

アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する 新規皮膚炎モデルの開発

広島大学原爆放射線医科学研究所

神 沼 修

Stimulating activity for skin, including that of patients with atopic dermatitis, is one of the most important issues for the development of cosmetics. I have recently proven that antigen-specific T cells have potential to induce allergic inflammation in various tissues including skin, without assistance of IgE/mast cell-dependent pathway. Here, I aimed to establish a new mouse model of skin inflammation that enable to evaluate the stimulating and protective effects of cosmetics on atopic patients' skin. Hairless mice in which antigen-specific T cell receptor (TCR) is expressed on all peripheral T cells is generated by mating BALB/c-background Hr mice with cloned mice that we recently established from mite-specific T cells. Th1 and Th2 cells were differentiated from splenic CD4⁺ T cells of ovalbumin (OVA)-specific TCR-transgenic mice by *in vitro* stimulation culture. BALB/c mice were adoptively transferred with the antigen-specific Th1 and Th2 cells, then the back skin was challenged with topical application of OVA solution. In addition to the inflammatory features observed in the histological specimens, accumulation of eosinophils and antigen-specific Th2 cells, evaluated by the elevation of eosinophil peroxidase activity and by flow cytometry, respectively, in the skin was induced by antigen challenge, despite the absence of antigen-specific IgE. Neither antigen-specific Th1 nor naive CD4⁺ T cells induced eosinophil accumulation, although Th1 cells by themselves migrated into the skin. The accumulation of eosinophils and Th2 cells in the skin was suppressed by administration of dexamethasone and FK506, indicating an essential role for Th2 cells in the eosinophil recruitment. Based on the rapid development of atopic dermatitis-like pathological features and its responsiveness to therapeutic drugs prescribed, the usefulness of our skin inflammation model for the evaluation of stimulating and protective effects of cosmetics on the skin of atopic patients was indicated.

1. 緒 言

腐食性を含めた皮膚刺激性は、化粧品を開発する上で最も重要な検討項目とされ、さまざまな実験系が実用化されている。一方、皮膚のバリア機能が低下したアトピー等の皮膚炎患者に対する皮膚刺激性の問題も大きい。現在それを的確に評価できる実験系はない。このことから、多くの化粧品において、アトピー患者等への使用は回避せざるを得ない状況となっている。

アトピー患者の皮膚に対する化粧品の影響評価が困難な要因として、迅速かつ安定的に発症し、さまざまな化合物の影響評価に資する皮膚炎モデルが樹立されていないことが挙げられる。アトピー性皮膚炎を模した自然発症および抗原誘発動物モデルは多いが、いずれも発症に長期間を要する上、個体間のバラツキが大きいため、本来影響がないことを前提に開発される化粧品類の微細な影響を解析するのに適しているモデルはない。

一方、申請者は独自に開発したマウスモデルを用い、アトピー性皮膚炎発症に重要と考えられてきたIgE／マスト細胞系が活性化されなくても、抗原特異的T細胞が存在す

るだけで、皮膚炎を含めたあらゆるアレルギー疾患病態が発症することを明らかにしてきた¹⁾。さらに最近、抗原特異的T細胞由来のクローンマウス樹立に世界で初めて成功し、そのマウスを用いれば、わずか3日という短期間でアレルギー病態を誘発できることを見いだした²⁾。

そこで本研究は、この新たに樹立した抗原特異的T細胞クローンマウスを活用し、化粧品のアトピー患者皮膚に対する刺激性や、場合によってはその逆となる保護作用の有無ならびに程度を的確に評価できる、迅速かつ安定的に発症する皮膚炎モデルの開発を目指した。その成果を元に、健常人だけでなく、化粧品の必要性をより強く感じているアトピー患者達でも安心して利用できる、安全な化粧品の開発を後押しするため、本モデルを用いた評価系の普及に努めてゆきたい。

2. 方 法

2. 1. 抗原特異的TCRを発現するヘアレスマウスの作出

クローンマウスのバックグラウンド系統であるBALB/c由来のヘアレスマウスであるHrと、申請者が独自に開発し、現在維持している8種類のT細胞クローンマウスのうち¹⁾、ダニ抗原(Der f)特異的な2種類のT細胞クローンマウス(Df#1, Df#2)を交配した。尾ゲノムを抽出してPCRを行うことにより、産仔の遺伝子型判定を行った。

2. 2. T細胞依存性皮膚炎病態の解析

T細胞クローンマウスおよび卵白アルブミン(OVA)特



Development of a new skin inflammation model useful for the evaluation of stimulating and protective effects of cosmetics on the skin of atopic patients

Osamu Kaminuma

Research Institute of Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

異的T細胞受容体 (TCR) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの脾細胞より、磁気細胞分離システムを用いてCD4⁺ T細胞を分離した。それをそれぞれ特異抗原およびX線照射したBALB/cマウス脾臓細胞と共培養することにより、OVA特異的T細胞を*in vitro*で樹立した。その際、Th1およびTh2細胞を分化誘導するために、それぞれIL-12 + 抗IL-4抗体およびIL-4 + 抗IFN- γ 抗体を培養開始時に添加して7-10日間培養した。樹立した抗原特異的T細胞を回収し、5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で染色した後、BALB/cマウスに尾静脈より移入した。その24間後、除毛した背部皮膚または耳介に抗原溶液を投与した。陰性コントロールとして、分化誘導前のナイーブCD4⁺ T細胞移入マウス群および非特異的抗原であるウシ血清アルブミン (BSA) 投与群を設定した。抗原チャレンジに伴う皮膚炎病態の発症を、病理組織学的変化を指標として評価した。また皮膚組織への好酸球浸潤を、組織ホモジネート中のeosinophil peroxidase (EPO)活性を測定することにより評価した。組織に浸潤した抗原特異的T細胞は、フローサイトメーターでCFSE陽性細胞を計数することにより解析した。

2. 3. T細胞依存性皮膚炎モデルに対する薬剤の効果

2. 2. で樹立した皮膚炎モデルに対する各種薬剤の効果を検討した。ステロイド薬であるdexamethasoneおよび免疫抑制薬であるタクロリムス (FK506) をphosphate-buffered saline (PBS) に懸濁し、抗原チャレンジの30分

前に皮下投与した。

3. 結 果

HrマウスとDf#1およびDf#2マウスを交配し、遺伝子型判定を行うことにより、ダニ抗原特異的TCRおよびヘアレス遺伝子の双方をヘテロに持つ雌雄マウスが確保できた。

また、そのヘアレスクローンマウスの樹立を待つ間、T細胞依存性皮膚炎病態の解析を進めた。*In vitro*で樹立した抗原特異的Th1およびTh2細胞をBALB/cマウスに移入し、その皮膚に抗原チャレンジすると、皮膚組織の肥厚および炎症細胞浸潤を伴う皮膚炎病態を惹起できた (図1)。ナイーブCD4⁺ T細胞を移入したコントロール群では、明らかな炎症応答はみられなかった。皮膚における好酸球浸潤に伴うEPO活性の変化を解析した結果、Th2細胞を移入した場合には好酸球が多く浸潤するが、Th1細胞移入マウスでは著しい好酸球浸潤はみられなかった (図2A)。一方、移入したT細胞は、Th1およびTh2細胞移入マウスの両者で、抗原チャレンジに伴い皮膚局所への有意な浸潤がみられた (図2B)。

Th2細胞移入モデルにデキサメサゾン (Dex) およびタクロリムス (FK) を投与したところ、いずれも抗原誘発皮膚好酸球および抗原特異的T細胞浸潤を有意に抑制した (図3)。アトピー性皮膚炎に対するステロイド薬および免疫抑制薬の効果が、Th2細胞移入モデルで再現できた。

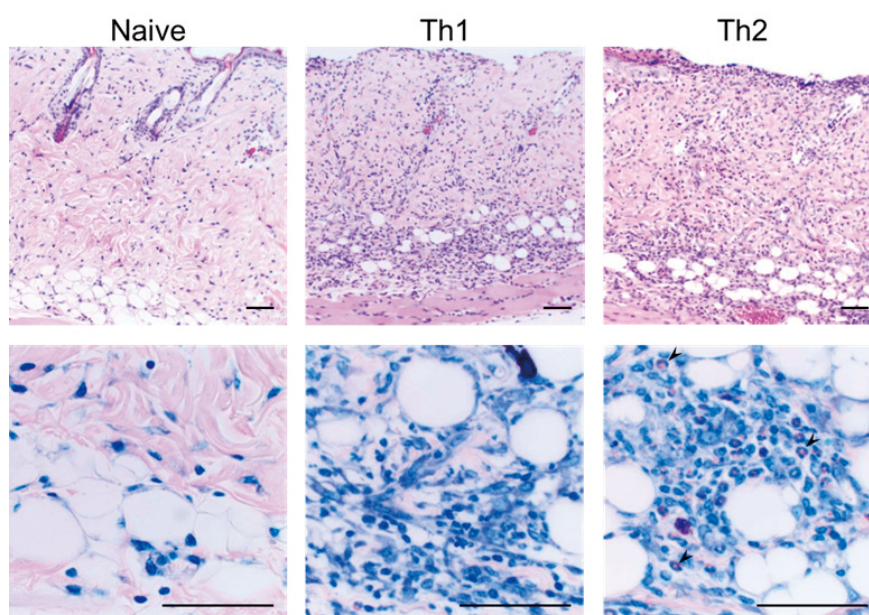


図1 T細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚炎反応
In vitroで樹立したOVA特異的ナイーブCD4⁺ T、Th1およびTh2細胞を移入したマウスの背部皮膚にOVAチャレンジした。チャレンジ96時間後に皮膚組織を採取し、H&E染色を行って弱拡大 (上段) および強拡大 (下段) で鏡検した。スケール; 50 μ m。矢印; 好酸球。

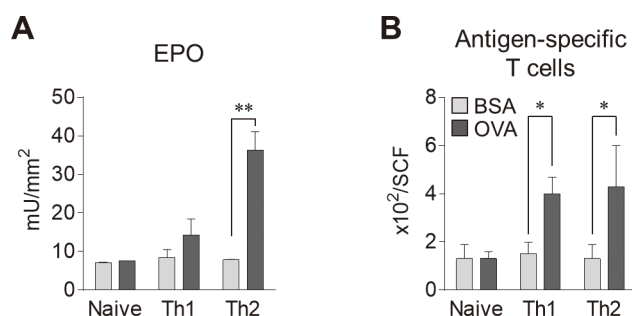


図2 T細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚細胞浸潤反応

OVAおよびBSAチャレンジ24時間後における、皮膚組織のEPO活性(A) および抗原特異的T細胞浸潤(B) 解析した。

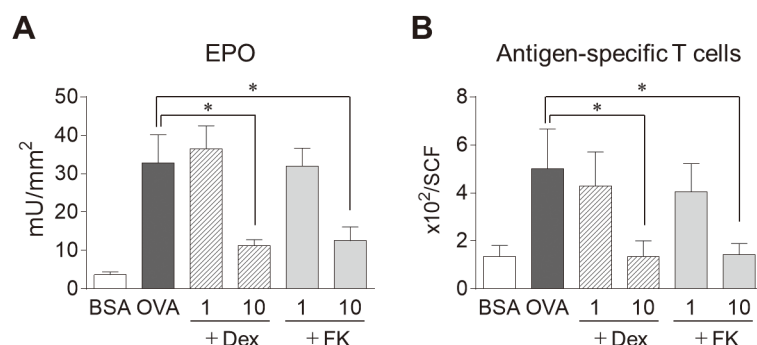


図3 Th2細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚炎に対する治療薬の作用

Th2移入マウスにデキサメサゾン(Dex) およびタクロリムス(FK) を1および10mg/kg皮下投与し、OVAおよびBSAチャレンジして、皮膚組織のEPO活性(A) および抗原特異的T細胞浸潤(B) 解析した。

4. 考 察

これまで、アトピー性皮膚炎を模した動物モデルとして、NC/Tnd (Nga) マウスの他³⁾、OVA 他抗原の反復投与による惹起モデル⁴⁾、CASP1⁵⁾、IL-18⁶⁾ および IL-33⁷⁾ 等の遺伝子導入マウス等が報告されている。しかし、いずれも発症に長時間を要する上、症状の不均一性や誘発工程の煩雑性等が問題となり、アトピー患者に対する化粧品を含めた化学物質の安全性を評価するための標準的な試験系とすることは難しい。

一方、本研究課題を実施する上で、アトピー性皮膚炎における発症機構の理解も重要となる。これまでの、多くの患者で血中IgEの上昇が観察され、そのIgEが抗原を介して架橋されることにより、掻痒等を誘発する主物質であるヒスタミンがマスト細胞から放出されるため、IgE /マスト細胞系がその病態形成にも重要であると考えられてきた。しかし申請者はそのパラダイムに逆行し、各種アレルギー疾患発症における共通の責任細胞として、T細胞が重要な役割を担うことを示してきた¹⁾。その成果は最近、代表的なT細胞サイトカインのIL-5およびその受容体に対する

モノクローナル抗体が気管支喘息を対象に、またIL-4およびIL-13の受容体に対する抗体がアトピー性皮膚炎に対する治療薬として上市されたことによって、臨床的にも実証された。

本研究でも、T細胞移入マウスにおいて、IgE /マスト細胞系の関与がなくても明らかな皮膚炎症状がみられたことは意義深い。その迅速かつ安定的に発症する性状に加え、明確な発症メカニズムならびに治療薬応答性の面からも、化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する標準的試験系としての高い有用性が示唆された。

5. 総 括

短期間に安定して皮膚炎症状が惹起できるアトピー性皮膚炎モデルが樹立できた。ヘアレスクローンマウスを確立できれば、より簡便に多くの化合物による影響をスクリーニング的に評価できるようになることから、アトピー患者皮膚に対して影響がないものだけでなく、それに対する保護・治癒作用を有する物質を見いだせる可能性がある。すなわち、これまでアトピー患者皮膚に対する悪影響を懸念して試験することも忌避されていた、多くの化粧品材料を

ライブラリーとした探索研究を実施することにより、コスメトロジー発の新たな皮膚炎治療薬開発に結びつくことも期待される。

(引用文献)

- 1) Miura K, Inoue K, Ogura A et al: Role of CD4 (+) T Cells in Allergic Airway Diseases: Learning from Murine Models. *Int J Mol Sci* **21**, 2020.
- 2) Kaminuma O, Katayama K, Inoue K et al: Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4⁺ T cells. *EMBO Rep* **18**: 885-893, 2017.
- 3) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP et al: Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* **9**: 461-466, 1997.
- 4) Wang G, Savinko T, Wolff H et al: Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clin Exp Allergy* **37**: 151-161, 2007.
- 5) Asahi K, Mizutani H, Tanaka M et al: Intradermal transfer of caspase-1 (CASP1) DNA into mouse dissects: role of CASP1 in interleukin-1beta associated skin inflammation and apoptotic cell death. *J Dermatol Sci* **21**: 49-58, 1999.
- 6) Konishi H, Tsutsui H, Murakami T 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* **99**: 11340-11345, 2002.
- 7) Imai Y, Yasuda K, Nagai M et al: IL-33-Induced Atopic Dermatitis-Like Inflammation in Mice Is Mediated by Group 2 Innate Lymphoid Cells in Concert with Basophils. *J Invest Dermatol* **139**: 2185-2194. e2183, 2019.