

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10234

研究課題名(和文) マウスを用いたアトピー性皮膚炎や魚鱗癬の胎児治療の確立

研究課題名(英文) Establishing Novel Embryonic and Neonatal Treatments using Mice with Atopic Dermatitis and Ichthyosis as Models

研究代表者

知野 剛直 (Chino, Takenao)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20521397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎や魚鱗癬などの動物モデルと考えられるDMKN / / 欠損マウスに、マウス胎仔期・新生児期から治療効果のある物質・蛋白質・細胞などを投与することにより、出生後の皮膚表現型の改善が得られるのか検証を続けている。今回、DMKN蛋白を発現している表皮細胞を皮下投与することで、皮膚症状の改善が得られるのかを検証した。マウス胎仔皮下投与と新生児皮下投与で、投与部位の皮膚表現型の改善が示唆された。将来、皮膚疾患のヒト胎児・新生児治療につながるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出生前に全身の皮膚に治療効果のある物質・蛋白質・細胞が定着し、出生後の皮膚表現型の改善がみられれば、将来的にアトピー性皮膚炎や魚鱗癬だけでなく、様々な皮膚疾患のヒト胎児・新生児治療につながるものと考えられる。この研究を通して出生後のマウス皮膚の改善が認められれば、様々な難治性皮膚疾患に適用可能な画期的な治療法になりうる点で、大きな意義があると考えられる。将来、拒絶反応が少なく効果が持続しやすいヒト胎児・新生児治療のメリットを生かした皮膚疾患の治療に発展させたい。

研究成果の概要(英文)：Obtaining improvements to the postnatal skin phenotype of DMKN / / deficient mice which are considered to be animal models of atopic dermatitis and ichthyosis from the embryonic to neonatal periods by administering therapeutics, proteins, cells, etc. are continuing to be researched. Currently, whether or not improvement of skin symptoms could be obtained by subcutaneously administering keratinocyte cells that express DMKN proteins was inspected. The subcutaneous administration to fetuses and newborn mice suggests that the skin phenotype at the administration site was improved. It is thought that this procedure could link to the treatment of newborn human fetuses with skin diseases.

研究分野：マウス胎仔・新生児治療

キーワード：マウス胎仔・新生児治療 DMKN 皮下投与

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Dermokine (DMKN)は、ヒトやマウスの表皮上層、特に顆粒層に発現する分泌蛋白である。ヒトでは、スプライシングバリエーションとして $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ の5つのアイソタイプが存在し、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ はマウスでも確認されている。特に Dermokine  $\beta/\gamma$  (DMKN- $\beta/\gamma$ )は表皮顆粒層に発現する蛋白で、報告者らは炎症や表皮角化細胞の増殖を抑制して皮膚の恒常性維持に働いていることを発見した。また、報告者らが独自に DMKN- $\alpha/\beta/\gamma$ を欠損したマウスを作製したところ、新生仔期より鱗屑の多い皮膚表現型がみられ、皮膚バリア機能と皮膚免疫の異常を認め、アトピー性皮膚炎や魚鱗癬などの動物モデルとして有用と考えられる。

この独自に作製した DMKN- $\alpha/\beta/\gamma$ 欠損マウスの皮膚表現型と皮膚免疫の解析を報告者グループ内で進めると同時に、報告者は、この欠損マウスの胎仔・新生児期に治療効果のありそうな物質などを投与することで、出生後の皮膚表現型の改善効果を検証する研究を行う。これにより、将来、拒絶反応が少なく効果が持続しやすい胎児・新生児治療のメリットを生かした皮膚疾患の治療に発展させたい。

## 2. 研究の目的

本研究では、独自に作成した DMKN- $\alpha/\beta/\gamma$ 欠損マウスのマウス胎仔・新生児期に治療効果のある薬剤、DMKN のリコンビナント蛋白や機能活性を有するペプチド、骨髄間葉系幹細胞、循環血液内幹細胞などを投与することで、出生後・成長後の皮膚表現型の改善効果が得られるのか検証することを目的とする。

また、出生前に全身の皮膚にこれらの蛋白質・細胞等が定着し、出生後の皮膚表現型の改善がみられれば、将来的にアトピー性皮膚炎や魚鱗癬だけでなく、様々な皮膚疾患のヒト胎児・新生児治療につながるものと考えられる。このことにより、難治性疾患の新規治療法の研究基盤を確立できると期待している。

## 3. 研究の方法

本研究では、報告者らが独自に作製した DMKN- $\alpha/\beta/\gamma$ 欠損マウスを使用して研究を行った。今回、DMKN 蛋白を持続的に発現しているマウス表皮細胞を、マウス胎仔・新生児の皮下投与することで、皮膚表現型の改善が局所で得られるのか検証した。マウス表皮細胞を皮下投与して、皮膚の鱗屑などの皮膚表現型が一番激しくなる生後 7-10 日目の皮膚を比較検討した。(図1)

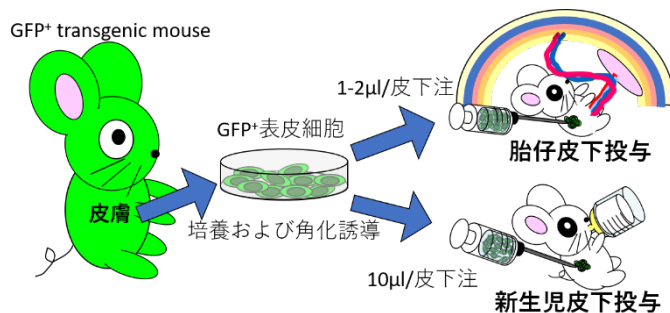


図1. Schema—研究方法

### (実験方法)

- (1) 生後1日目の新生児 GFP transgenic マウスの皮膚から表皮細胞を回収し、1週間程度細胞培養する。
- (2) 培養した GFP 表皮細胞を回収し、DMKN- $\alpha/\beta/\gamma$ 欠損マウスの胎仔13日目の皮下に投与する。同様に欠損マウスの新生児1日目の皮下にも投与する。
- (3) 皮下投与したマウスの皮膚を検証する。皮膚表現型が激しい新生児7-10日目の皮膚を検証し、局所で皮膚症状の改善が得られるか検討する。

### (解析方法)

- (1) 肉眼/実体顕微鏡による皮膚表現型を検証 表皮細胞を投与した生後7-10日の欠損型と投与していない欠損型の皮膚を肉眼/実体顕微鏡で、比較し検証した。
- (2) 光学顕微鏡による皮膚表現型の検証生後7-10日の皮下投与した欠損型と投与していない欠損型の皮膚でHE染色切片を作成し、光学顕微鏡で比較し検証した。

## 4. 研究成果

### (1) . マウス新生児皮下投与系

#### ①. 肉眼/実体顕微鏡による皮膚表現型を検証

生後1日目の欠損マウスに、GFP+表皮細胞を皮下投与した直後の写真を示す(図2)。生後10日(皮下投与9日)の欠損マウスの皮膚の経過を示す(図3)。GFP+表皮細胞を皮下投与直上の皮膚で、鱗屑・亀裂・過角化などの皮膚症状のわずかな改善を認めた。



図2 欠損マウス新生児にGFP表皮細胞を皮下投与した直後

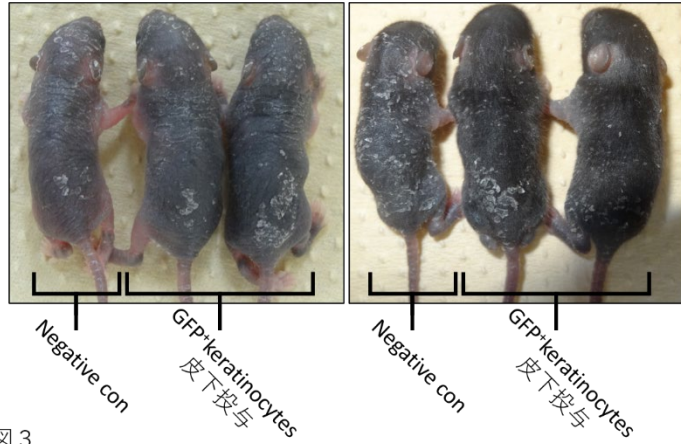


図3 生後6日目(皮下投与開始後、5日目) 生後10日目(皮下投与開始後、9日目)

②. 光学顕微鏡による皮膚表現型を検証

GFP<sup>+</sup>表皮細胞を投与した生後10日(皮下投与9日)の欠損マウスの皮膚と投与していない欠損マウスの皮膚を回収し、HE染色で比較検討したところ、皮下投与マウスの皮膚で、鱗層の厚みが改善し、欠損マウスの特徴である顆粒層の厚みも改善していた(図4)。

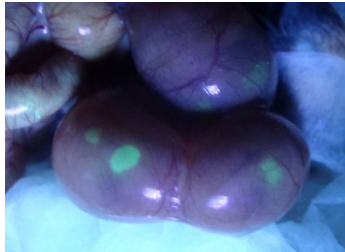


図5 GFP<sup>+</sup>表皮細胞を皮下投与直後

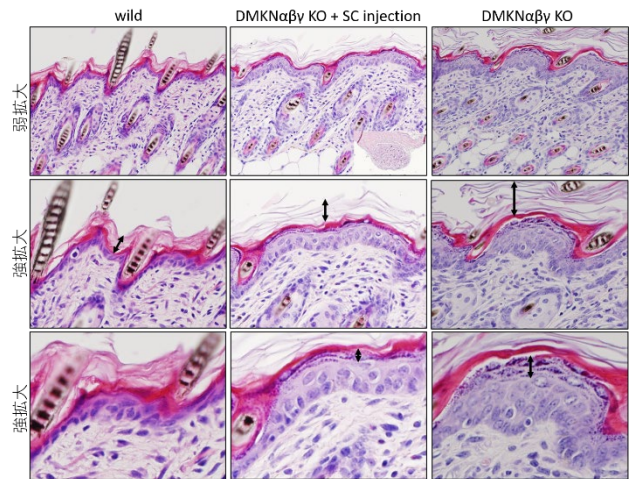


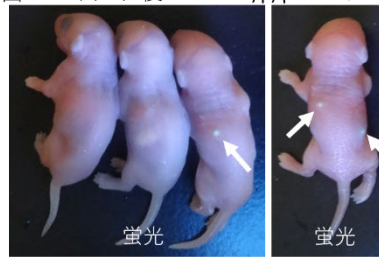
図4 生後10日目(皮下投与後9日目)のマウス皮膚のHE染色

(2). マウス胎仔皮下投与系

①. 肉眼/実体顕微鏡による皮膚表現型を検証

マウス胎仔13日目の欠損マウスに、GFP<sup>+</sup>表皮細胞を皮下投与した直後の写真を示す(図5左上)。生後7日(皮下投与14日)の欠損マウスの皮膚の経過を示す(図6)。GFP<sup>+</sup>表皮細胞を皮下投与した直上の皮膚で、鱗層・亀裂・過角化などの皮膚症状のわずかな改善を認めた。

図6 出生直後のDMKNα/β/γ KOマウス



出生7日目のDMKNα/β/γ KOマウス



Negative con  
GFP<sup>+</sup>keratinocytes 皮下投与  
GFP<sup>+</sup>keratinocytes 皮下投与

Negative con  
GFP<sup>+</sup>keratinocytes 皮下投与  
Negative con  
GFP<sup>+</sup>keratinocytes 皮下投与

②. 光学顕微鏡による皮膚表現型を検証

現在、解析を行っている。

これらの結果から、DMKNを発現している表皮細胞をマウス胎仔・新生児の皮下に投与することで、投与直上の皮膚症状の改善が得られることが示唆された。今後、N数を増やし、さらに検証していく予定である。また、今後、DMKN-α/β/γ欠損マウスの皮膚表現型の改善を促す可能性のあるものをマウス胎仔・新生児に投与し、その治療効果を検証する予定である。また、局所の皮膚だけではなく、全身の皮膚に治療効果を波及させるために、マウス胎仔期に、マウスDMKN蛋白質の全身投与と、表皮側からのDMKN遺伝子の導入を考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Utsunomiya, Takenao Chino, Natsuko Utsunomiya, Vu Huy Luong, Atsushi Tokuriki, Tatsuro Naganuma, Makoto Arita, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, Noriyuki Suzuki, Ayako Ohara, Manabu Sugai, Koji Sugawara, Daisuke Tsuruta, Noritaka Oyama, Minoru Hasegawa.	4. 巻 140(4)
2. 論文標題 Homeostatic Function of Dermokine in the Skin Barrier and Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 838-849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Utsunomiya, Takenao Chino, Natsuko Utsunomiya, Vu Huy Luong, Atsushi Tokuriki, Tatsuro Naganuma, Makoto Arita, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, Manabu Sugai, Koji Sugawara, Daisuke Tsuruta, Noritaka Oyama, Minoru Hasegawa.
2. 発表標題 Dual function of Dermokine in regulating Skin Barrier and Innate immunity.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatolog（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----