

遺伝子改変マウスを用いた ヒスタミンの接触性皮膚炎に与える影響の研究

東北大学大学院工学研究科応用量子医工学

大津 浩

Since its discovery in 1910, histamine has been regarded as one of the most important biogenic amines in medical and biological field. Histamine regulate smooth muscle contraction, immune response, vascular permeability, neurotransmission, and stimulation of gastric acid secretion. Histamine is synthesized from histidine through oxidative decarboxylation by histidine decarboxylase (HDC; EC 4.1.1.22), a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme. We generated histidine decarboxylase gene-knockout (HDC^{-/-}) mice and previously revealed that scratching behavior was exclusively induced in HDC^{+/+} mice whereas it was barely observed in HDC^{-/-} mice. Histological examination revealed that both HDC^{+/+} and HDC^{-/-} mice displayed similar extent of inflammatory cell infiltration, hyperplastic epidermis and newly spreading of neuronal processes in the skin tissue. Since several metal are ingredient of cosmetic material we started to consider that metal allergy is important for the cosmetics. The first step for the metal allergy is elution of metal ion into the skin. Therefore it is important to establish the measuring system of trace ionized metal in the skin. In this study we assessed metal allergy in mice using nickel wire implantation in their back skin and revealed that the amount of nickel ion in the tissue seems to be paralleled with the extent of inflammation. The amount of ionized metal in the skin tissue was measured using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and the surface of the metal wire was analyzed with X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy/energy dispersed X-ray analysis (SEM-EDX) method. To assess the extent of allergic reaction we generated HDC-promoter (1.1Kb) plus ZsGreen gene transgenic mice. It was shown that peritoneal macrophages in these mice were positively glittered under the fluorescent microscopy but we found that other cells which do not express HDC gene also glittered non-specifically. In this regards, we started to generate BAC based reporter mice to attain the accurate reflection of HDC expression in mice.

1. 緒言

化粧品学において、皮膚の炎症は重要な問題点である。私たちは、先にヒスタミンを欠くヒストジジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスを作製し (Ohtsu, Tanaka et al. 2001), 皮膚の炎症反応におけるヒスタミンの役割について研究を続けている。例えば、皮下に木綿糸を植え込んだ慢性炎症モデルでは、ヒスタミンによって肉芽腫が形成され、血管新生にヒスタミンが必須であり、マクロファージ由来のヒスタミンによって VEGF が誘導され、それによって血管新生が誘導されることを明らかにした (Ghosh, Hirasawa et al. 2002)。また、皮膚に創傷を作製し、ヒスタミンの影響を見る実験系において、ヒスタミンの存在は創傷治癒過程に重要であり、ヒスタミンが存在しないと創傷の治癒過程に遅れることが判明している。この過程でも血管新生が重要であるものの、この血管新生においては bFGF の作用がヒスタミンによってコントロールされ、創傷の治癒を促していることを明らかにしている (Numata, Terui et al. 2006)。また、ハプテンを繰り返して背部皮膚

に塗布して誘導した接触性皮膚炎のモデルにおいて、2週目から4週目に表皮肥厚を起こすがノックアウトマウスや H1 拮抗剤によってその程度が抑制され、ヒスタミンは痒みの発症に不可欠であり、痒みのシグナルは脊髄後角を伝達していくことを明らかにしている (Seike, Ikeda et al. 2005; Seike, Takata et al. 2005)。また H1 受容体拮抗剤を使った実験から、少なくとも H1 受容体を介する経路はこの接触性皮膚炎の発病に重要であることを報告している (Hamada, Seike et al. 2006)。このようにヒスタミンはマウス皮膚において、慢性炎症、皮膚創傷治癒、接触性皮膚炎など多岐に渡り重要な影響を与え化粧品学的に重要であると考えられる。

そこで、本研究においてヒスタミンの合成を触媒するヒストジジン脱炭酸酵素遺伝子のプロモーター領域に蛍光色素のレポーター遺伝子を繋いだトランスジェニックマウスを作製し、上述した皮膚疾患モデルのどの細胞にどのような時期にヒスタミン産生の遺伝子の発現が起きるのかについての検討を進めようと考えた。

また、装飾品などの含まれているニッケル、コバルトなどを考えてみると美容と金属アレルギーの関連は非常に重要な課題である。実際に金属によって起きるアレルギー性接触性皮膚炎 (ACD) は多くの皮膚反応が起き、この病態は皮膚や全身性に化粧品や、タトゥー、洗剤、装飾品、ピアス、皮のなめし、人工関節、歯科インプラントなどに暴露されることによって引き起こされる。ニッケルによって ACD が起きることはよく知られているが、その他にア



The effect of histamine on contact dermatitis using gene manipulated mice

Hiroshi Ohtsu

Applied Quantum Medical Engineering,
Tohoku University School of Engineering

ルミニウム, ベリリウム, クロミウム, コバルト, 銅, 金, イリジウム, 水銀, パラジウム, 白金, ロジウム, チタンが皮膚過敏を起こすことが知られている。このことにアプローチするため, 生体内に溶け出す金属イオンの測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果, 予後の判定などに大いに役立つ。そこで工学的な機器開発の現状と問題点に関して検討した。

2. 実験

2.1 マウスの金属ワイヤーの植え込み実験

4種類のマウス C57Bl/6, BALB/c, C3H/He, DBA/2 マウスの背部皮下に 13G の implant needle を用いて麻酔下で金属ワイヤーを打ち込む。金属ワイヤーは Ni, Co, Fe, Al で直径 0.8 mm であり, 長さは 5 mm とする。植え込み後 8 時間, 24 時間, 3 日後にマウスを処理して, 組織学的な観察や血管透過性について検討する。また, RT-PCR 法にて HDC や COX-2 の発現を検討する。

2.2 ICP-AES 法による組織内金属イオンの測定

ICP-AES 法 (誘導結合プラズマ発光分光法) は, 三重管の石英トーチを用い, その中にアルゴンガスを通して, 最外周管にはアルゴンガスをプラズマを形成するべく通す。またこのガスはトーチの冷却も兼ねる。また中間の管のアルゴンガスは補助ガスと呼ばれ, プラズマを上方に浮かせてトーチの中央と中間の管が溶けるのを防ぐ役割をする。トーチの外側上部に巻いた誘導コイルに高周波電流を流すと, 高周波がトーチ内のガス中に誘導されてプラズマを発生するようになっている。中心管からアルゴンキャリアーガスとともに試料溶液を霧状にして送ると, プラズマ中を通る間に試料は原子化, 一部はイオン化されて, さらに励起される。励起状態となった原子から放電によって発光スペクトルが得られて, スペクトルを分析することによって, 各元素のスペクトル線の波長が各元素固有のものであることを利用して元素の存在を確認するとともに, スペクトル線の強度を測定することによって, 試料中の定量成分元素の濃度を計算する。

2.3 XRD (X-ray diffraction) 法による Ni プレートの表面の性状分析

Ni ワイヤーを埋め込み, その表面を観察すると, 植え込み後数日経過すると黒ずんでくることが観察され, 実験当初表面が酸化するものと考えた。そこで, X 線回折法を用いて, 表面性状について検討した。Ni ワイヤーでは X 線回折法によつての観察が困難であるため, Ni のプレートを代わりに植え込み, 黒ずんだ部分と光っている部分を解析した。X 線回折分析法は, X 線が物質に当たって散乱されたとき, その波長は入射 X 線と同じ場合と長波長に

変化する場合とがある。入射 X 線と同じ場合を Rayleigh 散乱と呼び, 互いに干渉しあって回折 (diffraction) 現象を生じる。結晶面の格子間隔を d , X 線の入射角を θ とすると, X 線が回折を起こす条件は, $n\lambda=2d \sin\theta$ で表わされる。ここで n は任意の整数で回折の次数を表す。この式は Bragg の式と呼ばれる。この解析によって, 元素の化合状態の分析が可能となる。従って, この分析法を用いてプレートの表面の酸化状態の解析を行った。

2.4 走査型電子顕微鏡 Scanning electron microscopy/energy dispersed X-ray analysis (SEM-EDX) による金属プレート表面の解析

金属を植え込んだ実験系ではマウスの生体反応を起こした Ni wire のみが黒く変色していた。走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分光法を用いて Ni wire および Ni plate の表面の組成について分析した。走査型電子顕微鏡は電子を標本の表面に当て, 散乱および放出してくる電子を検出器でとらえて, 微細な表面の変化を観測できるため, 生体内で影響を受けた後の金属プレートの変化を観察できる。

2.5 レポーターマウスの作製

ヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine decarboxylase: HDC) はヒスチジンからヒスタミンを合成する生体内で唯一の酵素である。私たちはこの遺伝子をクローン化後, この遺伝子における転写調節機構について研究してきた。その後, 遺伝子ノックアウトマウスを作製し, ヒスタミン関与の種々の病態を明らかにしている (Ohtsu, Tanaka et al. 2001)。その中で接触性皮膚炎についての実験ではヒスタミンの有無に関わらず, 病理像は大きな変化はないものの, 痒みの対してはヒスタミンの役割が大きいことを明らかにしている (Seike, Ikeda et al. 2005)。その後, ヒスタミンの産生細胞を判断できるように, HDC 遺伝子プロモーターに蛍光色素遺伝子をプラスミッド上で繋ぎ, トランスジェニックマウスを作製した。当初 HDC 遺伝子のプロモーター 1.0kb に市販されているうちで最強の蛍光色素遺伝子と言われている pZsGreen1.1 を繋いだプラスミッドよりトランスジェニックマウスを作製したが, 思ったほど蛍光発光が強くないこと, 非特異的な発光がみえることから現在は bacterial artificial chromosome (BAC) を用いたトランスジェニックマウスを作製中である。

2.6 レポーターフィッシュの作製

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合, 色素細胞の自家発光と重なってしまい, 特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。そのため, 赤色の蛍光である mCherry という遺伝子を HDC promoter に繋いだプラス

ミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した。このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの、躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、フィッシュにおいては考えられる negative enhancer 部位を除いたレポーターフィッシュの作製を目指しており、それで期待される結果が得られない場合はマウス同様にBACを用いたトランスジェニックフィッシュを用意する予定である。

3. 結果

3. 1 溶出金属イオンの測定法の開発

マウスの背部皮下に種々の金属を植え込み炎症反応を惹起させると、ニッケルに特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきる。植え込んだニッケルの周辺組織におけるニッケル濃度を Newport Green を用いた蛍光法および ICP-AES 法で測定した (図 1)。両方法の結果を比較するために、横軸に蛍光法縦軸に ICP-AES 法の測定値をとり、Ni 濃度の測定結果を比較した。その結果両方法は良く相関し、ともに正確な測定法であると考えられた。また、Newport Green による測定では特異性がなかったニッケルと亜鉛を ICP-AES 法では分離して測定できることがわかった。測定の感度はほぼ同程度であった。また、Ni ion の周囲組織内への溶出経過の結果と、周囲組織における血漿成分の溶出反応をエバンスブルーという色素を用いて測定した結果を比較してみた (図 2)。Ni イオンは Ni wire を植え込んでから 8 時間で溶出を開始し、その時間経過はエバンスブルーによる血漿漏出反応の時間経過とよく一致していた。この結果、Ni ion が組織に溶け出すことが、血漿成分の血管外漏出にとって必要なことであろうと推察される。

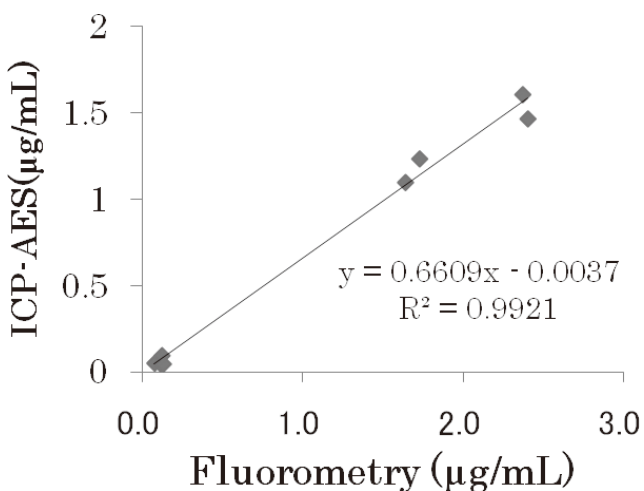


図1 Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の皮膚からのサンプル中における Ni ion の濃度

ICP-AES 法と New Port Green を使った蛍光法を用いた時の検出値の比較

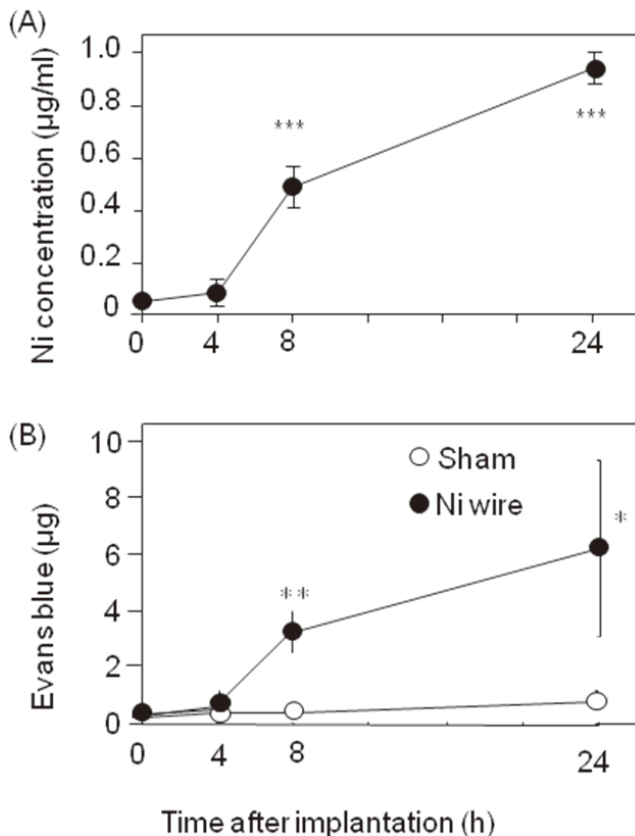


図2 Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の Ni イオンの濃度とエバンスブルーの組織内濃度

植え込み後の周囲組織内における Ni の濃度の経時変化 (A) と組織内への血漿成分の漏出反応をエバンスブルーを静脈内注射して測定した結果 (B)

3. 2 金属表面の分析

SEM-EDX (Scanning electron microscopy /energy dispersed X-ray analysis) による解析

走査型電子顕微鏡で、マウスの背部に植え込んだあとの Ni プレートを観察すると、黒く変色している部分(a)と金属本来の部分(b)が同時に存在していた (図 3)。変色のあった部分(a)を EDX 法にて分析すると、Ni のピークを検出した他に C、N、O、Cl、Na、P、S、K などの元素のピークも検出し、Ni プレートに生体内成分が付着あるいは浸潤していることがわかった。その中ではとくに C 元素のピークが高く、炭素元素が多量にプレートに付着あるいは浸潤していることがわかった。プレートは測定前に念入りに洗浄しているため、これらの生体内成分は恐らく金属表面よりやや内側に浸潤していつているものと考えられるが、今後はさらに別の実験系を組みその点を明らかにする必要もあるのかも知れない。

XRD (X-ray diffraction) 法による解析

マウスに Ni ワ이어やプレートを植え込み、X 線回折法にて Ni の化合状態の分析をおこなった (図 4)。その結

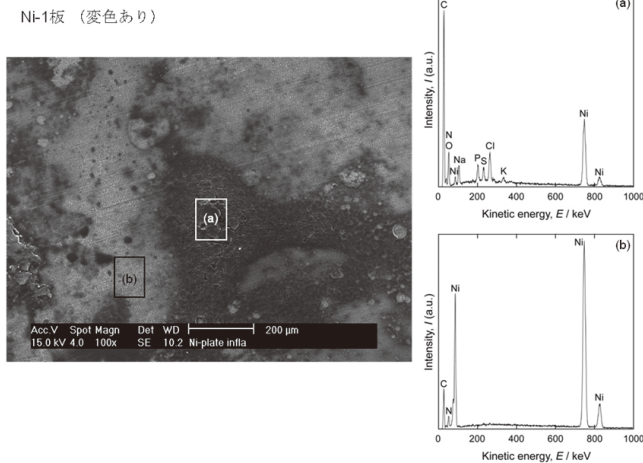


図3 Ni板のSEM-EDXによる解析

Niプレートについて、黒くなった部分(a)と金属光沢を残している部分(b)の表面性状をSEM-EDX法にて解析した。

XRD (α -2 θ)

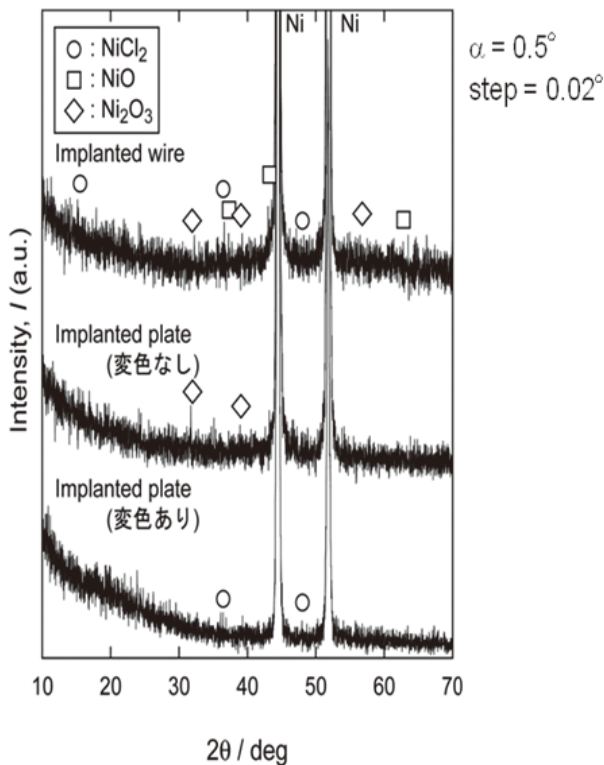


図4 Ni板のXRDによる解析

上段から、植え込み前のNiプレート的一部分、植え込んだもののNiプレートに変色を認めなかった部分、変色を認めた部分、それぞれのXRD解析を示している。

果、NiワイヤーにおいてNiのピーク以外に高いピークが認められない(上段)ことから、Niの酸化物などの化合物は少ないことがわかった。またNiプレートを植え込んだ後で、黒く変色していた部分(下段)も、金属の光沢のあった部分(中絶)と同様にNiの酸化物などの化合物の

量は少なく、植え込み前のプレートとしての性状と変化がなかった。従って黒く変色した金属プレートは酸化による変化ではないことが判明した。

3.3 レポーター動物の作製について
トランスジェニックマウス

HDC promoter+ZsGreen1.1マウスは肥満細胞が発光するものの、その発光強度は弱く、非特異的な部位における発光も見られるため、金属アレルギー反応において使用に耐えうるものであるかどうかには疑問がある。おそらく、使用したpromoter部分が1kbと短いため発現の特異性を担うのに十分な領域を持たず、発現特異性に問題のあるトランスジェニックマウスができた可能性が高い。そこで、実験のアプローチの方法を変えて、現在はHDC遺伝子を含むBACを入手して、プロモーター直後にGFP遺伝子を挿入してHDC遺伝子近傍100kbのDNAを丸ごとつけたトランスジェニックマウスを作製するべく実験を開始した。これによって、本来HDC遺伝子をもつ近傍の情報を十分に含んだDNAを導入できるため、本来の遺伝子の発現パターンを表すレポーターマウスが作製できると考えている。

トランスジェニックフィッシュ

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合、色素細胞の自家発光と重なってしまい、特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。このため、赤色の蛍光であるmCherry遺伝子をHDC promoterに繋いだプラスミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した。このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの、躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、コンストラクト内にNegative Enhancerがある可能性を考えて、全長300bp程度の短いプロモーターによってコントロールされるレポーター遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュを作製中である。

4. 考察

4.1 溶出金属イオンの測定法の開発

Ni wireを使った系では、今まで行われているNewport Greenを用いた蛍光色素を用いた解析でもNiの量を定量可能であると思われる。今回、生体内のしばしば用いられるステンレス鋼であるSUS316を植え込んだ周囲にNiの溶出が測定され、臨床的には問題がないと考えられているステンレス鋼からもNiの溶出があることが明らかになった。このことは、臨床的に問題となってくるNiの溶出には閾値があるか、あるいは、臨床的には問題にならない程度でも組織において反応している可能性があると考えられる。したがって、動物体内でのニッケルの溶出を正確に評

価する必要性が確認された。

今後、生体にしばしば用いられる金属を対象に、感度のより高い測定法を見つけ、どのような金属がイオン化しにくいかについて検討を進めていきたいと考えている。

4. 2 HDC promoter-reporter 動物の作製

作成したマウスにおいては、ZsGreen1.1の発光の特異性に問題があり、プロモーター内にすべての制御領域がはいっているかどうか問題がある。

今後、マウスではBACを用いたレポーターマウスの作成を、フィッシュにおいては考えられるnegative enhancer 部位を除いたレポーターフィッシュの作製を目指す。

5. 総括

Niの金属アレルギーに対して、組織内でNiイオンの量を測定することが可能になっている。また、金属表面の性状変化についても、2種類の方法で解析できる。

HDC promoterによるレポーター動物の作製は非特異的な発光を示していたため、方法を変えて再度作製を開始している。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団および共同研究者に深く感謝いたします。また、本研究をすい行するにあたり東北大学大学院薬学研究科平澤典保教授、東北大学工学研究科成島尚之教授およびヘルシンキ大学ペルティ・パヌラ教授にじん大なる支えんをいただいた事を報告し、深く御礼申し上げます。

(文献)

- 1) Ghosh, A. K., N. Hirasawa, H. Ohtsu, T. Watanabe and K. Ohuchi. (2002). "Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell-deficient mice." *J Exp Med* **195**(8): 973-82.
- 2) Hamada, R., M. Seike, R. Kamijima, M. Ikeda, H. Kodama, H. Ohtsu (2006). "Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine." *Eur J Pharmacol* **547**(1-3): 45-51.
- 3) Numata, Y., T. Terui, R. Okuyama, N. Hirasawa, Y. Sugiura, I. Miyoshi, T. Watanabe, A. Kuramasu, H. Tagami, and H. Ohtsu (2006). "The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor." *J Invest Dermatol* **126**(6): 1403-9.
- 4) Ohtsu, H., S. Tanaka, T. Terui, Y. Hori, Y. Makabe-Kobayashi G. Pejler, E. Tchougounova, L. Hellman, M. Gertsenstein, N. Hirasawa, E. Sakurai, E. Buzás, P. Kovács, G. Csaba, Á. Kittel, M. Okada, M. Hara, L. Mar, K. Numayama-Tsuruta, S. Ishigaki-Suzuki, K. Ohuchi, A. Ichikawa, A. Falus, T. Watanabe and A. Nagy (2001). "Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells." *FEBS Lett* **502**(1-2): 53-6.
- 5) Seike, M., M. Ikeda, H. Kodama, T. Terui, and H. Ohtsu. (2005). "Inhibition of scratching behaviour caused by contact dermatitis in histidine decarboxylase gene knockout mice." *Exp Dermatol* **14**(3): 169-75.
- 6) Seike, M., T. Takata, M. Ikeda, H. Kodama, T. Terui and H. Ohtsu. (2005). "Histamine helps development of eczematous lesions in experimental contact dermatitis in mice." *Arch Dermatol Res* **297**(2): 68-74.