

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791244

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel therapies for atopic dermatitis

研究代表者

浜坂 明日香（HAMASAKA ASUKA）

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60598382

研究成果の概要（和文）： フィラグリン遺伝子に1塩基の欠失変異を持つ flaky tail はアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を自然発症する。今回の研究では、この flaky tail をアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして用いた。このマウスに MIF-DNA ワクチンを投与したところ、皮膚炎の改善を認めた。また、同様に、DHEMQ で治療した場合も、皮膚炎の改善を認めた。両薬剤がアトピー性皮膚炎に対する新規治療候補薬となることが示された。

研究成果の概要（英文）： Flaky tail mice carry a 1bp deletion in a gene encoding filaggrin and develop spontaneous dermatitis. In this study, we used flaky tail mice as a model of atopic dermatitis. Improvement of dermatitis was observed after treatment with MIF-DNA vaccine or DHEMQ. These data suggest that both MIF-DNA vaccine and DHEMQ be a novel therapeutic option for atopic dermatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎、モデルマウス、新規治療法

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、先進国では小児の約15%が罹患する、極めて頻度の高い疾患である。しかしながら、アトピー性皮膚炎の病因は長らく不明であり、その治療はこれまでステロイド剤外用を中心とした対症療法に頼らざるを得ず、難治例では皮膚萎縮などのス

テロイドの副作用を高率に生じ、大きな社会問題となってきた。また、アトピー性皮膚炎の患者は、皮膚炎によるバリア機能異常を基盤に気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患を続発しやすいことが知られており（アレルギーマーチ）、皮膚炎に対する治療はこれらのアレルギー疾患の発症

予防の観点からも極めて重要である。このように、ステロイドに代わる新規治療薬の開発が強く求められる中、最近、研究代表者らは、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) に対する DNA ワクチンを DS-Nh と NC/Nga という 2 つの異なるアトピー性皮膚炎モデルマウスに投与し、皮膚症状、搔爬行動、血清 IgE 値などの炎症症状が改善することを示した (Hamasaka A et al, J Allergy Clin Immunol, 2009)。また、NF- κ B 阻害薬である dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) が、NC/Nga マウスの皮膚症状を改善することを示し、同薬剤が現在アトピー性皮膚炎患者に対して広く用いられている tacrolimus や betamethazone と同等の抗炎症効果を示すことに成功した (Hamasaka A et al, J Allergy Clin Immunol, 2010)。しかしながら、これらの研究に用いた 2 つのマウスには、ヒトのアトピー性皮膚炎の表現型をどの程度正確に反映しているかいまだに解明されていないという問題点があった。

そのような中、最近、研究代表者の所属する研究室では、日本人アトピー性皮膚炎患者の約 30%がフィラグリン遺伝子にナンセンス変異やフレームシフト変異を有していることを示した。フィラグリンは、表皮のケラトヒアリン顆粒の重要な構成要素であり、表皮細胞の角化の過程で、角化細胞内を満たし、正常の角化、および、皮膚表面角層のバリア機能に非常に重要な役割を果たしている蛋白であり、フィラグリン遺伝子変異によりフィラグリンの発現が低下すると皮膚バリア機能の障害が起こり、それに伴う慢性抗原刺激によりアトピー性皮膚炎を発症するものと推測されている。事実、フィラグリン遺伝子にフレームシフト変異を持つ flaky tail

マウスはアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を自然発症し、その皮膚にダニなどの抗原を反復性に塗布することで、強い皮膚炎を誘発できることが知られており、実際のアトピー性皮膚炎の病因に最も則したモデルマウスが利用できるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、これら最新の知見に基づき、MIF-DNA ワクチンと DHMEQ を、フィラグリン遺伝子変異を持つ flaky tail という、実際のヒトのアトピー性皮膚炎の病因に最も則したモデルマウスに投与し、アトピー性皮膚炎に対する新しい治療法と予防法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Flaky tail マウスの genotyping と皮膚炎モデルの作成

Flaky tail マウス (商品名 : STOCK *a/a ma ft/ma ft/J*; *Flg^{ft}* mice) は、フィラグリン遺伝子に 1 塩基の欠失変異 (5303delA) を homozygous に持ち、結果としてフィラグリンが全く産生されず、ドライスキンを呈するマウスである。このマウスを米国の Jackson 社より購入し、まずは genotyping を試みた。Mutant allele のフィラグリン遺伝子には 5303delA に加えて 15 塩基の挿入変異が起きていることを利用し、この 15 塩基の挿入変異をターゲットに、PCR 法と制限酵素切断法を用いて genotyping を行った。Genotyping 用の PCR には次のプライマーを用いた。Forward: 5' CAT CTC CAG TCA GGG CTG ACC 3' Reverse: 5' GCT GCC TGT GGC CGG ACT CG 3' ((94 ° C, 5 min) x 1; (94 ° C, 30 s; 58 ° C, 30 s; 72 ° C, 1 min) x 35; (72 ° C, 5 min) x 1) 。この PCR 産物を *AccI* により制限酵素切断した (変異 allele は 559bp と

134bp に分解されるのに対し、野生型 allele は分解されない (678bp))。flaky tail マウスは conventional な環境下で飼育した。自然に惹起された皮膚炎に対し、組織学的な検討を行った。

(2) MIF-DNA ワクチンによる治療

Flaky tail マウスに自然発症した皮膚炎に対し、MIF-DNA ワクチンを投与した。治療効果は、臨床症状、掻破行動を指標としたかゆみスコア、経皮的水分喪失量 (transepidermal water loss; TEWL) などの、アトピー性皮膚炎の病勢評価の判定によく用いられる指標を使い、マウス皮膚を経時的に評価した。また、それに加えて、組織学的に炎症細胞浸潤の程度も評価し、臨床的な皮膚炎の改善度だけではなく、組織学的な改善度の評価も行った。Negative control 群には naked plasmid を投与し、比較検討した。

(3) DHEMQ による治療

(2) と同様の方法を用いて、flaky tail マウスの皮膚炎部に DHEMQ 溶解液を外用し、臨床症状、掻破行動、TEWL などを指標に、治療効果判定を行った。治療効果を判定しやすいよう、背部の皮膚を剃毛してから治療を行った。Negative control 群には PBS を投与し、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 前述の方法を用いて正確な genotyping を行うことに成功した。Genotyping の結果に基づいて、フィラグリン遺伝子に homozygous に変異を有する flaky tail マウスを conventional な環境下で飼育したところ、皮膚炎が自然に惹起され、掻爬行動や部分脱毛を認めた。特に背部や尾の皮膚に強い炎症を認めた。アトピー性皮膚炎の自然発症モデル

マウスを確立することができた。皮膚炎部の組織学的な解析では、リンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を認めた。TEWL は上昇しており、バリア機能異常が示唆された。

(2) MIF-DNA ワクチンを投与した群では、naked plasmid を投与した negative control 群と比べ、改善が認められた。また、組織学的にも炎症所見の改善を認めた。MIF-DNA ワクチン投与群に明らかな副作用は認められなかった。

(3) DHEMQ を投与した群においても同様に、PBS を投与した negative control 群と比べ、改善が認められた。また、組織学的にも炎症所見の改善を認めた。DHEMQ 投与群に明らかな副作用は認められなかった。

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 1 件)

1. Hirata Y, Abe R, Kikuchi K, Hamasaka A, Shinkuma S, Ujiie H, Nomura T, Nishie W, Arita K, Shimizu H.

Intraepidermal neutrophilic IgA pemphigus successfully treated with dapsone.

The European Journal of Dermatology

(査読有) 22 巻、2012 年、282-3 頁。

doi: 10.1684/ejd.2012.1662.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜坂 明日香 (HAMASAKA ASUKA)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60598382

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：