

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15022

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における炎症反応の起点となる機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for triggering an onset of atopic dermatitis

研究代表者

宮井 智浩 (Miyai, Tomohiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：30812549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてはアトピー性皮膚炎(AD)の発症過程の中で、特に発症初期の時期に焦点を当てて解析を行った。ADモデルマウスを用い、赤みやかさぶたなどの目に見える炎症が起こる前の時点で皮膚に存在する各種の細胞を単離し、その遺伝子発現状態を比較した。その結果、生後かなり早い段階から血管内皮細胞の遺伝子発現が変化していることが明らかとなった。特に代謝・内分泌系に關与する遺伝子が突出して高発現することを見出し、全身性の恒常性維持機構の破綻が皮膚局所の炎症の引き金を引く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、皮膚局所の現象と全身性の恒常性維持機構との間に強い關連がある可能性が示唆された。実際、アトピー性皮膚炎のリスクファクターとして食生活をはじめとする生活様式の変化に伴う内分泌系異常が挙げられるが、メカニズムはこれまでに明らかになっていない。本研究ではその分子メカニズムの一端として血管内皮細胞由来の新規因子を見いだすことができた。今後、この因子の作用標的や欠損による影響を詳細に解析することで、アトピー性皮膚炎の予防や治療に有用な新規創薬ターゲットとしての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on the pre-symptomatic phase of atopic dermatitis (AD) and investigated the molecular mechanisms of the onset of the disease. A series of skin-resident cells was sorted from AD model and WT mice at pre-inflammatory periods then subjected to transcriptomic analysis. As a result, most of the cell types showed similar gene expression patterns between AD-model and WT; however, only endothelial cells exhibited different genetic characteristics from early postnatal period. Especially, a hormonal factor gene was ectopically expressed and high level of the protein was detected in the serum of AD-model mice. It was suggested that the imbalance of metabolic/endocrine systems could trigger the onset of local inflammation in the skin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 トランスクリプトーム 多臓器連関

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 (AD) は強い痒みと再発性の湿疹病変を特徴とする慢性難治性の皮膚炎で、国内での患者数は2014年時点で45万6千人にもものぼる (川崎ら、*実験医学*, 2017)。ADにおける炎症は他の炎症性疾患と異なって長期にわたり増悪と緩解を繰り返すことに加え、喘息等のアレルギー疾患が連鎖的に発症する「アレルギーマーチ」を誘発する契機となるため、未発症期および緩解期から炎症への移行を阻止する予防薬の開発が切望される。これまで、ヒトにおけるAD病態を理解するために複数のADモデルマウスが作製されてきた。我々が樹立した細胞内シグナル因子であるJak1の活性型変異をもつSpade (Stepwise progressive atopic dermatitis) マウス (Yasuda et al. *J Clin Invest.* 2016)、および皮膚顆粒細胞に発現するTmem79の変異マウス (Sasaki et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2013) では、SPF環境下で飼育してもADを自然発症する。それらのマウスは全ての個体で特定の時期に発症することから、ヒトでは解析が困難な発症前の細胞・分子動態を解析することが可能である。これまでに皮膚バリア機能の低下や顆粒球・リンパ球の関与が明らかになりつつあるが、AD発症の起点となる炎症の惹起機序は不明であった。それを明らかにするために指標となりうると考えたのが最初期遺伝子(immediate early genes, IEG)の発現誘導である。IEGは細胞への刺激に応答して速やかに発現誘導される遺伝子の総称であり、代表的な転写因子としてFos, Jun, Egr-1, Nr4a等が挙げられる。特に神経科学の分野においてシナプス活動や活動電位に伴うカルシウムイオンの流入によってそれらの発現が誘導されるため、神経活性化マーカーとして頻用される。一方でIEGの発現は神経系のみならずどの細胞種でも多様な刺激により誘導され、皮膚科学においては、ヒトの乾癬患者ではJunの発現が基底層および顆粒層で亢進していることも示されている

(Mehic et al. *J Invest Dermatol.* 2004)。これまで、我々はSpadeマウスやTmem79変異マウスの発症部位の組織サンプルを用いたトランスクリプトーム解析を行っており、その解析によってNr4a1やFos, FosbなどのIEG群が前炎症性サイトカインであるIl1bやIl6の発現誘導の直前期に一過的に高発現することを認めた (図1)。Tmem79変異マウスでは2度の連続するピークが見られるが、これは炎症が二峰性に生じる当該マウス特有の病態とも一致する (未発表)。これまで、虚血モデルマウスにおける炎症の経過においても、初期にIEGsの一過的誘導が起こったのちに自然免疫を賦活化するヒートショックプロテインや前炎症サイトカインが連続的に発現し、顆粒球や単球の浸潤が起こることが示されている (Allan & Rothwell, *Nat Rev Neurosci.* 2001)。これらの結果と過去の報告を踏まえ、申請者は「ADの発症前段階においてIEG発現細胞が炎症惹起の引き金を引く」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

2017年に改定された国の健康・医療戦略にも未病の概念 (遺伝的素因や環境変化等により、病気を発症する原因を体内に蓄積しつつあるがまだ発症には至らない状態) が新たに盛り込まれた。未病期における適切な処置・治療介入の実現に向けて、疾患の発症以前に予兆となる分子・細胞動態を検知することが不可欠であるが、その具体的実態は全く不明である。そこで、本研究では、AD発症前に炎症状態への遷移の前兆を捉えることを目標としている。

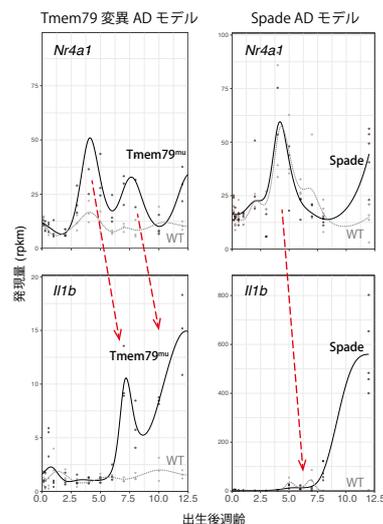


図1. ADモデルで見られるNr4a1とIL1βの発現動態。

3. 研究の方法

当初、Fos および Nr4a1 の発現を eGFP レポーターによって標識したトランスジェニックマウスと Spade マウスとの交配により組織学的に IEG 発現細胞を同定し、その下流因子の同定を試みたが、顕微鏡観察下で eGFP 蛍光タンパクの蛍光強度が低く、IEG 陽性細胞の同定が困難であった。そこで研究戦略を変更し、野生型および Spade マウスにおいて前炎症期（3 週齢・5 週齢）および炎症惹起期（8 週齢）の発症部位（耳介組織）を回収し、フローサイトメーターによって各細胞種に単離したのちに RNA シークエンス解析によって遺伝子発現状態を網羅的に比較した。

4. 研究成果

耳介皮膚の各細胞種における網羅的遺伝子発現解析の結果、炎症が惹起する前の 3 週や 5 週の時点ではほとんどの細胞種で野生型と Spade マウスの間で遺伝子発現パターンの変化が認められなかった一方

で、血管内皮細胞（endothelial）のみで遺伝子発現パターンの変化が認められた（図 2）。AD 発症の初期において、表皮バリアの脆弱化や自然免疫系の活性化が重要であることが知られている。これに対応する表皮角化細胞（keratinocyte）やランゲルハンス細胞（Langerhans cells）、

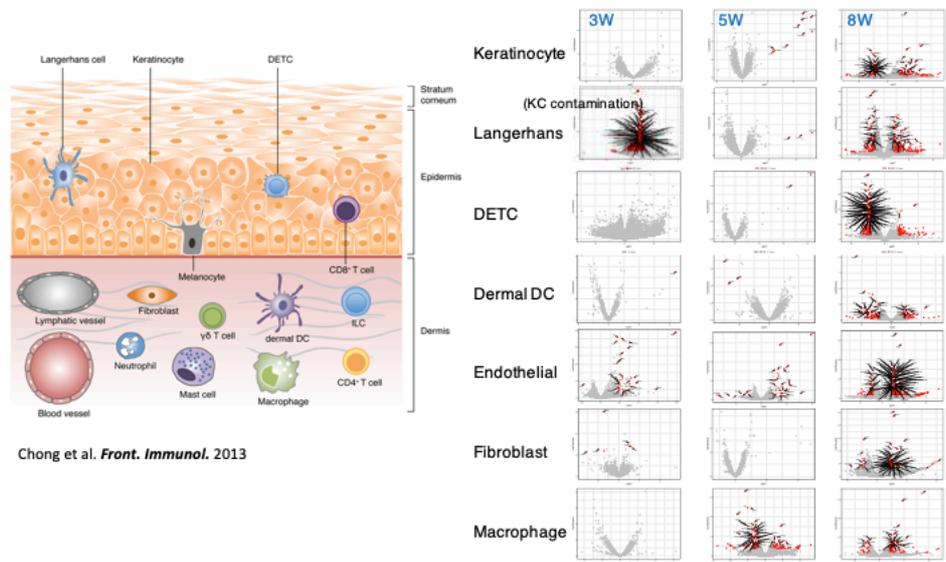


図 2. 皮膚にみられる細胞種（左）と野生型-Spade マウス間の遺伝子発現量の比較（右）。赤いプロットが統計的に有意な発現変動遺伝子を示す。

マクロファージ（macrophage）が最初期に性質変化すると解析当初に予想していたため、この結果は意外なものであった。次に、血管内皮細胞の発現変動遺伝子を精査したところ、Spade マウスにおいて *Fgf23* 遺伝子の発現が異所性に亢進していることが明らかとなった。この RNA シークエンスの結果は定量的 RT-PCR においても確認され、さらに Spade マウスでは血中の FGF23 タンパク質量も野生型と比較しておよそ 10 倍程度の異常な増加が認められることがわかった。この現象が Spade モデルにおいて特異的に認められるのかを確認するため、一般的に広く用いられている MC903 塗布による AD モデルにおいても *Fgf23* の mRNA 発現および血中 FGF23 タンパク質量を測定した。その結果、MC903 モデルにおいても同様の血管内皮細胞における *Fgf23* 遺伝子の異所的発現亢進及び血中 FGF23 タンパク質量の増加を認めたことから、FGF23 の制御異常は幅広い AD 病態で認められると考えられた。FGF23 はビタミン D₃ や副甲状腺ホルモンとフィードバックループを形成して、全身性のリンやカルシウムの恒常性維持に寄与するホルモン様の機能を示す。そこで 3 週齢の野生型および Spade マウスの血清を採取し、生化学検査を行ったところ、FGF23-ビタミン D₃-副甲状腺ホルモンの直接の標的であるカルシウムや無機リンの血中量が Spade マウスにおいて有意に増加していることを見出した。さらに、カリウムや尿酸、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）やアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）

といった腎臓や肝臓の障害に関連したパラメータも Spade マウスにおいて異常高値を示していたことから、Spade マウスは可視的な皮膚炎症のみならず内分泌系を介した全身性の恒常性異常が並列して生じていることが示唆された。この知見は皮膚炎発症において多臓器間の相互関連の異常が重要な引き金となっている可能性を示しており、今後は Fgf23 を標的とした遺伝子改変マウスの作出および生化学的解析によって、より詳細なメカニズム解析を推進していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮井 智浩, 川崎 洋, 古関 明彦
2. 発表標題 FGF23 is a novel endocrine regulator for the pathogenesis of atopic dermatitis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----