

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791176

研究課題名(和文) フィラグリン欠損マウスを用いた、低湿度環境によるアトピー性皮膚炎発症機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of filaggrin-null mice in dry environment to understand the pathogenic mechanism of atopic dermatitis

研究代表者

川崎 洋(KAWASAKI, HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70445344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：フィラグリンの機能喪失変異がアトピー性皮膚炎の発症因子として注目されている。乾燥環境がフィラグリン欠損皮膚に与える影響を評価することで、アトピー性皮膚炎発症機序の解明を試みた。生後より低湿度環境下で飼育したフィラグリン欠損マウスは、通常湿度環境下で飼育するのに比べ、尋常性魚鱗癬の表現型が増悪した。低湿度環境下で飼育したフィラグリン欠損マウスは、同腹の野生型マウス及び通常湿度環境下で飼育したマウスに比べ、異常な角質形成がみられ、角層の物質透過性が亢進していることがわかった。本研究より、フィラグリン欠損皮膚は、乾燥環境という因子が加わることでバリア機能がより増悪することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Loss-of-function mutations in the filaggrin gene are major predisposing factors for atopic dermatitis. In this study, we hypothesized that dry environment might influence the impact of filaggrin deficiency and we evaluated filaggrin-null (Flg-/-) mice in dry condition. Dry condition exacerbated scaly skin gross phenotype in Flg-/- mice, which resembled Ichthyosis vulgaris, while skin in wild-type littermates were not apparently affected. Histological examination revealed acanthosis and large, thick scales focally in Flg-/- skin in dry condition, indicating abnormal cornification. Both of "inside-to-outside" and "outside-to-inside" permeation through Flg-/- stratum corneum were more enhanced in dry condition, as compared with wild-type stratum corneum. Thus, the skin phenotype and barrier disruption due to lack of filaggrin became more prominent in dry condition, indicating the importance of environmental factor in development of skin phenotype in filaggrin deficiency.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学 アトピー性皮膚炎

## 1. 研究開始当初の背景

2006年、欧米の多くのアトピー性皮膚炎患者に、角層の主要な構成タンパク質であるフィラグリンの遺伝子変異が高率に認められたと報告された。その後フィラグリンとアトピー性皮膚炎に関する一連の研究は、フィラグリンが皮膚のバリア機能維持に重要であり、その変異は外来抗原や微生物の表皮内への侵入を容易とし、アトピー性皮膚炎の発症を引き起こすという興味深い仮説をもたらした。しかし、その詳細な機序は明らかではなかった。

研究代表者等はアトピー性皮膚炎の発症機序の解析を目的として、フィラグリン欠損 ( $Flg^{-/-}$ ) マウスを作成した。そして、フィラグリンは角層の物理的強度の保持に関わっていること、外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許し、経皮免疫応答の亢進につながることを明らかにした。しかし、 $Flg^{-/-}$ マウスを SPF 環境下で飼育しても皮膚炎の発症を認めなかった。

アトピー性皮膚炎や、フィラグリンが原因遺伝子の角化症である尋常性魚鱗癬は、冬の低湿度環境や暖房器具の使用により皮膚の乾燥が進むことで皮膚炎を発症し、症状が増悪することが知られている。しかし、乾燥環境下で皮膚炎が生じ増悪するメカニズムを直接的に示した研究はいまだ報告されていない。フィラグリンの分解産物であるアミノ酸は天然保湿因子としてはたらき、角層の水分保持に重要な役割を担うと考えられている。しかし、通常湿度環境下(湿度 40-60%)で飼育した  $Flg^{-/-}$ マウスは角層の天然保湿因子量が著しく減少し、肉眼的に皮膚乾燥と落屑を特徴とする尋常性魚鱗癬様の表現型を呈するにもかかわらず、角層内水分量の減少がみられなかった。研究代表者は、通常湿度環境下ではフィラグリン欠損による天然保湿因子の減少を他の物質により代償できるが、低湿度環境下で  $Flg^{-/-}$ マウスを飼育すると、この代償が効かず角層内水分量が減少し、皮膚のバリア機能がより低下して皮膚炎を発症しやすくなるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、 $Flg^{-/-}$ マウスを低湿度環境下で飼育し、乾燥環境がフィラグリン欠損皮膚に与える影響を構造、機能的に評価するとともに、各種抗原を塗布することでアトピー性皮膚炎様マウスモデルを作成することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 低湿度環境下でのマウス実験

研究代表者が所属する施設には、細かな湿度調節が可能な密封型のアイソレータがあり、アイソレータ内の湿度を安定して 10%の

低湿度にまで保てることが確認されている。また、本装置内にはマウスケージを 15 ケージ収容可能で、マウスの飲水や糞尿の影響を加味してもマウス飼育ケージ内の湿度を安定して 20%以下に保てることが確認されている。本研究の低湿度環境下でのマウス実験は本装置を使用した。そして通常湿度環境下(湿度 40-60%)と低湿度環境下(湿度 20%以下)でマウスを飼育し、それぞれの環境下での野生型マウスと  $Flg^{-/-}$ マウスの表現型の特徴を比較した。

### (2) 低湿度環境下での物質皮膚透過性の評価

#### ① 経皮水分蒸散能評価

Punch biopsy したマウス皮膚の真皮側を高真空用シリコングリースに埋没させ、表皮側からしか水分蒸散が起こらない状況を作り、経時的にサンプルの重量変化を測定することで、角層を透過する水分蒸散能の評価を行った。

#### ② 色素の角層透過性評価

川本法(Kawamoto, et al. Arch Histol Cytol 2003)という組織切片作成法を改良することで、組織の固定や観察時の色素の漏れ込みという問題点を解消し(Kawasaki, et al. J Allergy Clin Immunol 2012)、マウスの皮膚に蛍光物質カルセイン含有リポソームを塗布して、蛍光色素の角層透過性を共焦点顕微鏡で観察した。

### (3) 低湿度環境下での免疫応答の評価

低湿度環境下で飼育したマウスの血清総 IgE 値を測定した。その際、positive control の比較として、皮膚炎自然発症マウス flaky tail/matted マウスを使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 低湿度環境下でのマウス実験

通常湿度環境下で飼育した  $Flg^{-/-}$ マウスは、日齢 4-5 をピークにドライスキン様の外観と著しい落屑を認め、フィラグリンが原因遺伝子である尋常性魚鱗癬に類似した表現型を示すが、皮膚が体毛に覆われるとこれらの表現型は消失する。一方、低湿度環境下で生後より飼育した  $Flg^{-/-}$ マウスでは、通常環境下で飼育するのに比べ尋常性魚鱗癬の表現型が増悪することがわかった(図 1)。皮膚表面構造を詳細に観察したところ、低湿度環境下で飼育した  $Flg^{-/-}$ マウスで顕著に亀裂様の所見を多数観察した。低湿度環境下の  $Flg^{-/-}$ 皮膚を組織学的に観察すると、異常な角質形成が観察された(図 2)。

さらに、低湿度環境下で飼育した  $Flg^{-/-}$ マウスは同腹の野生型マウスに比べ、明らかな成長障害を認め、成長の途中で死亡してしまうマウスをしばしば観察した(図 3)。

(2) 低湿度環境下での物質皮膚透過性の評価

① 経皮水分蒸散能評価

低湿度環境下の  $Flg^{-/-}$  皮膚における物質透過性を評価した。通常、内から外への物質透過性の指標として汎用されている経皮水分蒸散量 (TEWL: transepidermal water loss) は、異なる湿度条件で計測した場合の値の比較ができないこと、低湿度環境下では野生型、 $Flg^{-/-}$ 、双方のマウスで測定値が低値を示し、両者間の差を評価できないことから、別の解析方法を確立する必要が生じた。そこで、上述の ex-vivo 解析法を考案し、経皮水分蒸散能評価を行った。

日齢 10 の野生型マウス、 $Flg^{-/-}$  マウスそれぞれの皮膚より採取したサンプルの重量変化を、通常湿度環境下で測定して比べると明らかな差を認めなかったが、低湿度環境下で測定すると、 $Flg^{-/-}$  皮膚は野生型マウスより採取した皮膚に比べ、顕著な重量減少を認めた (図 4)。本結果より、 $Flg^{-/-}$  皮膚では、角層を透過する水分蒸散量が上昇していることがわかった。

② 色素の角層透過性評価

次に、外界から角層内への物質透過性を評価することを試みた。マウスの尾の皮膚に蛍光物質カルセイン含有リポソームを塗布して、蛍光色素の皮膚透過性を組織学的に評価した。その結果、フィラグリン欠損マウスは野生型マウスに比べ、蛍光色素が局所的に角層ほぼ全層にしみ込む像を多く観察し、それは通常湿度環境下よりも低湿度環境下で飼育したマウスでより顕著だった。一方、野生型マウスは、通常湿度環境下においても蛍光色素の透過を認めた箇所はわずかだった (図 5)。

(3) 低湿度環境下での免疫応答の評価

低湿度環境下で飼育したマウスの血清総 IgE 値を測定したところ、野生型、 $Flg^{-/-}$  マウスともに、血清総 IgE 値の上昇を認めなかった (図 6)。一方、OVA を用いて外来抗原に対する経皮免疫応答能を評価したところ、通常湿度環境下で飼育したマウスに比べ、低湿度環境下で飼育したマウスにおいて経皮免疫応答能が亢進する可能性が示唆された。現在、研究代表者は本実験系を改良し、外来抗原の経皮投与から皮膚炎を安定して発症するマウスモデルの開発に努めている。

本研究から、 $Flg^{-/-}$  角層は、通常湿度環境下よりも乾燥環境下で、異常な角質形成を認め、亀裂が生じやすく、物理的に脆弱である可能性が示唆された。また、経皮水分透過機能を見る ex-vivo 実験より“角層内から外界への”物質透過性が、色素の浸透性をみる実験より“外界から角層内への”物質透過性がより亢進することがわかった。乾燥環境下でみられる角層バリア破綻が、低湿度環境下の  $Flg^{-/-}$  マウスの成長障害に影響したと考えられた。

しかし、生後より低湿度環境下で飼育した  $Flg^{-/-}$  マウスが皮膚炎を自然発症することはなく、血清総 IgE 値の上昇も観察しなかった。

今後は、 $Flg^{-/-}$  皮膚が乾燥環境下で角質バリア破綻が起こる機序のより詳細な解明を目指す。また、本知見を生かし、経皮的に外来抗原を塗布する系を組み合わせることで、安定してアトピー性皮膚炎様皮膚炎を発症するマウスモデルを作成し、フィラグリン機能異常を有する皮膚でアトピー性皮膚炎が生じる機序の解明を目指す。

本研究は、フィラグリン機能異常と乾燥環境の関わりがアトピー性皮膚炎の発症に影響する可能性を、マウスモデルを使って初めて示したものである。本研究を発展させることで、アトピー性皮膚炎発症機序の解明や新しい治療法の開発につながることを期待される。

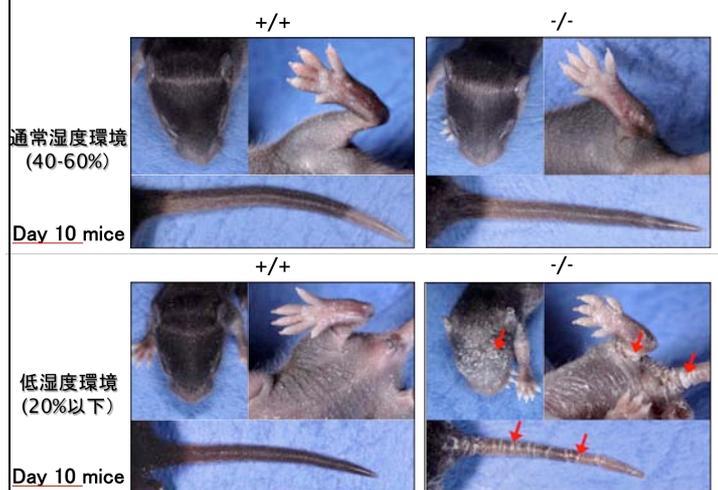


図1: 通常湿度環境と低湿度環境下で飼育したマウスの表現型の比較

日齢10のマウスの表現型を比較した。通常湿度環境下で飼育したマウスでは野生型マウス (+/+) と  $Flg^{-/-}$  マウス (-/-) 間に肉眼的に顕著な差異を認めない。一方、低湿度環境下で飼育したマウスでは、 $Flg^{-/-}$  マウスで皮膚の著しい落屑 (矢印) を観察し、表面が粗造で光沢有する皮膚を認め、尋常性魚鱗様様の表現型を呈した。

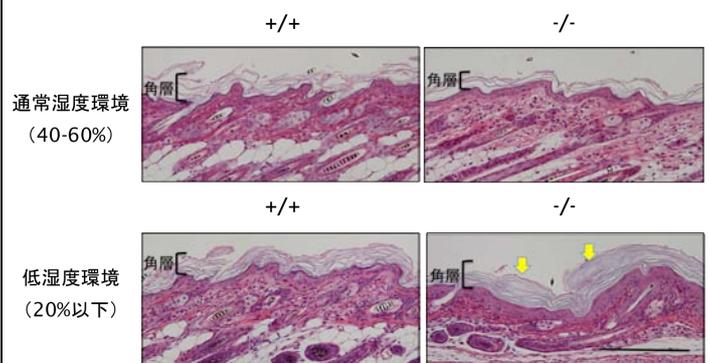


図2: 通常湿度環境と低湿度環境下で飼育したマウスのHE組織像

日齢10のマウス (腹部皮膚) のHE組織像。低湿度環境下で飼育した  $Flg^{-/-}$  マウス (-/-) で、異常な角質形成 (矢印) を認める。  
+/+: 野生型マウス

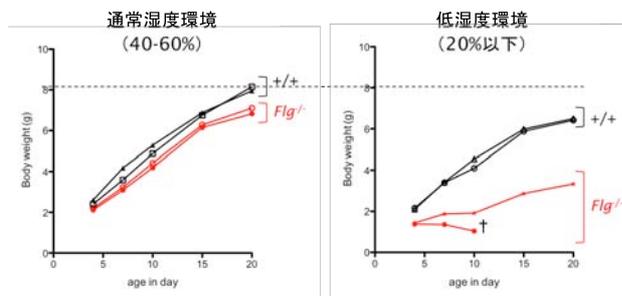
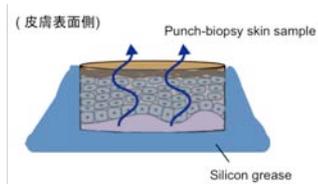


図3: 通常湿度環境下と低湿度環境下で飼育したマウスの成長の比較

通常湿度環境下で飼育したマウスと低湿度環境下で飼育したマウスの体重変化。代表的な同腹マウス (+/+ : 野生型マウス,  $Flg^{-/-}$  マウス) での結果を图示。



日齢10のマウスの背部皮膚を使用して測定

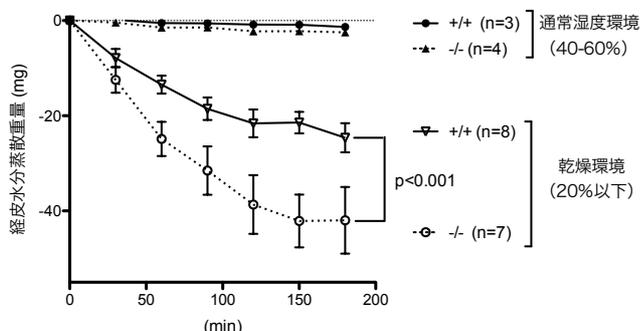
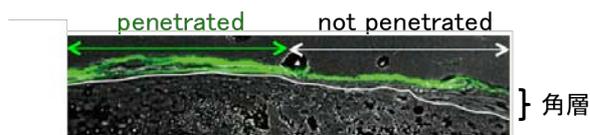


図4:  $Flg^{-/-}$  マウスでは、角層を透過する水分蒸散量が亢進している

上図の如くPunch biopsyした皮膚の真皮側を高真空用シリコングリースに埋没させ、表皮側からしか水分蒸散が起こらない状況を作り、計時的にサンプルの重量変化を測定することで、角層を透過する水分蒸散能を評価した。通常湿度環境下で測定しても野生型 (+/+) マウス、 $Flg^{-/-}$  (-/-) マウス間で差を認めなかったが、低湿度環境下で測定すると、 $Flg^{-/-}$  皮膚は野生型マウスより採取した皮膚に比べ、顕著な重量減少を認めた。



Penetration length : 顆粒層直上まで透過した色素の長さを計測 (observation length : 18mm, 3 mice each)

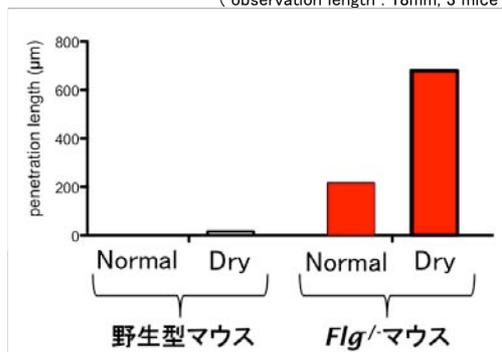


図5:  $Flg^{-/-}$  マウスでは、角層の外來物質透過性が亢進している

蛍光色素カルセイン含有リポソームを日齢7のマウスの尾に塗布し、色素の透過性を共焦点顕微鏡にて観察した。 $Flg^{-/-}$  マウスは野生型マウスに比べ、蛍光色素が局所的に角層ほぼ全層にしみ込む像を多く観察し、それは通常湿度環境下 (Normal) よりも低湿度環境下 (Dry) で飼育したマウスでより顕著だった。

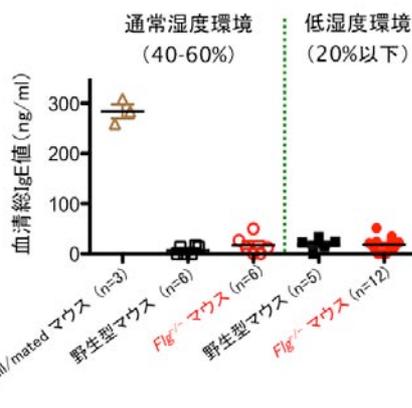


図6: 通常湿度環境下、低湿度環境下で飼育したマウスの血清総IgE値

positive controlとして、皮膚炎を自然発症するflaky tail/matted マウスを使用した。

## 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 2 件)

- ① Kawasaki H: Exacerbation of the skin barrier function of filaggrin-null mice in dry environment. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013. Dec.13. 幕張
- ② Kawasaki H: Filaggrin-null mice exhibit impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses. the Asian Society for Pigment Cell Research and the Australasian Society for Dermatology Research conference 2013, 2013. May.19. Sydney, Australia

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 洋 (KAWASAKI HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70445344