

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591474

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎の発症における非免疫学的機序と免疫学的機序との接点の解明

研究課題名(英文)Understanding of interaction between immunological and non-immunological mechanisms for development of atopic dermatitis

研究代表者

安田 琢和 (Yasuda, Takuwa)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00373374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が独自に樹立したアトピー性皮膚炎様の皮膚疾患を自然発症するSpadeマウスを用いて、皮膚炎の発症に関わる細胞と因子の解析を行った。

Spadeマウスの皮膚炎発症には、好塩基球が深く関わっていると考えられた。好塩基球を活性化する因子としてはTSLP, IL-33が有力であると考えられた。さらに好塩基球はIL-4, IL-13といった因子を産生し、直接もしくは他の細胞を制御する形でアレルギー反応に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a newly generated mutant mouse (Spade mouse), which spontaneously develops atopic dermatitis like skin disease, we investigated a responsible cells and factors for development of dermatitis.

Our data showed that basophils played a pivotal role in development of dermatitis in our Spade mouse model. Our results suggested that basophils were activated by TSLP and/or IL-33, and then, basophils secreted IL-4 and IL-13, those induced allergic responses directly or regulated inflammatory cells such as eosinophils, neutrophils and macrophages.

研究分野：免疫学・アレルギー学

キーワード：アトピー性皮膚炎 好塩基球

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は、我が国の乳幼児の10%から20%が発症するとされていて、その予防方法および治療薬剤の開発は、国民の医療およびQOL向上のための重要事項の一つになっている。しかし現実にはステロイド剤や保湿剤による対症療法が主な治療法となっており、アトピー性皮膚炎の発症機構を解明し、それに基づいた根治療法の開発が求められている。

アトピー性皮膚炎の発症要因には、皮膚バリア機能異常などの「非免疫学的機序」とTh2免疫反応に起因する「免疫学的機序」とが提唱されていて、これら両機序が連携することで皮膚炎が発症すると考えられている。このうち前者では、表皮のバリア形成に必要な細胞外基質タンパクの一つであるフィラグリンの遺伝子変異が湿疹、ひいてはアトピー性皮膚炎のリスクを高めるとの報告がある。このことから、皮膚のバリア機能異常がアトピー性皮膚炎の発症に先行すると考えることができる。

しかしながら、このような非免疫学的機序としての皮膚バリア機能異常と免疫学的機序の結果としての皮膚炎症との連携をつなぐ因子、細胞については不明な点が多い。また、全ての皮膚異常が皮膚炎発症に結びつくことはなく、さらにアトピー性皮膚炎とは異なる乾癬などの別な病態へ進むこともあり、解明すべき事項が多く残っている。

2. 研究の目的

上述の背景を鑑み、皮膚表皮バリア破綻などバリア機能異常に端を発し、表皮を形成するケラチノサイトへ伝わる因子、そのケラチノサイトから産生される因子、さらにその因子を受け取る炎症性細胞の組み合わせが、皮膚バリア機能異常とアトピー性の皮膚炎発症とをつなぐ鍵となるのではないかと考えた。

そして、このような因子や細胞の同定には、

疾患の発症過程を追跡しながらそれぞれの因子、細胞の機能を確認していくことが必要であり、そのためには実験動物個体レベルでの詳細な解析が必要不可欠であると考えている。

そこで本研究では、以下の方法欄で述べる適切なモデル動物を用い、皮膚バリア機能異常を生じた皮膚環境と炎症性細胞とを連携させる因子は何であるのか、そして炎症細胞とは何細胞であるのかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、我々が独自に樹立したアトピー性皮膚炎とよく似た皮膚疾患を自然発症するミュータントマウス (*Spade* マウス) という優れたモデルマウスを用いることができた。*Spade* マウスにおける皮膚炎発症の原因遺伝子変異は細胞内信号伝達に関わる分子の点突然変異であることを確認している。*Spade* マウスは、[Step 1] 皮膚表皮バリア機能異常期; 生後1ヶ月半程度から皮膚の乾燥や経皮水分蒸散量の上昇が認められる。

[Step 2] 皮膚炎症期; 掻破行動が見られるとともに、皮膚炎症状を観察できる。[Step 3] アレルギー反応を伴う増悪期; 皮膚炎症状が発現してから約2週間後に血清IgE値の増加が認められる。[Step 4] 慢性期; 頻繁な掻破行動による外傷を伴う皮膚の炎症が固定し、この状態では様々なクラスの血清免疫グロブリンの増加が検出できる。

この *spade* マウスを用いて皮膚炎発症に関わる細胞と因子の解析を行った。

皮膚炎発症に関わる細胞の解析は、*spade* マウスの皮膚組織での免疫組織染色法とリンパ節細胞をフローサイトメトリー法でそれぞれ行った。皮膚炎症に関わる因子の解析は、皮膚組織の破碎上清を用い、mRNAを抽出し発現量解析を、もしくはELISA法を用いたタンパク量測定で行った。

皮膚組織は自然発症の耳組織の発症前か

ら発症直後、その症状の悪化が進行している時期で採取し解析を行った。

さらに、未発症の背中皮膚部分に痒み誘導物質とされる PAR2 agonist peptide を投与することによって皮膚炎発症を制御できる方法を開発した。この方法で皮膚炎を誘導した背中皮膚サンプルを経時的に採取し解析を行った。

好塩基球について、BasTRECK マウスを用い解析を行った。このマウスはジフテリアトキシン投与により一時的に体内から好塩基球を消去できる。この BasTRECK マウスと *Spade* マウスのダブル mutant マウスを作製し、*Spade* マウスの皮膚炎発症における好塩基球の役割について検証を行った。

4. 研究成果

(1) アトピー性皮膚炎様の皮膚炎を発症した *Spade* マウスの耳組織に集積する細胞について免疫染色法で調べたところ、好酸球、好中球 (Gr-1 陽性細胞) 、マクロファージ (F4/80 陽性細胞) が皮膚の炎症部位から表皮にかけて増加していた。これらに加え、通常の耳組織ではほとんど見る事の出来ない好塩基球 (Mcp1 陽性細胞) の増加が見られた。

Spade マウスの所属リンパ節中の細胞についてフローサイトメトリー法で野生型と比較した。皮膚炎の発症前から発症後にかけて終始、T 細胞の割合は野生型の方が多く、B 細胞の割合は *Spade* マウスの方が多くなっていた。さらに発症初期のリンパ節で比較したところ、好中球、マクロファージ、好塩基球の割合が *Spade* マウスで野生型マウスに比べ多くなっていた。

(2) 次に *Spade* マウスでの皮膚炎発症の解析をより詳細に行えるように、未発症の背中皮膚部分に痒み誘導物質とされる PAR2 agonist peptide を投与し、皮膚炎発症を制御できる方法の開発を試みた。毛を除いた皮膚

への peptide 投与 1 回目の翌日から小さな掻き跡が見られはじめ、1 日 1 回の 3 日連日投与後には、掻き跡は大きくなる事が確認できた。この皮膚の組織学的な観察では、表皮、真皮の肥厚、細胞の集積などが見られ、炎症を誘導できている事が確認できた。

さらにこの方法で皮膚炎を誘導した背中皮膚で、皮膚炎発症に関わる細胞についての解析を行った。この結果、耳組織での解析と同様な細胞の増加が認められ、特に好塩基球の増加が顕著であった。

同じ peptide の投与によって、*Spade* マウスと同様に RAG1 KO-*Spade* マウスでも炎症を誘導することができた。このことから、この皮膚炎モデルの発症において T 細胞と B 細胞の役割は小さいと示された。

(3) これまでも、アレルギー反応において好塩基球が役割を果たすことは示されてきたが、アトピー性皮膚炎において明快に示した例は少ない。そこで、好塩基球について詳しい解析を進めた。

好塩基球を欠損した状態で *Spade* マウスの皮膚炎発症を観察するために、BasTRECK-*Spade* マウスを作製した。このマウスにジフテリアトキシンを投与し、好塩基球を除去し続けた結果、*Spade* マウスの皮膚炎発症は軽症となった。

次に、この好塩基球を活性化する因子についてタンパク産生量を測定することで進めた。自然発症の耳組織の発症前から発症直後、その症状の悪化が進行している時期、で採取し解析を行った。耳組織において、IL-4、IL-13 といった好塩基球が産生しアレルギー反応に関与する因子の産生が発症直後でも多くなっていて、創傷治癒に関わる因子とされる IL-6 も悪化が進行している時期での産生が多くなっていた。

比較のため PAR2 agonist peptide 投与から経時的に皮膚サンプルを採取し各種因子

のタンパクの産生を調べた。投与翌日から耳組織でと同様な因子の増加が認められた。自然発症耳部位と炎症誘導背中皮膚とで、同様な因子の増加が見られることから、この皮膚炎モデルの発症には、好塩基球によるアレルギー反応が関わっていると考えられた。

さらに好塩基球を活性化する因子として、好塩基球が受容体を発現しているという基準で、IL-3, IL-33, TSLP を考え解析を行った。これらの活性化因子は自然発症の耳において発症初期に IL-33, TSLP は鋭く増加し、IL-3 は穏やかではあるが増加していた。

これらの因子について、未発症の背中皮膚部分に PAR2 agonist peptide を投与することで誘導した皮膚炎発症部位でも調べた。タンパク産生量は3因子とも投与翌日から急上昇していた。

これらのことから、*Spade* マウスの皮膚炎発症には、好塩基球が深く関わっていると考えられた。好塩基球を活性化する因子としては TSLP, IL-33 が有力であると考えている。さらに好塩基球は IL-4, IL-13 といった因子を産生し、直接もしくは他の細胞を制御する形でアレルギー反応に関わっているものと考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安田 琢和 (YASUDA Takuwa)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00373374