

## 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：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591375

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎発症におけるキチナーゼ様タンパク質の役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of the role of Chitinase 3 like 1 in atopic dermatitis development

## 研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA HISAHIRO)

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・チームリーダー

研究者番号：20281090

## 研究成果の概要（和文）：

我々が発見したアトピー性皮膚炎モデルマウスの表皮において疾患発症前にキチナーゼ様タンパク質 Chi3l1 の発現が認められる。そこで Chi3l1 を表皮で過剰発現した TG マウスを作製すると、尻尾の表皮構造が破壊され、魚鱗癬様の外見を呈した。アトピー性皮膚炎モデルマウスをコンベンショナル環境で飼育すると同様の魚鱗癬様外見を呈した。同皮膚では Tight Junction 構成タンパクが発現低下し、この分子が表皮バリア形成に関与することが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We have found the over expression of Chi3l1 in epidermis of the newly identified atopic dermatitis model mouse before the onset of disease. Overexpression of Chi3l1 transgene in epidermis resulted in skin barrier permeability destruction and ichthyosis vulgaris like appearance, In addition, in conventional condition, the AD model mouse showed similar appearance and tight junction protein expression was down-regulated. These findings indicated Chi3l1 protein play a role in skin barrier formation.

## 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	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アトピー性皮膚炎，キチナーゼ様タンパク質，表皮バリア破壊，尋常性魚鱗癬，Filaggrin, Tight junction, 衛生環境，信号伝達

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は先進国で多く認められる皮膚疾患であり、およそ 10～20%の

小児で発症が認められる普遍的な疾患である。その疾患モデルの探索をしていて我々は ENU ミュータントスクリーニングマウスブ

ールの中から搔痒感の強いと思われる症状を示すアトピー性皮膚炎モデルマウスを発見した。このマウスは生後 8 週から 10 週で皮膚炎を発症し、皮膚炎発症後 3 週間目頃に血清 IgE が上昇する、血清ヒスタミンが上昇するなどの Th2 型免疫バイアスがかかり、それから約 4 週間たつと今度は Th1 型免疫バイアスで亢進する IgG2b などが上昇して慢性炎症型の経過をとることが観察できた。これらのことからこのマウスライン名は *Spade* (Stepwise Progressive Atopic Dermatitis) とした。骨髄移植の実験からこのマウスの疾患発症原因は皮膚の側にあることが明らかとなった。

*Spade* マウスでは皮膚炎発症前の時点で表皮バリア機能が低下していることが確認できたので、表皮の保湿を行ったところ、皮膚炎発症は数週間にわたって発症を遅らせることができた。また、環境因子による影響を調べるために無菌状態でマウスを飼育したところ、26 週以上飼育しても約半数が発症せず、発症した個体でも搔破行動を呈さないものが多く認められた。

*Spade* マウスの表皮組織においてどのような遺伝子の発現が亢進または低下しているかをマイクロアレイ解析したところ、皮膚炎発症前から KLK5 や marapsin などの serine protease 発現が亢進していることが明らかとなり、角質のターンオーバーが亢進することによる表皮バリアの破壊が示唆された。

しかしそれと同時に、Chitinase3like1 というキチナーゼ様タンパク質が過剰発現していることも観察された。

この分子は哺乳類の生態には存在しないキチン質に結合している分子で、キチンを持たない哺乳類において、キチナーゼ様タンパク質の作用機構はこれまで不明であったが、最近になって喘息患者の気道上皮や血清中での発現レベルが亢進していることが確認できた分子である。しかしながら哺乳類生体内における、特に表皮における機能はまだ明らかにされていない。そこでこの分子が *Spade* マウスの皮膚炎発症と進行にどのようにかわるのかを確認することを目的としてこの研究を計画した。

なお、遺伝子マッピングなどから *Spade* マウスのアトピー性皮膚炎の原因遺伝子はサイトカインシグナルの伝達経路で作動するチロシンキナーゼ分子における活性型の点突然変異であることがわかっている (論文投稿中につき、以降はチロシンキナーゼ X と表記する)。

## 2. 研究の目的

この AD モデルマウス *Spade* のアトピー性皮膚炎の進行段階は、皮膚バリアの破たん⇒皮膚の炎症進行⇒搔痒感の発現⇒搔破行動⇒皮膚炎の重症化⇒Th2 バイアス⇒肥満細胞活性化⇒Th1 バイアスと慢性炎症化の多段階の経過を持つ。

これらの多段階のどの時点で Chi311 が疾患とかかわりを持つのか、そしてその機能はなんであるのかを明らかにし、アトピー性皮膚炎の発症予防、あるいは治療にこの分子の機能に着目した治療方法が確立することが目的であった。

*Spade* マウスの出生後の疾患進行状況に応じて Chi311 分子の発現を確認すること、Chi311 分子の発現を亢進する状態と低下させる状態を作り出した時に疾患の進行がどうなるかを確認すること、*Spade* マウス皮膚炎以外の皮膚免疫疾患モデルマウスにおいて Chi311 分子がどのように皮膚免疫形成に関わるのかを確認すること、この分子の発現に環境要因がどのように影響を与えるのかを確認すること、以上のことを目的とした。

## 3. 研究の方法

後述の研究の目的に従って、以下の実験を行った。

- 1) *Spade* マウス疾患進行時の Chi311 分子の表皮およびほかの組織での発現観察
- 2) Chi311 遺伝子のトランスジェニックマウスを作製し、表皮特異的に過剰発現するモデルと、表皮特異的にコンディショナルノックアウトするモデルを作り、それらを *Spade* マウスと交配して疾患進行の影響を見ること
- 3) 皮膚経由で免疫負荷をかける場合に表皮から、真皮から、皮下からの抗原負荷のように抗原投与経路が異なることで Th1/Th2 バイアスが変化する実験系を確立して、それぞれの系で Chi311 発現がどのように変化するかを確認すること
- 4) キチン様物質がマウス生体内には存在しないことから、外部環境からのキチン質による刺激が *Spade* マウス表皮に発現している Chi311 分子に働きかけていることが考えられるので、飼育環境の清浄度を変えて、カビなどのキチン分子が豊富が環境で疾患が進展するのかどうかを確認すること

## 4. 研究成果

- 1) *Spade* マウスのアトピー性皮膚炎発症進展に伴う Chi311 分子の発現変化

マイクロアレイ観察では生後 2 週齢から皮膚組織において Chi311 分子の mRNA の発現が

亢進した。この亢進は生後 6 週齢の時点では野生型同腹仔の 10 倍程度にまで亢進した。免疫染色においては Chi311 分子は生後 4 週齢頃より表皮の顆粒層及び角質層に集中的に発現したが、同時期の野生型同腹仔の角質層での Chi311 分子発現はほとんど確認できなかった。

疾患発症後、表皮における同分子発現は増強したが、搔破行動が激しくなると表皮の外装はほぼ欠落するために、同分子の発現が確認できたのは残存した角質層と顆粒層のみであった。また、発症後は真皮内の炎症細胞（単球および顆粒球）でも Chi311 の発現が確認できた。

ヒトの喘息患者の症例報告から、同分子がこのマウスの気道上皮で発現亢進する可能性を考えて気道の免疫染色を行ったが、発現亢進は認められなかった。定常状態では発現が亢進しないが、喘息様状況では発現が亢進する可能性を考えて、OVA 免疫負荷による実験的喘息モデルを作製して確認したが、やはり気道上皮における Chi311 分子の発現は Spade マウスにおいても確認できなかった。このことから、チロシンキナーゼ X の活性化による Spade マウス表皮での Chi311 分子の発現亢進は、表皮に特異的な現象であると考えられた。

## 2) Chi311 分子のトランスジェニックマウス作成による観察

ヒトサイトケラチン 14 遺伝子のプロモーター下に Chi311 分子の cDNA をつないだトランスジェニックマウスを作製したところ、3 系統作成したうちの 2 系統において尻尾の皮膚に異常が認められた。出生後早期より表皮のひび割れとそれに引き続く表皮の増殖のために尻尾はひび割れていながら、リング状にでこぼこした外見を呈した。これらの症状の強弱は同腹の個体間で大きく異なることから、環境因子による影響を強く受けるものと考えられた。

現在、Spade マウスとの交配を進めており、この症状がチロシンキナーゼ X 活性亢進でどのような影響を受けるか観察予定である。

表皮特異的に Chi311 をノックアウトするコンストラクトに関しては、何度も試みたがコンストラクト形成が研究機関内に終了しなかった。完全に KO したマウスを作製している Yale 大学の研究者に交渉して、そのノックアウトマウスを実験に使う予定である。

## 3) 皮膚免疫負荷時の Chi311 発現変異に関して

皮膚は成体と外界を区別するバリア器官であるが、寄生虫や細菌、化学的、物理的侵襲による傷害を受けるのは不可避である。その時にそれぞれの侵襲に対して最適の免疫反応が成立することが求められる。

そこで表皮表面から、真皮内に微小注射針で、あるいは皮下に通常の注射針で OVA 抗原を免疫負荷した時に、個体はどのような免疫反応をするのかを実験した。すると、表皮表面からのパッチによる免疫負荷では Th2 優位の、真皮内及び皮下免疫では Th1 優位の、さらに真皮内免疫では皮下免疫よりも強い Th1 優位の免疫反応を呈することが分かった。そこでそれらの環境下で Chi311 分子がどのような分子で発現するのかについて検討した。

特に、表皮表面からの免疫不可反応が Th2 優位に大きく傾くことは、表皮を破壊して侵入する大型の生物、寄生虫による侵襲に対する反応を反映しているものと考えられ、このときには表皮で Chi311 分子が発現するのではないかと考えられた。

予想に反して、OVA 免疫負荷を受けた皮膚組織での Chi311 分子の発現は真皮内もしくは皮下の Myeloid 系細胞に局限した。Chi311 分子発現細胞はそれぞれの抗原投与経路に応じて、経表皮免疫では表皮直下の真皮で、真皮内投与では皮下組織で、皮下投与では皮下に散見されるという違いはあったが、表皮での発現は誘導されなかった。

このことから、Spade マウス表皮における Chi311 分子の発現亢進はチロシンキナーゼ X の活性化による intrinsic な信号伝達亢進の結果であり、免疫不可などの外界からの刺激に直接対応したものではない可能性が示唆された。

## 4) 飼育環境の変化に伴う Chi311 分子の機能の変化について

Spade マウスでは皮膚バリアが破壊されていること、それがチロシンキナーゼ X の発現亢進によることなどから、ヘテロマウスにおいても皮膚炎が発症するのかを調べるために、コンベンショナル環境で飼育したところ、皮膚炎の程度は軽いものの 100% のヘテロマウスが皮膚炎を発症した。そこでコンベンショナル環境で Spade マウスのホモとヘテロを飼育したところ、面白いことに、Spade マウスのホモミュータントにおいて表皮のひび割れが生じ、さらに表皮細胞の増生が起こってリング状にでこぼこする尻尾の形態を示した。この変化は生後 3~4 週で顕著であったが、生後 6~7 週では自然に改善した。

この外見は上記実験結果の (2) で作製した皮膚特異的 Chi311 分子発現マウスと酷

似していた、さらに、魚鱗癬モデルマウスとして知られている filaggrin 欠損マウスのしっぽの外見とも酷似していた。

以上の観察結果から、Spade マウスのしっぽの皮膚は環境依存的に魚鱗癬様の構造をとりうる表皮構造をしていることが推測できた。そこで、Spade マウスのしっぽでの皮膚バリア構成タンパクの発現を確認したところ、魚鱗癬の原因遺伝子とされるいくつかの表皮構成分子の発現が著しく低下していた。その中に特徴的な分子としては Claudin-3 と Claudin-4 の発現低下を mRNA レベル、あるいは免疫染色レベルで確認できた。

まとめ)

寄生虫やカビなどの生体構成タンパクであるキチン質を結合する Chi311 分子の発現亢進を、アトピー性皮膚炎様の皮膚炎を発症する Spade マウスの表皮顆粒層と角質層で確認した。野生型マウスでは皮膚からの免疫負荷実験などで表皮での Chi311 分子の発現亢進を誘導できなかったことから、この発現は皮膚での免疫反応の変化の結果引き起こされるのではなく、このマウスの遺伝子変異（チロシンキナーゼ X の活性化）に起因する intrinsic な発現亢進であることが示唆された。

しかしその発現亢進をトランスジェニックマウスで人為的に誘導した場合に、アトピー性皮膚炎ではなくて魚鱗癬様の表現型を呈したことから、また、Spade マウスを清浄度の低い環境（カビなどの存在量が多いと思われる）で飼育した時にも同様の魚鱗癬様の表現型を示したことから、Chi311 分子の表皮における発現亢進は、それ自体で、あるいは発現が弱い時にはキチン質による刺激で表皮細胞の挙動に影響を与えて、魚鱗癬の病態を引き起こす分子である可能性が示唆された。

魚鱗癬とアトピー性皮膚炎はともに filaggrin という表皮構成タンパクの変異で引き起こされ、その発症には環境因子が大きく関係することが示唆されていた。これらのことから、表皮における Chi311 分子の発現亢進はアトピー性皮膚炎の進行というよりは、魚鱗癬の病態発症にかかわる分子である可能性が示唆された。

しかしながら皮膚免疫において Myeloid 系細胞が同分子を発現することも確認できたことから、免疫系への刺激を入れる分枝としての機能も持つ可能性が残されており、今後トランスジェニックマウスや皮膚免疫の実験系を用いて Chi311 分子が免疫系においてどのような役割を果たすかについて検討していくことが次の課題であると考えられた。

## 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 3 件)

1.Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development.

Sugiyama M, Nakato G, Jinnohara T, Akiba H, Okumura K, Ohno H, Yoshida H. Int Immunol. 2012 Jun;24(6):369-78. Epub 2012 Feb 21. 査読有

2.Development 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

3.Runx1/Cbfb2 complexes are required for lymphoid tissue inducer cell differentiation at two developmental stages.

Tachibana M, Tenno M, Tezuka C, Sugiyama M, Yoshida H, Taniuchi I. J Immunol. 2011 Feb 1;186(3):1450-7. Epub 2010 Dec 22. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Stepwise progressive atopic dermatitis induced by a signaling molecule hyperactivation

Takuwa YASUDA, Hisahiro YOSHIDA Laboratory for Immunogenetics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology

14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (August 23-27, 2010, Kobe, Japan)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA HISAHIRO)  
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・チームリーダー  
研究者番号：20281090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安田 琢和  
独立行政法人理化学研究所  
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