

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688029

研究課題名(和文)新規アレルギーモデルマウスの確立とその解析

研究課題名(英文)Establishment and characterization of a new mouse model for allergic disorders

研究代表者

中江 進(Nakae, Susumu)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：60450409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー様皮膚炎を自然発症するNC/Ngaマウスを用いた研究は、当該疾患の病態の解明に大きな貢献をなしているが、当マウスでの皮膚炎は特定病原体除去環境下(SPF)では発症しないなどの制限がある。本研究では、NC/Ngaマウスでの解析で課せられる制限のない、また、簡便で再現性の高いマウスの皮膚炎モデルを確立し、また、その皮膚炎の発症及び病態形成の分子機構の解明を行うことを目的とした。プロテアーゼ抗原をマウスの耳介表面に隔日5回塗布することにより、アトピー性皮膚炎に良く似た皮膚炎を誘導できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：NC/Nga mice, which develop a spontaneous skin inflammation resembling atopic dermatitis in human under the conventional condition, are well used as one of a mouse model for human atopic dermatitis. Since these mice do not develop the disease under the SPF condition, it is difficult to elucidate the molecular mechanism of atopic dermatitis using these mice in the setting. Therefore, we newly established a mouse model for human atopic dermatitis in the SPF condition; we found that mice developed skin inflammation resembling human atopic dermatitis by epicutaneous application with a protease antigen. We are studying the detail molecular mechanism of development of the protease-induced dermatitis.

研究分野：農学

キーワード：応用動物学 免疫学 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

平成 20 年の厚生労働省の調査結果によると、アトピー性皮膚炎の国内患者数は約 38 万人とされ、非常によく知られた難治性アレルギー疾患の代表である。アトピー性皮膚炎の発症及び病態形成の分子機構の解明および治療薬の薬効評価には、皮膚炎を発症する/させたマウスの利用が非常に有用である。マウスの皮膚炎モデルには大きく 3 つ、(1) 遺伝子変異による自然発症型 (NC/Nga、flanky tail [*Flg^{fl}*]マウスなど)、(2) 皮膚に特定の遺伝子を過剰発現/欠失させた遺伝子改変型 (IL-18 トランスジェニックマウス、皮膚特異的 STAT3 欠損マウスなど)、および、(3) 皮膚へのアレルゲン塗布による実験的誘発型に分けられる。

タイトジャンクション構成に関する filaggrin 遺伝子の変異マウスが *Flg^{fl}* マウスであり、SPF 環境下でも皮膚炎を自然発症する。約 20%前後のアトピー性皮膚炎患者や尋常性魚鱗癬患者は、この遺伝子変異をもつことも知られており (Nat Genet 38, 337, 2006; Nat Genet 38, 441, 2006)、このマウスを利用した解析の有用性を支持するものの、一方で、残り 80%はこのマウスを用いた解析ではカバーできないことも暗示する。NC/Nga マウスは、conventional 環境下では皮膚炎を発症するが、SPF 環境下では発症しない。そのため、SPF 環境下では、NC/Nga マウスの皮膚に界面活性剤を塗布してバリアを破壊し、その後、ダニ抗原を塗布することで皮膚炎の誘導を実験的に誘導する必要がある。皮膚炎の発症機構を分子レベルで追求するために、皮膚炎標的遺伝子欠損マウスと皮膚炎発症マウスを交配させて解析を行う必要性が生じる。その場合、発症の原因遺伝子が未特定な NC/Nga マウスは使い勝手が悪い。(2)の遺伝子改変型マウスは、知的財産の所有権やカルタヘナ条約に基づく法規制限がかかり、治療薬の薬効評

価という知的財産権が発生しうる目的には不適である。事実、申請者は、IgE 受容体の下流で動く RabGEF というアダプター分子の欠損マウスを作成し、このマウスが皮膚炎を自然発症することを報告した (Nat Immunol, 5, 844, 2004) が、そのような利用制限のため、申請者自身ですら、このマウスを皮膚炎解析用ツールとしては利用していない。(3)には、接触型過敏症応答の誘導の際に使用される化学物質を繰り返し、長期間、マウスに塗布する方法がある。このモデルでは上述した(1)(2)のモデルのような制限はないが、使用する化学物質の違いによって、異なる免疫応答に依存する皮膚炎、言い換えれば、関係する遺伝子が異なるため、ある化学物質での皮膚炎モデルの結果が、他の皮膚炎モデルの発症機構に等しく適用できるとは限らない。それぞれのモデルに長短所があり、研究者の目的に応じて使い分けられているが、既存の皮膚炎モデルよりも利用制限の小さく、特殊な技術を必要とせず、誰が行っても簡単に誘導でき、再現性や普遍性が高く、かつ、汎用性に優れた実験的誘発型皮膚炎モデルの確立が必要である。

2. 研究の目的

アレルギーの発症及び病態形成のメカニズムの理解および薬効評価に、アレルギー疾患を自然に発症するマウスの利用の有用性は広く認知されている。事実、アトピー様皮膚炎を自然発症する NC/Nga マウスを用いた研究は、当該疾患の病態の解明に大きな貢献をなしている。一方、当マウスでの皮膚炎は SPF 環境下では発症せず、また、発症の原因遺伝子が未特定なため、他の欠損マウスとの交配が容易でない、などの特定の条件での使用制限がある。本研究では、NC/Nga マウスでの解析で課せられる制限のない、また、簡便で再現性の高いマウス

における皮膚炎モデルを確立し、また、その皮膚炎の発症及び病態形成の分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 新規アレルギー性皮膚炎モデルの確立

皮膚炎誘導のために、**tape-stripping** や界面活性剤を使用することがあるが、マウスの背部の剃毛処理等、ステップが煩雑である。これまでの予備検討の結果、そのようなステップを経ずとも、市販のプロテアーゼをマウスの耳介表面に隔日3-5回塗布することにより、皮膚炎が誘導できることが分かっている。使用するマウスの背景、性差、週令差、プロテアーゼの濃度、投与量などの最適化を行う。皮膚炎の評価は、皮膚炎に至る経時的に回収した皮膚サンプルを用いて、下記の一般的な病理学および免疫学的な解析により把握する。

- ① 皮膚の病理像解析 (H&E, Toluidine Blue, Congo Red 染色、IHC など)
- ② 皮膚の水分含有量解析 (専門機器による測定)
- ③ 血中イムノグロブリン量解析 (ELISA による IgE や IgG subsets 測定)
- ④ 皮膚組織での遺伝子発現変化解析 (DNA microarray, Real-time PCR)
- ⑤ 皮膚の浸潤細胞および従属リンパ節細胞のプロファイル評価 (FACS、IHC)

(2) 新規アレルギー性皮膚炎の発症に関わる細胞の同定

Rag2 欠損、マスト細胞欠損 (*Kit^{W-sh/W-sh}*)、樹状細胞欠損 (CD11c-DTR)、マクロファージ欠損 (CD169-DTR)、好酸球欠損 (dblGATA1) マウス等にプロテアーゼ皮膚炎を誘導し、皮膚炎の誘導に関係する細胞を同定する。

(3) 新規アレルギー性皮膚炎の発症に関わる細胞の同定

Th2 型 (IL-4、IL-5、IL-13、STAT6、IL-25、

IL-33、TSLP)、関連遺伝子欠損マウスに皮膚炎を誘導し、それら遺伝子の関与を評価する。

4. 研究成果

(1) 新規アレルギー性皮膚炎モデルの確立

皮膚炎の誘導に必要なプロテアーゼの量は、BALB/c マウスでは 20 µg、C57BL/6 マウスでは 60 µg であった。どちらのマウス背景においても、オスよりもメスの方が皮膚炎の重症化が見られた。皮膚の病理解析の結果、このプロテアーゼによる皮膚炎は、アトピー性皮膚炎様の炎症像を呈することが明らかになった。炎症局所では、Th1、Th2 および Th17 サイトカイン mRNA の発現増強が認められた。また、皮膚局所では、マクロファージ、顆粒球、リンパ球などの免疫細胞の浸潤が顕著に増加していた。

(2) 新規アレルギー性皮膚炎の発症に関わる細胞の同定

プロテアーゼの塗布による皮膚炎は、Rag2 欠損マウス、マスト細胞欠損マウス、好酸球欠損マウスにおいても、野生型マウスと同程度に炎症が誘導されることが明らかになった。したがって、この皮膚炎の誘導には、T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、マスト細胞および好酸球は必須ではないことが明らかになった。

(3) 新規アレルギー性皮膚炎の発症に関わる細胞の同定

プロテアーゼの塗布による皮膚炎は、Th2 関連遺伝子欠損マウスにおいても、野生型マウスと同程度に炎症が誘導されることが明らかになった。したがって、この皮膚炎の誘導には、Th2 サイトカインの寄与が小さいことが明らかになった。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中江 進 (NAKAE SUSUMU)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 60450409

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

南部あや (NAMBU AYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号: 10456197

松本健治 (MATSUMOTO KENJI)

独立行政法人国立成育医療センター研究
所・免疫アレルギー研究部・部長

研究者番号: 60181765

須藤カツ子 (SUDO KATSUKO)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50126091