

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：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860944

研究課題名(和文) フィラグリンモノマー過剰発現マウスにおける皮膚免疫機能の評価と天然保湿因子の役割

研究課題名(英文) Evaluation of percutaneous immune responses and role of natural moisturizing factor in filaggrin monomer transgenic mice

研究代表者

池谷 茂樹 (IKEYA, Shigeki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40436936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はフィラグリンモノマーを表皮に過剰に発現するトランスジェニックマウス(FLG-TGマウス)を作成した。FLG-TGマウスでは、有意に経表皮水分喪失量(TEWL)は低下し、低分子量色素(Lucifer yellow)の角層透過性が阻害されていた。したがってFLG-TGマウスでは皮膚バリア機能が亢進している可能性が示唆された。一方角質水分量は若干減弱しており、NMFが過剰に産生されているかについては、フィラグリン分解に関する酵素活性測定を含めた判断が必要であると考えた。今後の課題として、皮膚バリア機能の亢進が経皮的な免疫応答に与える影響を検討していく。

研究成果の概要(英文)：We generated a FLG monomers transgenic mouse under the control of involucrin promoter. The FLG-TG mouse could have more filaggrin monomers and its derivatives, NMF. We speculate that our mice are more protective against outer stimuli and are prone to develop both irritant and allergic dermatitis. This type of mice revealed decreased transepidermal water loss and prevent the out-to-inside transpenetration of a low molecular weight chromatophore, Lucifer yellow. These findings clearly indicate the importance of filaggrin monomers in skin barrier. On the other hand, SC hydration was not up-regulated in FLG-TG mice. The amount of NMF, which could be expected to correlate with SC hydration, is dependent on proteases including bleomycin hydrolase. Thus, we thought that the amount of NMF in our transgenic mice need careful assessment. In the future plan, we would like to analyze FLG-TG mice mainly focusing on the immunological reaction.

研究分野：皮膚免疫、皮膚バリア機能、アトピー性皮膚炎、紫外線誘発皮膚癌の発症機序

キーワード：フィラグリン 天然保湿因子 アトピー性皮膚炎 皮膚バリア 接触性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性接触皮膚炎は、外界から皮膚内に侵入した異物(抗原)を補足・記憶し、再び同じ抗原が皮膚内へ侵入した際、迅速に炎症を起こすことで抗原を取り除く反応である。皮膚内に侵入する抗原の多くは、毛包や汗腺といった皮膚付属器あるいは皮膚バリア損傷部位を経由すると考えられている。

最近、フィラグリン遺伝子変異を有し、バリア機能障害を自然発症する Flaky tail マウスにおいて(Fallon PG et al, Nat Genet. 2009)、ハプテン抗原であるジニトロフルオロベンゼン(DNFB)に対する接触皮膚炎を誘導した結果、野生型マウスに比べ、Flaky tail マウスでは、Th1型の免疫応答が有意に増強することが示された(Moniaga CS et al, Am J Pathol. 2010)。従って、フィラグリン低下に基づく皮膚バリア機能障害は、接触皮膚炎を促進させる。

一方、ヒト由来のフィラグリンモノマーを、過剰に発現するトランスジェニックマウスが作成されており、バリア破壊後の経皮水分蒸散量(TEWL)の回復率が、野生型マウスに比べ、有意に亢進することが示されている(Presland RB et al. J Invest Dermatol. 2004)。しかし、接触皮膚炎に関して、検討は行われていない。さらに、フィラグリンモノマーのアミノ酸配列の相同性は、マウスとヒトの間で比較すると、42%から60%と低いことから(Haydock PV et al. DNA Cell Biol. 1990)、ヒトのフィラグリンモノマーを、マウスで発現させた場合、その分子本来の機能が発揮できているか、あるいはNMFまでプロセスされているかは不明である。従って、機能的なモノマーあるいはNMF過剰マウスは、未だ存在しないと考えられる。

この学術的背景に基づき、申請者の研究グループでは、マウス由来のフィラグリンモノマーを過剰発現するマウスを、下図のベクターを作成し開発した。



2. 研究の目的

- (1) フィラグリン過剰発現マウスにおけるNMFを定量し、皮膚バリア機能に与える影響を検討する。
- (2) 同マウスにおいて、経皮抗原暴露を行うことで、NMFが皮膚への抗原侵入の際のバリアとしての役割を担っていることを示す。

3. 研究の方法

フィラグリンモノマー過剰発現マウスを使用して、NMFの産生が、野生型マウスに比べ、顕著に亢進していることをまず確認し、皮膚バリア機能に係る経表皮水分喪失量

(TEWL)、低分子量色素(Lucifer yellow)の角層透過性、角質水分量を測定する。またOVAやfluorescent isothiocyanate(FITC)などの抗原を経皮暴露した際、皮膚表皮に存在するLangerhans細胞の活性や所属リンパ節への遊走、抗原曝露時に免疫応答のTh2優位化を決定づける作用をもつ表皮内のthymic stromal lymphopoietin(TSLP)の発現、および所属リンパ節内のTh2サイトカインの発現を検討することで、NMFの作用を検討する(図4参照)。

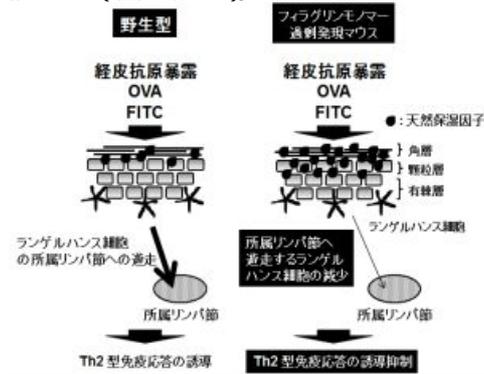


図2 作業仮説：NMFは、経皮抗原暴露によるTh2型免疫応答を抑制する

4. 研究成果

(1)我々はフィラグリンモノマーを表皮に過剰に発現するトランスジェニックマウス(FLG-TGマウス)を作成した(図3)。



図3 FLG-TGマウス 外見の明らかな表現型の違いを認めない

(2) FLG-TGマウスの電顕像とアミノ酸量測定FLG-TGマウスにおいて、外見の明らかな表現型の違いは認められないが下記の解析を行った。

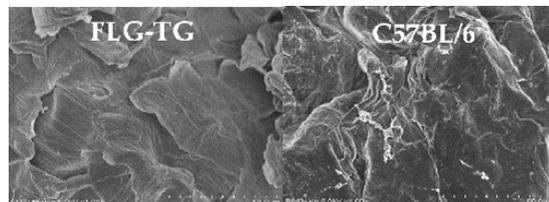


図4 透過型電顕像 FLG-TGマウスでは、滑らかな皮膚像を呈している

ヘテロ接合のFLG-TGマウスにおいて、フィラグリンの分解産物である天然保湿因子の量には明らかな違いを確認できなかった。

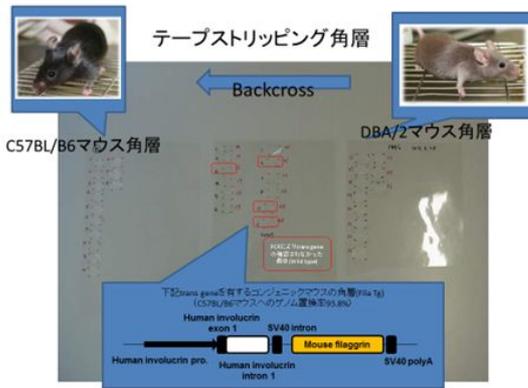


図5 アミノ酸定量は、NIH(ニンヒドリン)とOPA(オルトフタルアルデヒド)によるラベル化試薬を用いた

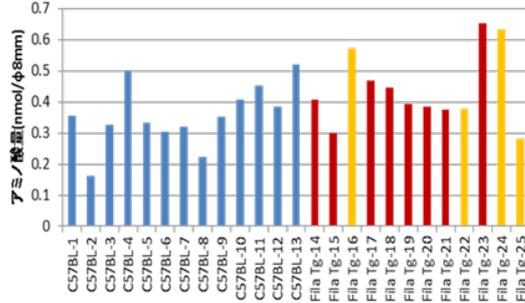


図6 単位角層中に含まれる水溶性アミノ酸量 (OPA)

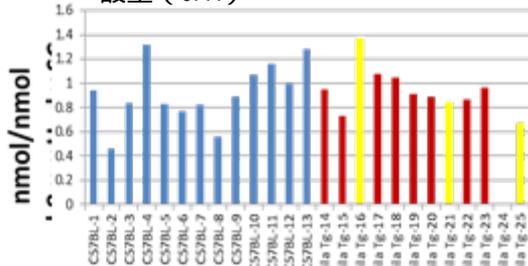


図7 単位角層中の各アミノ酸の総量 (NIH)

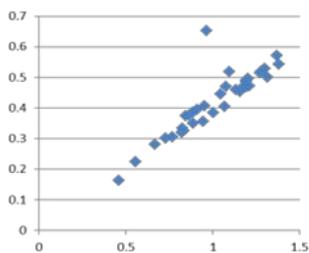


図8 蛍光分光計/OPA法により測定した水溶性アミノ酸量と高速アミノ酸分析計/NIH法により測定した水溶性アミノ酸量はほぼ一致

(3)ホモ接合 FLG-TG マウスの解析
ヘテロ接合の FLG-TG マウスにおいて、フィラグリンの分解産物である天然保湿因子の量には明らかな違いを確認できなかったため、ホモ接合マウスを作成し解析をすすめた。ホモ接合と思われる個体では、有意に経表皮水分喪失量 (TEWL) の低下を認めた。

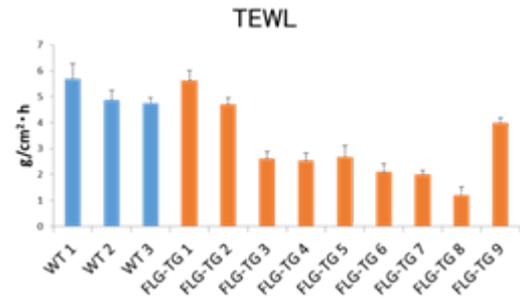


図9 経表皮水分喪失量 (Trans Epidermal Water Loss: TEWL) の測定。

さらに TEWL の低下した個体において、低分子量色素 (Lucifer yellow) の角層透過性が阻害されていた。

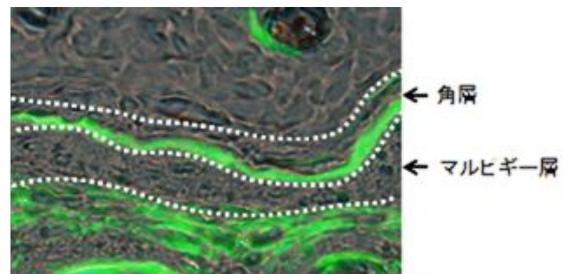


図10 Wild Type (littermate)における Lucifer yellow の透過性

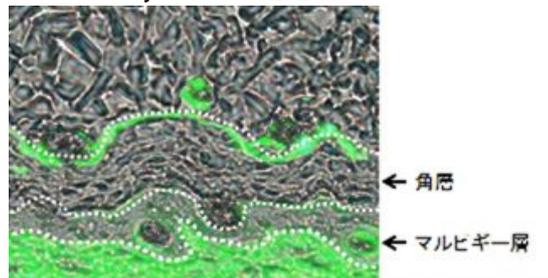


図11 FLG-TG マウスでは、Lucifer yellow の透過は阻害されている

したがって FLG-TG マウスでは皮膚バリア機能が亢進している可能性が示唆された。一方角質水分量は若干減弱していた(図12)。

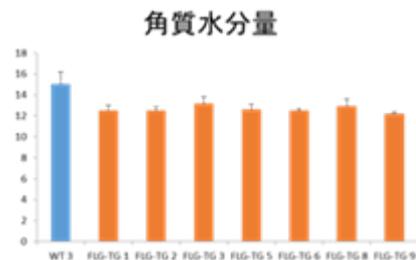


図12 角質水分量は、FLG-TG マウスにてやや減少傾向となっている (オレンジ)

しかしながら、ホモ接合 FLG-TG マウスにおいて NMF が過剰に産生されているかについては、フィラグリン分解に関与する bleomycin hydrolase などの酵素活性測定を含めた判断が必要である。

(4)今後の課題として、皮膚バリア機能の亢進が経皮的な免疫応答に与える影響を検討していく。

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 2 件)

Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. Jun-ichi Sakabe, Koji Kamiya, Hayato Yamaguchi, Shigeki Ikeya, Takahiro Suzuki, Masahiro Aoshima, Kazuki Tatsuno, Toshiharu Fujiyama, Masako Suzuki, Tsuyoshi Yatagai, Taisuke Ito, Toshiyuki Ojima, Yoshiki Tokura: J Allergy Clin Immunol. 2014; 134(4): 957-960. October <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.054>

Atopic dermatitis presenting as generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation. Shinsuke Nakazawa, Mutsumi Moriki, Shigeki Ikeya, Jun-ichi Sakabe, Yoshiki Tokura: J Dermatol. 2014; 41(3):230-1. doi:10.1111/1346-8138.12339
〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池谷 茂樹 (IKEYA, Shigeki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40436936

(2)研究分担者

戸倉 新樹 (TOKURA, Yoshiki)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：00172156

坂部 純一 (SAKABE, Jun-ichi)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：30631494

(3)連携研究者

(4) 研究協力者

高橋 慶人博士
株式会社力ネボウ化粧品・主任研究員

行 卓男博士
株式会社力ネボウ化粧品・研究員