

アトピー性皮膚炎モデルとかゆみメディエーターとの関わり

研究分担者 宮地良樹 京都大学医学研究科皮膚科学 教授
研究協力者 椛島健治 京都大学医学研究科皮膚科学 准教授
中島沙恵子 京都大学医学研究科皮膚科学 研究員

研究要旨 アトピー性皮膚炎はそう痒を伴う慢性の湿疹である。また、近年、一部のアトピー性皮膚炎の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められ、フィラグリン発現低下によるバリア機能異常がアトピー性皮膚炎の原因と考えられるようになった。

一方、アトピー性皮膚炎のそう痒は、蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤のそう痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外のそう痒伝達物質の存在が示唆される。また、シクロスポリンがアトピー性皮膚炎のそう痒抑制に有効であることより T 細胞が産生するそう痒伝達物質の存在の可能性が上げられる。近年 IL-31 が T 細胞から産生されるそう痒誘発サイトカインとして注目されている。本サイトカインはアトピー性皮膚炎で上昇しており、また、シクロスポリン投与によりそう痒の抑制と共に IL-31 の血清中の濃度も低下することを我々は昨年示した(Otsuka A et al.Eur J Dermatol.2011)。以上の結果より、IL-31 は、アトピー性皮膚炎のそう痒誘発に関与している可能性が示唆される。

このようなアトピー性皮膚炎の瘙痒の特徴を考える際に、小動物を用いて解析し、その結果をヒトの臨床との整合性を検証するという作業が重要である。そこで、ヒトの病態に近いフィラグリン遺伝子変異によるマウスアトピー性皮膚炎モデルを開発し、そう痒の評価系を形成し、IL-31 などのそう痒誘発分子の影響を検証することを本研究の目的とする。本年度は、フィラグリン遺伝子のみの変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、アトピー性皮膚炎モデルとしての可能性を検証する。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎はそう痒を伴う慢性の湿疹である。また、近年、一部のアトピー性皮膚炎の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められ、フィラグリン発現低下によるバリア機能異常がアトピー性皮膚炎の原因と考えられるようになった。

一方、アトピー性皮膚炎のそう痒は、蕁麻疹と異なり抗アレルギー剤のそう痒抑制効果が限られていることからヒスタミン以外のそう痒伝達物質の存在が示唆される。また、シクロスポリンがアトピー性皮膚炎のそう痒抑制に有効であることより T 細胞が産生するそう痒伝達物質の存在の可能性が上げられる。近年 IL-31 が T 細胞から産生されるそう痒誘発サイトカインとして注目されている。本サイトカインはアトピー性皮膚炎で上昇しており、また、シクロスポリン投与によりそう痒の抑制と共に IL-31 の血清中の濃度も低下することを我々は昨年示した(Otsuka A et al.Eur J Dermatol.2011)。以上の結果より、IL-31 は、アトピー性皮膚炎のそう痒誘発に関与している可能性が示唆される。

このようなアトピー性皮膚炎の瘙痒の特徴を考える際に、小動物を用いて解析し、その結果をヒトの臨床との整合性を検証するという作業が重要である。そこで、ヒトの病態に近いフィラグリン

遺伝子変異によるマウスアトピー性皮膚炎モデルを開発し、そう痒の評価系を形成し、IL-31 などのそう痒誘発分子の影響を検証することを本研究の目的とする。本年度は、フィラグリン遺伝子のみの変異を有するマウスを作製し、免疫学的な解析を実施し、アトピー性皮膚炎モデルとしての可能性を検証する

B. 研究方法

近年アトピーモデルとして用いられているフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウス(Moniaga CS et al. Am J Pathol.2010)を C57BL/6 マウスでバッククロスし、本マウスの詳細な解析の施行を可能にする。本マウスの免疫学的特徴と痒みの評価を実施する。

（倫理面への配慮）

組換えDNA実験は、遺伝子組換え生物などの使用の規制による生物多様性の確保に関する法律と京都大学組換えDNA実験安全管理規定に従って行う。

マウスを使用する実験は、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管などに関する基準」に記載されている方法により、また、京都大学大学動物実験及び飼育倫理審査にて承認されたプロトコール（承認番号

080150) に則り遂行する。遺伝子改変動物の取り扱いにおいては、第二種使用等拡散防止措置確認申請を行い、そのプロトコルに従って研究を遂行する。

臨床検体を用いる研究では、京都大学の医の倫理委員会に申請し承認を得ており(承認番号 E778番)、研究に参加していただく作業者には文書および口頭で今回の研究内容についての説明を行い、承諾書(検体の取り扱い・個人情報の保護・解析結果の公表・解析後の検体の取り扱い、協力した場合の利益・不利益などに関する項目など)を得た後に研究を遂行した。

C. 研究結果

Flaky tail マウスの皮膚では PH が上昇しており(図 1A)、これにより表皮ケラチノサイトの protease activated receptor-2 (PAR-2)活性が上昇することを確認した。さらにこの PAR-2 の上昇が、表皮ケラチノサイトの TSLP 産生を上昇させ(図 1B)、好塩基球の皮膚局所への浸潤を促進している(図 1C)ことが確認出来た(Moniaga CS et al, Am J Pathol, 2012, in press)。

フィラグリン変異を有するマウスを C57BL/6 マウスヘバッククロス(99.9%以上)した。本マウスでは、自然発症の皮膚炎、皮膚組織への好酸球や好塩基球および肥満細胞の浸潤、TSLP 発現の上昇、Th2 および Th17 サイトカイン発現の上昇や、血清 IgE 値の上昇を認めた。また、sclaba real を用いた解析により、掻破行動を起こしていることも明らかとなった。

D. 考察

フィラグリン遺伝子異常を有する flaky tail マウスを C57BL/6 マウスヘバッククロスすることにより、C57BL/6 マウスをコントロールとした解析、あるいは、各種遺伝子変異マウスを用いた解析を行うことを可能とした。本マウスはそう痒を認めるため、今後 IL-31、semaphorin の影響を検証するのみならず、好酸球や好塩基球、肥満細胞などの各種因子や IL-17A などの炎症性サイトカインが掻痒を含めた AD の病態形成にどのように関与しているかの検討が各種遺伝子改変マウスと掛け合わせるにより可能となる。

E. 結論

C57BL/6 を遺伝背景とするフィラグリン遺伝子異常を有する flaky tail マウスを作成した。本マウスは、マウスアトピー性皮膚炎モデルとして重要な役割を果たすことが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. 2012. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med* 209: 1743-52
- 2) Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. 2012. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J* 26: 211-8
- 3) Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. PGD2 induces eotaxin-3 via PPARgamma from sebocytes: a possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol* 129: 536-43
- 4) Nakahigashi K, Otsuka A, Doi H, Tanaka S, Okajima Y, Niizeki H, Hirakiyama A, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. Prostaglandin E2 Increase in Pachydermoperiostosis without 15-hydroprostaglandin Dehydrogenase Mutations. *Acta Derm Venereol* 2012 Jun 27. [Epub ahead of print]
- 5) Nakajima S, Igyarto BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K. 2012. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1048-55 e6
- 6) Ono S, Otsuka A, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. No filaggrin gene mutation in a patient with a combination of atopic dermatitis, alopecia areata and food allergy. *Eur J Dermatol* 2012 Nov 20.

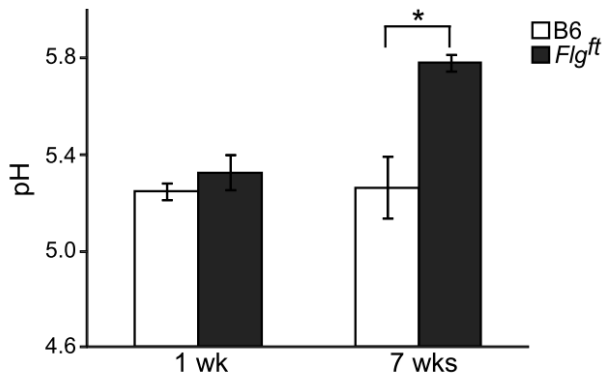
[Epub ahead of print]

- 7) Tanizaki H, Ikoma A, Fukuoka M, Miyachi Y, Kabashima K. 2012. Effects of bepotastine and fexofenadine on histamine-induced flare, wheal and itch. *Int Arch Allergy Immunol* 158: 191-5

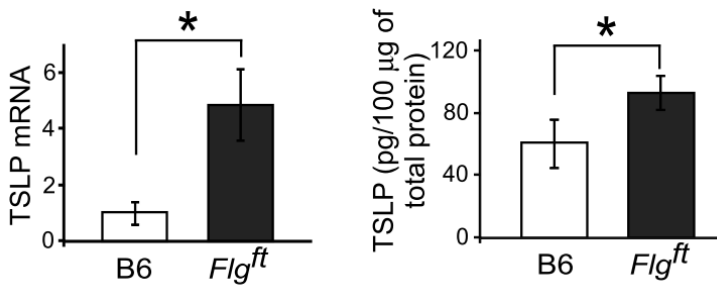
H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
該当せず

図 1

A Flaky tail マウス (Flg^{ft}) の皮膚 pH



B Flaky tail マウスの TSLP 発現 (mRNA、蛋白)



C 皮膚への好塩基球浸潤

