慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	乾燥環境下におけるフィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患発症機序の解明
Sub Title	Clarification of the pathogenesis of atopic disease by using filaggrin deficient mice in dry environment
Author	川崎, 洋(Kawasaki, Hiroshi) 塩濱, 愛子(Shiohama, Aiko) 久保, 亮治(Kubo, Akiharu) 天谷, 雅行(Amagai, Masayuki)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	フィラグリン欠損マウスを乾燥環境下で飼育するというモデルを用いて, フィラグリン欠損角層の機能が乾燥環境の影響を受け増悪し, アトピー疾患の発症を導く機序を解明することを目指した。乾燥環境下では通常湿度環境下で飼育したマウスに比べバリア機能の低下と経皮免疫応答の亢進を認め, それはフィラグリン欠損マウスで顕著だった。野生型マウスとフィラグリン欠損マウスの皮膚のトランスクリプトーム解析では, 生後より低湿度環境下で飼育した場合に比べ, 通常湿度環境下で飼育した場合には発現変動遺伝子がほとんど検出されなかった。フィラグリンの機能異常は, 湿度環境因子と密接に関わり表現型の発現に影響する。 We aimed to clarify the pathogenesis that stratum corneum function of filaggrin deficient mice was exacerbated by the dry condition and lead to develop atopic disease, by using the filaggrin deficient mouse model grown in dry environment. Excessive barrier dysfunction and aberrant percutaneous sensitization were evident in the mice kept in dry condition, and these extents were more obvious in filaggrin deficient mice. Skin transcriptomic analysis of differentially expressed genes (DEG) between filaggrin deficient and wild-type mice revealed that very few genes were differentially expressed in normal humidity condition as compared with DEG in dry condition, suggesting that the impact of filaggrin deficiency was not significant in humid condition. Thus, we demonstrated that functional disorder due to filaggrin deficiency had an impact on phenotypic expression of the mice, closely associated with environmental factor of humidity.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26461702 研究分野 : 医歯薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26461702seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　８　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６１７０２

研究課題名（和文）乾燥環境下におけるフィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患発症機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of the pathogenesis of atopic disease by using filaggrin deficient mice in dry environment

研究代表者

川崎　洋（Kawasaki, Hiroshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：７０４４５３４４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：フィラグリン欠損マウスを乾燥環境下で飼育するというモデルを用いて、フィラグリン欠損角層の機能が乾燥環境の影響を受け増悪し、アトピー疾患の発症を導く機序を解明することを目指した。乾燥環境下では通常湿度環境下で飼育したマウスに比べバリア機能の低下と経皮免疫応答の亢進を認め、それはフィラグリン欠損マウスで顕著だった。野生型マウスとフィラグリン欠損マウスの皮膚のトランスクリプトーム解析では、生後より低湿度環境下で飼育した場合に比べ、通常湿度環境下で飼育した場合には発現変動遺伝子がほとんど検出されなかった。フィラグリンの機能異常は、湿度環境因子と密接に関わり表現型の発現に影響する。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the pathogenesis that stratum corneum function of filaggrin deficient mice was exacerbated by the dry condition and lead to develop atopic disease, by using the filaggrin deficient mouse model grown in dry environment. Excessive barrier dysfunction and aberrant percutaneous sensitization were evident in the mice kept in dry condition, and these extents were more obvious in filaggrin deficient mice. Skin transcriptomic analysis of differentially expressed genes (DEG) between filaggrin deficient and wild-type mice revealed that very few genes were differentially expressed in normal humidity condition as compared with DEG in dry condition, suggesting that the impact of filaggrin deficiency was not significant in humid condition. Thus, we demonstrated that functional disorder due to filaggrin deficiency had an impact on phenotypic expression of the mice, closely associated with environmental factor of humidity.

研究分野：　医歯薬学

キーワード：　皮膚バリア　アトピー性皮膚炎　フィラグリン

１．研究開始当初の背景

尋常性魚鱗癬の原因遺伝子であり、皮膚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、アトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることが報告された。その後フィラグリン遺伝子変異は、アトピー性皮膚炎を有する気管支喘息、アレルギー性鼻炎、食物アレルギー等のアレルギー疾患の発症にも関連することが疫学的に示された。

研究代表者等は、フィラグリン欠損マウスを作成し、フィラグリン欠損のアトピー性皮膚炎発症やアレルギー疾患発症への意義を検証している。そして、同マウスの解析から、フィラグリンは角層のバリア機能維持に重要であり、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示したが、フィラグリン欠損マウスを SPF 環境下で飼育しても、皮膚炎等を自然発症することはなく、フィラグリンの欠損からアトピー疾患発症に至る分子機序には、いまだ未解明の点が多い。

過去の *in vitro* の解析から、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。そして、アトピー性皮膚炎や尋常性魚鱗癬では、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。そこで研究代表者等は、フィラグリン欠損マウスを低湿度環境下で飼育したところ、通常環境下で飼育した際に比べ、フィラグリン欠損角層のバリア機能が乾燥環境下で著しく増悪することを見出した。

２．研究の目的

本研究では、乾燥環境がフィラグリン欠損角層の機能を破綻させる機序を解明するとともに、湿度環境がアトピー疾患の発症にどのような意義をもつのかを、フィラグリン欠損マウスを低湿度環境下で飼育するというモデルを用いて検証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飼育

研究代表者が所属する施設には、こま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%の低湿度に保つことが可能であることが確認されている。そして、マウスの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（低湿度環境）に保てることが確認されている。また、このアイソレータ内に加湿器を設置し運用することで、アイソレータ内の飼育環境を湿度 50-60%（通常湿度環境）に安定して保つことが可能であることが確認されている。本研究のマウス実験はこのアイソレータ内で実施された。

(2) 低湿度環境下で飼育したフィラグリン欠損マウスの経皮免疫応答の評価

生後より通常湿度環境下で飼育したマウス、低湿度環境下で飼育したマウス、塗布 10 日前から低湿度環境下で飼育したマウス、それぞれの野生型およびフィラグリン欠損成体マウスの耳翼に OVA 溶液を dibutyl phthalate と共に、隔日（3 回/週）で塗布した。6 回目の塗布終了時に、血中 OVA 特異的 IgG1 を ELISA 法により測定した。

(3) 湿度環境変化に伴う皮膚トランスクリプトーム解析

低湿度環境下でフィラグリン欠損角層機能が破綻する機序を理解するために、生後より通常湿度環境および低湿度環境下で飼育した野生型マウスとフィラグリン欠損マウスの皮膚（耳、背部、尾）を日齢 1, 7 の複数タイムポイントで採取し、トランスクリプトーム解析を RNA-seq 法により実施した。また、通常湿度環境および低湿度環境下で飼育した成体（6 週齢）の野生型マウスとフィラグリン欠損マウスの皮膚（耳）のトランスクリプトーム解析も行った。

４．研究成果

(1) 低湿度環境下でのマウス飼育

通常湿度環境下で飼育したフィラグリン欠損マウスは、日齢 4-5 をピークにドライスキン様の外観と落屑を認めるが、その後これらの表現型は減弱し、日齢 10 ではほぼ野生型マウスと同様の外観を呈する。一方、低湿度環境下で生後より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したマウスに比べドライスキン様の外観と落屑が顕著になる。しかしながら、この特徴的な外観は日齢 7-10 頃がピークであり、その後は表現型が減弱することがわかった（図 1）

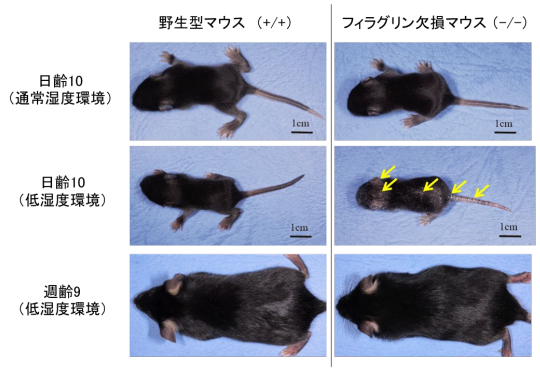


図1: 通常湿度（50～60%）環境と低湿度（<20%）環境下で飼育したマウスの表現型

低湿度環境下で飼育した日齢10のフィラグリン欠損マウス皮膚では、著しい落屑（矢印）が観察される。

(2) 低湿度環境下で飼育したフィラグリン欠損マウスの経皮免疫応答の評価

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（図 2）。野生型マウスとフィラグリン欠損マウス間の経皮免疫応答能に関しては、野生型マウスに比べフィラグリン欠損マウスで経皮免疫応答能が亢進している傾向が観察された。

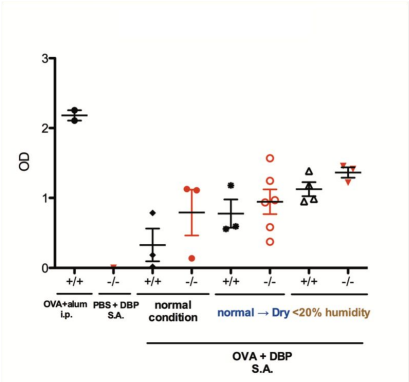


図2: OVA経皮的反復塗布後のマウスの血中OVA特異的IgG1評価

生後より通常湿度環境下(normal condition)で飼育したマウス、低湿度環境下(<20% humidity)で飼育したマウス、塗布10日前から低湿度環境下で飼育(normal→dry)したマウス、それぞれの野生型(+/+)およびフィラグリン欠損(-/-)成体マウスにOVA（卵白アルブミン）をdibutyl phthalate(DBP)とともに経皮的反復塗布した後の血中OVA特異的IgG1値をELISA法を用いて吸光度(OD)を測定することにより評価した。

(3) 湿度環境変化に伴う皮膚トランスクリプトーム解析

各組織、各タイムポイントに関してフィラグリン欠損マウス vs 野生型マウスで発現変動解析を行った。logFC の絶対値 >1、FDR < 0.05 の基準を両方満たすものを発現変動遺伝子（DEG）として定義した。通常湿度環境下で飼育したマウスの DEG は、day1 では認められるものの day7 ではほとんど認められなくなっていた。低湿度環境下で飼育したマウスの DEG は、成体マウスになると DEG の減少が観察された。

次に、低湿度環境下で飼育したマウスの DEG の overlap を観察すると、部位間では比較的 DEG の重複が確認された（図 3）。一方、低湿度環境下で飼育した day1 と day7 のマウスの DEG を比較すると、あまり overlap が起こっていないことが分かり、各時期で遺伝子発現が大きく変化していることが示唆された（図 3）。

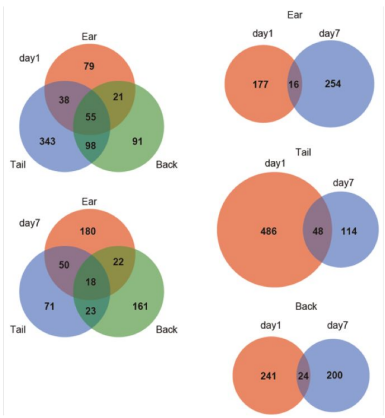


図3: 皮膚RNA-seq解析データを元にした、発現変動遺伝子解析結果のまとめ

日齢1, 日齢7の低湿度環境下で飼育したマウス皮膚（ear, back, tail）のRNA-seq解析データを元に、フィラグリン欠損マウス vs 野生型マウスで発現変動解析 を行った。左側は部位間でoverlapする発現変動遺伝子数を示し、右側は日齢間でoverlapする発現変動遺伝子数を示す。

本研究とこれまでの研究代表者等の観察から、フィラグリン欠損マウスのドライスキン様の外観や落屑という表現型は通常湿度 SPF 環境下で飼育した場合は日齢 4 頃をピークに症状が減弱し、日齢 10 の時点ではほぼ消失することが明らかになっている。一方、生後より乾燥環境下で飼育した場合には、これらの表現型が通常湿度環境下で飼育したマウスに比べ顕著であるものの、日齢 7-10 頃から徐々に減弱することがわかった。

フィラグリン欠損皮膚からアトピー疾患を発症する病態を理解するために、成体マウスへの経皮的抗原塗布による全身性感作モデルを確立することを目指した。使用抗原や塗布方法など、いくつかの系を試みたが、いずれも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傾向が観察された。また、フィラグリン欠損マウスでは野生型マウスに比べ乾燥環境下で経皮免疫応答が亢進しやすい傾向が観察された。しかし、想像したよりもフィラグリン欠損成体マウスへの経皮免疫応答に対する乾燥環境の影響は大きくなかった。

私たちは、以上の機序を詳細に理解するため、生後より通常湿度環境および低湿度環境下で飼育した野生型マウスとフィラグリン欠損マウスの皮膚のトランスクリプトーム解析を実施した。フィラグリン欠損マウス、野生型マウス間の発現変動解析を実施したところ、通常湿度環境下で飼育したマウスの DEG は、日齢 1 では認められるものの日齢 7 ではほとんど認められなくなっていた。低湿度環境下では日齢 7 でも DEG が認められることを考慮すると、フィラグリンの機能的意義は湿気のある環境よりも乾燥環境でより重要となることが示唆された。また、低湿度環境下で飼育したマウスであっても成体マウスになると DEG の減少が観察された。これらの知見は、本研究図 1 で示したように湿度環境の違いにより臨床外観の違いが生じることの解釈や皮膚症状の計時変化および経皮免疫応答能評価の結果を考える際に重要と考える。さらに、低湿度環境下で飼育した day1 と day7 のマウスの DEG の比較から、出生後の各時期で遺伝子発現が大きく変化していることが示唆された。皮膚は常に外界に曝される臓器であるため、皮膚バリアは複数の分子により相補的に機能が維持されたり、複数の代償機構が存在したりすることが報告されている。現在、発現変動する遺伝子リストやパスウェイ解析などをもとに、観察所見とそれをもたらす機序をつなぐ推論を構築し、この複雑な分子相互作用や病態を明らかにすべく研究を続けている。

本研究から、フィラグリンの機能異常が環境因子と密接に相互作用することによって表現型の決定につながること、そしてそれに関わる表皮内バリア関連遺伝子ネットワー

クの存在が示唆された。今後はフィラグリンの機能異常を起点としたアトピー疾患の発症・増悪に関係する分子機構の解明とそれを元にした治療標的になりうる分子・因子の検討を進めていく。

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　0　件）

〔学会発表〕（計　2　件）
①H. Kawasaki, A. Kubo, K. Nagao, T. Hirano, T. Yamada and M. Amagai: Filaggrin-null Mice as a Tool for Understanding the Complex Pathogenic Mechanisms of Atopic disease. The 5th NIF Winter School on Advanced Immunology, 2016. Jan 20, Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫)

②川崎 洋, 久保 亮治, 平野 尚茂, 山田 健人, 天谷 雅行: フィラグリン欠損マウスの角層バリア機能破綻に対する乾燥環境因子の関与. 第 42 回臨床免疫学会総会 workshop2「粘膜免疫と皮膚免疫」, (東京). 2014 年. 9 月 25 日. 京王プラザホテル (東京)

〔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〕
ホームページ等

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・共同研究員
研究者番号：70445344

(2)研究分担者
塩濱　愛子（SHIOHAMA Aiko）
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号： 40383731

久保　亮治（KUBO Akiharu）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号： 70335256

天谷　雅行（AMAGAI Masayuki）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号： 90212563