

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19649

研究課題名(和文) 高IgE症候群モデルマウスを用いたアトピー性皮膚炎重症化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of the severe atopic dermatitis in a mouse model of Hyper-IgE syndrome

研究代表者

和田 剛 (WADA, Takeshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・特任助教

研究者番号：80583418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高IgE症候群(HIES)患者における重症アトピー性皮膚炎の原因を解明するために、STAT3-DNマウス(HIESのマウスモデル)に、オキサゾロン反復塗布によるアトピー性皮膚炎を誘発し、皮膚の炎症反応を評価した。その結果、STAT3-DNマウスでは皮膚炎惹起部位の皮膚の肥厚ならびに浸潤細胞数の増加など免疫系の異常反応が皮膚炎の重症化につながる事が考えられる結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate a molecular mechanism underlying the severe atopic dermatitis in patient of Hyper-IgE syndrome (HIES), atopic dermatitis was elicited by repeated oxazolone (Ox) application to the ear of STAT3-DN mice, a mouse model of HIES, and cutaneous inflammatory responses were evaluated. We observed that abnormal immune reaction is responsible for severe inflammatory responses in repeated Ox-challenged STAT3-DN mice.

研究分野：免疫学

キーワード：高IgE症候群 皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

高 IgE 症候群は、(1) 新生児期から発症する重症性アトピー性皮膚炎、(2) 黄色ブドウ球菌を中心とする細胞外寄生細菌による皮膚膿瘍と肺炎、(3) 血清 IgE の高値を3主徴とする免疫不全症である。この病気の発症率は10万から50万人に1人といわれ、男女比は同等であると報告されている。

3主徴の一つである重症のアトピー性皮膚炎については、生後数週の間には膿疱性丘疹が顔、頭皮に発症し、次第に体の下方へ病態が広がり、慢性のアトピー性皮膚炎へと進行することが知られ、皮膚病理組織像では、好酸球の浸潤と乳頭浮腫を認める。

Davis らが1966年に Lancet に高 IgE 症候群の第1例を多発性反復性の黄色ブドウ球菌による感染に、アトピー性皮膚炎を合併する症例として報告した。当時は IgE を検出する技術が無かったので、高 IgE 値については報告されていなかったが、1972年に Buckley らは、これらの臨床症状に加えて著しい高 IgE 血症を合併することを報告した。このように疾患自体は、50年以上も前に既に報告されていたが、その原因並びに病気の発症メカニズムについては、全く分かっていなかった。

しかし、当研究室が世界に先駆けて、高 IgE 症候群の責任遺伝子である STAT3 を同定し、STAT3 遺伝子の単一の対立遺伝子におけるドミナントネガティブ (DN) 突然変異によって引き起こされることを明らかにした (Minegishi ら, Nature, 2007)。しかし、これらの遺伝子の異常がどのようなメカニズムで、高 IgE 症候群の患者において、アトピー性皮膚炎を重症化させるかはこれまで不明であった。

病態モデルマウスを用いることはメカニズムを解明する際に非常に有益であるが、STAT3 を全身でノックアウトすると、マウスが胎生致死になることから STAT3 ノックアウト

マウスが存在しないなど、高 IgE 症候群の適切なモデルマウスはこれまで存在していなかった。そこで、私たちは世界に先駆けて、高 IgE 症候群モデルマウスを作製した。

2. 研究の目的

本研究では、当研究室で樹立した STAT3 の DN 変異体を全身に発現する高 IgE 症候群モデルマウス (以下、STAT3-DN マウスと表記) を用いて、高 IgE 症候群の患者で起こるアトピー性皮膚炎重症化の病態に関わるメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎モデル実験系として確立されているオキサゾロン (Ox) 反復塗布皮膚炎 (マウスをハプテンである Ox で感作した後、2日に1回の割合で Ox を反復塗布することで起きるアトピー性皮膚炎様の慢性炎症) (Man ら, J Invest Dermatol, 2008) を野生型 (WT) マウスと STAT3-DN マウスに15日間惹起した。

惹起後にマウスより血液を採取し、遠心操作により血清を分離し、血清中に含まれる総 IgE 量、ならびに Ox 特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。総 IgE 量の測定法については、ELISA プレートに抗マウス IgE ヤギ抗体を加え4℃で一晩、固相化させた後、0.5% BSA 入りブロッキング液を加え、室温で1時間ブロッキングを行った。そこへ、10、100倍に希釈した血清を加え、室温で2時間反応させた後、ビオチン化抗マウス IgE 抗体を室温で1時間反応させた。続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、室温で30分反応させた。その後、発色基質液を加え、室温で30分反応させ、反応停止液 (0.2N H₂SO₄) を加え、プレートリーダーで吸光度 (O.D. 450-570nm) を測定した。

Ox 特異的 IgE 量については、ELISA プレートに Oxa-オボアルブミン (OVA) または OVA

を加え、4 で一晩反応させた後、10%FBS 入りブロッキング液を加え、室温で 1 時間反応させた。その後は、総 IgE 量測定と同じ手順で吸光度を測定し、Oxa-OVA 固相化プレートにおける吸光度から OVA 固相化プレートにおける吸光度を差し引いた値を O_x 特異的 IgE の吸光度とした。

皮膚炎惹起前・後の皮膚の厚さをダイヤルゲージを用いて測定した後に皮膚を採取した。一部はホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、各種染色 (Hematoxylin & Eosin 染色、免疫染色等) による病理組織学的検索を行った。

採取した皮膚はその他に、RNA を採取し、マイクロアレイを用いて皮膚炎惹起部位での各種遺伝子発現についての解析や、ホモジネート液を作製し ELISA 法を用いて、サイトカイン含有量の測定を行った。またコラゲナーゼ処理により皮膚をから細胞を単離し、フローサイトメーターを用いて皮膚炎惹起部への浸潤細胞集団の解析を行った。

4. 研究成果

まず、WT マウスまたは STAT3-DN マウスの耳に、O_x の反復塗布によるアトピー性皮膚炎を惹起後、マウスより血液を採取し、血清中に含まれる総 IgE 量と O_x 特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。すると、STAT3-DN マウスでは WT マウスと比較して、総 IgE 量のみならず、O_x 特異的 IgE 量も、有意に増加していることが分かった (図 1)。

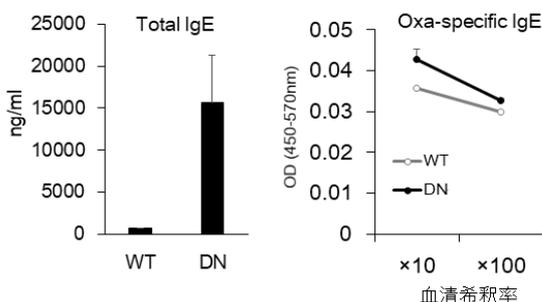


図1. O_x反復塗布後の血清中の総IgE量とO_x特異的IgE量

次に、皮膚炎惹起部位での炎症反応を評価するために、ダイヤルゲージを用いて皮膚厚を測定したところ、STAT3-DN マウスでは WT マウスと比較して有意に増加していることが分かった。また、Hematoxylin & Eosin 染色による病理組織学的検索を行ったところ、STAT3-DN マウスでは WT マウスと比較して、皮膚の肥厚ならびに浸潤細胞数の増加など、皮膚炎の重症化が観察された (図 2)。

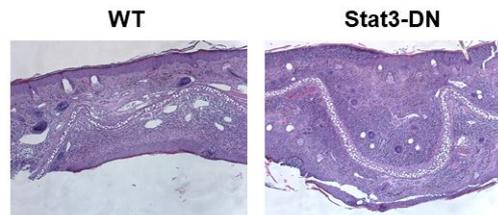


図2. O_x反復塗布後の耳の切片像

また、皮膚炎惹起部の皮膚をコラゲナーゼ処理することにより浸潤細胞を単離し、フローサイトメーターを用いて解析を行ったところ、皮膚炎惹起部位への好酸球の浸潤が STAT3-DN マウスでは WT マウスと比較して

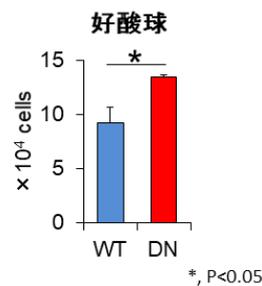


図3. O_x反復塗布後の耳の好酸球数

有意に増加していることが分かった (図 3)。これらの結果から、STAT3-DN マウスが好酸球浸潤数の増加や、皮膚炎の重症化などヒトでの

病態を再現することが確認できた。

皮膚炎惹起部位でのサイトカイン産生について、RNA を抽出しマイクロアレイを用いて解析を行ったところ、WT マウスに比べて STAT3-DN マウスでは、IL-4 関連遺伝子や TSLP 関連遺伝子の有意な上昇が認められた。さらに、ELISA 法を用いて皮膚炎惹起部位におけるサイトカイン含有量の測定を行ったところ TSLP 量と IL-4 量が、STAT3-DN マウスにおいて WT よりも有意に増加していること

が明らかとなった(図4)。

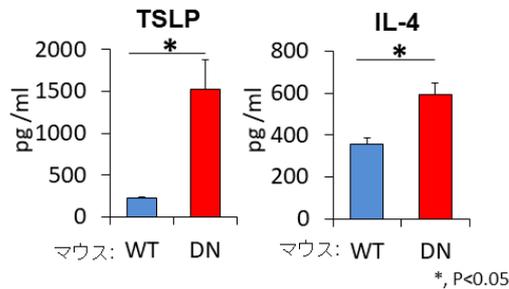


図4.炎症部位におけるTSLPおよびIL-4量

TSLP や IL-4 はアトピー性皮膚炎に関わることが報告されており、これらの免疫系の異常反応が高IgE症候群におけるアトピー性皮膚炎の重症化に關与している可能性が考えられる結果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Takeshi Wada, Yumiko Nishikawa, Yoshiyuki Minegishi, Exacerbation of oxazolone-induced atopic dermatitis in a mouse model of hyper-IgE syndrome, The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2017.12.13, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Takeshi Wada, Yumiko Nishikawa, Yoshiyuki Minegishi, Basophils promote oxazolone-induced atopic dermatitis in mouse model of hyper-IgE syndrome, The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2016.12.7, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Takeshi Wada, Yumiko Nishikawa, Yoshiyuki Minegishi, Analysis of a molecular mechanism underlying the susceptibility to Staphylococcus aureus infection in Hyper-IgE syndrome, International Congress of Immunology 2016, 2016.8.24,メルボルン(オーストラリア)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
徳島大学先端酵素学研究所プロテオゲノム
領域免疫アレルギー学分野 HP

<http://www.genome.tokushima-u.ac.jp/dmm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 剛(WADA, Takeshi)

徳島大学・先端酵素学研究所・特任助教

研究者番号：80583418

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし