

総 説

抗真菌薬はアトピー性皮膚炎患者 T 細胞の IL-4, IL-5 産生を抑制する

神 田 奈 緒 子

帝京大学医学部皮膚科

要 旨

アトピー性皮膚炎患者の治療に抗真菌薬が有効であることが報告されている。アトピー性皮膚炎患者および健常者の末梢血 T 細胞の抗 CD3, CD28 抗体刺激による Th1, Th2 サイトカイン産生に対する抗真菌薬の作用について検討した。抗 CD3, CD28 抗体で刺激した T 細胞の IL-4, IL-5 の放出量はアトピー性皮膚炎患者では健常者と比較して高かった。アゾール系抗真菌薬ケトコナゾール, イトラコナゾール, ミコナゾール, 非アゾール系抗真菌薬テルピナフィン, トルナフタートはアトピー性皮膚炎患者および健常者 T 細胞の IL-4, IL-5 の放出を抑制したが, IFN- γ , IL-2 の放出は抑制しなかった。アゾール系抗真菌薬は非アゾール系抗真菌薬より強力な抑制作用を示した。これらの抗真菌薬は Jurkat T 細胞において IL-4, IL-5 promoter 活性を抑制した。cAMP アナログは抗真菌薬の IL-4, IL-5 産生抑制作用を解除した。抗 CD3, CD28 抗体刺激により T 細胞内の cAMP 濃度は一過性に増加し, 抗真菌薬はこの cAMP の増加を抑制した。アゾール系抗真菌薬は cAMP を産生する acenylate cyclase を抑制し, 非アゾール系抗真菌薬は cAMP を分解する cyclic nucleotide phosphodiesterase 活性を増強した。抗真菌薬は cAMP シグナルの抑制を介して T 細胞の IL-4, IL-5 産生を抑制し, アトピー性皮膚炎患者の Th2 偏位を是正すると考えられる。

Key words: cAMP (サイクリック AMP), T helper-2 (T helper-2 細胞), atopic dermatitis (アトピー性皮膚炎), anti-mycotic (抗真菌薬), CD3, CD28

序 文

抗真菌薬の内服あるいは外用はアトピー性皮膚炎患者の治療に有効であることが報告されている¹⁾。この現象については, マラセチア等, 皮膚常在の真菌がアトピー性皮膚炎患者においてアレルゲンとして作用しており²⁾, 抗真菌薬で真菌が除去されることにより, アレルギー反応が抑制されるとの作用機序が想定されていた。しかし, 近年抗真菌薬は真菌に関係なく, 直接の免疫修飾作用を示すことが明らかになり³⁾, 抗真菌薬が直接アトピー性皮膚炎患者のアレルギー反応を調節する可能性が示唆されている。

アトピー性皮膚炎患者の T 細胞はアレルゲンに対し, IL-4, IL-5 等 Th2 系のサイトカインを優位に産生し, 一方, IFN- γ 等の Th1 系サイトカインの産生は抑制されていることが報告されている⁴⁾。IL-4 は B 細胞の IgE 産生を促進し, IL-5 は好酸球の分化を誘導する一方, IFN- γ は IL-4 に拮抗して IgE 産生を抑制する⁵⁾。したがって, アトピー性皮膚炎患者における Th2 偏位はアトピー性皮膚炎の病変形成において重要な役割を果たしていると考えられる。抗真菌薬のアトピー性皮膚炎患者への有効

性から, 抗真菌薬がアトピー性皮膚炎患者における Th2 偏位を是正する可能性が示唆される。

本研究ではアトピー性皮膚炎患者末梢血 T 細胞の, 抗 CD3, CD28 抗体刺激による Th1 (IL-2, IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5) 系サイトカイン産生に対する各種抗真菌薬の作用を検討した。

材料および方法

患者および健常者 T 細胞の培養: 15 人のアトピー性皮膚炎患者および 12 人の健常者より採血し, T 細胞を分離した⁶⁾。T 細胞は各種抗真菌薬と 30 分間培養後, 抗 CD3, CD28 抗体をコートしたプレート内で抗真菌薬の存在下に 48 時間培養し, 培養上清のサイトカイン濃度を ELISA (Biosource, Camarillo, CA) で測定した。細胞内 cAMP 濃度は ELISA (Amersham, Arlington Heights, IL) で測定した。T 細胞の protein kinase A の活性は ELISA (MBL 社, 名古屋) で測定した。細胞抽出物の cyclic nucleotide phosphodiesterase 活性あるいは細胞膜成分の adenylate cyclase 活性は ³H-cAMP あるいは ³²P-ATP を基質として反応させ, 水解あるいは産生される cAMP 量を定量化することにより測定した^{7, 8)}。

プラスミドおよび導入: pCAT3 basic vector (Promega, Madison, WI) の CAT reporter の上流に IL-2 (-541/+42 bp)⁹⁾, IFN- γ (-337/+64 bp)¹⁰⁾, IL-4 (-418/+50 bp)¹¹⁾,

別刷請求先: 神田奈緒子

〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1
帝京大学医学部皮膚科

IL-5 (-511/+4 bp) promoter¹²⁾をクローニングし, pIL-2-CAT, pIFN- γ -CAT, pIL-4-CAT, pIL-5-CAT vectorをそれぞれ作成した. これらの vector を DEAE-dextran (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて Jurkat T 細胞に導入し, 24時間後, 抗真菌薬と30分間培養した後, 抗真菌薬の存在下に抗 CD3, CD28 抗体をコートしたプレート内で細胞を培養した. 16時間後, 細胞を融解し, CAT の発現を ELISA (Roche Diagnostics, 東京) で測定し, 総蛋白量で補正した.

結 果

アトピー性皮膚炎患者 T 細胞による IL-4, IL-5 の産生: アトピー性皮膚炎患者では, T 細胞の抗 CD3, CD28 抗体刺激による IL-4, IL-5 の放出量は健常者と比較して高かった (Fig. 1). IFN- γ , IL-2 の放出量に有意差はなかった.

抗真菌薬による IL-4, IL-5 放出の抑制: アゾール系抗真菌薬ケトコナゾール, イトラコナゾール, ミコナゾール, 非アゾール系抗真菌薬テルビナフィン, トルナフタートはアトピー性皮膚炎患者 T 細胞において抗 CD3, CD28 抗体刺激による IL-4, IL-5 の放出を濃度依存的に抑制し, 1 μ M が最適濃度であった (Fig. 2). アゾール系抗真菌薬の抑制作用は非アゾール系抗真菌薬より強力であった. これら抗真菌薬は IFN- γ , IL-2 の放出は抑制しなかった (Fig. 3). 健常者の T 細胞においても同様の結果が得られた (結果非表示).

抗真菌薬による IL-4, IL-5 promoter 活性の抑制: Jurkat T 細胞においてケトコナゾール, テルビナフィン, トルナフタートは抗 CD3, CD28 抗体に誘導される IL-4, IL-5 promoter の活性を抑制したが, IFN- γ , IL-2 promoter の活性には影響を与えなかった (Fig. 4). ケトコナゾールの抑制作用はテルビナフィン, トルナフタートより強力であった. イトラコナゾール, ミコナゾール

もケトコナゾールと同程度の抑制作用を示した (結果非表示).

cAMP アナログによる抗真菌薬の作用の解除: アトピー性皮膚炎患者 T 細胞の抗 CD3, CD28 抗体刺激による IL-4, IL-5 の放出はケトコナゾールにより抑制されるが, この作用は cAMP アナログである dibutyryl cAMP の添加により解除された (Fig. 5). 抗 CD3, CD28 抗体刺激による IL-4, IL-5 の放出は cAMP 依存性の protein kinase (protein kinase A) の抑制剤である H89 により強力に抑制されるため, IL-4, IL-5 の放出には cAMP/protein kinase A シグナル伝達系の活性化が必要であることが示唆される. また H89 で cAMP/protein kinase A シグナル伝達系を抑制した状態では, ケトコナゾールはこれ以上の IL-4, IL-5 産生抑制作用は示さな

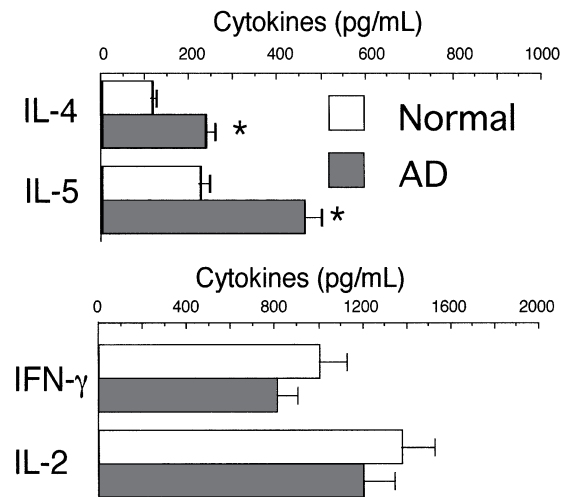


Fig. 1. Anti-CD3/CD28-induced IL-4, IL-5, IFN- γ , and IL-2 secretion in T cells from atopic dermatitis (AD) patients and normal donors.

*: $p < 0.05$ versus normal.

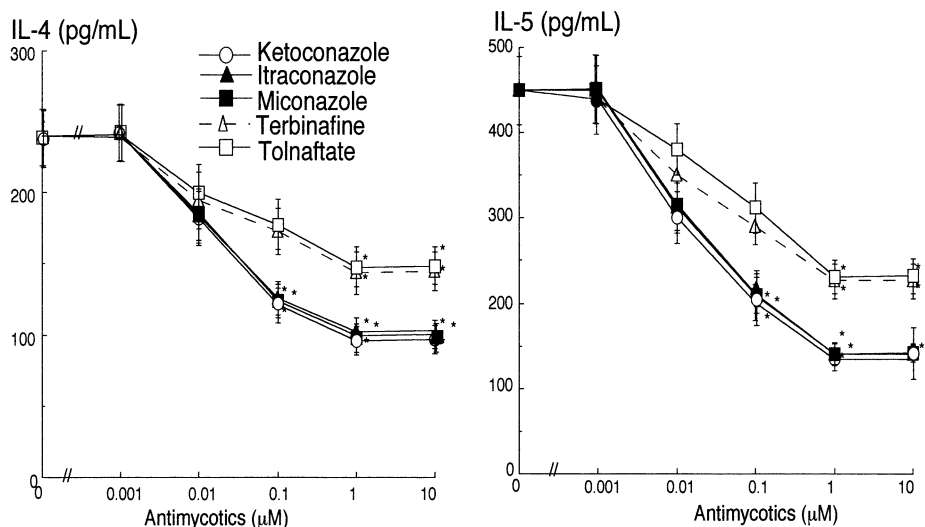


Fig. 2. The inhibitory effects of various antimycotics on anti-CD3/CD28-induced IL-4 and IL-5 secretion in T cells from patients with atopic dermatitis.

*: $p < 0.05$ versus controls.

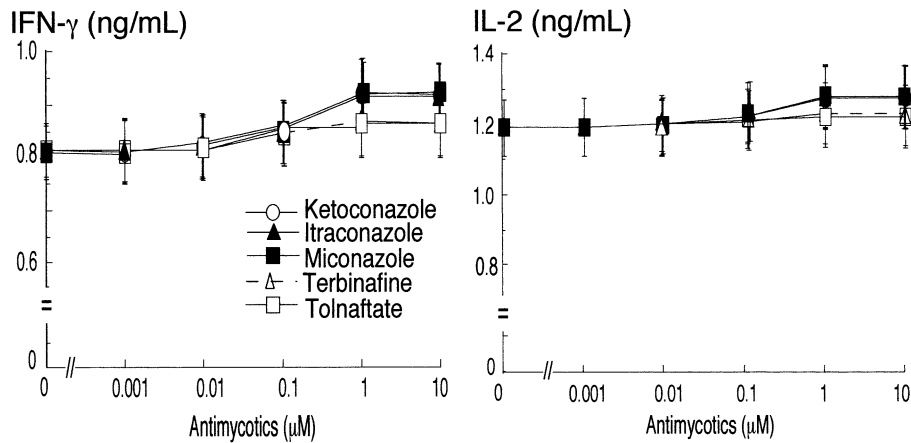


Fig. 3. The effects of various antimycotics on anti-CD3/CD28-induced IFN- γ and IL-2 secretion in T cells from patients with atopic dermatitis.

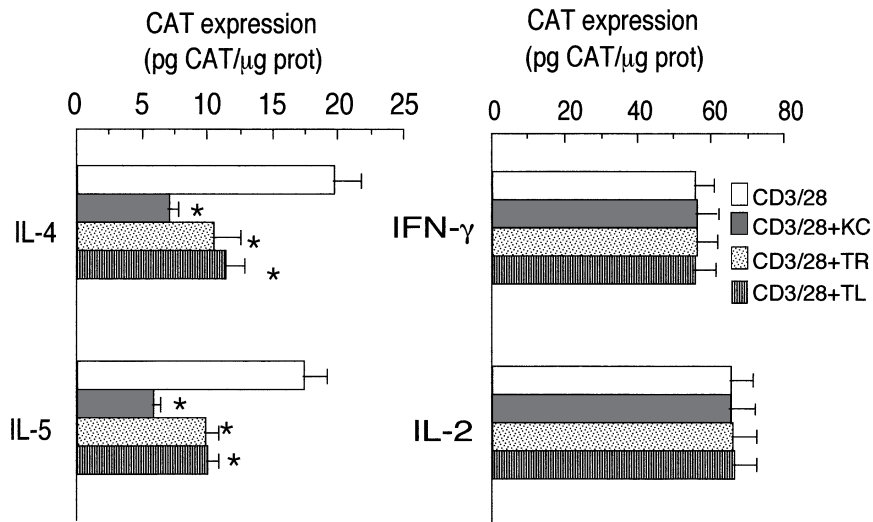


Fig. 4. The effects of antimycotics on anti-CD3/CD28-induced IL-4, IL-5, IFN- γ , and IL-2 promoter activities in Jurkat T cells.

*: $p < 0.05$ versus anti-CD3/CD28 alone. KC, ketoconazole; TR, terbinafine; TL, tolnaftate.

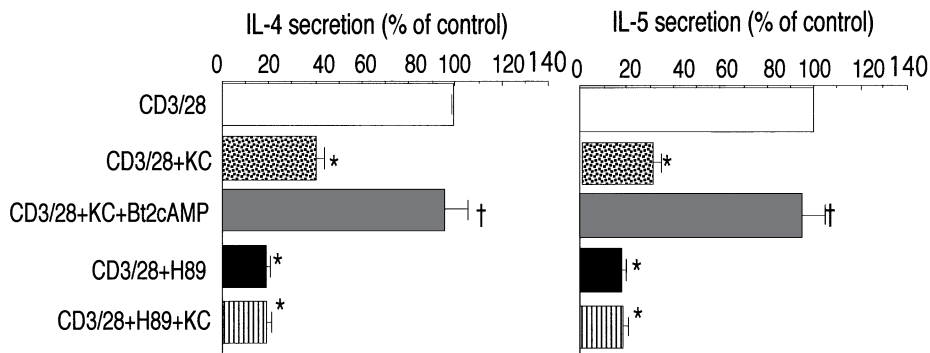


Fig. 5. cAMP analog-mediated reversal from ketoconazole(KC)-induced inhibition on IL-4 and IL-5 secretion.
*: $p < 0.05$ versus anti-CD3/CD28 alone, †, $p < 0.05$ versus anti-CD3/CD28 plus KC. Bt2cAMP, dibutyryl cAMP.

いため、ケトコナゾールによる IL-4, IL-5 の放出抑制には cAMP/protein kinase A シグナル伝達系が関与することが示唆される。ケトコナゾールによる IL-4, IL-5 promoter 活性の抑制も、cAMP アナログの添加により解除された (結果非表示)。他のアゾール系、非アゾール

系抗真菌薬でも同様の結果が得られた (結果非表示)。

抗 CD3, CD28 抗体刺激による cAMP 濃度の増加, protein kinase A の活性化に対する抗真菌薬の作用: アトピー性皮膚炎患者 T 細胞において、抗 CD3, CD28 抗体刺激の 5 分後、細胞内 cAMP 濃度は一過性に上昇

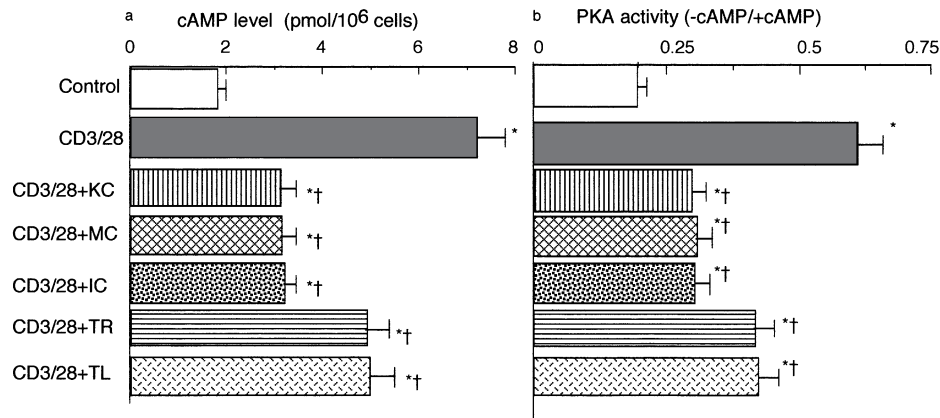


Fig. 6. The intracellular cAMP level (a) and protein kinase A activity (b) at 5 min after anti-CD3/CD28 stimulus in T cells from patients with atopic dermatitis.

*: $p < 0.05$ versus controls, †, $p < 0.05$ versus anti-CD3/CD28 alone. KC, ketoconazole; IC, itraconazole; MC, miconazole; TR, terbinafine; TL, tolnaftate.

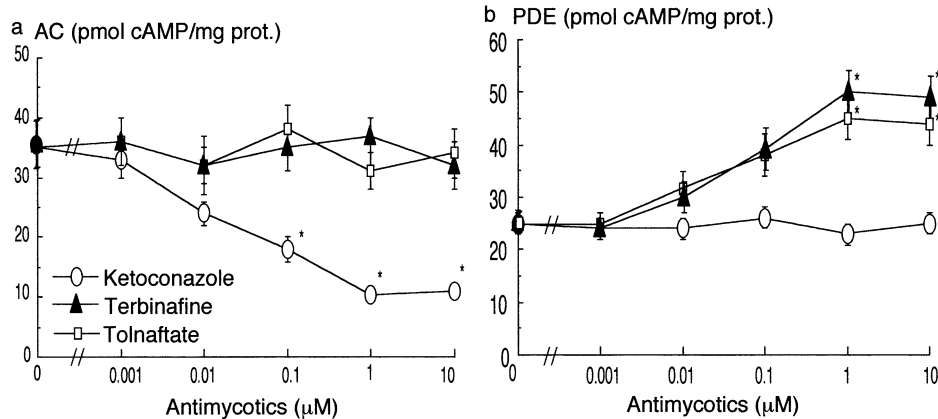


Fig. 7. The effects of antimycotics on adenylate cyclase (a) and cyclic nucleotide phosphodiesterase (b) activities in T cells from patients with atopic dermatitis.

*: $p < 0.05$ versus controls.

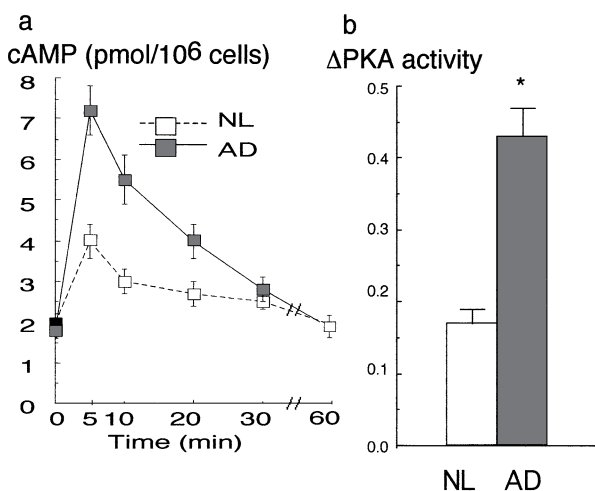


Fig. 8. The increases of cAMP level (a) and protein kinase A activity (b) after anti-CD3/CD28 stimulus in T cells from atopic dermatitis (AD) patients and normal donors.

*: $p < 0.05$ versus controls.

し、これと平行して protein kinase A の活性も増強した (Fig. 6). アゾール系、非アゾール系抗真菌薬は抗 CD3, CD28 抗体刺激による cAMP 濃度の増加, protein kinase A の活性化を抑制した. アゾール系抗真菌薬の抑制作用は非アゾール系抗真菌薬より強力であった. ケトコナゾール (Fig. 7a) イトラコナゾール, ミコナゾール (結果非表示) は cAMP を産生する adenylate cyclase の活性を抑制し、一方、テルビナフィン, トルナフタートは cAMP を分解する cyclic nucleotide phosphodiesterase の活性を増強した (Fig. 7b). 健常者の T 細胞および Jurkat T 細胞においても同様の結果が得られた (結果非表示).

IL-4, IL-5 産生能と cAMP シグナルとの相関: T 細胞の抗 CD3, CD28 抗体刺激後の細胞内 cAMP 濃度および protein kinase A 活性の増加量はいずれもアトピー性皮膚炎患者において健常者より高かった (Fig. 8). 抗 CD3, CD28 抗体刺激後の細胞内 cAMP 増加量は、アトピー性皮膚炎患者、健常者いずれの T 細胞においても IL-4, IL-5 放出量と正の相関を示し、特にアトピー性皮膚炎患者において、より強い相関がみられた (Fig. 9).

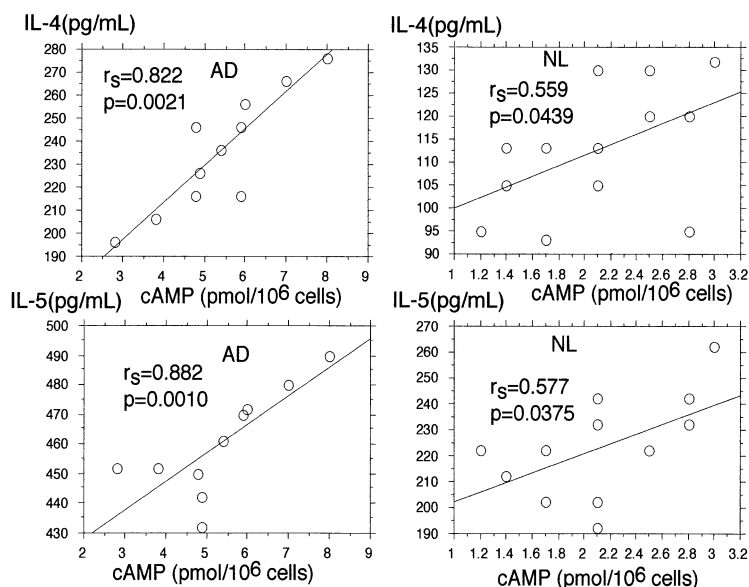


Fig. 9. Correlation between anti-CD3/CD28-induced cAMP increase and IL-4 or IL-5 secretion in T cells from atopic dermatitis (AD) patients and normal donors.

考 察

抗真菌薬はT細胞において抗CD3, CD28抗体刺激によるIL-4, IL-5の産生を抑制した。この作用は遺伝子転写レベルで生じると考えられる。T細胞表面のCD3, CD28分子の刺激によりphospholipase Cが活性化され、diacylglycerol, inositol-1,4,5-triphosphateが産生されるが、前者はprotein kinase Cを活性化し、後者は細胞内Ca²⁺のmobilizationを誘導する。protein kinase CおよびCa²⁺/calmodulin複合体はいずれもadenylate cyclaseを活性化するため、cAMPシグナルが誘導される^{13,14}。cAMPは転写因子NF-IL-6あるいはGATA3の活性化を介してそれぞれIL-4あるいはIL-5の転写を促進することが報告されている^{15,16}。本研究の結果から、アトピー性皮膚炎患者では健常者と比較して、抗CD3, CD28抗体刺激で誘導されるcAMPシグナルが強力であるため、IL-4, IL-5の産生能が亢進していることが推察される。この原因として、アトピー性皮膚炎患者と健常者とではadenylate cyclase, protein kinase Cまたadenylate cyclaseを調節するguanine nucleotide-binding proteinのサブタイプが異なることなどが考えられ、今後の検討が必要である。

本研究ではadenylate cyclaseを抑制するアゾール系抗真菌薬の方が、cyclic nucleotide phosphodiesteraseを活性化する非アゾール系抗真菌薬より、強力にIL-4, IL-5産生を抑制したが、これは前者の方がより強力にcAMPシグナルを遮断したと相関している。*In vitro*の抗真菌薬の示適濃度は1μMであったが、これは常用量のイトラコナゾールの血中のピーク時の濃度(0.71-0.85μM)にほぼ匹敵する¹⁷。したがって抗真菌薬は*in vivo*でも生理的濃度でIL-4, IL-5の産生を抑制すると考えられる。IL-4, IL-5等、Th2系サイトカインはアトピー性皮膚炎の急性期の炎症を惹起し、一方、慢性期では

IFN-γを産生するTh1細胞が炎症の増幅を司っていると考えられている^{5,18}。したがって抗真菌薬はアトピー性皮膚炎患者において、すでに起こっている炎症を鎮静化するのではなく、新たな炎症性病変の新生を抑制すると考えられる。今後はアトピー性皮膚炎患者に抗真菌薬治療を行った場合、治療によりT細胞のTh2偏位が是正されるか否かについても検討する必要がある。

文 献

- 1) Back O, Scheynius A, Hohansson SG: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Arch Dermatol Res* **287**: 448-451, 1995.
- 2) Tengvall Linder M, Johansson C, Zargari A *et al*: Detection of *Pityrosporum orbiculare* reactive T cells from skin and blood in atopic dermatitis and characterization of their cytokine profiles. *Clin Exp Allergy* **26**: 1286-1297, 1996.
- 3) Baroni A, Ruocco V, de Paolis P, Cicatiello L, Esumi H, Tufano MA: Ketoconazole inhibits lipopolysaccharide-induced activation of the nitric oxide synthase gene in the murine macrophage cell line J774. *Arch Dermatol Res* **291**: 54-58, 1999.
- 4) Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, van Lier RA, Kapsenberg ML: Human atopen-specific types 1 and 2 helper cell clones. *J Immunol* **147**: 2942-2949, 1991.
- 5) Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J: A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* **19**: 359-361, 1998.
- 6) Kanda N, Enomoto U, Watanabe S: Antimycotics suppress interleukin-4 and interleukin-5 production in anti-CD3 plus anti-CD28-stimulated T cells from patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **117**: 1635-1646, 2001.

- 7) Choi EJ, Xia Z, Storm DR: Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* **31**: 6492-6498, 1992.
- 8) Robicsek SA, Blanchard DK, Djeu JY, Krzanowski JJ, Szentivany A, Polson JB: Multiple high-affinity cAMP-phosphodiesterase in human T-lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **42**: 869-877, 1991.
- 9) Siebenlist U, Durand DB, Bressler P, Holbrook NJ, Norris CA, Kamoun M, Kant JA, Crabtree GR: Promoter region of interleukin-2 gene undergoes chromatin structure changes and confers inducibility on chloramphenicol acetyltransferase gene during activation of T cells. *Mol Cell Biol* **6**: 3042-3049, 1986.
- 10) Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM, Hoeffler JP, Kerppola TK, Wilson CB: The proximal regulatory element of the interferon- γ promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem* **271**: 31964-31972, 1996.
- 11) Paliogianni F, Hama N, Mavrothalassitis GJ, Thyphronitis G, Boumpas DT: Signal requirements for interleukin 4 promoter activation in human T cells. *Cell Immunol* **168**: 33-38, 1996.
- 12) Mori A, Kamimura O, Mikami T, Hoshino A, Ohmura T, Miyazawa K, Suko M, Okudaira H: Dissection of human IL-5 promoter-essential role of CLE0 element in human IL-5 gene transcription. *Int Arch Allergy Immunol* **113**: 272-274, 1997.
- 13) Bihoreau C, Heurtier A, Enjalbert A, Corvaia N, Bensussan A, Degos L, Kordon C: Activation of the CD3/T cell receptor (TcR) complex or of protein kinase C potentiate adenylyl cyclase stimulation in a tumoral T cell line: involvement of two distinct intracellular pathways. *Eur J Immunol* **21**: 2877-2882, 1991.
- 14) Nunes J, Klasen S, Franco M-D, Lipcey C, Mawas C, Bagnasco M: Signaling through CD28 T-cell activation pathway involves an inositol phospholipid-specific phospholipase C activity. *Biochem J* **293**: 835-842, 1993.
- 15) Davydov IV, Krammer PH, Li-Weber M: Nuclear factor-IL-6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J Immunol* **155**: 5273-5279, 1995.
- 16) Zhang D-H, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A: Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* **272**: 21597-21603, 1997.
- 17) Warnock DW: Itraconazole and fluconazole: new drugs for deep fungal infection. *J Antimicrob Chemother* **24**: 275-277, 1989.
- 18) Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichem DF, van Reijssen FC, Mudde GC, Bruijnzeel-Koomen CAFM: Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: an immunocytochemical study. *J Allergy Clin Immunol* **97**: 828-837, 1996.

Antimycotics Suppress Interleukin-4 and Interleukin-5 Production in Anti-CD3 plus Anti-CD28-Stimulated T Cells from Patients with Atopic Dermatitis

Naoko Kanda

Department of Dermatology, Teikyo University, School of Medicine,
2-11-1 Kaga, Itabashi, Tokyo 173-8605, Japan

It is reported that antimycotic agents are effective for the treatment of patients with atopic dermatitis (AD). We studied *in vitro* effects of antimycotics on T helper-1 and T helper-2 cytokine production in anti-CD3 plus anti-CD28-stimulated T cells from AD patients and normal donors. The amounts of interleukin-4 (IL-4) and IL-5 secreted by anti-CD3/CD28-stimulated T cells were higher in AD patients than in normal donors. Azole derivatives, ketoconazole, itraconazole, miconazole and non-azole terbinafine hydrochloride and tolnaftate reduced IL-4 and IL-5 secretion without altering that of IFN- γ and IL-2 in anti-CD3/CD28-stimulated T cells from both AD patients and normal donors. The azole derivatives were more inhibitory than non-azole antimycotics. These antimycotics reduced the anti-CD3/CD28-induced mRNA expression and promoter activities for IL-4 and IL-5. The cAMP analogue dibutyryl cAMP reversed the inhibitory effects of the antimycotics on IL-4 and IL-5 secretion, mRNA expression, and promoter activities. Anti-CD3/CD28 transiently (≤ 5 min) increased intracellular cAMP in T cells, and the increase was greater in AD patients than in normal donors. The increase of cAMP by anti-CD3/CD28 correlated with IL-4 and IL-5 secretion by anti-CD3/CD28. The transient cAMP increase was suppressed by antimycotics, and azole derivatives were more suppressive than non-azoles. Azole derivatives inhibited the activity of cAMP-synthesizing adenylyl cyclase while terbinafine hydrochloride and tolnaftate enhanced the activity of cAMP-hydrolyzing cyclic nucleotide phosphodiesterase in AD and normal T cells. These results suggest that the antimycotics may suppress IL-4 and IL-5 production by reducing cAMP signal, and strengthen the concept of their potential use for the suppression of T helper-2-mediated allergic reactions.

この論文は、第47回日本医真菌学会総会の“シンポジウム1: 皮膚科領域における抗真菌剤治療のトピックス—皮膚真菌症の病態と抗真菌薬の新展開—”において発表されたものです。