

フィラグリン遺伝子欠損ラットを用いたアレルギーマーチの解明

京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座

大塚 篤司

Allergy March (atopic march) means a series of allergic diseases induced by one allergic disease. In recent years, atopic dermatitis has attracted attention as a first step of allergy march. From the mouse model or human genetic analysis, the mechanism of allergy march is gradually being elucidated. In allergy march, percutaneous sensitization is regarded as important for the induction of other allergic diseases, and among them, there is a high possibility that the mutation of the filaggrin gene responsible for the skin barrier function is triggered. The application of zinc-finger nucleases (ZFNs) as a gene-targeting technology has been successful in rats, which is faster and more efficient than embryonic stem cell-mediated knockout technology. Herein, we report the generation and characterization of Flg knockout (Flg KO) rats. FLG KO rats showed an increase in transepidermal water loss. we found that OVA-induced asthma exacerbated using atopic dermatitis-induced FLG KO rat compared to that of wild type rat. It is expected that new allergy march therapy development focusing on filaggrin expression control will be developed in the future.

1. 緒言

フィラグリンは皮膚バリア機能を担う重要なタンパクである。アトピー性皮膚炎 (AD) の約 20-30% の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められるだけでなく、アトピー性皮膚炎の患者のほぼ全てでフィラグリンタンパクの発現が低下している。このことから、アトピー性皮膚炎発症とフィラグリンタンパクの関係は世界中で大きな注目を集めている。我々はこのフィラグリンの発現を亢進する新規化合物を発見し、この化合物を投与したモデルマウスではアトピー性皮膚炎が改善することを世界で初めて報告した¹⁾。

アトピー性皮膚炎、特にフィラグリン遺伝子の変異がアレルギーマーチの誘因に関与する可能性が海外で提唱されている。エアロアレルゲンの経皮感作マウスでは全身の Th2 免疫応答が誘導され、アレルギー性鼻炎が誘導されやすくなるとの報告がある²⁾。さらに、経皮感作によって誘導されたアトピー性皮膚炎モデルマウスでは、経気管支によるアレルギー反応が誘導されやすくなる³⁾。

ヒトでは、重症 AD 患者の 70% がその後喘息及びアレルギー性鼻炎を併発する⁴⁾。フィラグリン遺伝子変異を持つ AD 患者はフィラグリン遺伝子に変異を持たない AD 患者比で喘息に罹患する可能性が高い⁵⁾。また、フィラグリン遺伝子に変異を持つ喘息患者ほど治療が難治するとの報告もある⁶⁾。さらに、フィラグリン遺伝子変異は食物ア

レルギー発症のリスクを高め、10 歳でオッズ比が 2.86、18 歳ではオッズ比が 4.25 にのぼる⁷⁾。ピーナッツアレルギーのリスクがフィラグリン遺伝子の変異に依存するとの報告もある⁸⁾。アレルギーマーチのメカニズムを説明する上で抗原の交差性も指摘されている。ピーナッツのアレルゲンはスギ花粉などのエアロアレルゲンとの交差性を認める⁹⁾。このようにアトピー性皮膚炎、特にフィラグリン遺伝子の変異とアレルギーマーチの関連を示唆する多くの傍証はあるものの、そのメカニズムに関しての詳細は不明である。

そこで本研究申請課題では、申請者らが作成した新規モデル動物であるフィラグリン遺伝子欠損ラットを用いて、フィラグリン遺伝子異常から始まる喘息発症のメカニズムを解析し、アレルギーマーチ全貌の解明につなげることを目的とする。

2. 方法

2.1. フィラグリンラットの作成

近年、遺伝子ターゲティング技術としてのジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) が開発され、胚性幹細胞によるノックアウト技術よりも速く効率的な遺伝子改変モデルの作成が可能となっている¹⁰⁾。ラットフィラグリン遺伝子の第 2 エキソンを、従来の ZFN 試薬を用いて標的化した。確認された ZFN mRNA を受精した F344/Stm 卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠 CrIj: WI 雌ラット (偽妊娠里親) の卵管に移した。8 匹の新生動物をスクリーニングすると、4 匹 (50%) が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLG タンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である 7bp ~ 2622bp の欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。



Mechanism of atopic march using filaggrin knockout rat

Atsushi Otsuka

Department of Dermatology, Kyoto University

2. 2. 喘息モデルの作成

アトピー性皮膚炎モデルは、OVA アルブミンタンパクを経皮的に感作し続ける OVA-ODT モデルが一般的に広く用いられている。毛剃りしたマウスの背部に OVA タンパクを数日間貼付け密封し、それを 2 週間以上繰り返すことで、OVA 特異的 IgE がマウス内で上昇し、OVA タンパクを貼付けた部位には皮膚炎が誘導され、組織学的にはアトピー性皮膚炎に近いことが知られている。そこでまず、FLG KO ラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルの構築を行う。皮膚における炎症の評価、全身性 Th2 反応の変化を観察する。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行う。密閉した箱内でラットを飼育し OVA タンパクを生食に溶解させネブライザーで噴霧させる。この惹起を 2 回ほど行い、気道内浸潤細胞の評価、肺気道上皮の組織学的解析、また Th2 サイトカインの発現の変化を観察する。皮膚局所での炎症浸潤細胞とサイトカインの発現変化、また肺気道上皮でのそれら変化を比較し、アレルギーマーチの誘導に重要な標的物質の同定を試みる。

3. 結果

3. 1. フィラグリン遺伝子変異 (FLG KO) ラットの解析

Flaky tail マウスとは、フィラグリン遺伝子に変異 (5303delA) を有するマウスであり、申請者が所属する研究室において Flaky tail マウスがダニ抗原を用いた接触皮膚

炎反応を亢進することを報告している¹¹⁾。しかしながら、Flaky tail マウスはフィラグリン遺伝子のみならず matted 遺伝子の変異を認めるため、フィラグリン遺伝子と皮膚の表現系の関連性は直接的に証明されていなかった。2012 年 Kawasaki らによってフィラグリン遺伝子欠損マウスが作製され、皮膚に特徴的な所見は認めないことが報告された¹²⁾。我々はこのマウスと人のフィラグリン遺伝子変異による表現系の違いが表皮の厚さによるものではないかと考え、マウスに比べ表皮の厚いラットを用いてフィラグリン遺伝子欠損動物を作成した。フィラグリン遺伝子欠損 (FLG KO) ラットを作成にあたり、Zink finger protein を用いた。ラットフィラグリン遺伝子の第 2 エキソンを、従来の ZFN 試薬を用いて標的化した。確認された ZFN mRNA を受精した F344/Stm 卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠 Crlj:WI 雌ラット (偽妊娠里親) の卵管に移した。8 匹の新生動物をスクリーニングすると、4 匹 (50%) が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLG タンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である 7bp ~ 2622bp の欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。

このラットは、尾部に絞扼輪を伴い臨床所見を有する (図 1 A)。遺伝子改変ラット (KO) では尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコピーにて表皮が変化していることがわかった。また、ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色では、KO ラットのフィラグリン発現が完全に消失して

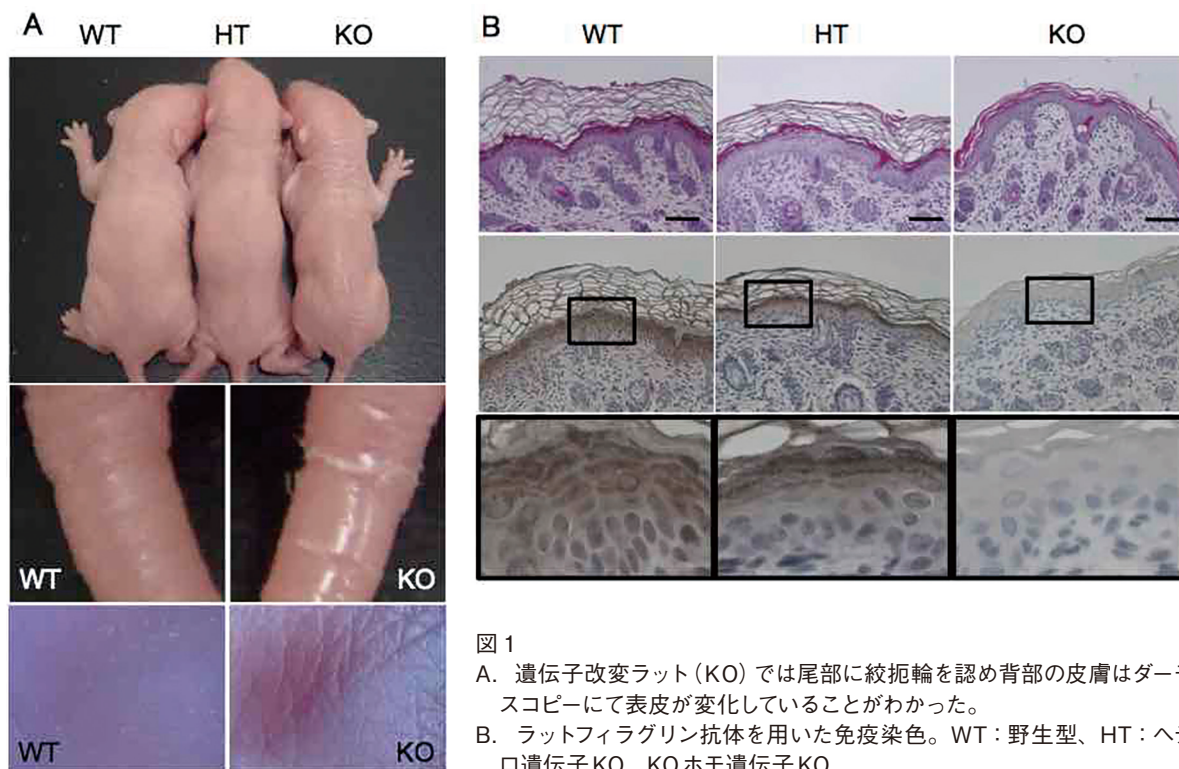


図 1
A. 遺伝子改変ラット (KO) では尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコピーにて表皮が変化していることがわかった。
B. ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色。WT: 野生型、HT: ヘテロ遺伝子 KO、KO ホモ遺伝子 KO

いることを確認した(図1B)。このラットを用いて皮膚バリア機能の基礎的な解析を行った。経皮水分喪失量と皮膚コンダクタンスは、FLG KOラットで明らかに減弱していることが明らかとなった。また、共焦点ラマン分光装置を用いて角質層における天然保湿因子の含有量の評価を行ったところ、水分保持量がFLG KOラットで優位に減弱していることを見出した。

3. 2. フィラグリン遺伝子変異 (FLG KO) ラットの解析

FLG KOラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルを構築した。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行った。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は、野生型ラットに比べてFLG KOラットで優位に上昇していた。さらに細胞分画を比較したところ、好酸球がFLG KOラットで優位に上昇していることを見出した(図2A, B)。

4. 考 察

今回、我々はFLG KOラットの作成に成功した。フィラグリン遺伝子欠損(FLG KO)ラットを作成にあたり、Zink finger proteinを用いた。ラットフィラグリン遺伝子の第2エクソンを、従来のZFN試薬を用いて標的化した。確

認されたZFN mRNAを受精したF344/Stm卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠Crlj:WI雌ラット(偽妊娠里親)の卵管に移した。8匹の新生動物をスクリーニングすると、4匹(50%)が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLGタンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である7bp~2622bpの欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。このFLG KOラットでは、尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコピーにて表皮が変化していることがわかった。また、ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色では、KOラットのフィラグリン発現が完全に消失していることを確認した。さらに、水分保持量がFLG KOラットで優位に減弱していることを見出した。FLG KOラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルを構築した。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行った。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は、野生型ラットに比べてFLG KOラットで優位に上昇していた。さらに細胞分画を比較したところ、好酸球がFLG KOラットで優位に上昇していることを見出した。以上より、FLG KOラットでは、アトピー性皮膚炎誘導に伴い、喘息の増悪がみられることが明らかとなった。

ヒトの体全体を覆う皮膚は、面積が1.6m²、重量は体重

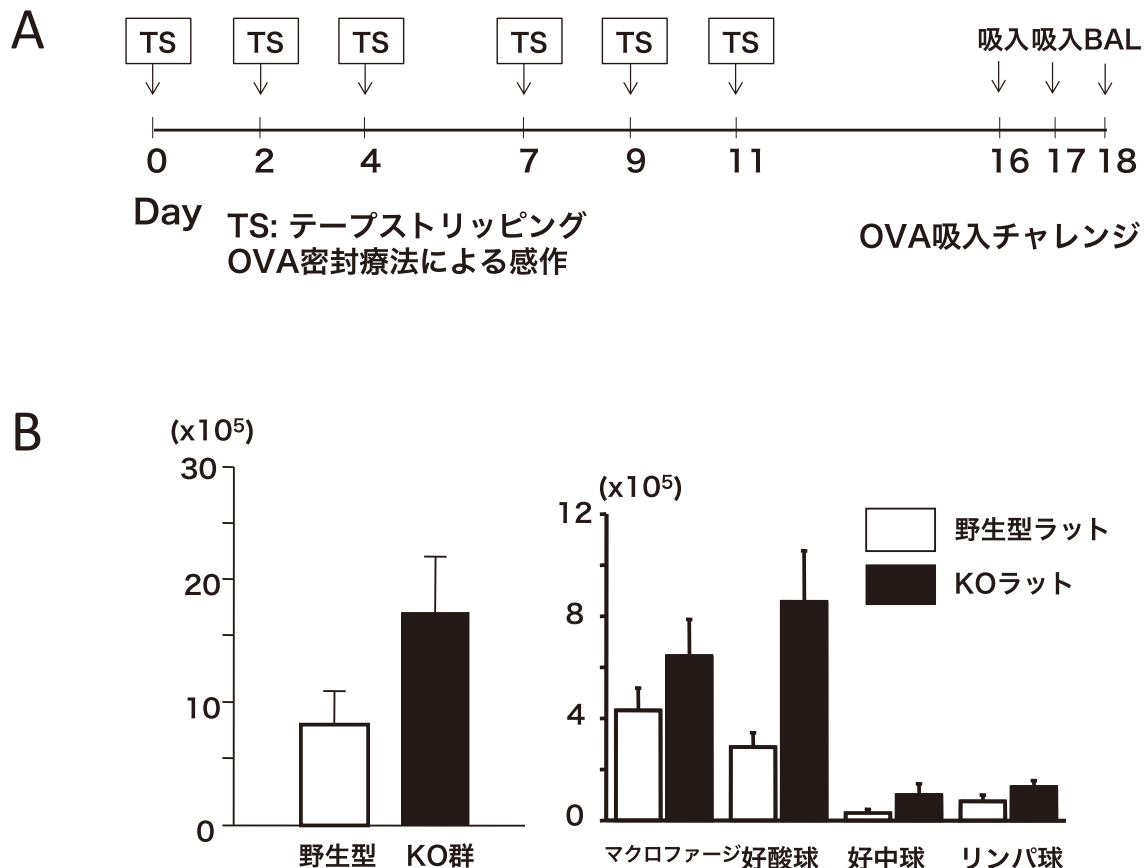


図2

の16%を占める人体最大の臓器である。皮膚は外界との接触がある臓器であるため生命を維持するための様々な機能を有している。主な機能として、水分の喪失や透過を防ぐ、体温を調整する、微生物や物理化学的な刺激から生体を守る、感覚器としての役割を果たす、などがある。皮膚は外層から表皮、真皮、皮下組織の3層の構造を有する。表皮は角化細胞で構成され、外層から角層、顆粒層、有棘層、基底層の4つに分類される。基底層にある基底細胞は皮膚外層に向かい分裂しそれぞれの層を構成することとなる。最終的に核が脱落し角層になるまで約45日のターンオーバー時間がかかるといわれている。

皮膚の最外層である角層では、細胞は脱核し死んだ角化細胞は落ち葉を敷き詰めたように重層化する。約10層からなる角層は表面から順に垢としてはがれ落ちる。フィラグリンはその角層の主要な構成成分の一つである。その働きは強度や柔軟性、水分保持、皮膚のPH、生体内化合物へのバッファー作用など多岐にわたる。フィラグリン遺伝子は角化細胞の他の最終分化に関連するタンパクと同様にクロモソーム1q21に存在する。フィラグリンはプロフィラグリンとしてまず産生される。プロフィラグリンは分子量約400KDa、10-12のフィラグリンリピート構造を有する。角化細胞の最終分化に伴いプロフィラグリンは脱リン酸化し、様々なプロテアーゼの作用により37KDaのフィラグリンへと分解される。この脱リン酸化とプロテアーゼによる分解はカルシウム濃度、セリンプロテアーゼCAP1/Prss8、そしてプロテアーゼ阻害剤(LEKTI)によって制御されていることが報告されている¹³⁻¹⁶⁾。モノマーになったフィラグリンはケラチンフィラメント同士を凝集させる線維間凝集物質として働く。この間フィラグリンは角層での強度や柔軟性に大きく貢献する。フィラグリンがない状態では角層細胞ははがれやすく、経皮的な内と外との浸透性が上昇する。このことからフィラグリンがない状態では経皮水分喪失量(transepidermal water loss, TEWL)が上昇する¹⁷⁾。角層の外層部ではフィラグリンは更に分解し、アミノ酸、ウロカニン酸などの天然保湿因子(NMF)になる(図1)。NMFは角層における水分保持量を担保し、PHを維持しバッファー効果を有する。このことで表皮細胞の正常分化を促し、病原性細菌の集落形成を減少させる¹⁸⁾。

本研究は、我々の研究室で作成した世界初のFLG KOラットを用いてアレルギーマーチメカニズムの解明を目指した。今後喘息モデルのみならず他のアレルギーモデルを適応することでアレルギー疾患に広くアプローチができるものと考えられる。アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患は今後更に増加することが予想される。現在解析しているフィラグリン遺伝子異常から始まるバリア機能の破綻とアレルギーマーチの誘導メカニズムは、皮膚の健康がアレルギーの予防という新しいコンセプトを提供可能であ

り、今後のコスメトロジーに大きな影響を与えるものと考えられる。

我々は、本研究にてFLG KOラットの作成に成功した。我々はこれまで、FLGの発現をコントロールする化合物の同定に成功し報告した¹⁾。具体的には、培養表皮細胞を用いて約1,200種類の市販の化合物ライブラリーからフィラグリンの発現を亢進する化合物のスクリーニングを行った。この結果、JTC801という化合物が培養表皮細胞のフィラグリン(プロフィラグリン)の発現を亢進させた。また、JTC801は、ヒトの皮膚に近い構造を持つ3次元表皮培養においても、フィラグリンの発現を亢進させた。ヒトアトピー性皮膚炎患者ではフィラグリン遺伝子のヘテロ変異がほとんどである。そこでフィラグリン遺伝子にヘテロ変異を有するマウスにJTC801を投与させたところ、フィラグリンの発現が亢進した。また、JTC801を投与したマウスでは経皮水分喪失量の低下が見られた。さらに、アトピー性皮膚炎モデルであるNC/Ngaマウスを用いた実験では、JTC801を内服させたマウス群でフィラグリンタンパクの発現が亢進し、アトピー性皮膚炎様の症状が改善された。以上より、皮膚でのフィラグリンの発現を上昇させ、バリア機能を亢進させることにより、アトピー性皮膚炎の発症を抑制させる可能性があることが示唆された。しかしながら、JTC801を用いたヒトを対象とした臨床治験を行うには安全性試験など多くの課題が残されている。また、マウスの皮膚はヒトとは違い、表皮が薄いことが知られている。そのため、新規化合物や薬剤のヒトでの有効性が検討可能なモデル動物の開発が必要である。本研究で開発した、FLG KOラットは、ヒトの皮膚に近いラットにてアトピー性皮膚炎のモデル動物を作成できたことに大きな意義がある。

今回、我々は世界初のFLG KOラットの作成に成功した。また、このKOラットを用いたアトピー性皮膚炎モデルでは、喘息が増悪することが明らかとなった。今後、このモデル動物を用いてアレルギーマーチの解明のみならず、新規薬剤の検討が可能となるだろう。

(引用文献)

- 1) Otsuka, A., *et al.* Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 139-146 e131-110 (2014).
- 2) Akei, H.S., *et al.* Epicutaneous aeroallergen exposure induces systemic TH2 immunity that predisposes to allergic nasal responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 62-69 (2006).
- 3) Spergel, J.M., *et al.* Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis

- and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 1614–1622 (1998).
- 4) Zheng, T., Yu, J., Oh, M.H. & Zhu, Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, asthma & immunology research* **3**, 67–73 (2011).
 - 5) Henderson, J., *et al.* The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 872–877 e879 (2008).
 - 6) Palmer, C.N., *et al.* Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 64–68 (2007).
 - 7) Venkataraman, D., *et al.* Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014).
 - 8) Asai, Y., *et al.* Filaggrin gene mutation associations with peanut allergy persist despite variations in peanut allergy diagnostic criteria or asthma status. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 239–242 (2013).
 - 9) Niggemann, B., Schmitz, R. & Schlaud, M. The high prevalence of peanut sensitization in childhood is due to cross-reactivity to pollen. *Allergy* **66**, 980–981 (2011).
 - 10) Mashimo, T., *et al.* Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* **5**, e8870 (2010).
 - 11) Moniaga, C.S., *et al.* Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am. J. Pathol.* **176**, 2385–2393 (2010).
 - 12) Kawasaki, H., *et al.* Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1538–1546 e1536 (2012).
 - 13) O'Regan, G.M., Sandilands, A., McLean, W.H. & Irvine, A.D. Filaggrin in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 689–693 (2008).
 - 14) O'Regan, G.M. & Irvine, A.D. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 965–972 (2010).
 - 15) Irvine, A.D. Fleshing out filaggrin phenotypes. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 504–507 (2007).
 - 16) List, K., *et al.* Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J. Cell Biol.* **163**, 901–910 (2003).
 - 17) Elias, P.M. & Schmutz, M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**, 437–446 (2009).
 - 18) Irvine, A.D. & McLean, W.H. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1200–1202 (2006).