

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791095

研究課題名(和文)

フィラグリン変異マウスを用いた新規アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

研究課題名(英文) Development of a New Model for Atopic Dermatitis Using Filaggrin Mutant Mice

研究代表者

川崎 洋 (KAWASAKI HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)

研究者番号：70445344

研究成果の概要(和文): フィラグリンの発現が著しく低下している flaky tail マウスを用い、フィラグリンの機能を正しく評価すると共に、アトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とする新しいマウスモデルの作製を目指す。Flaky tail マウスは外から内への物質透過性の亢進を認めたと、フィラグリン変異それ自体ではTEWLの上昇を起こさないことが示唆された。Flaky tail マウスは野生型マウスに比べ、経皮免疫反応の亢進が認められた。

研究成果の概要(英文): To better understand the functional properties of filaggrin and to develop a new model for elucidating the pathogenesis of atopic dermatitis, flaky tail mice, which have mutant filaggrin and its expression is significantly reduced, were utilized. This study exhibited enhanced outside-to-inside permeability in flaky tail mice, however it indicated filaggrin deficiency itself was not affected with increased transepidermal water loss. Flaky tail mice showed enhanced percutaneous immune response, as compared with wild-type mice.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚バリア、アトピー性皮膚炎、フィラグリン

## 1. 研究開始当初の背景

2006年4月、欧米の多くのアトピー性皮膚炎患者に、高率にフィラグリン遺伝子変異が認められたと報告された(Palmer CAN, et al. Nat Genet 2006)。フィラグリンは表皮角層の主要構成成分であり、フィラグリン遺伝子変異に基づく皮膚バリア機能異常がアトピー性皮膚炎発症の主要因であるという仮説が注目されていた。しかし、上記仮説を体現する動物モデルは過去に報告されておらず、その大前提であるはずのフィラグリンと皮膚バリア機能、特に物質皮膚透過性に対する影響も明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、フィラグリンの発現が著しく低下している flaky tail マウスを用い、物質の皮膚透過性におけるフィラグリンの関与を明らかにする。そして、この知見を元にして上記仮説を検証し、皮膚バリア機能異常に起因するアトピー性皮膚炎マウスモデルを確立するため、フィラグリン変異皮膚における経皮的抗原曝露後の免疫応答の詳細を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) フィラグリンの物質皮膚透過性に関する解析

TEWL(trans epidermal water loss:経皮的水分蒸散量)を測定し、内から外への水分蒸散量に対する検討を行った。

メタノールを用いて脱脂処理した胎児期のマウスにトルイジンブルーを塗布し、その浸透性を評価した。

#### (2) フィラグリン変異マウスの経皮免疫反応の解析

##### 刺激性接触皮膚炎反応

マウス耳翼に 0.6% croton oil を塗布し、その後の耳翼腫脹を計時的に評価した。

##### ハプテン誘導性接触過敏反応

剃毛したマウスの腹部に 0.3% DNFB を塗布して感作した 5 日後、マウス耳翼に 0.15% DNFB を塗布した。その後の耳翼腫脹を計時的に評価した。

##### 蛋白抗原に対する液性免疫応答

マウスの耳翼に OVA 溶液を dibutyl phthalate と共に隔日(3回/週)で塗布した。8 回目の塗布を行った後、OVA 特異的 IgG, OVA 特異的 IgE を ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) フィラグリンの物質皮膚透過性に関する解析

仔マウスの TEWL を測定したところ、flaky tail マウスと野生型マウス間で有意差を認めなかった(図 1)。また、flaky tail マウスは SPF 下で長期間飼育すると肉眼的・組織学的皮膚炎を自然発症することを報告したが(Moniaga CS, et al. Am J Pathol, 2010)、皮疹部では TEWL が上昇しているのに対し、無疹部では TEWL の上昇がみられないことがわかった。つまり、フィラグリン変異それ自体では TEWL の上昇を起こさないことが示唆された。

一方、アトピー性皮膚炎の発症に最も影響する皮膚のバリア機能は、外界の物質の経皮的透過を防ぐ物質移動の障壁としての役割である。胎児マウスにトルイジンブルーを塗布し、その浸透性を評価したところ、flaky tail マウスでは野生型マウスに比べ明らかな色素透過性の亢進を認めた(図 2)。

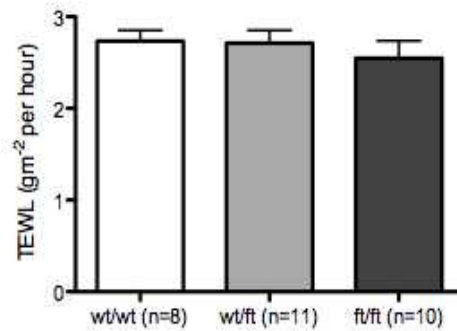


図 1 TEWL を測定したところ、野生型マウス(wt/wt)と flaky tail マウス(ft/ft)との間に有意差を認めなかった。(wt/ft: ヘテロマウス)



図 2 ft/wt を交配した littermate マウス胎児にトルイジンブルーを浸透させ、色素透過性を比較した(左図:野生型マウス(wt/wt), 右図: flaky tail マウス(ft/ft))

本研究より、フィラグリンは外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、TEWL のみでは体外から表皮内への物質透過能を評価することはできないことが示唆された。

#### (2) フィラグリン変異マウスの経皮免疫反応の解析

##### 刺激性接触皮膚炎反応

flaky tail マウスは野生型マウスに比べ、croton oil 塗布後の耳翼腫脹反応が有意に亢進した。(図 3)

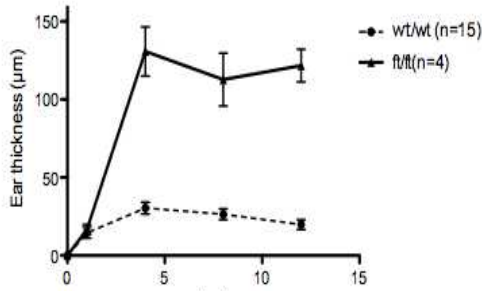


図3 野生型マウス(wt/wt)と flaky tail マウス(ft/ft)の croton oil 塗布後の刺激性接触皮膚炎反応の比較

#### ハプテン誘導性接触過敏反応

flaky tail マウスは野生型マウスに比べ、DNFB によるハプテン誘導性接触過敏反応の有意な亢進を認めた。(図4)

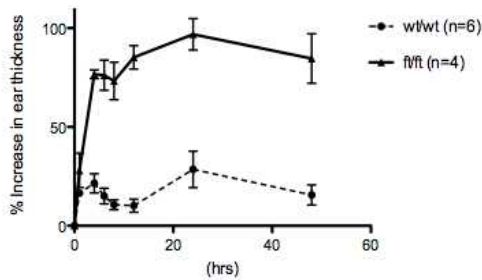
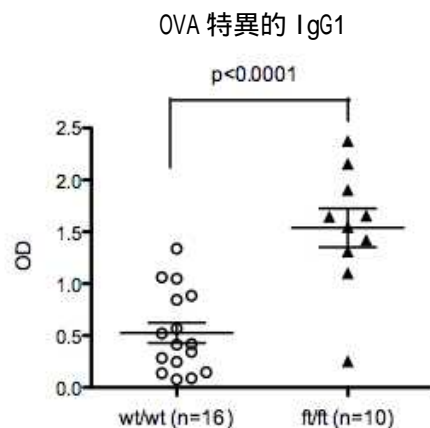


図4 野生型マウス(wt/wt)と flaky tail マウス(ft/ft)のハプテン(DNFB)誘導性接触過敏反応の比較

#### 蛋白抗原に対する液性免疫応答

OVA を繰り返し塗布した後の抗原特異的 IgG 及び IgE 産生能を ELISA 法により評価したところ、flaky tail マウスは野生型マウスに比べ、血清中 OVA 特異的 IgG1, OVA 特異的 IgE 値の有意な上昇を認めた。(図5)



#### OVA 特異的 IgE

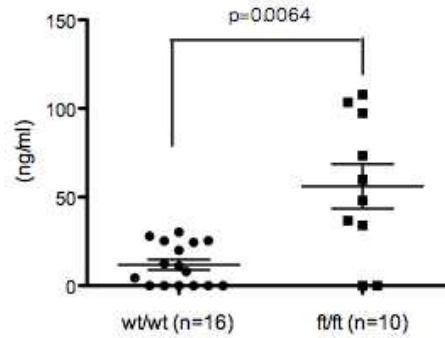


図5 野生型マウス(wt/wt)と flaky tail マウス(ft/ft)の蛋白抗原(OVA)繰り返し塗布後の抗原特異的 IgG1 及び IgE 産生能の比較

以上の flaky tail マウスを用いた経皮免疫応答の解析から、フィラグリン変異皮膚では経皮的な外来抗原曝露後の免疫反応が亢進していることが示唆された。

今後は抗原の種類、曝露方法を十分に検討することで、安定して皮膚炎を誘導できるアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指す。

本研究は、フィラグリンの機能を正しく評価すると共に、皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とするマウスモデルの作製につながるものである。

#### 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2件)

Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. EMBO Mol Med. (in press)  
査読有り

Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with Dermatophagoides pteronyssinus extract. Am J Pathol 176(5): 2385-93, 2010 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

Kawasaki H: Filaggrin null mice exhibit altered skin barrier formation and enhanced percutaneous immune responses. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, Japan. 2010. Dec 3.

Kawasaki H: Filaggrin knockout mice as a tool for understanding percutaneous antigen exposure in barrier disrupted skin. the 40<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland. 2010. Sep 10.

Kawasaki H: Filaggrin Knockout Mice as a Tool for Understanding the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Japan. 2010. Aug 25.

川崎 洋: Filaggrin Knockout Mice as a Tool for Understanding the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. Filaggrin Knockout Mice as a Tool for Understanding the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. 第39回日本免疫

学会総会・学術集会,(大阪). 12月3日. 2009年.

川崎 洋: アトピー性皮膚炎病態解明のためのフィラグリン欠失マウスの作製. 第16回分子皮膚科学フォーラム,(札幌). 11月21日. 2009年.

〔図書〕(計1件)

Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M. KARGER. Curr Probl Dermatol.

Loss of function mutations within the filaggrin gene predispose to atopic dermatitis. 41: 35-46, 2011 (in press)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 洋  
慶應義塾大学・医学部・研究員(非常勤)  
研究者番号: 70445344

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし