

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790949

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎の発症においてケラチノサイトと炎症性細胞とが果たす役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of keratinocyte and inflammatory cells for development of atopic dermatitis

研究代表者

安田 琢和 (YASUDA TAKUWA)

独立行政法人理化学研究所・アレルギー免疫遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：00373374

研究成果の概要（和文）：

本研究では、我々が独自に樹立したアトピー性皮膚炎様の皮膚疾患を自然発症する *spade* マウスを用いて、皮膚炎の発症機構の解明を目指した。

表皮ケラチノサイトへ加わる皮膚炎発症に関わる因子としては、黄色ブドウ球菌の細菌成分と痒み刺激が有効であることが分かった。そして、これに続いて起こる皮膚炎症時には、顆粒球の浸潤、特に好塩基球の増加が顕著であった。一方、これまで皮膚炎発症に対して重要視されていた肥満細胞や IgE は、補助的な役割にとどまることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, using a newly generated mutant mouse (*spade* mouse), which spontaneously develops atopic dermatitis like skin disease, we investigated a mechanisms for development of dermatitis.

Our data showed that bacterial component from *S. aureus* and pruritic stimulus elicited by PAR2-agonist peptide had a potential for an activating factor affecting epidermal keratinocytes in the development of dermatitis. Infiltration of granulocytes, especially basophils were higher in *spade* mouse skin than in wild-type mouse skin at just before the appearance of dermatitis, and were increased in skin of *spade* mouse after the development of dermatitis. On the other hand, our results suggested that mast cells and IgE played a supportive role in the development of dermatitis in our mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、黄色ブドウ球菌、好塩基球、肥満細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、乳児期早期から発症がみられ、他のアレルギー疾患に比べても発症が早くに認められる。さらに、この乳児期のアトピー性皮膚炎は幼児期以降の気管支喘息、アレルギー性鼻炎やアレルギー性結膜炎などの花粉症といったアレルギー疾患の発症へと繋がる、アレルギーマーチとして知られる現象の起点となることが多いとされている。そこで、この起点となるようなアトピー性皮膚炎の予防方法および治療薬剤の開発は、後で発症してくるアレルギー疾患への予防的な見地から有用であり、国民の医療および QOL 向上のための重要事項の一つと考えられる。

しかしながら現実には、ステロイド剤や保湿剤による対症療法が主な治療法となっており、アトピー性皮膚炎の発症機構を解明し、それに基づいた根治的療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎の発症機構には、免疫学的な要因に基づくものや皮膚表皮バリア機能の破綻を要因とするものなどが考えられている。この内後者では、表皮バリア形成に必要な細胞外基質蛋白の一つであるフィラグリンの変異がアトピー性皮膚炎患者で同定され、疾患の発症要因として注目されている。

しかしながら、このような皮膚バリア破綻が、どのようなメカニズムで皮膚炎発症へ至るのかについては不明な点が多い。また全ての皮膚異常が皮膚炎発症に結びつくことはなく、乾癬などの別な病態へ進むこともある。これらのことから、皮膚バリアを形成するセラチノサイトへの刺激と、そして皮膚炎症を引き起こすような免疫系の細胞、炎症性細胞との相互作用が、表皮バリア破綻からアトピー性皮膚炎発症へ至る鍵となるのではないかと考えた。

そこで本研究では、皮膚バリア破綻に関わる仕組みを解明し皮膚炎発症の制御に関して、皮膚炎発症に関わる細胞の解明を目指した。

3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎の発症機構の解明のためには、疾患の発症過程を追跡し、発症の各段階の仕組みを一段階ずつ確認していくことが必要であり、そのためには実験動物個体レベルでの詳細な解析が必要不可欠であると考えた。

ここで本研究では、この必要に適う優れた実験動物モデルを用いることができた。これは、我々が独自に樹立したヒトのアトピー性皮膚炎とよく似た皮膚疾患を自然発症するミュータントマウスである。現在までに原因遺伝子変異は細胞内信号伝達に関わる分子の点突然変異であることを確認している。また我々は、このミュータントマウスの病態が、[Step 1]皮膚表皮バリア破綻期、[Step 2]皮膚炎症期、[Step 3]アレルギー反応を伴う増悪期、[Step 4]慢性期、のように段階的に遷移していくことを見いだしたので、このマウスを *spade* (Stepwise progressive atopic dermatitis) マウスと命名した。

この *spade* マウスを用いて皮膚炎発症に関わる細胞の解析と皮膚炎発症の制御に関する研究を行った。

皮膚炎発症に関わる細胞の解析は、*spade* マウスの発症直前直後の皮膚組織を採取し、細胞特異的な抗体を用いた免疫組織染色法、または、細胞特異的な分子の遺伝子発現解析法を用い行った。さらに、細胞欠損マウスが入手出来る場合は、それら欠損マウスと *spade* マウスとで交配を行い、観察を行った。

皮膚炎発症の制御に関しては、細菌成分によって皮膚炎の誘導を試みる方法と痒み反応によって誘導する方法とについて検討を行った。細菌細分については、近年アトピー性皮膚炎発症への関与が示唆されているが、中でも報告の多い黄色ブドウ球菌の成分を *spade* マウスの皮膚へ塗布した。痒み誘導については、Protease-activated receptor 2 (PAR2) agonist ペプチドを *spade* マウスの皮内へ投与し、痒み反応が皮膚炎発症に関わるのかを調べた。

4. 研究成果

皮膚炎発症に関わる細胞の解析

本研究に用いた *spade* マウスでは、ほぼ全ての *spade* ミュータントホモマウスで耳から発症が始まる。そこで、*spade* マウスの耳皮膚において、皮膚炎発症前と発症後とで、好中球（抗 Gr-1 抗体）、好酸球（Cyanide-resistant EPO 法）、好塩基球（抗 MCP-8 抗体）について組織染色を行い、野生型マウスの耳皮膚とで比較した。この結果、これらのどの炎症性細胞も野生型に比べ多くの細胞が浸潤しており、発症後には、さらに多くの細胞の浸潤が見られた。特に好塩基球に関しては、特異的遺伝子（MCP-8）の発現が発症前から顕著に高くなっていて、この細胞の皮膚炎発症への関与を強く示唆した。

次に、細胞欠損マウスを入手できた細胞については、それら欠損マウスと *spade* マウスとで交配を行い、観察をした。

CD3 欠損（T 細胞欠損）-*spade* マウスでは、皮膚炎の発症が見られ、発症週齢も *spade* マウスと比較して同様であった。このことから、本モデルでの皮膚炎発症は T 細胞に依存しないと考えられた。さらに、T 細胞と B 細胞とを欠損した RAG1 欠損-*spade* マウスでも皮膚炎が発症することを観察できた。しかしこの場合は、*spade* マウスと比べ、平均発症週齢は遅くなり、平均クリニカルスコアも下がった。これらのことは、本モデルでの皮膚炎発症には T 細胞、B 細胞といった獲得免疫系は必須ではないが、補助的なブースト効果を有していることを示唆した。また、これまでのアトピー性皮膚炎のマウスモデルでは、その発症には T 細胞が必須であるとされていたが、この結果はその見解に新たな知見を加えるものと期待できる。

次に、肥満細胞について、この細胞を欠損する *c-kit^{flsh}* マウスとの間で肥満細胞欠損 *spade* マウスを交配により作製し、観察を行った。結果、このマウスでも *spade* マウスと同程度に皮膚炎の発症が見られた。さらに血清中の IgE 値の測定では、IgE 値が *spade* マウスでは、発症後に増加し、その値を維持するのに対して、*c-kit^{flsh}*-*spade* マウスでは、同様に発症後に増加するが、その後減少することがわかった。これまで、アレルギー炎症において重要視されてきた肥満細胞、IgE が、本モデルでは補助的な役割にとどまることが示された。実際、ヒトでも IgE 非依存的な病態が存在し、このよいモデルとなり得ると

考えられる。

さらに NK 細胞、NK-T 細胞についても、我々で新たに樹立した *IL15^{flsh}* マウス（解析結果の一部を後記雑誌論文で発表）との間で、両細胞を欠損した *spade* マウスを作製し、観察を行った。結果、このマウスでも *spade* マウスと同程度に皮膚炎の発症が見られ、本モデルではこれらの細胞も皮膚炎発症への関与は小さいと考えられた。

皮膚炎発症の制御

皮膚バリア破綻を促す因子として、近年報告が多い細菌感染を想定し、その細菌成分である黄色ブドウ球菌プロテイン A を用いて、これを有機溶剤（SDS）と共に *spade* ヘテロマウスへ連日塗布を行った。通常 *spade* ヘテロマウスは、SPF 飼育環境では自然発症しないが、8 週間の連日塗布によって、皮膚に強い乾燥が見られ、組織学的解析では、表皮、皮下の肥厚と好酸球を中心とした炎症性細胞の浸潤が見られた。このような現象は細菌成分のみ、有機溶剤のみの塗布では見られなかった。一方で、細菌成分+有機溶剤の塗布後にも重度の炎症像は認められなかった。このことから、炎症誘導や皮膚炎の増悪には、他の因子を必要としている可能性が考えられた。

次に、痒みとそれに伴う持続的な搔破行動の皮膚バリア破綻へ及ぼす影響を調べるために、Protease-activated receptor 2 (PAR2) agonist ペプチドを皮内投与で用いた。結果、*spade* ミュータントホモマウスの背中皮膚の 100%に、*spade* ヘテロマウスの背中にも微弱であるものの半数程度に皮膚炎を誘導することが出来た。皮膚炎を誘導できた背中皮膚組織の組織学的解析では、表皮、皮下の肥厚と多くの炎症性細胞の浸潤が見られた。このような現象は野生型マウスへのペプチド投与では見られなかった。これらのことは、皮膚炎発症の起点として、痒み反応もしくは、物理的な搔破行動が大きく影響していることを示している。さらに、この皮膚炎誘導方法により、皮膚炎の開始を制御できることを示せたことになり、今後も重要な研究手段として活用できるものと考えている。

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 1 件)

①Development and Function of Invariant Natural Killer T cells Producing TH2- and TH17-cytokines
Hiroshi Watarai, Etsuko Sekine-Kondo, Tomokuni Shigeura, Yasutaka Motomura, Takuwa Yasuda, Rumi Satoh, Hisahiro Yoshida, Masato Kubo, Hiroshi Kawamoto, Haruhiko Koseki, Masaru Taniguchi
PLoS Biology 10(2), e1001255 (2012) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

①Stepwise progressive atopic dermatitis induced by a signaling molecule hyperactivation
Takuwa YASUDA, Hisahiro YOSHIDA
Laboratory for Immunogenetics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology
14th International Congress of Immunology (August 23-27, 2010, Kobe, Japan)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：皮膚炎症性疾患の診断方法
発明者：吉田 尚弘、安田 琢和、若菜 茂
晴、久保 允人
権利者：独立行政法人理化学研究所
種類：特許
番号：特願 2010-208532
出願年月日：平成 22 年 9 月 16 日
国内外の別：国際特許

○取得状況 (計 1 件)

名称：皮膚炎症性疾患の診断方法
発明者：吉田 尚弘、安田 琢和、若菜 茂

晴、久保 允人

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：特開 2011-083279

取得年月日：平成 23 年 4 月 28 日

国内外の別：国際特許

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 琢和 (YASUDA TAKUWA)

独立行政法人理化学研究所・アレルギー免疫
遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：00373374