



新規ダニ誘発性掻痒自然発症モデルマウスの病態解析

1. はじめに

アトピー性皮膚炎 (AD) は、アトピー素因とよばれる遺伝的アレルギー体質や様々な刺激 (感染, 環境因子など) などの外的因子により生じる炎症応答, 痒み (掻痒感) およびそれに対する掻破行動を主徴とする慢性皮膚疾患である (図1)。興味深いことに, ADで誘発された掻痒感, 患者に掻破行動を惹起し, そのことがさらに皮膚の損傷や炎症を誘発するという, いわゆる itch-scratch cycle を誘導する¹⁾。したがって, ADにおいて痒みを制御することは極めて重要である。一般に, ADの治療には, 原因除去などの生活改善が重要とされるが, 抗炎症を目的としたステロイドや, 痒みを標的とした抗ヒスタミン薬が処方され

る。しかし, 近年では, これらの薬剤に抵抗性を有する難治性のAD患者も急増し, 問題となっている²⁾。これは, 炎症やヒスタミンに依存しない多因子経路が, ADの掻痒感誘発に関与することを示唆しており, 病態モデルマウス等の詳細な解析によるAD発症機構の理解が重要であることを示す。

現在までに, AD病態を理解する上で有用なマウスモデルとして, 1) ovalubmin (OVA), ダニ抗原および trinitrochlorobenzene (TNBC) 等のハプテンなどの外因子により誘導するマウスモデル, 2) IL-4, IL-18やTSLPなどの炎症関連遺伝子トランスジェニックマウスモデル, 3) 自然発症マウスモデル (Nc/Nga, DS-Nhなど), が存在する³⁾。これらのモデルは, 共通の, または個々に異なる表現型を示し, それぞれ利点・欠点を有する。例えば, 1) においては, ほぼ100%の確立で再現性のよいモデルを作成でき, また, マウス種や外的因子の種類により表現型をコントロールし易いという利点を有するが, 基本的には急性モデルであることから慢性疾患との表現型のギャップが存在することがある。2) においては, 単一因子に起因する病態であることから, AD病態の包括的理解に困難を要する可能性が高い。一方, 3) は, 自然発症型であり, AD病態の経時的な理解に優れることから, 最もよく利用されるが, 原因遺伝子が正確に同定されていないことや発症効率の悪さなどの問題点が残る。なお, 1)-3) のモデルは, 炎症と掻痒感が同時に惹起される同時進行型モデルであり, 掻痒感に端を発するモデルではない。このような背景か

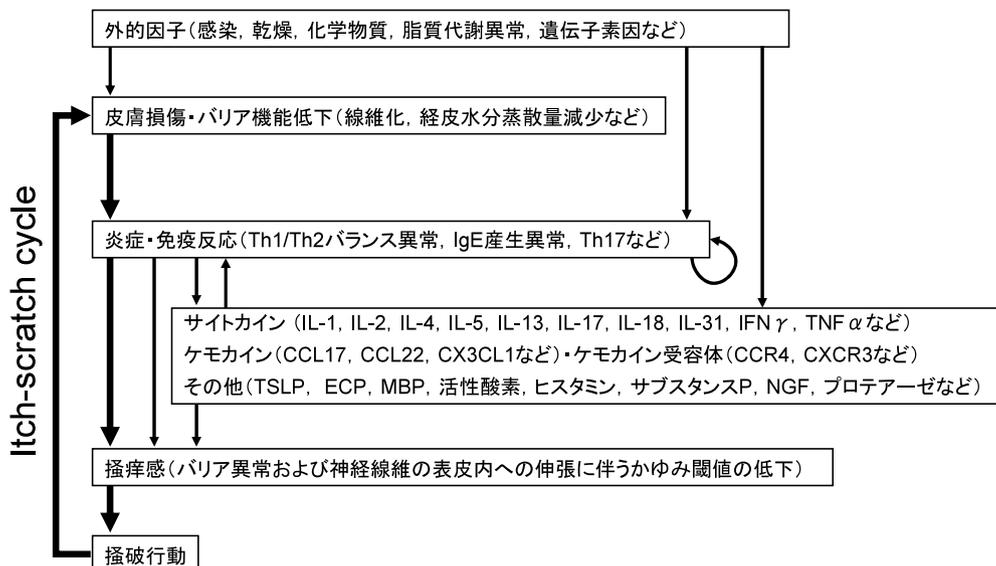


図1 Itch-scratch cycle 慢性皮膚疾患の発症機序

ら、本稿では、著者らが見いだした、ダニ感染性搔痒感から皮膚炎病態を誘発する新規モデルマウス (*Cftr*^{ΔF508/ΔF508}マウス) に関する知見について述べる。

2. CFTR と各種疾患

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は、cAMP 依存性の Cl⁻ イオンチャネルである⁴⁾。CFTR の機能が低下または欠損すると、CFTR によって調節される細胞内のさまざまな現象に異常を来し、特に難治性呼吸器疾患を伴う嚢胞性線維症 (cystic fibrosis : CF) を引き起こす。これは、主に気道上皮に存在する CFTR が欠損することで、結果として、気道におけるイオン環境が変化し、慢性的な炎症病態、粘液貯留および細菌感染が惹起されることによるものである。このとき、興味深いことは、CFTR が機能不全に陥ると、CFTR 発現細胞における遺伝子発現パターンが変化することであり、そのことが、CF 患者の免疫異常病態をさらに促進するという点である。実際に、著者らも、CF 患者に最も多い機能不全型変異 CFTR (ΔF508) 発現細胞において、細菌感染誘導性の炎症病態を増悪させる可能性のある *toll-like receptor-2* (*TLR2*) 遺伝子の発現が、エピジェネティックな機序により上昇することを見いだしている^{5,6)}。このように、CFTR は、細胞の表現型を炎症抑制的に制御する因子としての特色が強いことがわかる。

近年、CFTR が他の臓器 (消化管、膵臓、生殖腺、皮膚

など) にも発現し、それぞれ重要な役割を担うことが明らかとなってきた。例えば、膵臓における CFTR の機能低下は、膵臓細胞機能を低下させ、インスリン分泌不全を惹起し、糖尿病病態を形成する⁷⁾。また、消化管における CFTR の機能低下は、脂質の代謝不全を惹起し、消化障害や腸閉塞を引き起こす⁸⁾。一方、皮膚においては、汗腺に発現する CFTR が塩分濃度を調節することのみが明らかであった。一方、Sato らは、皮膚ケラチノサイトに CFTR が発現していることを同定したが、その生理的意義については不明である⁹⁾。

3. ダニ誘発性搔破行動および皮膚病態変化に対する CFTR 変異の影響¹⁰⁾

著者らは、皮膚における CFTR の役割を解明し、その皮膚炎病態発症における重要性を明らかにすることを目的とし、マウスに汗腺がないことに着眼して、AD 自然発症モデルマウスである Nc/Nga マウスを対照群として実験を行った。Nc/Nga マウスは、SPF 環境下での飼育では AD は発症しないが、conventional 環境下 (ダニ存在下) において、激しい搔破行動を引き起こす (表 1, 搔破行動数, Nc/Nga)¹¹⁾。なお、Nc/Nga マウスの conventional 環境下飼育による皮膚炎自然発症には、既発症動物との同居飼育によるダニの寄生が関与しており、本法は、安定かつ高頻度の症状発現が得られるという利点を有する実験系である¹²⁾。次に、著者らは、このダニ感作 (既発症動物との同

表 1 Nc/Nga マウスおよび *Cftr*^{ΔF508/ΔF508} マウスの各種皮膚炎パラメーターの週齢ごとの比較

同居開始からの週数	0	1	2	3	4	5	6	7	8
搔破行動数 ¹⁾									
<i>Cftr</i> ^{+/+}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{+/ΔF508}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{ΔF508/ΔF508}	-	-	-	+	++	+++	+++	++++	++++
Nc/Nga	-	-	-	+	+	+++	+++	++++	++++
血清 IgE ²⁾									
<i>Cftr</i> ^{+/+}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{+/ΔF508}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{ΔF508/ΔF508}	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Nc/Nga	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
経皮水分蒸散量 ³⁾									
<i>Cftr</i> ^{+/+}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{+/ΔF508}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cftr</i> ^{ΔF508/ΔF508}	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Nc/Nga	-	-	+	++	++	++	++	+++	++

1) 単位 (回/30分) (- : <40, + : <60, ++ : <80, +++ : <100, ++++ : <120)

2) 単位 (ng/mL) (- : <5,000, + : <10,000, ++ : <25,000, +++ : <30,000)

3) 単位 (g/h/m²) (- : <5, + : <10, ++ : <15, +++ : <25)

居飼育)による皮膚炎発症の実験系を用いて, CFTR 変異体発現マウス ($Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウス)において, AD 様症状を示すか否かを検討した. その結果, ダニ感作3週目から, 経時的に $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの搔破行動数が野生型マウス (+/+) と比較して顕著に増加した(表1, 搔破行動数, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$). さらに, H.E. 染色により, ダニ感作8週後の吻側背部の病理組織学的観察により, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスは, 野生型マウスと比較して顕著な表皮肥厚ならびに真皮層の線維化(線維芽細胞と膠原繊維の増生)を認めることを明らかにした.

次に, 著者らは, 表皮中知覚神経量を調べるため, マウスの皮膚組織(ダニ感作8週後の吻側背部皮膚)を, 知覚神経終末のマーカーである Protein Gene Product (PGP) 9.5 を用いて免疫組織化学染色を行った¹³⁾. その結果, Nc/Nga マウスおよび $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの皮膚において, 表皮中への知覚神経の伸長が有意に多かった. このとき, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおける神経成長因子 Nerve Growth Factor (NGF) の発現は, Nc/Nga マウスと同様に, 野生型マウスに比べ, 表皮中の NGF 陽性染色が顕著に認められた¹³⁾. 以上より, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの顕著な搔破行動は, NGF 過剰産生に伴う知覚神経 C 線維の表皮内への伸長により, 痒みに対する感受性が増加することに起因することが示唆された.

次に, 過剰に産生された NGF が $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの搔破行動誘発に関与しているか否かを明らかにするために, NGF の高親和性受容体である tropomyosin-related kinase A (TrkA) の阻害剤 K252a の頻回投与により, ダニ感作により誘発される搔破行動が抑制されるかを調べた¹⁴⁾. ダニ感

作開始日から, 各マウスの吻側背部(頸背部)に, 週に5回, K252a を経皮投与して, 搔破行動数を観察した. その結果, K252a 投与により, 有意な搔破行動抑制効果が見られた.

最後に, AD の免疫学的な特徴である血中の IgE 値の増加および皮膚のバリア機能について調べた. この時, 皮膚のバリア破壊の指標として経皮水分蒸散量 Transepidermal water loss (TEWL) を測定した. その結果, 過去の報告通り, Nc/Nga マウスの血中 IgE 値は, ダニ感作4週から野生型マウスに対し顕著に高く, また, TEWL もダニ感作開始2週間から上昇し始め, その後も経時的に上昇し, 野生型マウスと比較して顕著に増加した(表1, 血清 IgE・経皮水分蒸散量, Nc/Nga). 一方, 興味深いことに, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおける血中 IgE 値および TEWL は, ダニ感作6-8週で緩やかに増加し, Nc/Nga マウスの経時変化と比較すると, 大きな違いが認められた(表1, 血清 IgE・経皮水分蒸散量, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$).

4. Nc/Nga マウスと $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの皮膚炎病態の違い¹⁰⁾

これまでの多くの Nc/Nga に関する知見と, 著者らの $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスの知見を総合的に考えると, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおいて発症する皮膚炎病態のユニークさがわかる. 両マウスともに, ダニ感作後に搔痒感に伴う搔破行動が惹起される点で共通する(表1, 感作後5週以降). しかしながら, Nc/Nga マウスは, ダニ感作後, AD で認められる免疫・炎症反応の指標である IgE 値の上昇や皮膚バリアの指標である TEWL の上昇がすみやかに

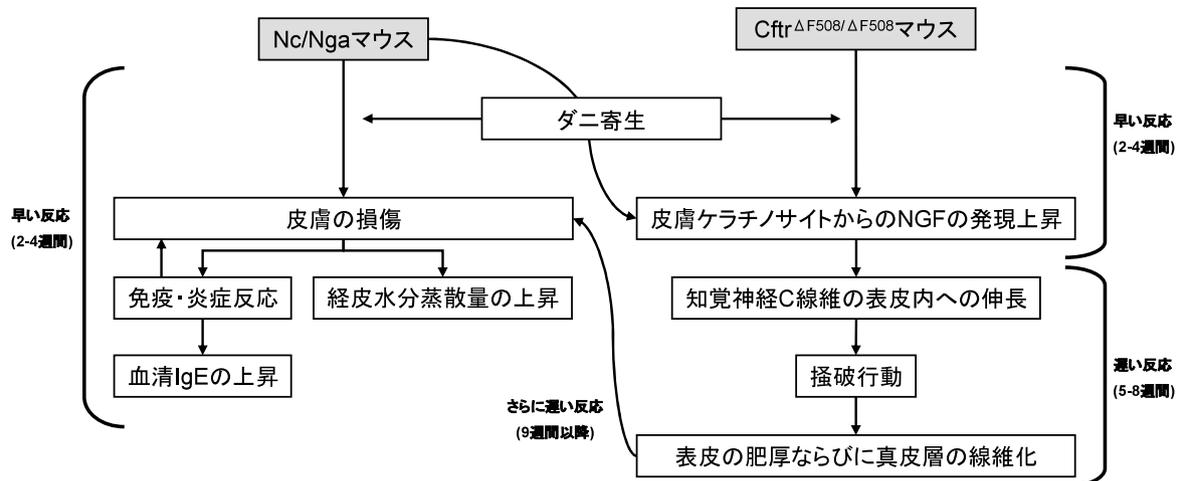


図2 Nc/Nga および $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおける皮膚炎病態発症機序の比較

認められるのに対し (表1, 感作後2-4週以降), 一方, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスでは, 同時期において全く発症しない (表1). このことは, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスにおける皮膚炎が, 既存の自然発症型モデルマウスと異なり, ダニ感染による搔痒感をきっかけに itch-scratch cycle から皮膚炎病態を誘発する新規モデルマウスである可能性を示唆している (図2). Nc/Nga と同様に自然発症型であることから, 入手の利便性や再現性に問題が残るが, $Cftr^{\Delta F508/\Delta F508}$ マウスは, ADの多様な症状の中で, 搔痒感誘発性皮膚炎症状を解析するための有用なモデルになるかもしれない.

5. おわりに

これまで, ADの病態形成において重要な役割を担う搔痒感の誘発においては, 図1に示すさまざまな因子 (ヒスタミン・プロテアーゼ・IL-1・TNF α ・ECP・MBP・活性酸素・サブスタンスP・NGFなど)が同定されてきたが¹⁵⁾, 著者らは, CFTRがこれらの上流の制御因子の一つである可能性を示した. 今後, どのようにCFTRがNGF発現を制御するのか, ヒト皮膚におけるCFTRがマウスと同様に搔痒感誘発に関わるのか, また, CFTR機能の活性化が, 病態の改善に貢献するかなど, 解決すべきことは多く残されている. 幸いにもCFTRを標的とする活性化剤や阻害剤は, 欧米で盛んに行われているCF治療研究から多く見いだされており, 入手が可能となってきた. 今後, これらのツールを用いた搔痒誘発性皮膚炎に対する研究展開により, 既存薬が功を奏しない難治性のAD患者に対する新規治療法が開発できる日もくるかもしれない.

謝辞

本研究の遂行において, 多大なる御助力を賜った甲斐広文教授を始め, 共同研究者の皆様へ厚くお礼を申し上げます.

- 1) Wahlgren, C.F. (1999) *J. Dermatol.*, **26**, 770-779.
- 2) Murota, H. & Katayama, I. (2011) *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **11**, 428-437.
- 3) Jin, H., He, R., Oyoshi, M., & Geha, R.S. (2009) *J. Invest. Dermatol.*, **129**, 31-40.
- 4) Ratjen, F. & Doring, G. (2003) *Lancet*, **361**, 681-689.
- 5) Shuto, T., Furuta, T., Oba, M., Xu, H., Li, J.D., Cheung, J., Gruenert, D.C., Uehara, A., Suico, M.A., Okiyoneda, T., & Kai, H. (2006) *FASEB J.*, **20**, 782-784.
- 6) Furuta, T., Shuto, T., Shimasaki, S., Ohira, Y., Suico, M.A., Gruenert, D.C., & Kai, H. (2008) *BMC Mol. Biol.*, **9**, 39.
- 7) Ntimbane, T., Comte, B., Mailhot, G., Berthiaume, Y., Poutout, V., Prentki, M., Rabasa-Lhoret, R., & Levy, E. (2009) *Clin.*

Biochem. Rev., **30**, 153-177.

- 8) Freedman, S.D., Blanco, P.G., Zaman, M.M., Shea, J.C., Ollero, M., Hopper, I.K., Weed, D.A., Gelrud, A., Regan, M.M., Laposata, M., Alvarez, J.G., & O'Sullivan, B.P. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **350**, 560-569.
- 9) Sato, F., Soos, G., Link, C., & Sato, K. (2002) *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 1224-1230.
- 10) Hashimoto, Y., Shuto, T., Mizunoe, S., Tomita, A., Koga, T., Sato, T., Takeya, M., Suico, M.A., Niibori, A., Sugahara, T., Shimasaki, S., Sugiyama, T., Scholte, B., & Kai, H. (2011) *Lab. Invest.*, **91**, 509-518.
- 11) Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G.P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P.W., & Ra, C. (1997) *Int. Immunol.*, **9**, 461-466.
- 12) Takano, N., Arai, I., & Kurachi, M. (2006) *Br. J. Dermatol.*, **154**, 426-430.
- 13) Horiuchi, Y., Bae, S., & Katayama, I. (2005) *J. Dermatol. Sci.*, **39**, 56-58.
- 14) Takano, N., Sakurai, T., Ohashi, Y., & Kurachi, M. (2007) *Br. J. Dermatol.*, **156**, 241-246.
- 15) 高森建二 (2009) 医学のあゆみ, **228**, 25-30.

首藤 剛

(熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学教育部)
遺伝子機能応用学分野)

The novel spontaneous mouse model of mite-induced itch symptoms
Tsuyoshi Shuto (Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan)

鋳型非依存的 RNA 合成酵素の特異性の分子基盤

細胞内の多くの mRNA は DNA から転写された後, その 3' 末端に, 鋳型 DNA 上にコードされていないポリ A 配列がポリ A 付加酵素と呼ばれる鋳型非依存的 RNA 合成酵素によって合成付加される. mRNA の 3' 末端に付加されたポリ A 配列は, その mRNA の安定性や翻訳促進などに関わっており, 遺伝子発現に重要な役割を果たしている¹⁾. また, 最近では鋳型非依存的に RNA の 3' 末端に余分なヌクレオチド配列を合成付加する鋳型非依存的 RNA 合成酵素群が RNA の積極的な分解による遺伝子発現制御に関与していることが報告されてきている²⁾.

大腸菌のような真正細菌ではポリ A 付加酵素によってその mRNA の 3' 末端にポリ A 配列が付加され, 細胞内では付加されたポリ A 配列は RNA 分解のシグナルとして働