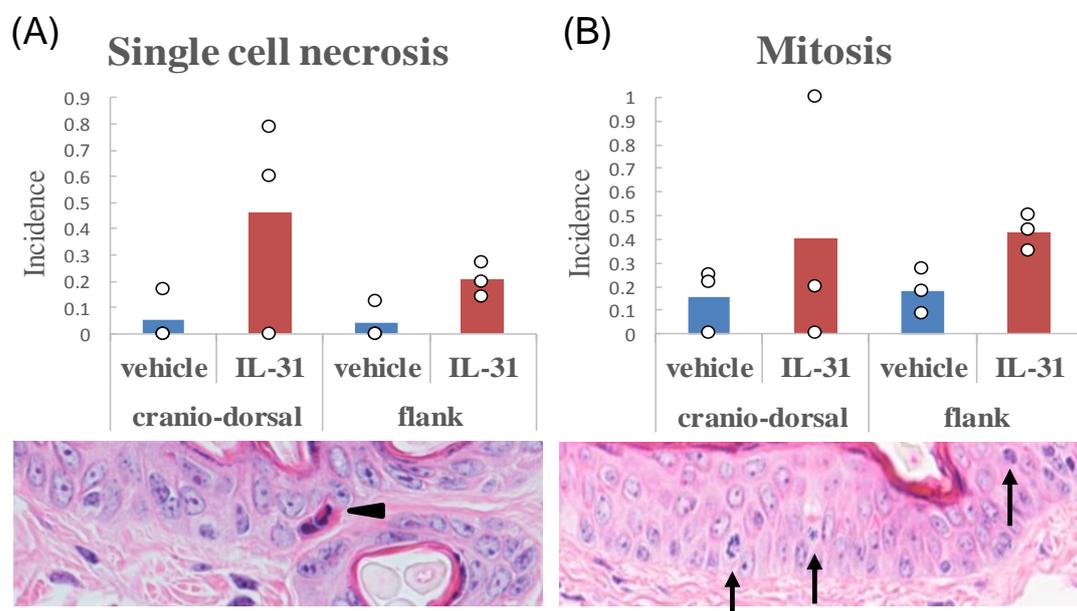


Figure 8 IL-31による表皮ターンオーバーの促進

IL-31を14日間持続投与したマウスの皮膚では、vehicle投与群と比較して表皮における単細胞壊死（黒矢頭(A)）や有糸分裂像（矢印(B)）を示す細胞の増加が認められた。図のプロットは1視野あたりの細胞数を示し、カラムは3匹のマウスの平均値を示す。

2-3-3. IL-31によるケラチノサイトの caspase 3/7 活性の誘導

ケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞を 100 ng/mL の hIFN- γ で一夜刺激することにより、IL-31RA の発現が誘導された(Figure 9)。

また、HaCaT 細胞を hIFN- γ 存在下 4 日間培養することにより、caspase 3/7 活性が誘導された(Figure 10A)。さらに hIL-31 は、hIFN- γ と共刺激することにより、caspase 3/7 活性を相乗的に誘導した(Figure 10A, 10B)。

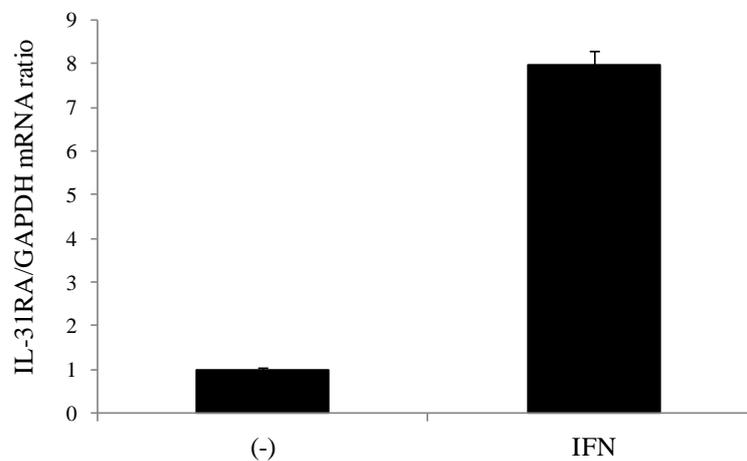
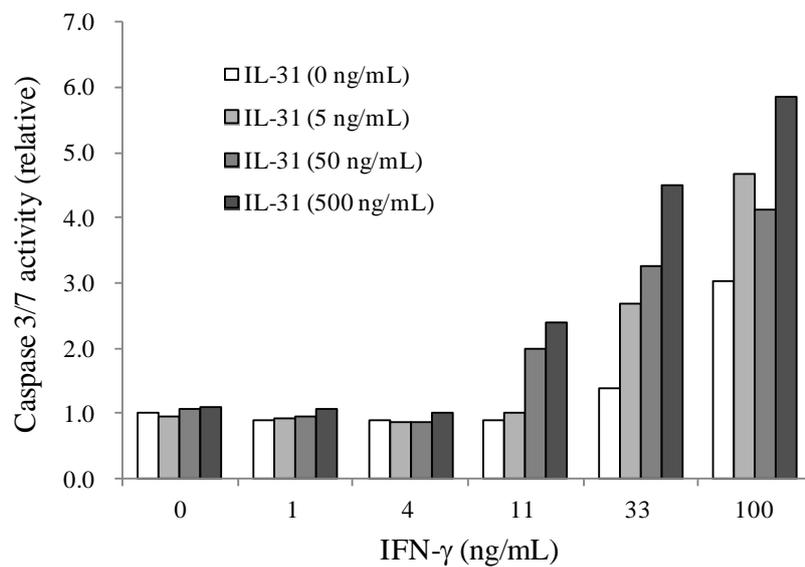


Figure 9 HaCaT 細胞における IL-31RA mRNA の発現

hIFN- γ (100 ng/mL) で刺激することにより、HaCaT 細胞の IL-31RA 発現が誘導された。図のカラムは、無刺激(-)の IL-31RA 発現量を 1 とした時の相対値 (3 ウェルの平均値 \pm 標準偏差) を示す。

(A)



(B)

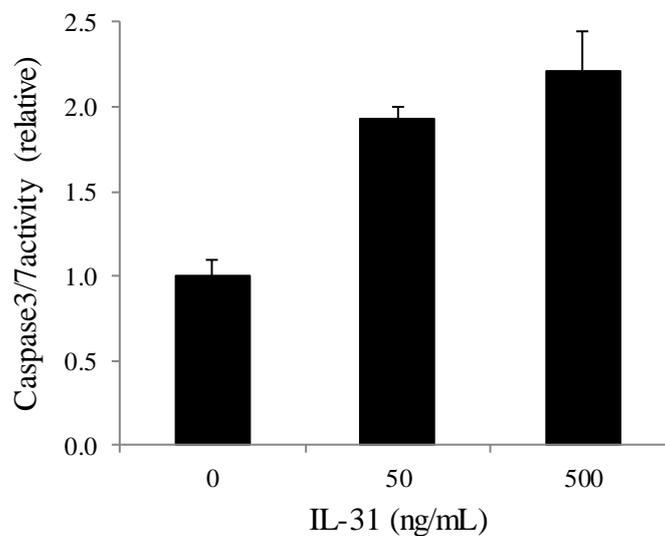


Figure 10 IL-31によるHaCaT細胞のcaspase 3/7活性の誘導

0-100 ng/mL (A)または100 ng/mL (B)のhIFN- γ 共存下、hIL-31によりHaCaT細胞を4日間刺激した。(A)図カラムは無刺激のcaspase 3/7活性を1とした時の相対値を示す。(B)図カラムはIL-31 (0 ng/mL)のcaspase 3/7活性を1とした時の相対値(3ウェルの平均値 \pm 標準偏差)を示す。

2-4. 考察

IL-31を持続投与したマウスの皮膚では、表皮の肥厚と皮脂腺細胞の増加が認められ、肥厚した表皮では単細胞壊死や有糸分裂像を示す細胞が顕著に増加していた。従って、IL-31を投与したマウスの皮膚は、ターンオーバーが早まり、未分化な角質層を形成しやすい状態であることが示唆された。さらに、ケラチノサイト細胞株を用いた検討において、IL-31がIFN- γ 共存下caspase 3/7活性を相乗的に誘導することが明らかとなった。一方Cornelissenらは、IL-31がケラチノサイトの分化を阻害し、セルサイクルアレストを起こして細胞増殖を抑制すること、IL-31レセプター強制発現HaCaT細胞を用いた3次元培養においてIL-31刺激により表皮が薄くなり、表皮構造の乱れやフィラグリン発現の低下がみられることを報告している[37]。ケラチノサイトにおけるIL-31レセプターの発現がケラチノサイトの分化段階により異なることが報告されている[56]ため、IL-31レセプター強制発現HaCaT細胞を用いた既報はケラチノサイトの分化段階のある局面のみを抽出解析した結果といえる。表皮に傷害が生じるとその防衛反応として、角質細胞のターンオーバーが促進され、皮脂腺からは皮脂が分泌されて角質層を覆うことにより水分蒸発を防ぐことが知られている。IL-31によって惹起されたフィラグリンに富む顆粒層・角質層細胞の分化・増殖阻害やアポトーシス誘導が引き金となって、表皮の傷害に対する防御反応として表皮のターンオーバーが促進された可能性が考えられた。また、表皮のターンオーバーの規則性が失われた状態が慢性化すると、未分化な角質層を形成しやすくなり、さらにバリア機能が低下するという悪循環に陥る。このようにして、IL-31は表皮のバリア機能を低下させ、外界からの様々な刺激物質の生体内への侵入を容易にし、さらなる症状悪化を招く要因となっている可能性がある。

急性および慢性炎症時には、皮膚に浸潤したリンパ球の産生するIFN- γ の作用により角質細胞上のFas分子の発現が誘導され、アポトーシスを引き起こすことが知られている[57-59]。また、ADの病変皮膚において、IFN- γ 発現リンパ球の増加と相関して表皮

のcaspase-3 cleavageが増加していることが報告されている[60]。角質細胞は互いにデスモソームと呼ばれる結合装置で強く結合しており、角質細胞のアポトーシスによってスポンジ様の水泡形成を引き起こし、海綿状態と呼ばれるADに特徴的な病理変化をもたらして湿疹症状を呈すると考えられている[61]。HaCaT細胞をhIFN- γ 存在下4日間培養することによりcaspase 3/7活性の誘導が認められ、そこにhIL-31を共存させることによって、caspase 3/7活性が相乗的に誘導されることがわかった。従って、ADの病態では、IL-31はIFN- γ と協調して、アポトーシス誘導など病態の悪化に寄与している可能性が示唆された。

本論

第3章 皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果

3-1. 背景・目的

先述のように、AD 患者サンプルにおける IL-31 の発現と臨床スコアが相関する[25]などの報告から、AD の病態における IL-31 の関与が示唆されている。またマウスにおいても、IL-31 を過剰発現させたトランスジェニックマウスが AD 様の皮膚炎や著しい搔破行動を示すこと[20]、さらに、本研究の第 1 章および第 2 章の実験結果から、AD 病態における皮膚炎や搔痒発生への IL-31 の関与が示唆された。しかしながら、IL-31 のシグナルをブロックすることにより、AD の病態に治療効果が得られるかについては明らかになっていない。そこで本章では、IL-31 レセプター中和抗体が皮膚炎の病態に対し治療効果を示すか検討した。検討には、IL-31 レセプター中和抗体による効果が抗原刺激による病態のオンセットに寄与しているのか、あるいは、慢性の病態に伴う持続的搔痒や皮膚のバリア機能障害を軽減しているのかを調べる目的で、2 つの皮膚炎モデルを使用した。モデルの 1 つは、急性の接触性皮膚炎のモデルで、ハプテンを 2 回だけ耳に塗布して感作・誘導する系である。感作抗原特異的に惹起される T 細胞依存性の免疫応答による遅延型アレルギーのモデルで、持続的な搔痒行動は認められない[62]。もう 1 つは慢性の AD モデルで、ハプテンを繰り返し塗布することにより誘導するモデルである。本モデルでは、肥満細胞が関与する即時反応が惹起され、皮膚のびらんや癬痕、痂皮形成といった皮膚炎の悪化と、恒常的な搔痒行動が認められるなど、AD 様の病態を示すことが報告されている[49, 63, 64]。ハプテンで誘導する 2 つの皮膚炎モデルを用いて、IL-31 レセプター中和抗体による皮膚炎の治療効果を評価するとともに、その作用機序について考察した。

3-2. 材料・方法

3-2-1. マウス

5週令の雌性 BALB/c マウスを日本チャールスリバーより購入し、6-8週令で使用した。マウスは設定照明時間が12時間（午前7時～午後7時）、設定温度が20-26℃、設定湿度が35-75%の飼育環境で飼育した。固形飼料および飲水は自由摂取とした。

3-2-2. 急性の接触性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の評価

50 μ L の 7%塩化ピクリル（ナカライ）溶液（エタノール／アセトン；3：1 v/v）をマウスの毛刈りした腹部皮膚に塗布した。感作5日後に、20 μ L の 1%塩化ピクリル溶液（アセトン／オリーブオイル；1：4 v/v）を片方の耳に塗布して誘発した。IL-31 レセプター中和抗体である BM095（1-2-3.参照）は感作、誘発のそれぞれ1日前に 10 mg/kg を静脈内に投与した。耳の厚さは、キャリブレートされた dial thickness gauge（Mitutoyo）を用いて、塩化ピクリルによる誘発の直前と誘発後 24 時間、48 時間に測定した。塩化ピクリルの塗布により腫脹した耳の厚さの程度を、vehicle を塗布したもう一方の耳の厚さと比較することにより評価した。感作しなかったマウスに塩化ピクリルによる誘発を同様に行い、塩化ピクリルの感作・誘発により成立する病態（陽性対照）を確認するための陰性対照とした。

3-2-3. 慢性のアトピー性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の評価

マウスの耳に塩化ピクリルを繰り返し塗布することによりモデルを作製した。具体的には、20 μ L の 0.5%塩化ピクリル溶液（アセトン／オリーブオイル；1：4 v/v）を右耳に塗って感作し、その8日後（Day 0）から 20 μ L の 0.25%塩化ピクリル溶液（アセトン／オリーブオイル；1：4 v/v）を1日おきに6週間、Day 44 まで右耳に繰り返し

塗布した。BM095の予防効果評価群には、感作前日(Day -9)より、10 mg/kgのBM095を週1回、腹腔内に投与した。BM095の治療効果評価群には、病態成立後のDay 20より、10 mg/kgのBM095を週1回、腹腔内に投与した。病態コントロール群には、Day -9より溶媒を週1回、腹腔内に投与した。

BM095の皮膚炎に対する効果は、耳の厚さと皮膚炎スコアにより評価した。耳の厚さは、キャリブレートされた dial thickness gauge を用いて、右耳の厚さを塩化ピクリル塗布前に経時的に測定した。皮膚炎のスコアは、出血(0; なし、1; あり)、乾燥・痂皮形成(0; なしまたは軽微、1; 中等度または重度)、腫脹(0; <0.6 mm、1; ≥ 0.6 mm)の3項目により、塩化ピクリル塗布前に評価した。加えて、Day 42における痂皮形成の程度を、-; なし、+; 軽微、++; 中等度、+++; 重度、の4グレードでスコア化して評価した。Day 44に、塩化ピクリル塗布4時間後に麻酔下腹部大動脈より全採血を行い、得られた血清中のIgEおよびIgG1, IgG2bのレベルをELISAにより測定した。また、右耳を採材して組織学的評価を行った。採材した耳を長径方向に切断し、10%ホルマリン溶液で固定後パラフィンに包埋して約5 μm に薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

3-2-4. 統計

統計学的解析にはSAS version 8.02 (SAS 前臨床パッケージ)を使用した。耳の腫脹および血清イムノグロブリン(IgE, IgG1, IgG2b)レベルにおけるBM095の効果の評価には、Student's t testを用いた。皮膚炎スコアにおけるBM095の効果の評価には、Wilcoxon's testを用いて解析した。

3-3. 結果

3-3-1. 急性の接触性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果

塩化ピクリル感作後、再び塩化ピクリルを塗布して誘導することにより、誘導のみを行った陰性対照群(Negative control)と比較して、耳の腫脹が認められた(Positive control)(Figure 11)。BM095 は、塩化ピクリルによる感作・誘発のそれぞれ 1 日前に 10 mg/kg を投与したが、誘発後 24 時間および 48 時間でみられる耳の腫脹に BM095 は効果を示さなかった。

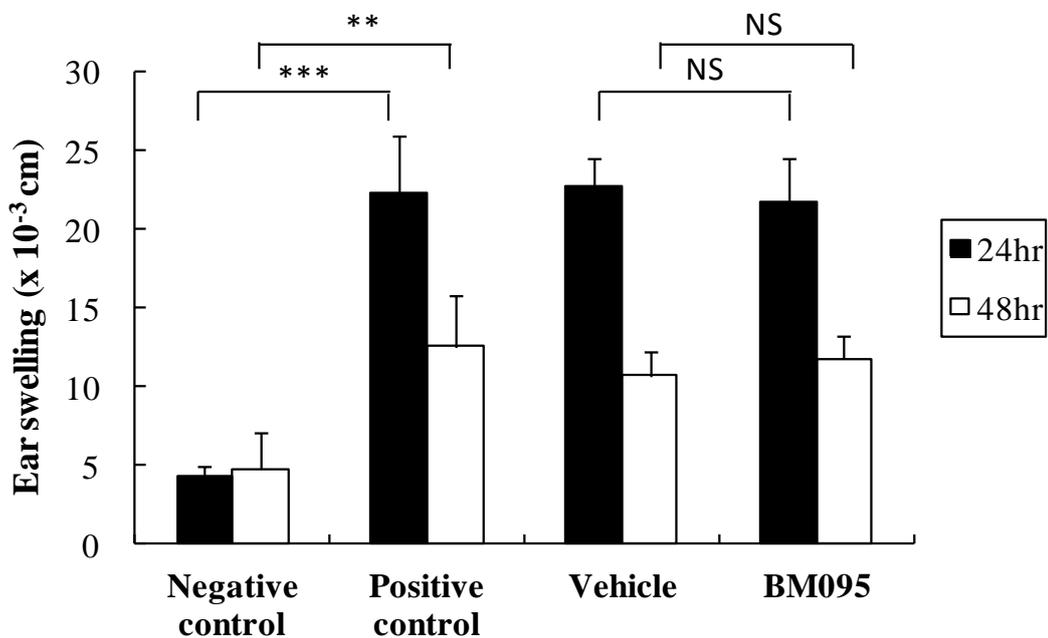


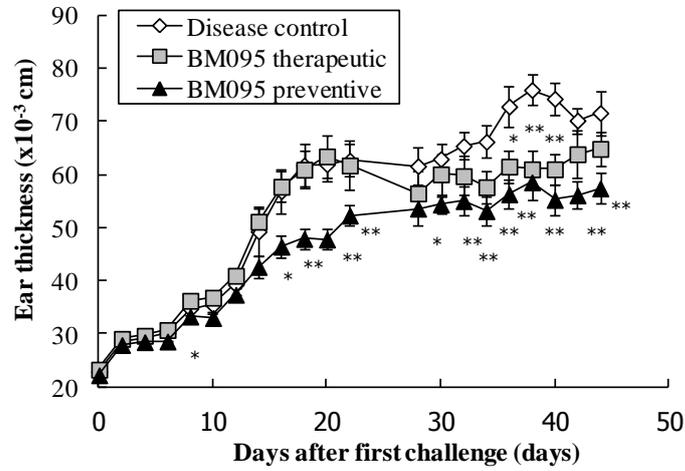
Figure 11 急性の接触性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果

塩化ピクリルの感作・誘発により腫脹した耳の厚さの程度を、vehicle で誘発したもう片側の耳の厚さと比較することにより評価した。誘発後 24 時間および 48 時間の耳の腫脹を示した。図のカラムは 5-6 匹のマウスの平均値±標準誤差を示す。**p<0.01, ***p<0.001 at the corresponding time point. NS, not significant.

3-3-2. 慢性のアトピー性皮膚炎モデルにおける IL-31 レセプター中和抗体の効果

塩化ピクリルの塗布を繰り返すことにより、耳の腫脹が次第に悪化した(Figure 12A)。加えて、びらんや癬痕、出血を伴う皮膚炎の悪化が認められた(Figure 12B, 13)。BM095 を予防的に投与した群では、Day 16 から耳の腫脹および皮膚炎スコアの増加が有意に軽減された(Figure 12A, 12B)。また、Day 42 における痂皮形成の程度を 4 グレードで評価したところ、BM095 投与群では、病態コントロール群に比べて有意に病態が軽減した(Figure 13)。さらに、BM095 は予防効果を示すだけでなく、病態成立後 Day 20 からの投与においても耳の腫脹と皮膚炎スコアを有意に抑制し、治療効果を示した(Figure 12A, 12B)。Day 44 の病変部の病理組織学的解析では、病変部の表皮において肥厚やびらん、潰瘍、痂皮、並びに真皮や皮下組織における炎症性細胞浸潤が認められた。びらん、潰瘍、痂皮の形成は BM095 投与群で軽減されたが、表皮の肥厚や炎症性細胞浸潤の程度は両群で差はなかった(Figure 14A)。また、Day 44 時点の血中 IgE および IgG1, IgG2b のレベルは、BM095 投与群と非投与群で差は認められなかった(Figure 14B)。

(A)



(B)

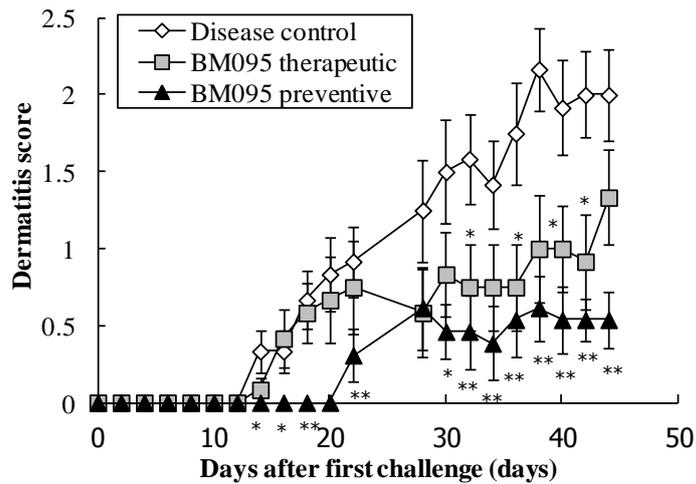


Figure 12 慢性のADモデルにおけるIL-31レセプター中和抗体の効果(1)

塩化ピクリルを繰り返し塗布することにより惹起した耳の腫脹(A)および皮膚炎スコアの増悪(B)に対し、BM095 予防投与群 (Day -9 より週 1 回投与) および BM095 治療投与群 (Day20 より週 1 回投与) が軽減効果を示した。図のポイントは 12-13 匹のマウスの平均値±標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the disease control group at the corresponding time point.

Grade	Group		
	Disease Control (n=12)	BM095 Therapeutic (n=12)	BM095 Preventive (n=13)
-	1	1	6
+	2	8	5
++	7	2	2
+++	2	1	0

**

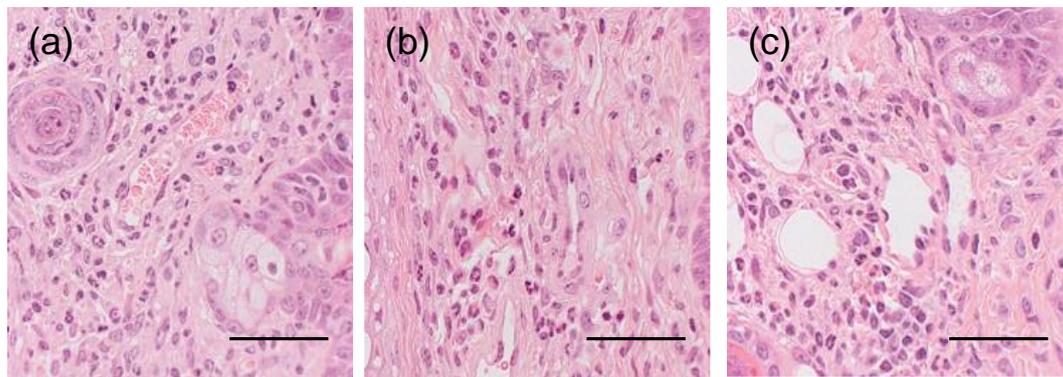
Grade



Figure 13 慢性のADモデルにおけるIL-31レセプター中和抗体の効果(2)

Day 42における痂皮形成の程度を、- ; なし、+ ; 軽微、++ ; 中等度、+++ ; 重度、の4グレードでスコア化して評価した。写真は、それぞれのグレードの1例を示す。 **p<0.01 versus the disease control group.

(A)



(B)

	Disease Control (n=12)	BM095 Therapeutic (n=12)	BM095 Preventive (n=13)
IgE ($\mu\text{g/mL}$)	10.8 ± 2.2	9.2 ± 1.9	9.9 ± 1.7
IgG1 (mg/mL)	5.5 ± 1.1	3.4 ± 0.4	3.4 ± 0.5
IgG2b ($\mu\text{g/mL}$)	173.2 ± 31.0	129.8 ± 14.5	119.4 ± 18.6

Figure 14 慢性のADモデルにおけるIL-31レセプター中和抗体の効果 (3)

Day 44における塩化ピクリル塗布4時間後の耳の組織学的評価(A)と血中IgE, IgG1, IgG2b濃度(B)。画像(A)は、病態コントロール群(a)、BM095治療投与群(b)、BM095予防投与群(c)のそれぞれ代表的な1例の耳介真皮における炎症性細胞浸潤を示す(ヘマトキシリン・エオシン染色、Bar: 50 μm)。表(B)は、12-13匹のマウスのIgE, IgG1, IgG2b濃度の平均値 \pm 標準誤差を示す。

3-4. 考察

Grimstad らは、NC/Nga マウスを用いた AD 自然発症モデルにおいて抗 IL-31 中和抗体は掻痒を抑制するものの皮膚炎に対しては効果を示さないと報告している[65]。臨床および非臨床の様々な報告から AD 病態への IL-31 の関与が示唆されているが、IL-31 のシグナルをブロックすることにより AD の病態に対し治療効果を有するかは明らかではなかった。本研究において、慢性の AD モデルにおいて IL-31 レセプター中和抗体が皮膚炎の病態を軽減すること、さらには病態成立後に抗体の投与を開始しても治療効果を示すことを初めて明らかにし、IL-31 レセプター中和抗体が AD の掻痒および皮膚炎の治療における新規の治療オプションとなる可能性を示した。

検討に用いたハプテン繰り返し塗布により誘導する慢性の AD モデルでは、先述のように、皮膚のびらんや癬痕、痂皮形成といった皮膚炎の悪化と、恒常的な掻痒行動が認められ、AD 患者に類似した病態を示すことが報告されている[49, 63, 64]。また、病態の発症率がよく、オンセットをコントロール可能なモデルで、薬効の評価に適した均一な病態の作製が可能であった。本モデルにおいて、IL-31 レセプター中和抗体は皮膚炎の悪化を軽減したが、急性の接触性皮膚炎のモデルにおいては、ハプテンの感作・誘発により惹起された耳の腫脹に効果を示さなかった。従って、IL-31 レセプター中和抗体は、感作抗原特異的に惹起される T 細胞依存性の免疫応答の阻害に寄与しているのではなく、慢性の病態に伴う持続的掻痒や皮膚のバリア機能障害を軽減することにより AD の病態に治療効果を示したと考えられた。実際に、慢性の AD モデルにおいて、患部への炎症性細胞浸潤や血中の IgE, IgG1, IgG2b レベルでは、IL-31 レセプター中和抗体投与による有意な変化が認められなかった。また、持続的な掻痒を伴う NC/Nga マウスの自然発症モデルでは IL-31 mRNA 発現の増加がみられるが、持続的掻痒を伴わない NC/Nga マウスの 2,4,6-trinitrochlorobenzene 誘発モデルでは IL-31 mRNA 発現の増加が認められないという報告[28]もあり、本研究の結果を支持する。

第1章および第2章で得られた結果から、AD病態に対するIL-31レセプター中和抗体の治療効果は、IL-31が関与する掻痒誘発並びに皮膚バリア機能障害を抑制することによって得られたと考えられる。慢性のADモデルとして本研究に使用したハプテンを繰り返し塗布するモデルでは、経時的に慢性の掻痒行動を評価するのは困難であった。ハプテンだけでなくその溶媒を塗布することによっても非特異的に掻痒行動が惹起されることが報告されており[64]、ハプテン塗布の間隔が短い本モデルにおいて、病態の初期に非特異的な行動を排除して慢性の掻痒を抽出解析するのは困難と考えられた。また、病態の後期には、BM095投与群では皮膚炎の悪化が有意に抑制されており、ハプテン刺激により誘発される掻破行動に違いが生じるのは当然の結果といえる。上記の理由で、本研究では皮膚炎モデルにおける掻痒の解析は実施しなかったが、持続的掻痒を誘発する慢性のADモデルにおいて、IL-31レセプター中和抗体投与群では掻破痕とも言える患部のびらんや潰瘍、痂皮形成が有意に抑制されていたことから、掻破行動の抑制が示唆された。また我々は、ダニ誘発のADモデルにおいて、IL-31レセプター中和抗体が掻痒を抑制することを確認している（投稿準備中）。

先述のconventional環境下で飼育することによりAD様の皮膚炎を自然発症するNC/Ngaマウスでは、皮膚炎発症に先立ち掻痒行動が始まる時期からIL-31 mRNAの発現亢進が観察されることから、IL-31は皮膚炎発症のごく初期のステージ、特に痒みの発症に関与していることが示唆されている[27]。しかしながら、掻痒反応に加えて、第2章で明らかにしたようにIL-31による皮膚バリア機能障害も皮膚炎発症の初期ステージから重要な役割を果たしている可能性がある。今後さらなる解析により、IL-31の作用機序や生体における役割がさらに明らかになることが期待される。

総括

AD は、掻痒のある湿疹を主病変とする慢性炎症性疾患であり、角層の異常に起因する皮膚の乾燥とバリア機能障害を伴い、抗原物質に対する免疫反応やその他の機械的刺激が引き金となって発症する。また、掻破－皮膚炎悪化－掻痒悪化の悪循環は *itch-scratch-cycle* と呼ばれ、病態の慢性化につながる事が知られている。従って、皮膚のバリア機能の維持および炎症への対処、並びに掻痒のコントロールが、AD の QOL 向上と皮膚炎改善のために重要であるといえる。

最近、IL-31が掻痒誘発因子として注目されており、この10年程の間に AD の病態における IL-31の関与が精力的に調べられている。しかしながら、IL-31が AD の *itch-scratch-cycle* および病態の慢性化にどのように関与し、機能しているかは不明であり、さらに、IL-31のシグナルをブロックすることにより AD の病態に治療効果を有するかについては明らかではなかった。そこで本研究では、IL-31をマウスに投与した時に誘発される掻痒、並びに皮膚病変の解析を行い、AD 病態における IL-31の作用機序について検討した。また、IL-31レセプター中和抗体の慢性 AD モデルにおける治療効果についても評価した。

IL-31をマウスに投与した時に誘発される掻痒の解析では、投与ルート（静脈内、皮下、皮内）に関係なく、IL-31により投与後4-6時間をピークとする持続的な掻痒行動が誘発された。従って IL-31は、神経に発現するレセプターに結合して神経を刺激するといった直接的機序とは異なる別の作用を介して掻痒を誘発する可能性が示唆された。そこで、IL-31による掻痒誘発を介在する因子や機序を解析する目的で、動物モデルや臨床において掻痒抑制効果が示されている既存薬による影響を調べた。その結果、IL-31誘発の掻痒はこれら既存薬によって抑制されなかったことから、IL-31誘発の掻痒には、既存薬とは異なる新規のメカニズムが介在することが明らかとなった。

次に、IL-31レセプターが発現する皮膚に対するIL-31の作用を調べた。IL-31を持続投与したマウスの皮膚では、表皮の肥厚と皮脂腺細胞の増加が認められ、肥厚した表皮では単細胞壊死や有糸分裂像を示す細胞が顕著に増加していた。従って、IL-31投与により、皮膚のターンオーバーが早まり、未分化な角質層を形成しやすい状態となることが示唆された。さらに、ケラチノサイト細胞株を用いた検討において、IL-31がIFN- γ 共存下 caspase 3/7活性を誘導することが明らかとなった。急性および慢性炎症時の皮膚では、IFN- γ の作用によりアポトーシスが惹起されることが知られており、IL-31はIFN- γ と協調して、皮膚のバリア機能低下に寄与している可能性が示唆された。

最後に、皮膚炎モデルにおけるIL-31レセプター中和抗体の効果を調べた。IL-31レセプター中和抗体は、急性の接触性皮膚炎モデルにおける耳の腫脹には効果を示さなかったが、慢性のADモデルにおいて病態悪化を有意に軽減し、さらには、病態成立後に投与した場合にも皮膚炎の治療効果を示した。

以上、本研究の結果より、IL-31はADの掻痒および皮膚炎の治療における新規の治療ターゲットとなる可能性があり、IL-31レセプターのブロックが現在の治療では十分に掻痒のコントロールができない患者の治療オプションになることが示唆された。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました武蔵野大学薬学部薬物療法学研究室 山下直美教授に深く感謝致しますと共に、謹んで御礼申し上げます。

本論分の審査にあたり、専門的な観点からご助言とご討論を賜りました武蔵野大学薬学部の諸先生方に深く感謝いたしますと共に、心より御礼申し上げます。

本研究は中外製薬株式会社 富士御殿場研究所において行われたもので、本研究にあたりご支援、ご協力を頂きました研究員の皆様に心から感謝いたしますと共に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Williams, H.C., et al., *The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. III. Independent hospital validation.* Br J Dermatol, 1994. **131**(3): p. 406-16.
2. Hanifin, J.M., *Diagnostic criteria for atopic dermatitis: consider the context.* Arch Dermatol, 1999. **135**(12): p. 1551.
3. De Benedetto, A., et al., *Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects?* J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 14-30.
4. De Benedetto, A., et al., *Tight junction defects in patients with atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 773-86 e1-7.
5. Cork, M.J., et al., *Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 1892-908.
6. Mildner, M., et al., *Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model.* J Invest Dermatol, 2010. **130**(9): p. 2286-94.
7. Sandilands, A., et al., *Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 9): p. 1285-94.
8. Sandilands, A., et al., *Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema.* Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 650-4.
9. Weidinger, S., et al., *Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis.* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 724-6.
10. Romeo, S.P., *Atopic dermatitis: the itch that rashes.* Pediatr Nurs, 1995. **21**(2): p. 157-63.
11. Koblenzer, C.S., *Itching and the atopic skin.* J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(3 Pt 2): p. S109-13.
12. Stander, S. and M. Steinhoff, *Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview.* Exp Dermatol, 2002. **11**(1): p. 12-24.
13. Zuberbier, T., et al., *Patient perspectives on the management of atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 226-32.
14. Su, J.C., et al., *Atopic eczema: its impact on the family and financial cost.* Arch Dis Child, 1997. **76**(2): p. 159-62.
15. Handwerker, H.O., C. Forster, and C. Kirchhoff, *Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli.* J Neurophysiol, 1991. **66**(1): p. 307-15.

16. Baron, R., et al., *Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia*. *Neuroreport*, 2001. **12**(16): p. 3475-8.
17. Konishi, H., et al., *IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11340-5.
18. Novak, N., T. Bieber, and D.Y. Leung, *Immune mechanisms leading to atopic dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(6 Suppl): p. S128-39.
19. Steinhoff, M., et al., *Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(8): p. 1705-18.
20. Dillon, S.R., et al., *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 752-60.
21. Neis, M.M., et al., *Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(4): p. 930-7.
22. Paus, R., et al., *Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1174-86.
23. Sonkoly, E., et al., *IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2): p. 411-7.
24. Bilsborough, J., et al., *IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2): p. 418-25.
25. Gambichler, T., et al., *Gene expression of cytokines in atopic eczema before and after ultraviolet A1 phototherapy*. *Br J Dermatol*, 2008. **158**(5): p. 1117-20.
26. Schulz, F., et al., *A common haplotype of the IL-31 gene influencing gene expression is associated with nonatopic eczema*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(5): p. 1097-102.
27. Takaoka, A., et al., *Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis*. *Eur J Pharmacol*, 2005. **516**(2): p. 180-1.
28. Takaoka, A., et al., *Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic-like dermatitis*. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(3): p. 161-7.
29. Metz, M., S. Grundmann, and S. Stander, *Pruritus: an overview of current concepts*. *Vet Dermatol*, 2011. **22**(2): p. 121-31.
30. Dreuw, A., et al., *Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(34): p. 36112-20.
31. Bando, T., et al., *Complete overlap of interleukin-31 receptor A and oncostatin M receptor beta in the adult dorsal root ganglia with distinct developmental expression*

- patterns*. Neuroscience, 2006. **142**(4): p. 1263-71.
32. Yamaoka, K., et al., *Proteomic Approach to FcepsilonRI aggregation-initiated signal transduction cascade in human mast cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2009. **149 Suppl 1**: p. 73-6.
 33. Cheung, P.F., et al., *Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Int Immunol, 2010. **22**(6): p. 453-67.
 34. Kasraie, S., M. Niebuhr, and T. Werfel, *Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins*. Allergy, 2010. **65**(6): p. 712-21.
 35. Cornelissen, C., et al., *Signaling by IL-31 and functional consequences*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 552-66.
 36. Zhang, Q., et al., *Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 347-56.
 37. Cornelissen, C., et al., *IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 426-33, 433 e1-8.
 38. Okayama, Y., et al., *In vitro effects of H1-antihistamines on histamine and PGD2 release from mast cells of human lung, tonsil, and skin*. Allergy, 1994. **49**(4): p. 246-53.
 39. Hanifin, J.M. and S.J. Toft, *Update on therapy of atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(3 Pt 2): p. S123-5.
 40. Assmann, T., B. Homey, and T. Ruzicka, *Topical tacrolimus for the treatment of inflammatory skin diseases*. Expert Opin Pharmacother, 2001. **2**(7): p. 1167-75.
 41. Takano, N., I. Arai, and M. Kurachi, *Analysis of the spontaneous scratching behavior by NC/Nga mice: a possible approach to evaluate antipruritics for subjects with atopic dermatitis*. Eur J Pharmacol, 2003. **471**(3): p. 223-8.
 42. Takano, N., et al., *Evaluation of antipruritic effects of several agents on scratching behavior by NC/Nga mice*. Eur J Pharmacol, 2004. **495**(2-3): p. 159-65.
 43. Sengoku, T., et al., *FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils*. Int J Immunopharmacol, 2000. **22**(3): p. 189-201.
 44. Kim, H.O., et al., *Effects of tacrolimus ointment on the expression of substance P, nerve growth factor, and neurotrophin-3 in atopic dermatitis*. Int J Dermatol, 2009. **48**(4): p. 431-8.
 45. Bernstein, J.E., et al., *Antipruritic effect of an opiate antagonist, naloxone hydrochloride*. J Invest Dermatol, 1982. **78**(1): p. 82-3.

46. Monroe, E.W., *Efficacy and safety of nalmefene in patients with severe pruritus caused by chronic urticaria and atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 1989. **21**(1): p. 135-6.
47. Inagaki, N., et al., *Evaluation and characterization of mouse scratching behavior by a new apparatus, MicroAct*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2003. **16**(3): p. 165-75.
48. Inagaki, N., et al., *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): p. 175-83.
49. Yamashita, H., et al., *Pharmacological characterization of a chronic pruritus model induced by multiple application of 2,4,6-trinitrochlorobenzene in NC mice*. Eur J Pharmacol, 2007. **563**(1-3): p. 233-9.
50. Arai, I., et al., *A single dose of interleukin-31 (IL-31) causes continuous itch-associated scratching behaviour in mice*. Exp Dermatol, 2013. **22**(10): p. 669-71.
51. Hawro, T., et al., *Interleukin-31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge*. Allergy, 2013.
52. Cevikbas, F., et al., *A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 448-60.
53. Kasraie, S., et al., *Functional effects of interleukin 31 in human primary keratinocytes*. Allergy, 2011. **66**(7): p. 845-52.
54. Krause, K., et al., *Effective control of recalcitrant pruritus by bevacizumab: a possible role for vascular endothelial growth factor in chronic itch?* Acta Derm Venereol, 2013. **93**(2): p. 175-9.
55. Buddenkotte, J. and M. Steinhoff, *Pathophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases*. Allergy, 2010. **65**(7): p. 805-21.
56. Heise, R., et al., *IL-31 receptor alpha expression in epidermal keratinocytes is modulated by cell differentiation and interferon gamma*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 240-3.
57. Trautmann, A., et al., *T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 25-35.
58. Takahashi, H., et al., *Interferon-gamma-dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes: modulation of the apoptotic process by protein kinase C*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(6): p. 810-5.
59. Moers, C., et al., *Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin*. Int J Cancer, 1999.

- 80(4): p. 564-72.
60. Simon, D., et al., *Epidermal caspase-3 cleavage associated with interferon-gamma-expressing lymphocytes in acute atopic dermatitis lesions*. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(6): p. 441-6.
 61. Trautmann, A., et al., *Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(5): p. 839-46.
 62. Xu, H., N.A. DiIulio, and R.L. Fairchild, *T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 1001-12.
 63. Inoue, Y., et al., *Protective and curative effects of topically applied CX-659S, a novel diaminouracil derivative, on chronic picryl chloride-induced contact hypersensitivity responses*. *Br J Dermatol*, 2002. **147**(4): p. 675-82.
 64. Yamashita, H., et al., *Dermal mast cells play a central role in the incidence of scratching behavior in mice induced by multiple application of the hapten, 2,4,6-trinitrochlorobenzene*. *Exp Dermatol*, 2005. **14**(6): p. 438-44.
 65. Grimstad, O., et al., *Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis*. *Exp Dermatol*, 2009. **18**(1): p. 35-43.