

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03569

研究課題名(和文) ラットモデルを用いたアトピー性皮膚炎原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of causative genes in a rat model of atopic dermatitis

研究代表者

庫本 高志 (KURAMOTO, Takashi)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：20311409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎モデルラットであるKFRS4ラットの皮膚炎原因遺伝子を遺伝学的手法によって同定することを目的とした。308頭のF2交雑子と1403個のSNPマーカーを用いてQTL解析を行った。ラット17番染色体遠位部に原因遺伝子座Atopic dermatitis KFRS4-1 (Adermk1)を同定した。また、KFRS4ラットと正常型のPVGラットの皮膚で発現の異なる遺伝子を見出した。しかし、これらの遺伝子のうちAdermk1座位に存在するものはなかった。一方、Adermk1には、Th2細胞分化を制御する転写因子Gata3遺伝子が存在しており、原因遺伝子の強力な候補として挙げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の優れたモデル動物であるKFRS4ラットの皮膚炎発症に係る遺伝子座を見出した。この遺伝子座には、Th2細胞分化を制御する転写因子Gata3遺伝子が存在しており、Gata3 遺伝子がアトピー性皮膚炎に係る可能性が示唆された。今後、コンジェニック系統や詳細な遺伝子発現解析を行うことで、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子の同定が期待される。これにより、多くの人が苦しんでいるアトピー性皮膚炎に対する新たな治療法、予防法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Kyoto Fancy Rat Stock 4 (KFRS4) rats spontaneously developed dermatitis that accompanied an elevation of IgE and scratching behavior. The dermatitis was evidently suppressed by topical application of betamethasone. In addition, KFRS4 rats exhibit skin barrier dysfunction. Thus, the KFRS4 rat is a good model of the atopic dermatitis. Here, we performed quantitative trait locus (QTL) analysis of the onset and severity of the dermatitis in KFRS4 rats. We produced 308 (KFRS4 × PVG)F2 intercross progeny and determined the onset and severity of dermatitis of them. We determined genotypes for 86 SSLP markers and performed QTL analysis with the R/qt1 program. We found significant linkage relationships between two SSLP markers with the onset and severity, respectively. Both SSLP makers located on chromosome 17 and mapped within a 3cM-region. Thus, we considered that a QTL that included the two markers influenced the onset and severity.

研究分野：実験動物学

キーワード：アトピー性皮膚炎 ラット QTL解析 SNP SSLP 連鎖解析 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、かゆみを伴う湿疹を主病変とする疾患である。患者の多くは、アレルギー性疾患の家族歴・既往歴をもつ。また、IgE抗体を産生しやすい体質をもつ。さらに、皮膚バリアの機能障害が、アトピー性皮膚炎の発症に深く関わっていることが明らかとなっている。アトピー性皮膚炎の最大のリスク要因は遺伝因子である。ヒトやマウスの家系解析などから、アトピー性皮膚炎は複数の遺伝要因により発症すると考えられた。

アトピー性皮膚炎の原因遺伝子を同定する手法として、動物モデルを用いた方法がある。優れた動物モデルがあればその原因遺伝子を同定することで、アトピー性皮膚炎に係る遺伝要因を同定することができる。

我々が開発したアトピー性皮膚炎モデルラットに KFRS4/Kyo ラットがある(Kuramoto et al. J Dermatol Sci, 2015)。KFRS4 ラットは、雌では全ての個体が約6か月齢で、ダニなどの感染なしに、引っ掻き行動を伴う重篤な皮膚炎を自然発症する(図1)。さらに、血中IgEの上昇、皮膚バリアの機能障害が観察される。このように、KFRS4の皮膚炎は、ヒトアトピー性皮膚炎に類似しており、新たなアトピー性皮膚炎のモデルとして確立された。



図1. KFRS4 ラットの外観

KFRS4 ラットのアトピー性皮膚炎原因遺伝子を遺伝学的解析手法によって同定するには、多数の交雑子の作製と多数の遺伝マーカーが必要である。分担研究者である九州大学の須山らは、ラットにおいて、約3万個のSNPマーカーからなるジェノタイプングキットを開発した。

2. 研究の目的

本研究では、KFRS4 ラットのアトピー性皮膚炎原因遺伝子を同定するために、原因遺伝子の染色体マッピング、候補遺伝子の抽出と変異の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 原因遺伝子の染色体マッピング

表現型の決定

(KFRS4xPVG)F2 と (PVGxKFRS4)F2 あわせて308頭(雌雄含む)の産子を作成した。8週齢から、2週間毎に、皮膚炎の発症を観察した。具体的には、上唇、下唇、右手、左手、右足、左足、背部、頭頸部の8部位について、紅斑(軽度)、湿疹(軽度、中程度)、痂皮(中程度、重度)、水疱(中程度、重度)、糜爛(中程度、重度)をスコアリングした。皮膚炎の進行が顕著な個体は、随時、安楽死処分し、主要臓器に加え、皮膚、リンパ節、血液を採取した。

スコアが1、3、9を超えた時点の発症時期、剖検時までの累積スコアを量的形質として、発症の有無を質的形質として用いた。

遺伝子型の決定

KFRS4 と PVG で多型のある88個のSSLPマーカーを用いた。また、次世代シーケンサーを用いて1403個のSNPマーカーを用いた遺伝子型の決定を行った。

QTL解析

上記で決定した表現型と遺伝子型をもとに、ソフトウェア(R/qt1)を用いてQTL解析を行った。

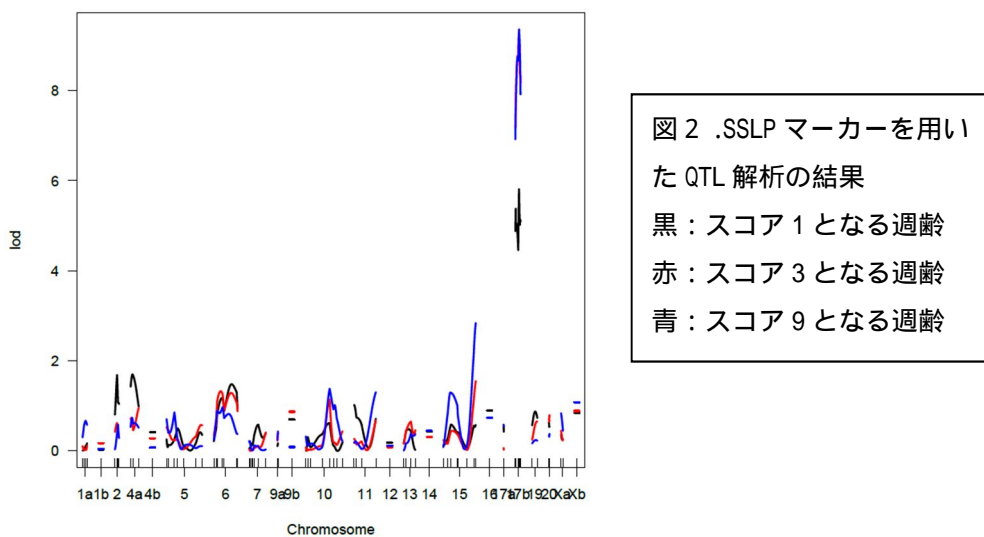
(2) 候補遺伝子の抽出

1週齢と6週齢のKFRS4ラットとPVGラットの皮膚を採取し、トータルRNAを精製しRNA-seq法で遺伝子の発現解析を行った。QTL解析で限定されたアトピー性皮膚炎原因座位に存在し、KFRS4ラットとPVGラットの皮膚で発現量の異なる遺伝子を候補遺伝子とした。また、免疫、皮膚バリアに関係すると思われる遺伝子も候補遺伝子とした。

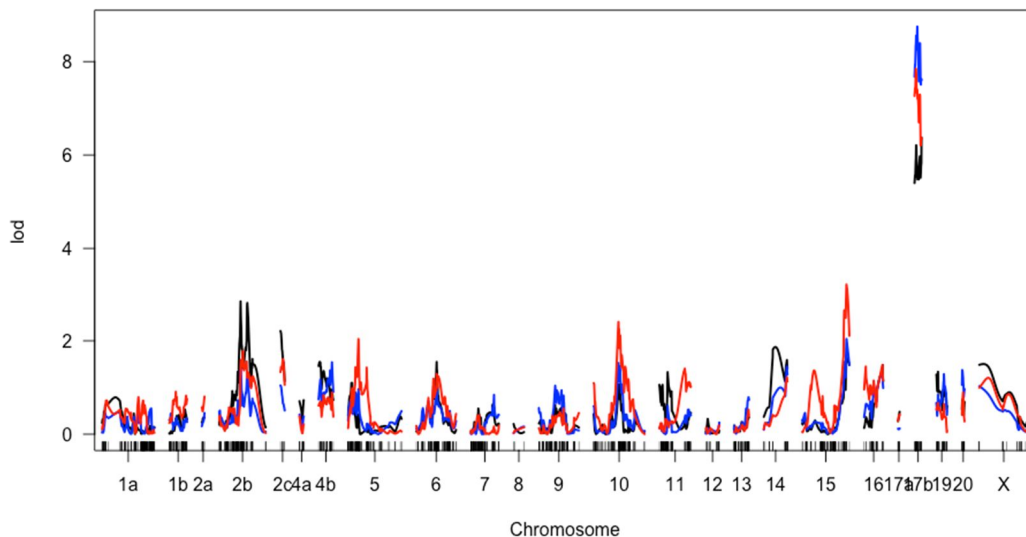
4. 研究成果

(1) 原因遺伝子の染色体マッピング

308頭のF2交雑子の皮膚炎発症の経時的変化をスコア化し、表現型を決定した。また、88個のSSLPマーカーを用いて遺伝子型を決定した。次いで、QTL解析を行い、皮膚炎の発症週齢、最高スコアを規定する遺伝子座を17番染色体遠位部に同定した(図2)。



さらに、発症個体183個体を対象に、1260個のSNPマーカーによる遺伝子型を決定し、QTL解析を行った。その結果、皮膚炎発症に係る遺伝子座を17番染色体遠位部に同定した(図3)。



D17Rat47 の遺伝型が KFRS4 ホモ型の個体は、PVG ホモ型の個体に比べ、発症週齢は約 20 週早かった。また、D17Rat82 の遺伝型が KFRS4 ホモ型の個体は、PVG ホモ型の個体に比べ、最高スコアは約 5 ポイント高かった。D17Rat47 と D17Rat82 の組換え率は 3.1%であった。以上のことから、D17Rat47 と D17Rat82 を含む領域を KFRS4 ラットの皮膚炎発症を規定する遺伝子座とし、この QTL を atopic dermatitis in KFRS4-1(Adermk1) と名付けた。

(2) 候補遺伝子の抽出

KFRS4 と PVG ラットの皮膚で発現している mRNA を RNA-seq 法により比較した。1 週齢と 4 週齢で共通して発現が変化している遺伝子として表 1 の遺伝子が得られた。

表 1 KFRS4 と PVG ラットの皮膚で発現が変化していた遺伝子 (変化量は log2 の値で表す。)

KFRS4で発現量が減少していた遺伝子

Gene_Symbol	Gene_Description	fold change (1w)	fold change (4w)
<i>Npy</i>	neuropeptide Y	-7.6	-40.5
<i>Mlana</i>	melan-A	-7.1	-30.0
<i>Idi2</i>	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2	-9.8	-2.7
<i>Caprin1</i>	cell cycle associated protein 1	-2.6	-2.7
<i>Tpm4</i>	tropomyosin 4	-2.1	-2.4
<i>Ptrf</i>	polymerase I and transcript release factor	-2.3	-2.3
<i>Ccnd2</i>	cyclin D2	-2.6	-2.2
<i>Fstl1</i>	follicle-stimulating-like 1	-2.3	-2.1

KFRS4で発現量が増加していた遺伝子

Gene_Symbol	Gene_Description	fold change (1w)	fold change (4w)
<i>RT1-A1</i>	RT1 class Ia, locus A1	6.8	24.6
<i>Krtap16-5</i>	keratin associated protein 16-5	4.2	142.5
<i>Krtap1-5</i>	keratin associated protein 1-5	3.6	60.0
<i>Krt34</i>	keratin 34	3.8	72.6
<i>Krtap14</i>	keratin associated protein 14	4.6	62.0
<i>Krt86</i>	keratin 86	4.3	93.5
<i>Krtap7-1</i>	keratin associated protein 7-1	3.2	390.2
<i>Krtap15-1</i>	keratin associated protein 15-1	3.3	241.9
<i>Krt81</i>	keratin 81	4.2	89.9
<i>Krt33b</i>	keratin 33B	3.7	155.3
<i>Kb23</i>	type II keratin 23	3.9	150.3
<i>Krt33a</i>	keratin 33A	3.3	96.1
<i>LOC685544</i>	hypothetical protein LOC685544	3.7	7.4
<i>Krt31</i>	keratin 31	3.5	111.3

これらの遺伝子のゲノム上の位置を調べたところ、Adermk1 座位に存在する遺伝子は無かった。それゆえ、これらの遺伝子が KFRS4 ラットの皮膚炎発症の原因遺伝子ではないと考えた。

アトピー性皮膚炎の発症には免疫の関与が大きい。そこで、Adermk1 座位近傍で免疫機能に関与すると知られている遺伝子を調べた。その結果、Gata3 が見出された。Gata3 は、Th2 細胞分化を制御する転写因子 GATA3 をコードする。Th2 細胞は、アトピー性皮膚炎を含むアレルギー疾患の発症に重要な役割を果たす。そこで、Gata3 を KFRS4 ラットのアトピー性皮膚炎の原因遺伝子の候補遺伝子とした。エクソン領域をシーケンスしたところ、PVG ラットとの間に機能を変

異は見出せなかった。

以上、本研究では、アトピー性皮膚炎の優れたモデル動物である KFRS4 ラットの皮膚炎発症に係る遺伝子座を見出した。この遺伝子座には、Th2 細胞分化を制御する転写因子 Gata3 遺伝子が存在しており、Gata3 遺伝子がアトピー性皮膚炎に係る可能性が示唆された。今後、コンジェニック系統や詳細な遺伝子発現解析を行うことで、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子の同定が期待される。これにより、多くの人が苦しんでいるアトピー性皮膚炎に対する新たな治療法、予防法が開発されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庫本高志、横江繭子
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎モデルラットにおけるハプテン誘発皮膚炎
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 庫本高志 横江繭子、石川 明
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎発症遺伝子座の同定
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金子 武人 (KANEKO Takehito) (30332878)	岩手大学・理工学部・准教授 (11201)	
研究分担者	須山 幹太 (SUYAMA Mikita) (70452365)	九州大学・生体防御医学研究所・教授 (17102)	