

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290031

研究課題名(和文) 痒みを伴う皮膚炎を自然発症するラット系統を用いたアトピー性皮膚炎治療試験系の開発

研究課題名(英文) Establishment of KFRS4 rats as a model of atopic dermatitis

研究代表者

庫本 高志 (Kuramoto, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20311409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、KFRS4ラットをアトピー性皮膚炎のモデルとして確立した。KFRS4は、引掻き行動を伴う皮膚炎を発症し、皮膚病変部には、好酸球、マスト細胞が浸潤していた。また、皮膚炎の発症に伴い血中IgEが上昇し、皮膚バリアの機能障害を呈した。さらに、ヒトのアトピー性皮膚炎の治療に広く用いられているステロイドの塗布により皮膚炎は抑制された。以上のことから、KFRS4を新規のアトピー性皮膚炎モデルとして確立できた。また、本ラットはアトピー性皮膚炎治療薬(とくにステロイド)への反応性が高いことから、新たなアトピー性皮膚炎の治療薬の開発、発症メカニズムの解明に利用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rats showing spontaneous atopic dermatitis (AD)-like skin lesions were observed in the Kyoto fancy rat stock 4 (KFRS4) rats. To establish the KFRS4 rat as a model of AD, clinical symptom, scratching behavior, and transepidermal water loss (TEWL) were examined. Dermatitis initially appeared around 4 months of age and rapidly worsened from 6 to 8 months of age. The skin lesions accompanied scratching behavior and were predominantly observed in females. The increased TEWL indicated skin barrier dysfunction. Extensive infiltration of eosinophils, mast cells and lymphocytes was observed in the skin lesions. The plasma IgE level increased in accord with increasing severity of dermatitis. The betamethasone improved the symptoms of dermatitis. These findings demonstrated that dermatitis in the KFRS4 rats closely resembled that seen in human AD, which suggested that female KFRS4 rats have the potential to serve as an animal model of human AD.

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 疾患モデル IgE 引掻き行動 好酸球 マスト細胞 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎とは、増悪・寛解を繰り返す、かゆみのある湿疹を主病変とする疾患である。患者の多くはアトピー素因を持つ。アトピー素因とは、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎などの家族歴・既往歴があること、または IgE 抗体を産生しやすい素因をさす。

我が国の有病率は、乳幼児で 12%程度、大学生で 8%程度、30 代以降でも 5%程度である。

病因は、多因性で、遺伝要因と環境要因からなる。遺伝要因には、アトピー素因に加え、皮膚バリアの機能障害がある。環境要因としては、ほこり、ダニ、花粉などのアレルゲン、汗、衣服の刺激、ストレスなど日常生活に関するものがある。

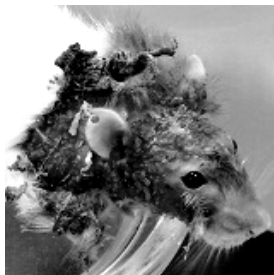
治療は、抗炎症剤（ステロイドやタクロリムス軟膏）の外用、皮膚バリアの保護を目的とした保湿剤の外用、かゆみ止めを目的とした抗ヒスタミン薬の内服からなる。基本的には、対症療法であり、完治は難しい。そのうえ、近年では、外用薬の効果が持続しなくなる重症難治例が増加している。このような患者は、眠れないほどのひどいかゆみに悩まされる。また、心理的な苦痛を生じて出勤や登校ができないなど、社会問題化している。

このように、アトピー性皮膚炎は、患者数が多いこと、完治が困難であること、そして、重症難治例があることなどから、医学的にも、社会的にも大きな問題となっている。

アトピー性皮膚炎に対する新しい治療薬や治療法の開発には、モデル動物の開発とそれを用いた評価系の確立が必要である。

我々は、実験用ラットの遺伝資源の拡張を目的として、愛玩ラットの実験動物化を行ってきた。具体的には、米国から愛玩ラットを導入、実験用ラットと交配した後、複数の近交系を確立した (Kuramoto et al. *Exp Anim*, 2010)。最近、このなかの KFRS4/Kyo という系統では、全ての個体がアトピー様の皮膚炎を発症することを見出した。

皮膚炎は、顔面や指先における腫れや丘疹に始まり、痒みによる引っ掻き行動を伴う。その後、患部は拡張し、びらんやかさぶたからなる多数の掻き壊しが観察される。この間、血中 IgE 値が上昇する。皮膚炎は、週齢を追うごとに悪化し自然治癒しない。発症時期には雌雄差がある。雌は 6 か月齢以上、雄は 8 か月齢以上である。雌では、進行が速く、8 か月齢でほぼすべての個体が重症の皮膚炎を呈する。



2. 研究の目的

KFRS4/Kyo ラットは痒みを伴う皮膚炎を発症し、アトピー素因（家族性、高 IgE 値）を持つといえる。しかも、この炎症はすべての個体に発症する。そこで、本研究では、KFRS4/Kyo をアトピー性皮膚炎モデルとして開発し、アトピー性皮膚炎の治療薬・治療法の評価系への応用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎のラットモデルを新たに開発し、それを用いた治療試験系を確立するために、下記項目について研究を実施した。

A. KFRS4/Kyo ラットの自然発症皮膚炎の解析 B. KFRS4/Kyo ラットの薬剤評価系への応用性の検討

A-1. 臨床（症状と掻痒行動の経時的観察）

雌雄 8 頭ずつを対象に、2 か月齢から、毎週、部位別の皮膚病変を記録した。頭頸部、前肢、後肢、背、臀、尾について、丘疹、水疱、びらん、かさぶたなどの病変とそれらの各部位に占める割合を記録し、スコア化した。掻痒行動は、4, 6, 8 か月齢時に、60 分間観察し掻痒行動の回数を求めた。

A-2. 病理

皮膚病変の未発症、軽度、中程度、重度の個体について、主要臓器、リンパ節、皮膚の病理検査を行った。皮膚については、HE 染色による炎症の評価（好酸球など）、トルイジンブルー染色によるマスト細胞の検出、抗 CD4、CD8 抗体による T 細胞の検出を行なった。

A-3. 免疫（血中 IgE、サイトカイン定量）

臨床症状の観察時に、毎月 1 回、麻酔下で尾静脈より採血を行った。血漿を分離し、ELISA 法にて IgE を測定した。病理解剖時に採取した皮膚組織中のサイトカインの発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

A-4. 皮膚バリア機能評価

皮膚病変の未発症時（5, 9 週齢）に、KFRS4/Kyo 皮膚の内から外へのバリア機能を、経表皮水分喪失量 (TEWL) の測定により評価した。

B-1. 皮膚炎の治療試験

ステロイド外用薬とタクロリムス軟膏（カルシニューリン阻害外用薬）を用いて、皮膚炎の治療試験を行った。

4 か月齢の KFRS4/Kyo 雌ラット（1 群 6 頭）の背側の頭頸部の毛を刈った。露出させた皮膚に、ステロイド軟膏（リンデロン V、塩野義製薬）を、毎週 3 回、一定量塗布した。

4 週間おきに、症状を記録し、引掻き行動

の観察と血中 IgE の測定を行った。同様の実験を、タクロリムス軟膏（プロトピック、アステラス製薬）についても行った。

4. 研究成果

A-1. 臨床（症状と掻痒行動の経時的観察）

皮膚症状は、4 ヶ月齢ごろより下唇や手先の紅斑として現れた。その後、月齢とともに丘疹、痂が頭頸部や臀部の皮膚に出現した。6 か月齢頃より皮膚炎は急速に悪化し、水疱やびらんとなった（図1）。皮膚炎には性差があり、スコア値は雌で有意に高かった（図2）。雌における掻痒行動を測定した。身震いと引っ掻き行動は、6 か月齢より観察され、皮膚炎の増悪とともにその回数は増加した（図3）。

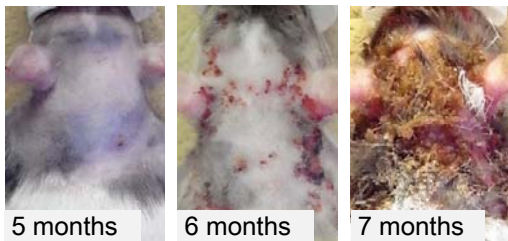


図1、KFRS4 ラットの皮膚炎症状

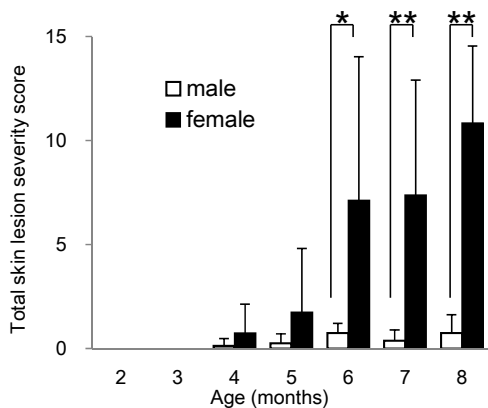


図2、KFRS4 の皮膚炎症状の経時的変化

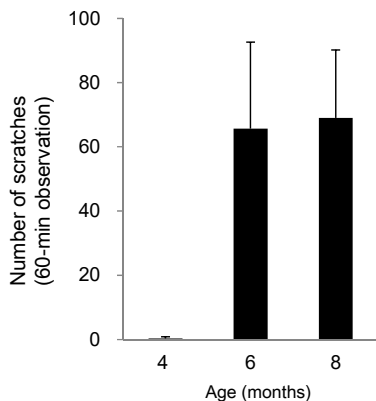


図3、KFRS4 の引掻き行動の経時的変化

A-2. 病理

皮膚病変部には、リンパ細胞が集簇していた。ヒトのアトピー性皮膚炎同様、好酸球の浸潤が顕著であった（図4）。CD4、CD8 陽性細胞の浸潤も確認された（図5）。さらに、真皮部分にマスト細胞の浸潤も観察された（図6）。

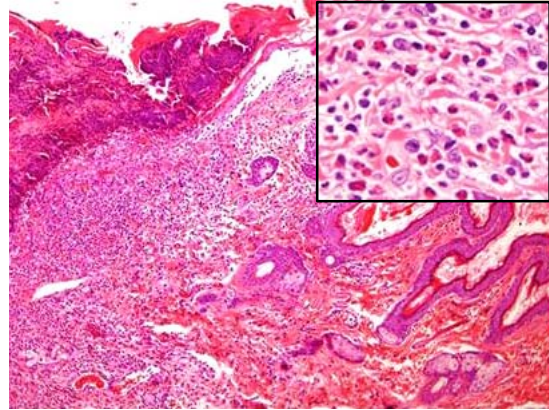


図4、KFRS4 の皮膚病変
拡大部：好酸球の浸潤を認める

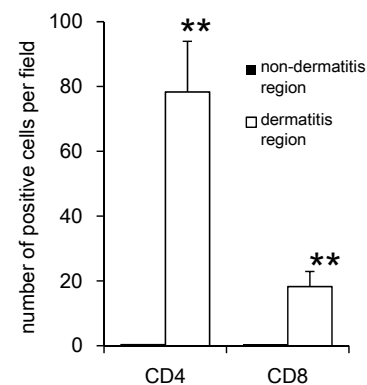
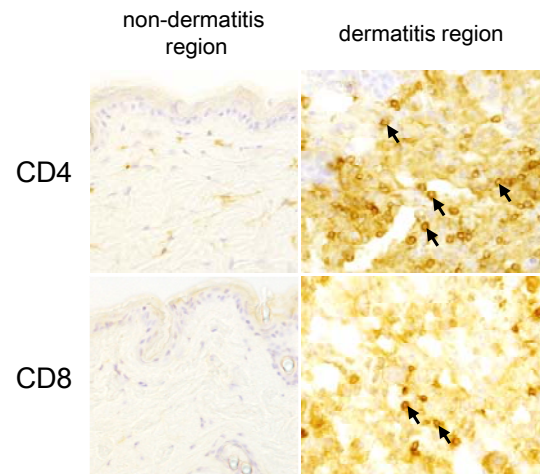


図5 皮膚炎部分における CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の浸潤

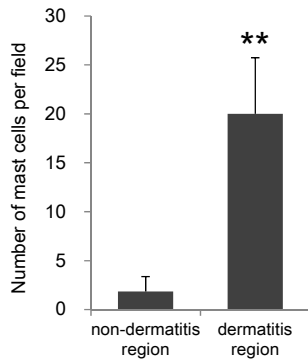
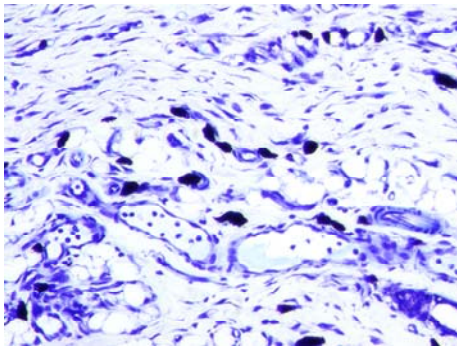


図 6、皮膚炎部分におけるマスト細胞の浸潤

A-3. 免疫（血中 IgE、サイトカイン定量）
IgE 濃度は、皮膚病変の進行に伴い上昇した。つまり、雌で高く、雄で低い。雌では、4 月齢から著しく上昇した（図 7）。

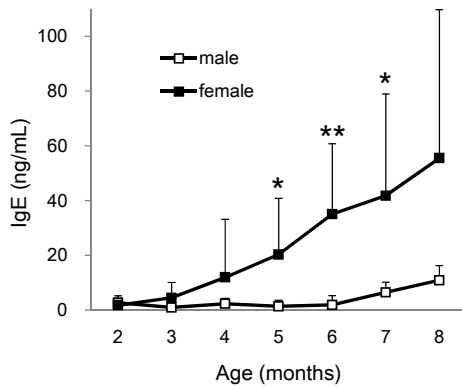


図 7、血中 IgE 濃度の経時的変化

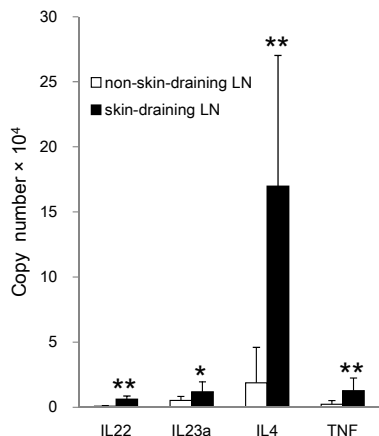


図 8、リンパ節におけるサイトカインの発現量

A-4. 皮膚バリア機能評価
KFRS4 の皮膚水分蒸発量は、対照系統の PVG にくらべ有意に高かった（図 9）。

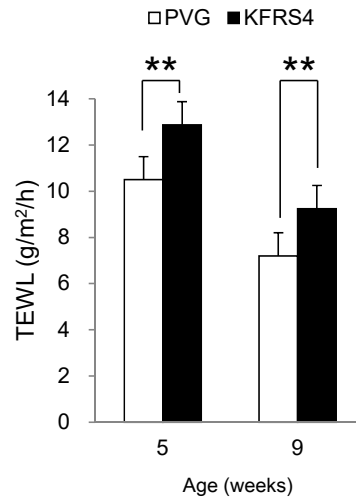


図 9、KFRS4 の経皮水分蒸発量

B-1. 皮膚炎の治療試験
ステロイドの塗布により、皮膚炎の発症は顕著に抑制された。しかし、タクロリムスは皮膚炎を抑制しなかった（図 10）。また、引掻き行動は、ステロイドにより顕著に抑制された。

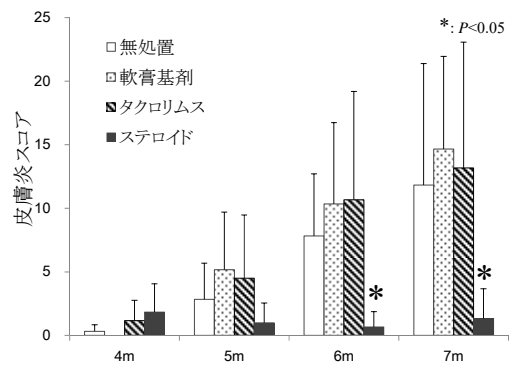


図 10、治療試験における皮膚炎症状の経時的変化

以上、KFRS4 は、引掻き行動を伴う皮膚炎を発症し、皮膚病変部には、好酸球、マスト細胞が浸潤することが判明した。また、皮膚炎の発症に伴い血中 IgE が上昇し、皮膚バリアの機能障害を呈することも判明した。さらに、ヒトのアトピー性皮膚炎の治療に広く用いられているステロイドの塗布により皮膚炎は抑制された。これらのことから、KFRS4 ラットはヒトアトピー性皮膚炎と類似の症

状を示すことが明らかとなった。

本研究では、KFRS4 を新規のアトピー性皮膚炎モデルとして確立できた。また、本ラットはアトピー性皮膚炎治療薬（とくにステロイド）への反応性が高いことから、新たなアトピー性皮膚炎の治療薬の開発、発症メカニズムの解明に利用できることが示唆された。

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5件)

- ① Atopic dermatitis-like skin lesions with IgE hyperproduction and pruritus in KFRS4/Kyo rats. Kuramoto T, Yokoe M, Tanaka D, Yuri A, Nishitani A, Higuchi Y, Yoshimi K, Tanaka M, Kuwamura M, Hiai H, Kabashima K, Serikawa T. *J Dermatol Sci* 80:116-123, 2015. 査読あり
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.09.005
- ② A distal 594bp ECR specifies Hmx1 expression in pinna and lateral facial morphogenesis and is regulated by Hox-Pbx-Meis. Rosin JM, Li W, Cox LL, Rolfe SM, Latorre V, Akiyama JA, Visel A, Kuramoto T, Bobola N, Turner EE, Cox TC. *Development* 143(14):2582-2592, 2016. 査読あり
DOI: 10.1242/dev.133736
- ③ Design and application of a target capture sequencing of exons and conserved non-coding sequences for the rat. Yoshihara M, Saito D, Sato T, Ohara O, Kuramoto T, Suyama M. *BMC Genomics* 2016 Aug 9;17:593. 査読あり
DOI: 10.1186/s12864-016-2975-9
- ④ Application of target capture sequencing of exons and conserved non-coding sequences to 20 inbred rat strains. Yoshihara M, Sato T, Saito D, Ohara O, Kuramoto T, Suyama M. *Genomics Data* 10:155-157, 2016. 査読あり
DOI: 10.1016/j.gdata.2016.11.010
- ⑤ A deletion in the intergenic region upstream of Ednrb causes head spot in the rat strain KFRS4/Kyo. Yoshihara M, Sato T, Saito D, Ohara O, Kuramoto T, Suyama M. *BMC Genetics* 18:29, 2017. 査読あり
DOI: 10.1186/s12863-017-0497-3

[学会発表] (計5件)

- ① アトピー性皮膚炎モデルラットの治療試験、庫本高志、横江繭子、西谷あい、日合 弘、梶島健治、第 63 回日本実験動物学会、平成 28 年 5 月 18 日～20 日、ミューザ川崎シンフォニーホール、川崎市幸区
- ② Atopic dermatitis-like skin lesions with IgE hyperproduction and pruritus in KFRS4/Kyo rats. Kuramoto T, Yokoe M, Tanaka D, Yuri A, Nishitani A, Higuchi Y, Yoshimi K, Tanaka M, Kuwamura M, Hiai H, Kabashima K, Serikawa T. *Rat Genomics & Models*, December 9-12, 2015, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- ③ アトピー性皮膚炎モデルラットの治療試験、庫本高志、横江繭子、西谷あい、由利 梓、日合 弘、梶島健治、第 128 回関西実験動物研究会、平成 27 年 12 月 4 日、楽友会館、京都市左京区
- ④ 新たなアトピー性皮膚炎モデルの開発、庫本高志、横江繭子、由利 梓、西谷あい、田中大資、日合 弘、芹川忠夫、第 62 回日本実験動物学会、平成 27 年 5 月 28 日～30 日、京都テルサ、京都市南区
- ⑤ 新たなアトピー性皮膚炎モデルの開発、樋口裕城、横江繭子、由利 梓、田中大資、日合 弘、芹川忠夫、庫本高志、第 124 回関西実験動物研究会、平成 26 年 12 月 5 日、楽友会館、京都市左京区

[図書] (計0件)

[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

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/Kuramoto/home.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庫本 高志 (KURAMOTO, Takashi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20311409

(2) 研究分担者

梶島 健治 (KABASHIMA, Kenji)

京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：00362484

吉見 一人 (Yoshimi, Kazuto)
大阪大学・医学研究科・助教
研究者番号：50709813

(3)連携研究者
日合 弘 (HIAI, Hiroshi)
京都大学・名誉教授
研究者番号：10073131

(4)研究協力者
なし