特集：免疫疾患の治療の進歩

総 説

皮膚アレルギー疾患における核酸医薬療法

横 関 博 雄

A Decoy Oligodeoxynucleotides therapy for allergic skin diseases

Hiroo YOKOZEKI, M.D., Ph.D.

Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Department of Dermatology

(Received December 20, 2011)

summary

Atopic dermatitis (AD) is a common, chronically relapsing skin disease. It is very difficult to treat severe type AD by steroid ointment. We therefore hypothesized that synthetic double-stranded DNA with a high affinity for Signal Transducers and Activators of Transcription 6 (STAT6) could be introduced *in vivo* as a decoy cis elements to bind the transcriptional factor and to block the gene activation of contributing the onset and progression of AD, thus providing effective therapy for AD. Treatment by the transfection of STAT6 decoy oligodeoxynucleotides (ODN), but not scrambled decoy ODN in the AD model mice, had a significantly inhibitory effect on not only STAT6 binding to nuclei but also on the third phase response. A histological analysis revealed that both edema and the infiltration of eosinophils and degranulated mast cells significantly decreased in STAT6 decoy ODN transfected mice. We herein report the first successful *in vivo* transfer of STAT6 decoy ODN to reduce the third phase reaction in AD model mice, thereby providing a new therapeutic strategy for atopic dermatitis. We also introduce another NF- κ B Decoy Oligodeoxynucleotides therapy or STAT6siRNA therapy for allergic diseases.

Key words——atopic dermatitis; Oligodeoxynucleotides therapy; decoy; contact hypersensitivity)

抄 録

成人発症の重症型アトピー性皮膚炎の患者が増加して社会現象の一つにもなっていたが、免疫抑制外用薬の開発により沈静化してきている。しかし、重症アトピー性皮膚炎の一部の症例では既存の治療法のみでは改善せず長年にわたり緩解、増悪をくり返すことがあり治療に苦慮する。遺伝子治療である核酸医薬の一つとして、おとり型核酸医薬（デコイ）が開発され、冠動脈疾患などに対する遺伝子療法として幅広く試みられている。また、最近、アトピー性皮膚炎の患者の治療に NF- κ B デコイ軟膏が開発され現在治験段階になっている。一方、私達の教室でも IL-4, IL-13 の重要な転写調節因子である STAT6 に対するデコイ軟膏を作製して、重症のアトピー性皮膚炎患者への臨床応用も試みられ良好な結果が得られている。さらに、RNA 干渉は近年注目されている現象であり、ターゲットとなる遺伝子と同一の配列を持つ siRNA を導入することにより標的遺伝子がノックダウンされる現象である。最近、STAT6 をターゲットとした siRNA を開発し接触アレルギー、アレルギー性鼻炎のモデルマウスを用いて炎症を抑制しうることを明らかにしたのでこの干渉 RNA による核酸医薬療法も紹介したい。今回、皮膚科領域におけるアレルギー疾患への核酸医薬の有効性について述べ臨床的応用の展望を語りたい。

はじめに

皮膚アレルギー疾患で最も治療に苦慮する疾患がアトピー性皮膚炎である。アトピー性皮膚炎は増悪因子除去、スキンケア、薬物療法を3本柱とした適切な治療をすることによりほぼ大多数の症例がコントロール可能である。しかし、成人型アトピー性皮

膚炎の一部の重症例は難治性で根本的な治療法がないのが現状である。現在、アトピー性皮膚炎の新規治療法として抗 IgE 抗体療法 (Omalizumab), DNA ワクチン療法などが開発されているが、まだ臨床応用には至っていない。一方、核酸医薬外用薬は現在、臨床応用され NF- κ B デコイ軟膏が臨床治験の段階に至っている。また、最近私たちの教室では IL-4, IL-13 のシグナル伝達に重要な役割をはたす転写調節因子である STAT6 が核内の cis-element に結合するのを競合的に阻害する STAT6 デコイオ

リボヌクレオチド (ODN: デコイ) を作成しアトピー性皮膚炎のモデルマウスの皮膚炎症反応を抑制することを報告した¹⁾。臨床研究の段階であるが STAT6 デコイ軟膏が一部のアトピー性皮膚炎患者に有効であることも確認された。さらに, STAT6 をターゲットとした干渉 RNA (siRNA) 療法も開発され接触皮膚炎, アレルギー性鼻炎で有効であることが明らかになった。今回, デコイ, siRNA などの核酸医薬品によるアレルギー疾患の治療戦略について論説したい。

I. デコイ (decoy)

おとり型核酸医薬剤であるデコイは, アンチセンスオリゴなどと同様に核酸医薬に属しており遺伝子発現調節剤の一つである。デコイ核酸医薬は特定の転写調節因子の結合部 (cis-element) への結合を図 1 のように競合的に阻害し, 活性化される遺伝子群の抑制を行うものである。デコイの特徴としては 1) 転写調節因子がクローニングされる必要がない。2) 転写調節因子がファミリーとして存在しており, 結合部位に結合する転写調節因子が複数でも良い。3) 広範囲な対象遺伝子群の抑制が可能などである。アンチセンス法に比較してより効果的な遺伝子調節法であると考えられている。

II. NF- κ B デコイ

NF- κ B は炎症サイトカインである IL-1, TNF- α などの重要な細胞伝達因子でありこのシグナルを抑制することにより多くの炎症反応が抑制できる。また, ステロイドホルモンも I κ B を増強することに

より NF- κ B が核内に入り核に結合することを抑制すると考えられている。大阪大学の森下教授らはこの NF- κ B のデコイを作成し虚血性心疾患の治療が可能であることをモデルマウスで明らかにした²⁾。さらに NF- κ B を含有した軟膏がアトピー性皮膚炎のモデルマウスである NC/Nga マウスに外用することにより治療が可能であることが明らかになった³⁾。最近, NF- κ B デコイ軟膏の有効性を成人型アトピー性皮膚炎の患者の顔面紅斑に対して臨床治験で検討された。その結果, 統計学的にプラセボ投与群とデコイ投与群では有意差がみとめられ第 3 相臨床試験が検討中である。

III. STAT6 デコイによる遅発型反応の抑制

マウスにおける抗原特異的 IgE を介した遅発型反応の誘導に STAT6 シグナルを STAT6 デコイで制御することにより遅発型反応がどのように変化するかを明らかにするため, 抗 DNP-IgE 抗体の静脈内投与により感作したマウスに, STAT6 デコイを惹起部の耳に惹起前に皮下投与した¹⁾。BALB/c マウスに感作した後, 耳介にデコイの皮下投与後 DNFB を塗布することにより惹起して耳介腫脹反応を比較検討した。IgE を介した耳介腫脹反応は STAT6 デコイ投与マウスでは scramble デコイ投与マウスに比べ惹起 1 時間後の早期反応は変化が認められなかったが惹起 24 時間後の遅発型反応は減弱していた¹⁾。この結果は, IgE を介した耳介腫脹反応では, 遅発型反応に STAT6 が関与する可能性を示唆しており STAT6 デコイが効果的であることが明らかになった。炎症反応抑制のメカニズムを明らかにするため, 惹起した耳介皮膚局所におけるサイトカインの動態を mRNA, 蛋白レベルで解析した¹⁾。その結果, STAT6 デコイ投与マウスでは抗原特異的 IgE で誘導された遅発型反応の皮膚局所における IL-4, IL-5 を産生する Th2 細胞の浸潤が抑制されている可能性が示された¹⁾。また IgE を介した遅発型反応に IL-4 シグナル伝達で重要な役割を果たす STAT6 が必要であることも明らかになった。さらに, 病理学的な解析で STAT6 デコイ投与マウスでは好酸球, 好中球の浸潤が抑制されていることより, 肥満細胞, 線維芽細胞からの Eotaxin などのケモカイン産生に STAT6 が重要な役割を果たす可能性があると考えられた (図 2)¹⁾。

遺伝子発現を調節することにより各種疾患を治療

図1 デコイの機序: デコイ核酸医薬は特定の転写調節因子の結合部 (cis-element) への結合を競合的に阻害することで, 活性化される遺伝子群の抑制を行う。

IV. STAT6 デコイ軟膏のアトピー性皮膚炎患者への臨床応用

現在、この STAT6 デコイ軟膏をアトピー性皮膚炎患者の難治性顔面紅斑に大学の倫理委員会の許可を得て外用の効果を評価している。7 症例に試みた結果紅斑、痒みともに著明に改善した（図 3, 4）。特に痒みは早期に改善している⁴⁾。今後、さらに多くの症例で安全性、有効性を検討する必要がある。

図 2 抗原特異的 IgE 投与マウスの病理学的な解析で STAT6 デコイ投与マウスでは好酸球、好中球の浸潤が抑制されていることが明らかにされた。

V. 干渉 RNA によるアレルギー反応の抑制

最近、私たちの教室では RNA 干渉の理論を利用して、マウス STAT6 産生を有効に抑制しうる STAT6 siRNA 核酸配列を独自に選定し、その *in vitro* 効果や接触過敏反応、アレルギー性鼻炎反応に対する *in vivo* 効果を検討した。今回作成を試みたマウス STAT6 siRNA は 3 種類の候補（STAT6 siRNA 1, 2, 3）があり全てに線維芽細胞の STAT6 蛋白発現を抑制する効果が見られた（図 5）⁵⁾。3 種

図 4 Clinical Score : STAT6 デコイ軟膏をアトピー性皮膚炎患者の難治性顔面紅斑に大学の倫理委員会の許可を得て外用の効果を評価している。7 症例に試みた結果、紅斑、痒みともに著明に改善した。

Igawa K et al, Bri J Dermatol, 2009

6.5	4	1.5	Clinical score (EASI) VAS score
48	23	6	

図 3 著効例の臨床像。Clinical score, VAS score ともに改善。

STAT6 siRNA

図5 マウス STAT6 siRNA は 3 種類の候補 (STAT6 siRNA 1, 2, 3) があり, 全てに線維芽細胞の STAT6 蛋白発現を抑制する効果が確認された。

類の中で最も効率よく STAT6 発現を抑制した STAT6 siRNA 3 を STAT6 siRNA として *in vivo* の検討に用いた。TNCB による接触過敏反応は, STAT6 siRNA の耳介への皮下投与により有意に抑制された (図 6)⁵⁾。同様の抑制は DNFB や oxazolone に対する接触過敏反応においても認められた (図 6)⁵⁾。TNCB に対する接触過敏反応を病理標本で検討したところ, STAT6 siRNA は真皮浮腫と細胞浸潤を顕著に抑制していた⁵⁾。そして単核細胞, 好酸球, 好中球, 脱顆粒している肥満細胞のいずれの細胞数も減少していた⁵⁾。一方, アレルギー性鼻炎モデルマウスでも STAT6 siRNA の効果を検討した。OVA 感作マウスの鼻腔に Days 21 から 27 に

図6 各種のハプテンを塗布することにより誘導された接触過敏反応は, STAT6 siRNA の耳介への皮下投与により有意に抑制された。

*: $P < 0.00001$

図7 アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた解析で STAT6 siRNA の投与により, くしゃみと鼻かき運動の回数が著明に減少した。

かけて連日 OVA を吸入させて鼻炎反応を誘発した⁵⁾。惹起開始翌日から 3 日間連続して STAT6 siRNA (3 nmol/day) を鼻腔内に投与して、その治療効果を検討した。その結果、STAT6 siRNA の投与により、くしゃみと鼻かき運動の回数が著明に減少することが分かった (図 7)⁵⁾。炎症反応の抑制は好酸球を含めた細胞浸潤の減少によっても確認された。以上の結果より STAT6 をターゲットとした STAT6 siRNA を用いて接触過敏症、アレルギー性鼻炎の著明な改善が見られ今後、STAT6 をターゲットとした遺伝子療法の開発が期待される。

ま と め

今回、アトピー性皮膚炎、接触過敏症、アレルギー性鼻炎の核酸医薬のデコイ、siRNA の有効性について述べた。今後、さらに詳細な検討が必要であるが、将来的に NF- κ B, STAT6 を制御することによりアトピー性皮膚炎のみならずアトピー喘息、アレルギー性鼻炎などを治療する遺伝子療法を用いた戦略が可能であり今後の成果に期待したい。

文 献

- 1) Yokozeki H et al. : *In vivo* transfection of cis element “decoy” against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates IgE mediated late phase reaction in an atopic dermatitis mouse model, *Gene Therapy*, **11** : 1753, 2004.
- 2) Morishita, R., T. Sugimoto, M. Aoki, I. Kida, N. Tomita, A. Moriguchi, K. Maeda, Y. Sawa, Y. Kaneda, J. Higaki, T. Ogihara. : *On vivo* transfection of cis element “decoy” against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infection. *Nature Med.*, **3** : 894–899, 1997.
- 3) Nakamura, H., Aoki M., Tamai K., Oishi M., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R. : Prevention and regulation of atopic dermatitis by ointment containing NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides in NC/Nga atopic mouse model. *Gene Therapy*, **9** : 1221–1229, 2002.
- 4) Igawa K, Satoh T, Yokozeki H. : A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotide ointment in atopic dermatitis : a pilot study in adults. *Br J Dermatol.* 2009 May; **160**(5) : 1124–1126, 2009.
- 5) Hosoya H, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K, Igawa K, Okano M, Moriya T, Imamura O, Nemoto Y, Yokozeki H : Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis : *Allergy*. Jan; **66**(1) : 124–131, 2010.