

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20780224  
 研究課題名 (和文) アトピー性皮膚炎の局所病態発現に及ぼすケラチノサイトの役割とその作用解析

研究課題名 (英文) Role of keratinocytes in the development of atopic dermatitis

## 研究代表者

大森 啓太郎 ( OHMORI KEITARO )  
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教  
 研究者番号：20466915

研究成果の概要 (和文)： アトピー性皮膚炎自然発症マウスおよびイヌを用いて、アトピー性皮膚炎の局所病態発現におけるケラチノサイトの役割を検証した。その結果、ケラチノサイト細胞増殖能の亢進および局所におけるケラチノサイトとマスト細胞とのクロストークが、病態形成や臨床症状の発現に重要であることが明らかとなった。さらに、皮膚バリア機能を改善させるための局所療法が、アトピー性皮膚炎の緩和に有効であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： The importance of keratinocytes in the development of atopic dermatitis was evaluated by using a murine model of atopic dermatitis and dogs. We found that increased cell proliferation of keratinocytes and the local crosstalk between keratinocytes and mast cells in the skin were pivotal in the pathogenesis and clinical signs of atopic dermatitis. We also revealed that improvement of skin barrier function could be effective for alleviating atopic dermatitis and would be a local therapeutic option.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：アレルギー、免疫、炎症、皮膚、動物

## 1. 研究開始当初の背景

ケラチノサイトは外界と身体とのバリアとして機能するが、様々な免疫反応において重要な役割を担っている。例えば、ケラチノサイトは外界の病原体を認識し、皮膚に存在する樹状細胞を活性化することで、自然免疫

と獲得免疫の橋渡し役として機能する。痒みを主徴とする慢性炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎は、ヒトおよびイヌにおいて高頻度に認められ、医学および獣医学上克服すべき重要疾患に位置づけられている。これまでの研究から、アトピー性皮膚炎の病変部においてケラチノサイトが増殖し、ケラチノ

サイトからアレルギーに関与するサイトカインやケモカインが産生されることが明らかとなっている。このことから、アトピー性皮膚炎の病態形成と痒みの発現において、ケラチノサイトが重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに、表皮ケラチノサイトを標的とした局所療法が、アトピー性皮膚炎の臨床症状である痒みや皮膚炎を改善させる治療法となることも期待できる。

## 2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎自然発症マウスである NC/NgaTnd マウスを用いて、アトピー性皮膚炎の局所病態発現に及ぼすケラチノサイトの役割とその作用を解明するとともに、アトピー性皮膚炎を自然発症するイヌを用いて、表皮ケラチノサイトを標的とした臨床応用可能な治療法を確立することを目指して研究を行った。具体的には以下の2つを解明することを目的として研究を行った。

(1) NC/NgaTnd マウスにおけるケラチノサイトの特性解析とアレルギーエフェクター細胞とのクロストークの解明

NC/NgaTnd マウスは、コンベンショナル環境下で飼育するとアトピー性皮膚炎様症状を自然発症し、痒みに伴う引っ掻き行動を示す。さらに、皮膚炎の発症に伴い、アレルギーエフェクター細胞であるマスト細胞が皮膚において増加することが知られている。本研究では、NC/NgaTnd マウスのケラチノサイトの特性を、*in vitro* および *in vivo* の両側面から解析した。また、アトピー性皮膚炎局所病態発現におけるケラチノサイトとマスト細胞とのクロストークの重要性を解析した。

(2) 皮膚炎自然発症犬を用いた高純度軟化水による皮膚炎改善効果の検証

これまでの研究から、表皮における低カルシウムおよび低マグネシウム環境は、皮膚バリア機能を改善させることが明らかとなっている。そこで、カルシウムおよびマグネシウムを含まない高純度軟化水を用いて、皮膚炎を自然発症したイヌの臨床症状（皮膚炎および痒み）を改善させることができるか否かを検証した。

## 3. 研究の方法

(1) NC/NgaTnd マウスにおけるケラチノサイトの特性解析とアレルギーエフェクター細胞とのクロストークの解明

NC/NgaTnd マウスをコンベンショナル環境下で飼育し、アトピー性皮膚炎様症状を自然発症させた。皮膚炎発症前から発症後に

けて経時的に皮膚を採取し、表皮の肥厚を H&E 染色により病理組織学的に評価した。マウスケラチノサイトの培養方法を確立するため、生後3日以内の新生子マウスから表皮細胞を分離し、ケラチノサイト培養用無血清培地において培養した。NC/NgaTnd マウス由来のケラチノサイトと、C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウス由来のケラチノサイトにおいて、MTT 法により細胞増殖速度を比較した。次に、ケラチノサイトとマスト細胞のクロストークを解析した。マウス骨髄由来マスト細胞を分化させた後、IgE および抗原により刺激し脱顆粒させた。その培養上清とケラチノサイトを *in vitro* で共培養した。Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) などアレルギー発症に関与することが報告されている因子について、その mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により解析した。

(2) 皮膚炎自然発症犬を用いた高純度軟化水による皮膚炎改善効果の検証

外部寄生虫、細菌、真菌感染を除外した皮膚炎および痒みを主症状とするイヌ 11 頭を市販のイヌ用シャンプーを用いて週に1回、1ヶ月間、高純度軟化水または水道水でシャンプーした。被験犬を無作為に2つの群に分類し、群1においては高純度軟化水によるシャンプーを行い、その後一定期間を置いて水道水によるシャンプーを行った。群2においては水道水によるシャンプーを行い、その後一定期間を置いて高純度軟化水によるシャンプーを行った。試験前および試験終了後に、獣医師が皮膚炎の重症度をアトピー性皮膚炎皮膚重症度指数 (CADESI スコア) で評価し、飼い主が痒みの程度を痒みスコア (PVAS スコア) で評価した。また、皮膚バリア機能の指標として、経皮水分蒸発量 (TEWL) を測定した。シャンプーの際に使用した水の種類は獣医師には明かされたが、飼い主には明かされなかった。

## 4. 研究成果

(1) NC/NgaTnd マウスにおけるケラチノサイトの特性解析とアレルギーエフェクター細胞とのクロストークの解明

NC/NgaTnd マウスにおいては、アトピー性皮膚炎様症状の発現に伴い、表皮ケラチノサイトが経時的に肥厚していくことを病理学組織学的に確認した。その原因を明らかにするため、MTT 法によりケラチノサイトの細胞増殖速度を比較した。その結果、NC/NgaTnd マウス由来のケラチノサイトにおいて、他系統のマウス由来ケラチノサイトよりも細胞増殖速度が亢進していた。次に、ケラチノサイトとマスト細胞のクロストークを解析するため、ケラチノサイトをマスト細胞の脱顆

粒上清で刺激した。その結果、刺激したケラチノサイトにおいて、アトピー性皮膚炎や喘息などの病態を開始させるために重要な TSLP など様々な因子の mRNA の発現が上昇していた。以上の結果から、NC/NgaTnd マウスにおいては、内因性の要因によりケラチノサイトの細胞増殖速度が亢進していることが明らかとなった。また、アトピー性皮膚炎局所病態発現においては、ケラチノサイトとマスト細胞のクロストークが重要であることが示唆された。

## (2) 皮膚炎自然発症犬を用いた高純度軟化水による皮膚炎改善効果の検証

群1および群2において、一定期間高純度軟化水または水道水を用いたシャンプーを行わなかったことによる持ち越し効果は認められなかった。また、群1および群2において、高純度軟化水または水道水による試験前の2群間のスコアおよびTEWLに有意差は認められなかった。そのため、群1と群2を統合し結果を解析した結果、高純度軟化水によるシャンプー療法により、CADESIスコア、PVASスコアおよびTEWLは有意に減少したが、水道水によるシャンプー療法では、両スコアおよびTEWLの有意な減少は認められなかった(図1、図2、図3)。本研究結果から、皮膚炎および痒みを主症状とするイヌに対して高純度軟化水を用いたシャンプー療法を行い、表皮を低カルシウムおよび低マグネシウム環境にすることで、皮膚バリア機能が改善し、皮膚炎および痒みが改善することが明らかとなった。

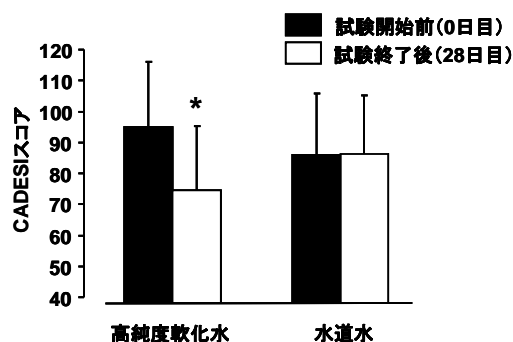


図1. 高純度軟化水および水道水を用いたシャンプー療法試験における CADESI スコアの変化。試験開始前および試験終了後に、獣医師が被験犬の CADESI スコアを評価した。図の棒グラフは、被験犬 (n = 11) の平均値±標準誤差を表している。\*  $P < 0.05$

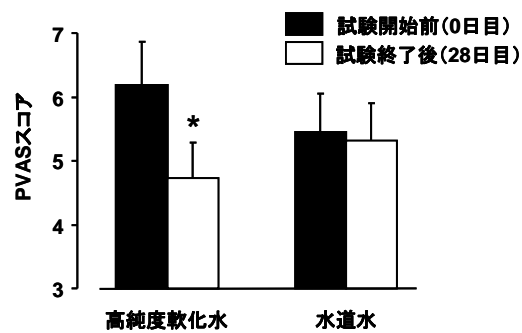


図2. 高純度軟化水および水道水を用いたシャンプー療法試験における PVAS スコアの変化。試験開始前および試験終了後に、PVAS に基づいて飼い主が被験犬の痒みを 10 段階で評価した。図の棒グラフは、被験犬 (n = 11) の平均値±標準誤差を表している。\*  $P < 0.05$

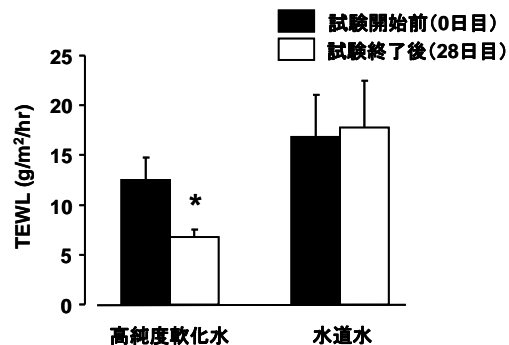


図3. 高純度軟化水および水道水を用いたシャンプー療法試験における TEWL の変化。試験開始前および試験終了後に、獣医師が被験犬の TEWL を測定した。図の棒グラフは、被験犬 (n = 11) の平均値±標準誤差を表している。\*  $P < 0.05$

以上の研究成果より、ケラチノサイトにおける細胞増殖速度の亢進およびケラチノサイトとマスト細胞とのクロストークが、アトピー性皮膚炎局所病態発現において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、表皮ケラチノサイトを標的とした局所療法が、アトピー性皮膚炎の臨床症状を緩和するために非常に有効であることが示された。本研究においては、マウスおよびイヌを用いてアトピー性皮膚炎発症におけるケラチノサイトの重要性を検討したが、今後は、人医療への展開を目指して、アトピー性皮膚炎のヒトにおいて研究を推進していく必要がある。

## 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6件)

① Ohmori K, Tanaka A, Makita Y, Takai M, Yoshinari Y, Matsuda H. Pilot evaluation of the efficacy of shampoo treatment with ultra-pure soft water for canine pruritus. *Veterinary Dermatology* 2010 (in press) 査読有り

② Matsuda A, Tanaka A, Muto S, Ohmori K, Furusaka T, Jung K, Karasawa K, Okamoto N, Oida K, Itai A, Matsuda H. A novel NF- $\kappa$ B inhibitor improves glucocorticoid sensitivity of canine neoplastic lymphoid cells by up-regulating expression of glucocorticoid receptors. *Research in Veterinary Science* 2010 (in press) 査読有り

③ Kawarai S, Masuda K, Ohmori K, Matsuura S, Yasuda N, Nagata M, Sakaguchi M, Tsujimoto H. Cultivation and characterization of canine skin-derived mast cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 72(2): 131-140, 2010. 査読有り

④ Ohmori K, Luo Y, Jia Y, Nishida J, Wang Z, Bunting KD, Wang D, Huang H. IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *The Journal of Immunology* 182(5): 2835-41, 2009. 査読有り

⑤ Tanaka A, Jung K, Benyacoub J, Prioult G, Okamoto N, Ohmori K, Blum S, Mercenier A, Matsuda H. Oral supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN- $\gamma$ . *Experimental Dermatology* 18(12): 1022-7, 2009. 査読有り

⑥ Ohmori K, Kawarai S, Yasuda N, Tanaka A, Matsuda H, Nishimura R, Sasaki N, Tsujimoto H, Masuda K. Identification of c-kit mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126(1-2): 43-53, 2008. 査読有り

[学会発表] (計4件)

① 大森啓太郎、田中あかね、巻田優花、高井政貴、吉成佑治、松田浩珍. 皮膚炎自然発

症犬を用いた高純度軟化水による皮膚炎改善効果の検証. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2009年10月. 秋田キャッスルホテル (秋田県)

② 大森啓太郎、田中あかね、巻田優花、高井政貴、吉成佑治、松田浩珍. イヌの痒みに対する高純度軟化水を用いたシャンプー療法の臨床的効果. 第148回日本獣医学会学術集会. 2009年9月. とりぎん文化会館 (鳥取県)

③ 田中あかね、大森啓太郎、高井政貴、吉成佑治、松田浩珍. 高純度軟化水 (UPSW) のアトピー性皮膚炎改善効果 4. 皮膚バリア損傷モデルでの検証. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008年11月. 東京国際フォーラム (東京都)

④ 大森啓太郎、田中あかね、高井政貴、吉成佑治、松田浩珍. ヒトおよびイヌの皮膚バリア機能に及ぼす高純度軟化水の影響. 第146回日本獣医学会学術集会. 2008年9月. ワールドコンベンションセンター (宮崎県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 啓太郎 (OHMORI KEITARO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教

研究者番号 : 20466915