Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-02-03

DS-Nhマウスにおけるアトピー性皮膚炎の原因遺伝子探索と病態解析に関する研究

浅川, 誠

(Degree)
博士（理学）

(Date of Degree)
2009-09-25

(Date of Publication)
2013-01-22

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲4780

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004780

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博　士　論　文

DS-*Nh* マウスにおけるアトピー性皮膚炎の原因遺伝子探索と病態解析に関する研究

平成２１年７月

神戸大学大学院自然科学研究科

浅　川　　誠

目次

略語一覧 **3**

概要 **4**

序論 **7**

1. アトピー性皮膚炎について 7
2. アトピー性皮膚炎モデル動物について 8
3. 本論文の構成について 9
4. TRPV3 遺伝子について 9

第一章　ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の同定と、トランスジェニックマウス作成による原因遺伝子の特定 **11**

材料と方法 11

1. 動物 11
2. DS-*Nh* マウスのポジショナルクローニング 11
3. トランスジェニックマウスの作製 15

結果 16

1. DS-*Nh* マウスのポジショナルクローニング 16
2. トランスジェニックマウスの作製と解析 19

図表 21

考察 29

1. ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の同定 29
2. TRPV3^{Gly573Ser} 発現トランスジェニックマウス作成による原因遺伝子の特定 29

第二章　TRPV3^{GLY573SER} 変異によりおこる皮膚炎の解析 **32**

材料と方法 32

1. TRPV3 変異による皮膚の変化 32
2. トランスジェニックマウスの解析 32

結果 35

1. WBN/Kob-*Ht* ラットにおける皮膚炎の性状 35
2. TRPV3 変異による皮膚の変化 36

3. トランスジェニックマウスの解析 38
図表 41
考察 52
1. TRPV3^{Gly573Ser} 変異の生理機能への影響 52
2. WBN/Kob-*Ht* ラットと DS-*Nh* マウスの皮膚炎の類似性について 53
3. C57BL 遺伝背景下での TRPV3^{Gly573Ser} の影響について 54
4. 無毛、皮膚炎形質のメカニズムについて 55

まとめ 59

文献 61

謝辞 70

略語一覧

2-APB: 2- アミノメトキシジフェニルホウ酸 ; 2-Aminoethoxydiphenyl borate

AD: アトピー性皮膚炎； atopic dermatitis

BAC: 細菌人工染色体； bacterial artificial chromosme

BC2: バッククロス第二世代； back cross second generation

BSA: 牛血清アルブミン； bovine serum albumin

CD: 白血球分化抗原； cluster of differentiation

cM: センチモルガン； centimorgan

F1: 雑種第一世代； the first filial generation

FCS: 牛胎児血清； fetal calf serum

IFN: インターフェロン； interferon

Ig: 免疫グロブリン； immunoglobulin

IL: インターロイキン； interleukin

MCP: 単球走化性蛋白質； monocyte chemotactic protein

NGF: 神経成長因子； nerve growth factor

PBS: リン酸緩衝食塩水； phosphate buffered saline

PCR: ポリメラーゼ連鎖反応； polymerase chain reaction

PGP9.5: 神経特異的蛋白質の一種；protein gene product 9.5

RANTES: CC ケモカインの一種； regulated on activation, normal, T cell expressed and secreted

SA: スーパー抗原； superantigen

SE: ブドウ球菌腸毒素； staphylococcal enterotoxin

SPF: 特定病原微生物を持たない状態； specific pathogen free

SSCP: 一本鎖構造多型； single-stranded conformation polymorphism

TRP: TRP 型カチイオンチャネル； transient receptor potential

YAC: 酵母人工染色体 yeast artificial chromosome

概要

アトピー性皮膚炎 (AD) は、増悪と寛解を繰り返す掻痒のある皮膚炎であり、患者の多くはアトピー要因を持つ遺伝的疾患である。日本の小児では 10% 以上の罹患率であり、治療に対する満足度も低い。そのため、新規メカニズムを持つ有効な治療薬の開発が待たれている。

疾患に対する治療薬の研究開発には、ヒトの疾患を実験動物において再現するモデル動物が有効なツールである。DS-*Nh* マウスは、筆者の所属研究グループにより単離、同定された無毛でコンベンショナル環境下でヒト AD 様皮膚炎を自然発症するマウスである。その表現型の遺伝様式は常染色体優性遺伝であり、原因遺伝子は第 11 番染色体上にマッピングされている。(Watanabe *et al.*, 2003a; Watanabe *et al.*, 2003b; Yoshioka *et al.*, 2003)

本研究はこれまでの研究成果を受けて、DS-*Nh* マウスにおける AD 様皮膚炎発症のメカニズムを解析し、AD 治療薬の新たな分子ターゲットを見いだすことを目的として行われた。

本研究ではまず、DS-*Nh* マウスの無毛・皮膚炎表現型の原因遺伝子の同定を、ポジショナルクローニングの手法により行った。11 番染色体にマッピングされていた *Nh* 領域をさらに詳細なマッピングを行い、1,000 kb の領域にまで特定し、その領域のゲノム塩基配列を DS、DS-*Nh* マウス間で比較したところ、TRPV3 上の 1 塩基置換を見いだした。TRPV3 は 33 度以上の温度で活性化される温度感受性の陽イオンチャネルであり、皮膚ケラチノサイトに発現している(Peier *et al.*, 2002b)。1,000 匹以上の個体について調べたところ、無毛と皮膚炎の表現型は分離できなかったことから、TRPV3 の変異は無毛・皮膚炎両方の表現型に関与していると考えられた。

一方、DS-*Nh* マウスと同様に無毛、皮膚炎自然発症の表現型を持つ WBN/Kob-*Ht* ラットが報告されている。このラットの原因遺伝子は 10 番染色体上にマッピングされており、その領域はマウス 11 番染色体の *Nh* 領域と重なるため、WBN/Kob-*Ht* ラットの TRPV3 遺伝子配列を調べたところ、DS-*Nh* マウスと全く同じ位置に塩基置換が存在した。また、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎は、マスト細胞の浸潤、IgE の増加など DS-*Nh* マウスの皮膚炎を類似の症状であることを見いだした。

次に、同定された TPRV3 の変異が無毛・皮膚炎形質を引き起こすことを直接的に証明するため、変異 TRPV3 を発現するトランスジェニックマウスの作成を試みた。プロモーター領域には TRPV3 上流のプロモーター活性を持つ DNA 断片を用いた。得られたトランスジェニックマウスのうち、1 系統のみで変異 TRPV3 の発現が見られた。このトランスジェニックマウスにおいて、TRPV3 は皮膚と精巣に発現

していた。

トランスジェニックマウスは、完全な無毛ではないが部分的に無毛な体毛異常が見られた。さらに、DS-*Nh* マウスが皮膚炎を発症しない SPF 環境下においても皮膚炎を自然発症した。血清学的解析により、トランスジェニックマウスの皮膚炎が DS-*Nh* マウスに見られるものと類似のものであることを示した。

この結果により、TRPV3 の変異が無毛・皮膚炎形質の原因であると結論した。

次に、原因遺伝子である TRPV3 が皮膚ケラチノサイトに主に発現しているため、DS-*Nh* マウスの皮膚組織についての解析を行った。DS-*Nh* マウスの皮膚では、マスト細胞数の増加の他、ヒスタミン、NGF 濃度上昇や、神経細胞数の上昇、毛包数の増加と不規則な配列が見られた。また、DS-*Nh* マウス由来のケラチノサイトでは、DS マウスのそれに比べて温度刺激に敏感にカルシウム取り込みが見られた。このことは、変異 TRPV3 は、温度刺激に対してより活性化しやすいことを示している。

皮膚の環境温度は出生前後で劇的に変化する。すなわち出生前の胎内では 37 度以上、出生後は室温付近に下がる。このとき野生型の TRPV3 は活性化されていない定常状態であるが、変異型は活性化され続けることが考えられる。出生前後の皮膚組織を調べたところ、野生型の DS マウスでは出生後、皮膚マスト細胞数の減少が起こるのに対して、DS-*Nh* マウスでは起こらなかった。このことは、出生前後の TRPV3 の活性の変化が皮膚のマスト細胞数の変化に影響を与えることを示唆する。

以上の解析は DS マウスの遺伝的バックグラウンドで行ったものであるが、TRPV3 変異の影響が、他の遺伝的バックグラウンドにも及ぶかどうか調べるために、アレルギー反応に耐性を持つ Th1 優位なマウスとして知られている C57BL マウスに *Nh* 変異を導入した。C57BL-*Nh* マウスは無毛であるり、コンベンショナル環境下においても皮膚炎を発症しなかったが、スクラッチ行動が増加し、かゆみを感じていることが示唆された。この結果は、TRPV3 変異による皮膚炎発症は、遺伝的バックグラウンドに影響を受けること、また皮膚炎発症はかゆみの誘発によることを示唆するものであった。

以上の結果より、DS-*Nh* マウスにおいて、TRPV3 の変異が無毛・皮膚炎形質を引き起こすことが明らかになった。

本研究の結果より、TRPV3 の変異による皮膚炎発症のメカニズムは、以下のようであると推測される。すなわち、

(1) 変異により、TRPV3 の温度感受性が変化し、常に活性化された状態になる。

(2) 活性化された TRPV3 により、マスト細胞数の増加、ヒスタミン濃度増加が起きる。

(3) その結果として、NGF の濃度上昇が起こる。

(4) NGF により、神経細胞が増加する。

(5)　神経細胞の増加により、かゆみ刺激に対して敏感になり、スクラッチ行動が増加する。
(6)　スクラッチ行動により、皮膚炎が発生する。
(7)　*S.aureusu* により、皮膚炎が悪化する。

ヒトにおいて TRPV3 の遺伝的多型と AD の関連に関する報告はないが、本研究の結果は野生型においても TRPV3 の活性を適切に調節することで、AD の発症、増悪を防げることを示唆するものである。

よって、本研究の結論として、TRPV3 を新たな AD 治療薬のターゲットとして提唱する。

序論

1. アトピー性皮膚炎について

アトピー性皮膚炎 (AD) は、慢性に反復性に生じる掻痒と湿疹を伴う皮膚炎である。かゆみと皮膚病変から、生活の質に重要な影響を与える他、各種皮膚感染症や網膜剥離、白内障などの重篤な合併症を併発することもある (Furue *et al.*, 2008)。

特に小児においては有症者が多く、日本においては乳児から小学 6 年生まで、ほぼすべての世代で有症者率が 10% を超えている。

AD 治療の基本は、① 発症・悪化因子の検索と対策、② スキンケア(異常な皮膚機能の補正)、③ 薬物療法の 3 点からなる (Furue *et al.*, 2008)。

薬物療法では、ステロイド外用剤、タクロリムス軟膏、保湿剤、抗ヒスタミン剤・抗アレルギー剤の 4 つが基本となっている。ステロイド外用剤は、ステロイドホルモン受容体活性化剤である。即効的な抗炎症作用、抗アレルギー作用、免疫抑制作用からなる抗炎症作用により、50 年以上の実績と優れた臨床効果がある一方、長期の使用による皮膚への影響、不適切な使用による病態の変化などが問題となり、満足度は低い。タクロリムス軟膏は、ステロイド外用薬と異なる作用機序で、アレルギー炎症の発症に中心的な役割を果たす T 細胞の機能を抑制することによる免疫抑制剤であり、ステロイド外用剤への不満を満たすが、免疫抑制による局所感染症悪化や、悪性腫瘍発生のリスクなどがあり第一選択薬とはなっていない。保湿剤や抗ヒスタミン･抗アレルギー剤まで考慮に入れても､いずれも患者の満足度は低い。またいずれも対症療法であり、根治療法は見つかっていない。

よって、AD の発症メカニズムに基づいた新たなる医薬品は、多くのアトピー性皮膚炎患者により望まれているといえる。

日本皮膚学会 (Kono and Yamamoto, 2008) によると、AD は「増悪、寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」と定義され、またアトピー素因とは、「① 家族歴・既往症 (気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患)、または、② IgE 抗体を産生しやすい素因」である。

アトピー素因の考え方が示すとおり、AD では、家族内に AD 患者がいると発症率が上がる (Bradley *et al.*, 2000) ことや、二卵性双生児よりも一卵性双生児で発症の一致率が上がる (Coleman *et al.*, 1997) ことから、遺伝的要因が関与していることは間違いないと考えられている。しかしそれは一つの因子ではなく、多数の遺伝子が関与していると考えられている。これまでにヒトの遺伝学的解析で AD との関連

が報告されている遺伝子としては、マスト細胞キマーゼ (Iwanaga *et al.*, 2004; Pascale *et al.*, 2001)、高親和性 IgR 受容体 (Fc ε RI) (Cox *et al.*, 1998; Iizuka *et al.*, 2002)、RANTES/CCL5 (Bai *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006)、IL-4 (Bradley *et al.*, 2000; Kawashima *et al.*, 1998b)、IL-12 (Takahashi *et al.*, 2005)、IL-18 (Kim *et al.*, 2007)、IL-4 受容体 (Fukai *et al.*, 2004; Isidoro-García *et al.*, 2005) などがあるが、いずれも発症リスクをわずかに上昇させる程度の関与である。AD は遺伝素因も関与しているが、環境要因も大きく関与しており、原因遺伝子から導き出された分子は、ステロイド外用剤やタクロリムス軟膏などの対症療法を超える根治療薬の標的とはなりにくい。

2. アトピー性皮膚炎モデル動物について

AD の様に複雑で多因子が関与する疾患の発症メカニズムを解析する場合、ヒトにおける疾患の病態を模倣する、マウスやラットなどのモデル動物の研究は有効な手段である。マウスでは、NC/Nga マウス (Matsuda *et al.*, 1997) や NOA マウス (Watanabe *et al.*, 1999) が AD モデルマウスとして広く知られ、研究に用いられてきた。NC/Nga マウスはコンベンショナル環境下で皮膚の過角化、浮腫、マスト細胞の浸潤および顆粒球、好酸球の浸潤、そして血中 IgE の上昇など、ヒト AD と類似した皮膚炎を発症する。一方 NOA マウスは、マスト細胞、好酸球の多数浸潤した湿潤性皮膚病変と共に血中 IgE の上昇が見られる。

また、筆者の所属研究グループでは、研究所内で自家繁殖していた DS マウスから、無毛の突然変異を単離し、DS-*Nh* マウスとして系統化した。DS-*Nh* は無毛の他に、コンベンショナル環境下で皮膚炎を自然発症するという表現型を示し、この皮膚炎は、強い掻痒、黄色ブドウ球菌の関与、血中 IgE、血中 IL-4 濃度の上昇、皮膚組織へのマスト細胞の浸潤などの点でヒト AD と類似しており、AD モデルマウスの一つとして提唱してきた (Yoshioka *et al.*, 2003)。

DS-*Nh* マウスは、DS マウスより派生した無毛突然変異であり、これまでの研究から、この変異は常染色体優性遺伝し、その遺伝子座は 11 番染色体上の 1 領域の変異であることが報告されている (Watanabe *et al.*, 2003b)。特定の遺伝子の変異により、AD 様皮膚炎を誘発するこのマウスの解析は、AD の発症メカニズム解析に適していると考えられる。

本研究では、AD の発症メカニズムについての知見を広め、AD 治療薬の創製に役立てるために DS-*Nh* マウスの無毛・皮膚炎の原因となる遺伝子変異を同定し、その病態と原因遺伝子との関わりを解析する事を目的とした。

3. 本論文の構成について

本論文は二章で構成されている。第一章では、DS-*Nh* マウスの皮膚炎発症の原因遺伝子をポジショナルクローニングにより同定し、トランスジェニックマウスの作製によりその遺伝子が原因遺伝子であることを確認した。また第二章では、その遺伝子変異を持つ様々なモデル動物の皮膚炎病態を解析し、原因遺伝子との関連を調べた。

ポジショナルクローニングの結果、DS-*Nh* マウスには TRPV3 (transient receptor potential vanilloid (TRPV) ion channel subfamily3) 遺伝子の 573 番目のアミノ酸がグリシンからセリンへ変化する突然変異が生じていた。

一方、ラットにおいても、無毛で、コンベンショナル環境下において皮膚炎を自然発症する WBN/Kob-*Ht* ラット (文献により WBN/Ila-*Ht* ラットと表記) が存在する (Tani *et al.*, 1998)。このラットの皮膚炎は黄色ブドウ球菌により引き起こされ、またこの形質は、常染色体優性遺伝により受け継がれる。原因遺伝子はラット 10 番染色体の 37 から 45.6 cM の位置にマッピングされている (Akimoto *et al.*, 2000) が、その位置は、マウス 11 番染色体の *Nh* 候補領域を含んでいるため、DS-*Nh* マウスにおける変異遺伝子と同じ原因で無毛、皮膚炎発症の形質が引き起こされている可能性があると考え、WBN/Kob-*Ht* ラットの TRPV3 遺伝子の塩基配列を決定したところ、同じ位置のアミノ酸が変化する変異を生じていた。。

また、DS-*Nh* マウスの TRPV3^{Gly573Ser} の変異を導入したトランスジェニックマウスを作製したところ、このマウスは SPF 環境下においても皮膚炎を自然発症したため、TRPV3^{Gly573Ser} を DS-*Nh* マウスの表現型の原因遺伝子と特定した。

4. TRPV3 遺伝子について

DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の原因遺伝子である TRPV3 は、TRP (transient receptor poential) ファミリーとしてクローニングされた陽イオンチャネルである。TRP はショウジョウバエの光受容体変異株の原因遺伝子として同定されたイオンチャネルである。TRPV3 は 6 回膜貫通型のイオンチャネルであり、皮膚や小腸で発現している。そして 33 度以上の温度により活性化し、細胞内にカルシウムを流入させるが、生体でのリガンドや、具体的な生理機能は分かっていない。(Peier *et al.*, 2002b)

TRP ファミリーには、カプサイシンなどバニロイドをリガンドとし、また 42 度以上の温度により活性化する TRPV1 (Caterina *et al.*, 1999) に相同性を持ち、主に高温刺激により活性化する TRPV サブファミリー。そしてメントールをリガンドとし、

主に低温刺激により活性化する TRPM ファミリー (Peier *et al.*, 2002a) などがあり、感覚器官での温度感受性を担っていると考えられている。

第一章　ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の同定と、トランスジェニックマウス作成による原因遺伝子の特定

材料と方法

1. 動物

本研究に用いたすべてのマウスは、塩野義製薬油日ラボラトリーズにて生産、供給されたものを用いた。WBN/Kob-*Ht* ラットに関しては、石川実験動物研究所より供給されたものを用いた。

本研究に用いたすべてのマウスは、マイクロアイソレーター内、12 時間明環境/12 時間暗環境のサイクルで飼育された。食餌と水は通常コンディションのものを不断給餌により与えた。

マウスは、SPF およびコンベンショナル環境下のいずれかで飼育された。

すべての動物実験は、塩野義製薬動物実験ガイドラインに従って行われた。

2. DS-*Nh* マウスのポジショナルクローニング

2-1 遺伝的解析

ホモ二量体の DS-*Nh* (*Nh*/*Nh*) マウスは DS、BALB/c または C57BL/6 マウスと交配し、雑種第一世代の F1 マウスを作出した。無毛の F1 マウスにDS、BALB/c または C57BL/6 マウスを戻し交配し、第二世代のバッククロス (BC2) マウスを作出した。

バッククロスの表現型の決定は、肉眼にて体毛の有無を観察することによって行った。

2-2 ポジショナルクローニング

2-2-1　マーカーの検出方法

すべてのマーカーの検出は PCR-SSCP (single-stranded conformation polymorphism) 法によった。検体より採取した尾端約 1 cmより QIAamp Tissue Kit もしくは DNeasy Tissue Kit (いずれも QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として PCR を行った。得られた PCR 産物を 4% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色によりマーカーの検出を行った。明瞭な泳動像が認められ

たものについては、PCR 産物をホルムアミド存在化において熱変性させた後、GenePhor (Amarsham Pharmacia Biotech) により泳動し、銀染色することで一本鎖高次構造多型を判定した。

マイクロサテライトマーカーの増幅に用いた PCR プライマーは、Mouse MapPairs (Research Genetics) を用いた。

2-2-2　大規模戻し交配集団の作出

約 120 匹のヘテロ二量体の DS-*Nh* (*Nh*/+) マウスを同数の NC/NGA マウス と交配して、約 800 匹の F1 個体を得た。 F1 個体の表現型の決定は、肉眼にて体毛の有無を観察することにより行った。無毛の F1 個体 400 匹以上を DS マウスに戻し交配することにより、2,303 匹の バッククロス第二世代 BC2 個体の集団を得た。BC2 集団のうち無毛のマウス 1,000 匹を、コンベンショナル環境下で飼育して、皮膚炎の有無を肉眼により観察した。大規模戻し交配集団は、数回に分けて作出された合計匹数を示した。

2-2-3　YAC, BAC ライブラリを用いた物理的地図の作製

マウスゲノムの酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) およびバクテリア人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome; BAC) ライブラリならびにそれらのライブラリスクリーニングに必要な DNA プールは、Research Genetics 社より入手した。スクリーニングを実施したライブラリは WI/MIT820 mouse YAC library および CITB mouse BAC library であり、クローンの単離は Research Genetics のマニュアルに準じて行った。単離した YAC および BAC クローンからの DNA 抽出は、Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega) もしくは YeaStar Genomic DNA Kit (ZYMO-RESEARCH) を用い、マニュアルに準じて行った。

2-2-4　BAC インサートサイズの測定

抽出した BAC DNA を制限酵素 *Not*I で処理することでマウスゲノム DNA を切り出したあと、0.5×TBE バッファーにて調製した 0.9% アガロースゲルを用い、0.5×TBE バッファー中で分子量マーカーと共に field inversion 泳動を行うことでサイズを測定した。field inversion 泳動のコントローラーは PPI-200 Programmable Power Inverter (MJ Research) を用い、プログラム 4、70V/cm にて行った。

2-2-5　BAC 挿入配列決定

DNA 塩基配列の決定は、CEQ2000 (Beckman) あるいは ABI310 (Perkin-Elmer) を用いて行った。BAC クローンの挿入配列はショットガンシークエンスにより決定し

た。BAC DNA 抽出後、ネビュライザー (Invitrogen) にて、DNA を 600bp から1kb の長さになるように断片化し、pCR 4Blunt-TOPO ベクター (Invitrogen) にライゲーションし、大腸菌に形質転換後、BAC1 クローンについて約 300 のコロニーを取得した。これらのコロニーを培養してプラスミド抽出機 PI-50 (KURABO) によりプラスミド DNA を抽出した後、M13シークエンスプライマー (Invitrogen) を用いてサイクルシークエンスを行った。

得られた DNA 配列データは SEQUENCHER. 2.0 (HitachSoft) により解析し、連続した配列を得た。

2-2-6　コスミドライブラリの作製

DS-*Nh* および DS マウスのゲノムライブラリは、SuperCos1 Cosmid Vector. Kit (Stratagene) を用いて作製した。ゲノム DNA は、ホモ二量体の DS-*Nh* (*Nh*/*Nh*) マウスと DS ($+^{Nh}/+^{Nh}$) マウスの肝臓から ISOTISSUE (NIPPON GENE) を用いて抽出した。キットのプロトコルに従い、制限酵素 *Xba*I、*Bam*HI で消化した SuperCos1 と *Bam*HI で部分消化したゲノム DNA をライゲーションした。パッケージングには Gigapack III XL Packaging Extract (STRATAGENE) を用い、マニュアルに準じて行った。ただし、ホストの大腸菌には XL-1 Blue MR (STRATAGENE)　を用いた。

パッケージング溶液は一部を大腸菌に形質転換し力価を測定した後、500 コロニー/プレートとなるよう希釈して形質転換し、64 枚にプレーティングした。37 度一晩培養後出現したコロニーを 5ml の LB 培地を用いてスクレーパーで掻き取り、20％ グリセロールを加えた後 500 クローンのサブライブラリとして保存した。

2-2-7　コスミドライブラリからのクローン単離

コスミドライブラリからのクローン単離には PCR 法を用いた。*Nh* 領域内のマイクロサテライトマーカーあるいは BAC クローンの塩基配列決定より得られた配列情報から作製した PCR プライマーを用いて、コスミドライブラリのサブライブラリ (大腸菌懸濁液) を鋳型に PCR を行った。ポジティブなサブライブラリをプレートに 300 コロニー/プレートとなるようにプレーティングし、得られた個々のコロニーを爪楊枝で取り上げ、PCR の鋳型に用いると共に新たなプレートに整列させた。PCR 反応後に陽性クローンを選び、液体培養して DNA を抽出すると共にクローンとして保存した。

2-2-8 コスミドクローン挿入配列決定

コスミドクローンの挿入配列決定は、BAC 挿入配列決定の方法に従い、ショットガンクローニング法にて行った。

2-2-9　TRPV3 遺伝子と蛋白質の検出

各組織での TRPV3 の発現は、ノザンブロット法により解析した。マウスの各組織からのRNA抽出は ISOGEN (NIPPON GENE) を用いた。抽出した RNA はアガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、PCR 増幅により作製した TRPV3 特異的プローブを Praime-It Randam Primer Labeling Kit (STRATAGENE) と [^{32}P] dATP を用いてラベルし、ハイブリダイゼーション後に X 線フィルムに露光して検出した。

皮膚組織における TRPV3 発現位置の解析は、*in situ* ハイブリダイゼーションにより行った。DS-*Nh* マウスの皮膚組織から作製した 10μm の組織切片は、4% パラホルムアミドで 30 分固定し、0.3% Triton X-100 で透過処理をした後、4% パラホルムアミドで再度固定を行い、その後に 2μg/ml のプロティナーゼK溶液中で 37 度 7.5 分間の蛋白質消化処理を行った。4×SSC- 50% ホルムアミド溶液で 30 分間前処理を行った後、ハイブリダイゼーション溶液 (10mM Tris-HCl, 250ug/ml yeast tRNA、0.02% SDS、10mM Dig-labeled TRPV3 probe) 中で 37 度 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。センス鎖、アンチセンス鎖のプローブは、TRPV3 コード領域をクローニングしたプラスミドを直鎖状にして、T7（センス鎖）またはSP6 (アンチセンス鎖）の RNA ポリメラーゼを用いて作製した。ハイブリダイゼーション後、アルカリフォスファターゼとコンジュゲートした抗 Dig-Fab (Boehringer Mannheim) により二次ハイブリダイゼーションを行い、 ニトロブルーテトラゾリウム塩(NBT) と 5-ブロモ- 4-クロロ- 3-インドリル-ホスフェイト，トルイジニウム塩 (BCIP) を用いて視覚化した。

ケラチノサイト中の TRPV3 の蛋白質は、ノザンブロット解析により検出した。抗 TRPV3 抗体は、マウス TRPV3 蛋白質の一部と相同性を持つペプチド (VRL3-1; RTTAPGGNPVVLTEKC) をラビットに免疫し、同ペプチドへの結合を ELISA で確認した血清をポリクローナル抗体として用いた。DS-*Nh* マウスと DS マウスのケラチノサイトおよび、TRPV3 発現ベクターをトランスフェクションした CHO 細胞を溶解、電気泳動、ブロッティング後、抗 TRPV3 抗体と HRP 結合抗ラビット IgG 抗体 (EPITOMICS) を用いて検出を行った。

皮膚組織における変異 TRPV3 の発現量は、PCR-RFLP (制限断片長多型) 法により調べた。DS-*Nh* マウスおよび DS マウスの皮膚より抽出した RNA を用いて、2 段階 RT-PCR を行い、TRPV3 遺伝子領域中の断片を増幅した。増幅した断片と用いたプライマーの配列を Figure 4e に示した。2 段階目に用いたプライマーは、 *Nh* 変異を持つ断片を増幅した場合にのみ制限酵素 *Alu*I で切断されるように、1 塩基のミスマッチを含む。そのため、PCR 産物を制限酵素 *Alu*I で消化すると野生型の

TRPV3 由来では 52bp, 150bp の断片が得られるのに対して、*Nh* 変異をもつ TRPV３ 由来では 19bp、52bp、131bp の断片が得られる。得られた PCR 産物を制限酵素 *Alu*I で消化し、4％ アガロースゲル電気泳動後により断片を確認した。

3. トランスジェニックマウスの作製

TRPV3^{Gly573Ser} を保持するトランスジェニックマウスは以下のように作製した。翻訳開始領域上流 436 bpを持つ TRPV3^{Gly573Ser} 全長 cDNA は、pSG5 ベクター (STRAGAGENE) の制限酵素 *Bam*HI 部位にクローニングされた。大量調製したこのプラスミドを制限酵素 *Eco*RI、*Bgl*II で消化し、ベクター部分を含まないプロモーター部位を含んだ TRPV3^{Gly573Ser} 断片を精製し、C57BL/６ × DBA2 F1 (BDF1) マウスの前核後期胚にマイクロインジェクションで注入し、定法により偽妊娠のレシピエントマウス卵管へ胚移植を行い、自然分娩により出産させた。

導入した TRPV3^{Gly573Ser} を発現する Tg-2 系統のマウスは、DS マウスに戻し交配した。7-10 世代の戻し交配により、遺伝的バックグラウンドが DS マウスとほぼ同じとなったと判断し、各種解析に用いた。

遺伝的バックグラウンドが *Nh* 変異の表現型に与える影響を調べるため、C57BL/6マウスに TRPV3^{Gly573Ser} を導入した。DS-*Nh* マウスを C57BL/6 マウスと交配し、生まれた無毛の F1 個体を C57BL/6 に戻し交配を行った。同様に 7-10 代の戻し交配を経て、C57BL の遺伝的バックグラウンドを持つ C57BL-*Nh* を作製した。

結果

1. DS-*Nh* マウスのポジショナルクローニング

1-1 遺伝的解析

DS-Nh マウスは、無毛形質、コンベンショナル環境下における皮膚炎発症を特徴とするマウスである。その遺伝様式を詳細に解析するため、無毛、皮膚炎発症を表現型としない DS, BALB/c, C57BL/6 系統のマウスと交配させ家系解析を行った。*Nh* 変異を持つ *DS-Nh* (*Nh*/*Nh*) 個体をこれらの系統と交配し雑種第一世代の F1 個体を得、F1 個体を交配に用いた系統を用いて戻し交配し、第二世代のバッククロス個体を得た (BC2)。*Nh* 変異の有無は無毛形質を指標に目視により分類した。F1 世代 (*Nh*/+) ではすべての個体が無毛であり、BC2 では無毛個体と有毛個体が、報告されている常染色体優性遺伝様式から推定されるとおり、ほぼ 1：1 の頻度で出現した (Figure 1a)。

SPF 環境下、コンベンショナル環境下で飼育された各系統の BC2 個体の皮膚炎の様子を Figure 1 に示した。

1-2 *Nh* 変異に対応する遺伝子のポジショナルクローニング

マウス 11 番染色体の *Nh* 領域の位置を正確に決定するため、大規模戻し交配集団を作出し、*Nh* 領域の高密度なマッピングを行う必要がある。そのためには、*Nh* 領域周辺に位置するマーカーの多型頻度の高い系統間で大規模交配集団を作出することが望ましい。筆者はまず、*Nh* 領域が位置すると推察されるマウス 11 番染色体の 42.0-44.0 cM の領域にマッピングされている 22 種のマイクロサテライトマーカー (Montgomery *et al.*, 1997) について、*DS-Nh* マウスと起源の異なる C57BL, BALB/c, C3H, CTS, DBA, KK および NC の 7 近交系間の多型を調査した。その結果、*DS-Nh* と NC 間での多型頻度が最も高く、この両者間で大規模近交系集団を作出するのが適当であると結論された (Table 1)。

ポジショナルクローニングのための高密度マッピングには、1,000 匹以上の戻し交配集団が必要であり、そのためには交配相手の親株も相当数必要となる。*DS-Nh* マウスおよび NC/Nga マウスは所属研究グループにおける維持集団の規模が小さく、早期の大規模交配集団を作出するのが困難であった。そのため、戻し交配の親株として、NC/Nga マウスの代わりに維持集団の規模の比較的大きい DS マウスを用いることを検討した。*DS-Nh* マウスは DS マウスに生じた突然変異を維持するために分離育成されたコアイソジェニック系統であるため、両者の遺伝的バックグラウン

ドの違いはほとんどないと推察される。そのため、無毛形質について劣性遺伝をし、多型マーカーについては DS-*Nh* マウスを同一であり、戻し交配への使用は問題ないと考えられた。戻し交配への DS マウスの使用の是非を検討するため、高密度マッピングに使用する 14 種のマイクロサテライトマーカーについて、*DS-Nh* マウスと DS マウス間での多型を調べたところ、相違は認められなかった (data not shown)。そのため、戻し交配には DS マウスを用いることとした。また、通常、*DS-Nh* 株は、*Nh*/+ の雄と DS (+/+) の雌の掛け合わせで保持されているため、これ以降実験に用いたすべての *DS-Nh* マウスは *Nh*/+ のヘテロ二量体である。

DS-Nh と NC の交配により生じた F1 のうち、無毛形質を持つマウスを DS マウスに戻し交配することによりバッククロス第二世代から成る大規模戻し交配集団を作出した。作出された 2,303 匹の BC2 マウスは、無毛を指標として表現型で分類し、さらに *DS-Nh* と NC/Nga マウス間で多型のあるマイクロサテライトマーカーを用いて *Nh* 領域付近の遺伝子型を決定した。BC2 個体の遺伝子型は *Nh* 領域付近の組換え位置により 10 種類のグループに分類し (Figure 2a) 、それぞれの無毛表現型を調べた。その結果、*Nh* 変異は常に D11Mit194 マーカーと挙動を共にしていたが、U49394 マーカーとの間では 2,306 匹中 9 匹、D11Mit65 との間では 3 匹の組換え個体が得られた。これにより、U49394 と D11Mit65 で挟まれた、D11Mit194 を含む領域を *Nh* 領域と推定した (Figure 2)。その遺伝的距離は、2,306 匹中 12 匹に組換えが認められたため、12 / 2,306 × 100 = 0.52 センチモルガン (cM) であった。センチモルガンは、遺伝的距離の単位で、100 回の減数分裂に 1 回の頻度で組換えが起こる距離を 1cM と規定している。

また、この戻し交配集団のうち、約 1,000 匹の無毛 BC2 個体について、コンベンショナル環境下で飼育したところ、すべての個体において皮膚炎症状が認められた (data not shown)。そのため無毛形質と皮膚炎発症の表現型は同一の変異に由来するものか、もしくは密接に連鎖しているものと考えられた。

そこで筆者は、市販の BAC ライブラリを用いて本領域のゲノム配列情報を取得し、その情報を元に、DS および *DS-Nh* マウスのゲノムから作製したコスミドクローンを用いて、DS および *DS-Nh* マウスゲノムの *Nh* 領域のコスミドによるコンティグを作製し、各コスミドクローンの塩基配列の決定を行った。*Nh* 領域の物理的長さは約 1,000kb あり、その半分ほどの領域は、オルファクトリー受容体スーパークラスターが占めていた。オルファクトリー受容体は、匂いを感じる受容体で、高い相同性を持った受容体遺伝子多数が、スーパークラスターを形成している。この領域は繰り返し配列が多く塩基配列の決定が困難なこと、遺伝子の機能から考えて無毛、皮膚炎表現型の原因とはなりにくいと考えられることから、オルファクトリー受容体スーパークラスターについては、遺伝子のコード領域のみを、そのほか

の領域については全ゲノムの遺伝子配列解析を行った。

DS および DS-*Nh* マウスのゲノム配列を比較したところ、塩基配列を決定した中では、TRPV3 遺伝子領域内に 1 塩基の突然変異が検出された。想定される転写開始部位から数えて 1,717 番目のグアニンが、DS-*Nh* マウスのゲノムではアデニンに変化していた (*Nh* 変異)。この変異は TRPV3 蛋白質において 573 番目のグリシンをセリンに置換するものである (Figure 3, a and b)。

一方、DS-*Nh* マウスと同様に体毛異常、および皮膚炎の自然発症という表現型を常染色体優性遺伝する WBN/Kob-*Ht* ラットという系統のラットが報告されている。WBN/Kob-*Ht* ラットの *Ht* 変異は、ラットの 10 番染色体上に存在すると報告されているが、ラットの 10 番染色体はマウスの 11 番染色体に相当する (Akimoto *et al.*, 2000)。そこで筆者は、TRPV３ の変異が、WBN/Kob-*Ht* ラットにも存在するかどうかを確認するため、WBN/Kob-*Ht* ラットとその親株の WBN/Kob ラットについて、TRPV3 のコード領域の塩基配列を決定した。その結果、WBN/Kob-*Ht* ラットにおいても DS-*Nh* での変異と同じ位置、TRPV3 遺伝子の 1,717 番目のグアニンがチミンに変化していた。WBN/Kob-*Ht* ラットでは、もうひとつ、1,728 番目のシトシンがチミンに変化していたが、こちらの変異はアミノ酸置換を起こさない変異であった (Figure 3)。

TRPV3 蛋白質の予測される構造の模式図を Figure3 c に示した。変異箇所は赤丸印で示したように、4 番目と 5 番目の膜貫通領域の間の細胞内領域に存在する。

1-3　マウスの皮膚における TRPV3 の発現

DS-*Nh* での変異および野生型 TRPV3 発現部位を調べるために DS-*Nh* の各組織由来の mRNA および皮膚切片を用いてノザンブロット解析および *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った (Figure 4)。ノザンブロット解析では、TRPV3 は皮膚に多く発現していることが示された (Figure 4a)。*in situ* ハイブリダイゼーション解析ではさらに、TPRV3 は皮膚のケラチノサイトで発現していることが示された (Figure 4b)。次に筆者は、TRPV3 のアミノ酸配列の一部分を持つポリペプチドをマウスに免役して得た抗 TRPV3 ポリクローナル抗体を用いて、DS と DS-*Nh* マウスから採取した皮膚ケラチノサイトの初代培養細胞でのウエスタンブロット解析を行った。DS および DS-*Nh* のケラチノサイトでは、TRPV3 を発現していることが示された。

筆者はさらに、 PCR- 制限酵素断片長多型法を用いて、野生型と *Nh* 変異を持つ TRPV3 発現量の比を推測した (Figure 4d)。TRPV3 断片を増幅した PCR 産物を、制限酵素 *Alu* I で消化すると、野生型では 52bp と 150bp の断片が、*Nh* 変異では

52bp、131bp および 19bp の断片が得られるように設計したプライマーを用いて、DS および DS-*Nh* の皮膚組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行った。検出されたバンドの濃度より、*Nh* 変異を持つ TRPV3 は、野生型の半分程度の発現量であると見積もった (Figure 4e)。

これらの結果より、DS-*Nh* で発見された *Nh* 変異を持つ TRPV3 は、皮膚において発現していることが示された。同様の表現型を示す 2 種類の齧歯類において同一遺伝子の同じ位置に変異があったこと、その遺伝子産物が皮膚において発現していることから、TRPV3 のこの変異が DS-*Nh* マウスおよび WBN/Kob-*Ht* ラットの無毛、皮膚炎の原因である可能性は強いと考えられた。

TRPV3 のこの変異が、無毛、皮膚炎の直接的な原因であることを証明するために、筆者は次に、TRPV3^{Gly573Ser} を発現するトランスジェニックマウスの構築を試みた。

2. トランスジェニックマウスの作製と解析

2-1 トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウス作製にあたり、その発現組織、発現量を内在性 TRPV3 に近づけるため、遺伝子上流の想定上のプロモーター領域を評価し、それを用いることにした。TRPV3 の翻訳開始コドンの上流領域の、2,054bp から 436bp までの様々な長さを持つ DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニングし (Figure 5a) 、マウス角化細胞株 XB-2 に導入することによりそのプロモーター活性を評価した (FIgure 5b)。調べたものはすべて十分なプロモーター活性を持っていたため、一番短い 436bp の断片をプロモーター領域としてトランスジェニックマウスの作製に用いた。

得られたトランスジェニックマウスは 6 系統であった。サザンブロット解析により導入 TRPV3 遺伝子のコピー数を検討した。すべての系統から導入 TRPV3 遺伝子が検出されたが、サザンブロット解析で得られた当該バンドと内在性 TRPV3 のバンド濃度の比から、コピー数の比較的少ない Tg-2 系統と、比較的多い、Tg-4 に代表されるそれ以外の系統に分類された。コピー数は、Tg-2 が 1,2 コピー、それ以外は 10 コピー以上がゲノム上に挿入されていると推測された (Figure 5c)。

2-2 トランスジェニックマウスにおける変異 TRPV3 の発現と臨床的特徴

各系統のトランスジェニックマウスについて、RT-PCR 制限酵素断片長多型法により皮膚領域での変異 TRPV3 の発現を評価した (Figure 6a)。変異 TPRV3 遺伝子由来のバンドは 131bp であり、野生型由来のバンドは 150bp の長さを持つ。検討

の結果、Tg-2 系統のマウスのみが変異型 TRPV3 を皮膚領域で発現していた。よって、以下の実験にはトランスジェニックマウスとして Tg-2 系統のみを用いた。なお、バンドの濃度から推定した変異 TRPV3 の発現量は、内在性の野生型 TRPV3 と 1：1，全体の TRPV3 発現量の約 50％ を占めていると見積もられた。

さらに、トランスジェニックマウスの各組織における全 TRPV3 遺伝子 (内在性、導入遺伝子の和) の発現を、リアルタイム PCR 法により検出した (Figure 6b)。TRPV3 の発現は耳 (皮膚) と精巣で検出された。これは報告されている通常の TRPV3 の発現パターンと一致するものであった。

また、トランスジェニックマウスの皮膚における TRPV3 遺伝子の発現を、TRPV3 ポリクローナル抗体を用いた免疫染色で確認したところ、ケラチノサイトでの発現が確認できた (Figure 6c)

本トランスジェニックマウスは、DS-*Nh* マウスのように全身無毛ではなく、全身にわたってまだらに発毛が認められた (Figure 6d)。しかし本トランスジェニックマウスは、SPF 環境下にあっても、皮膚炎を自然発症した。SPF 環境下に飼育した 30 週齢のトランスジェニックマウスの写真を Figure 6e に示した。この皮膚炎は紅斑、浮腫、乾燥、皮膚の浸食と擦り傷を含むものであり、脱毛を伴っていた。

DS マウスとトランスジェニックマウスは、同一遺伝的バックグラウンド上に、挿入遺伝子として TRPV3^{Gly573Ser} 遺伝子を持つことのみが異なる。その違いにより、体毛の異常と皮膚炎が生じたことにより、 TRPV3^{Gly573Ser} は無毛、皮膚炎の原因変異であると結論できた。

図表

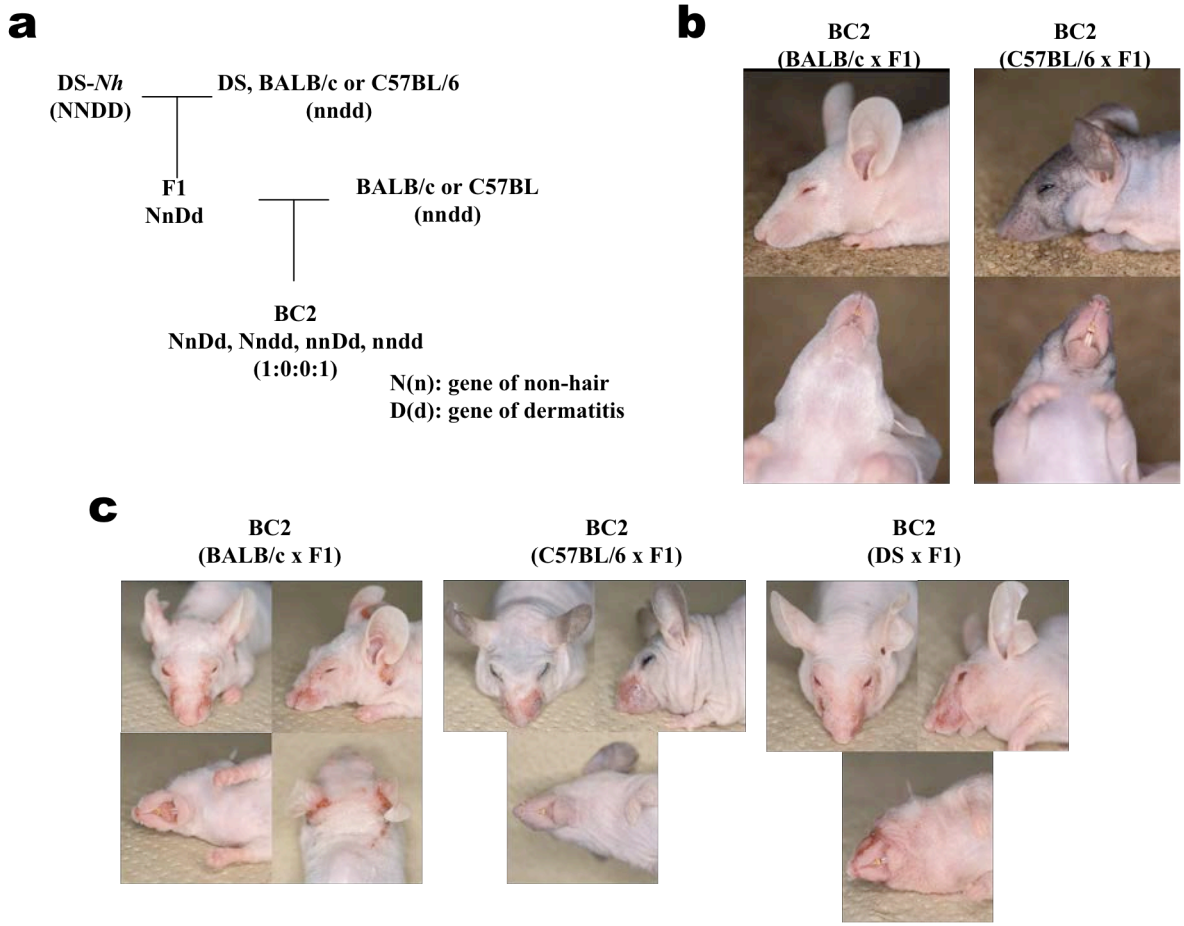

Figure 1

DS-*Nh* マウスにおける無毛・皮膚炎表現型の家系解析の結果

(a) 家系構造と予測される遺伝子型の出現頻度。(b) SPF 環境下で 5 週齢まで飼育した BALB/c-*Nh* (*Nh*/+), C57BL/6-*Nh* (*Nh*/+)の外見的特徴。(c）コンベンショナル環境下で 20 週齢まで飼育した DS-*Nh* (*Nh*/+), BALB/c-*Nh* (*Nh*/+), C57BL/6-*Nh* (*Nh*/+) の外見的特徴。

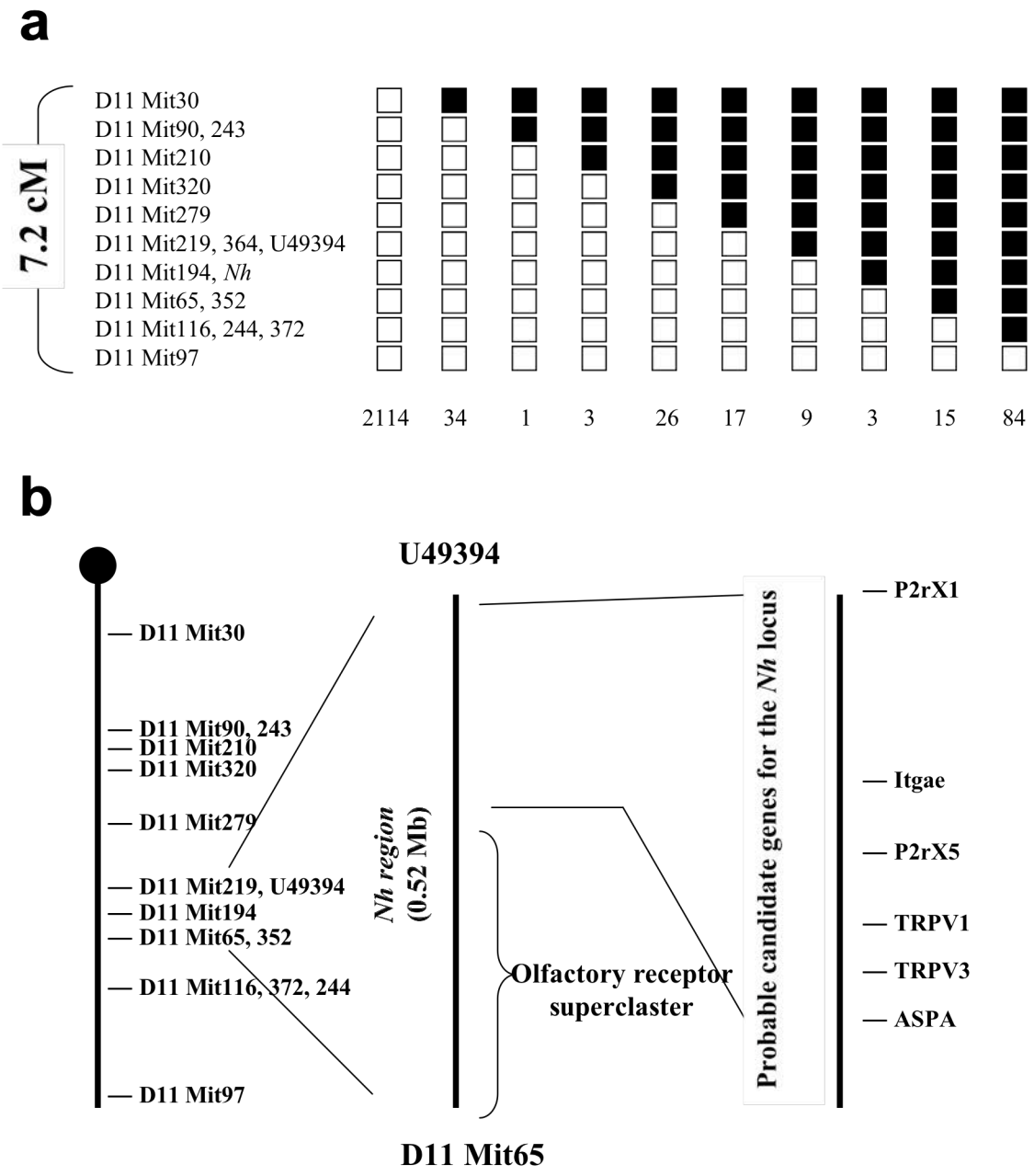

Figure 2

Nh 領域の高解像度連鎖および物理的地図

(a) 2303 匹のマウスを用いたジェノタイピング。2303 匹の (DS-*Nh* × NC/Nga) F1 × NC/Nga の戻し交配により得られた個体を、マウス 11 番染色体の *Nh* 領域近傍の多型マーカーを用いてジェノタイピングした。それぞれの四角は多型マーカーの型を示している。白と黒の四角の境界は、染色体組換えの起こった箇所を示す。図中のマーカー間の遺伝的距離 は(Montgomery *et al.*, 1997) に依った。 (b) *Nh* 領域の物理的地図。 *Nh* 領域は D11Mit194 マーカーと同じ挙動を示すが、U49394, D11Mit65 マーカーとは異なる挙動を示した。U49394 と D11Mit65 で両端を決定される約 1.1Mb の *Nh* 領域の物理的地図を示した。図中の遺伝子の位置は、それぞれの物理的距離の割合を示した。

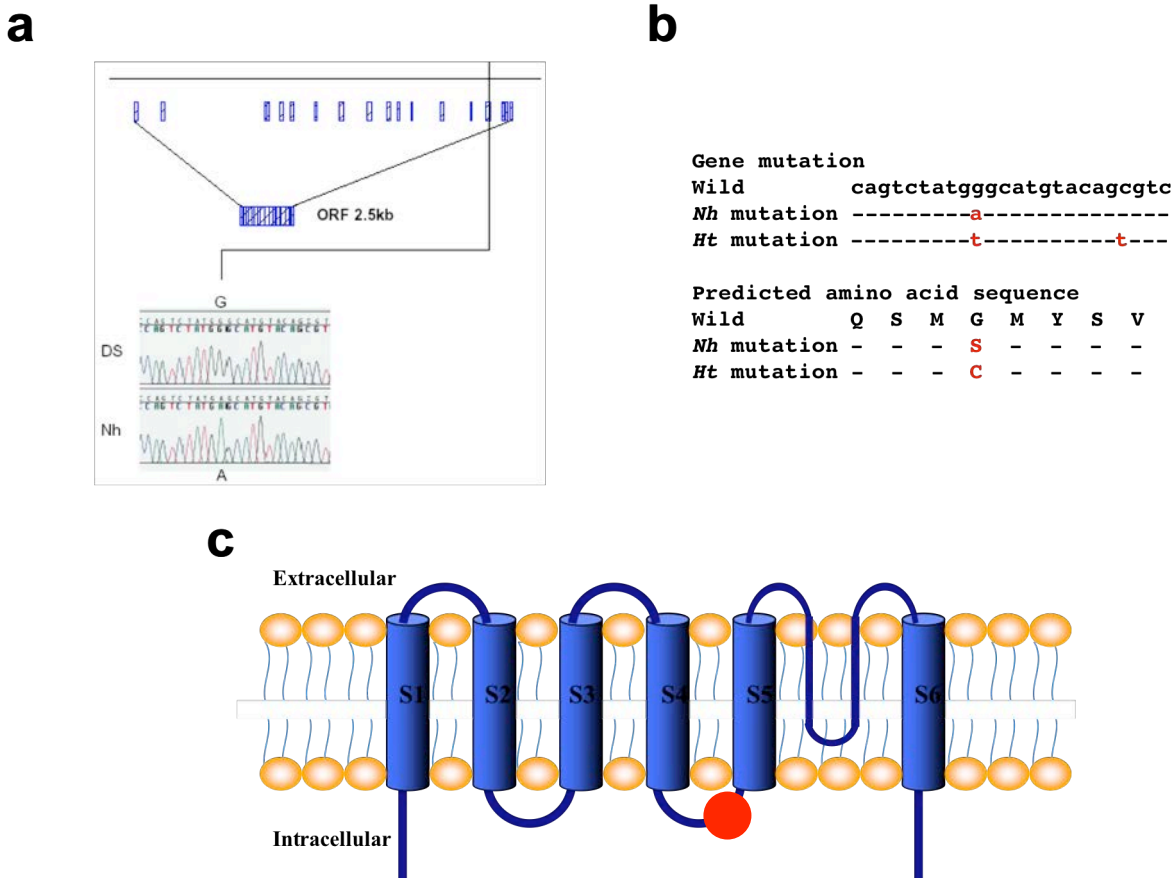

Figure 3

DS-*Nh* マウスの TRPV3 遺伝子変異部位

(a) TRPV3 遺伝子構造と *Nh* 変異の位置。(b) DS-*Nh* マウスおよび WBN/Kob-*Ht* ラットの TRPV3 変異およびアミノ酸配列予測。*Nh* 変異は 573 番目のアミノ酸のグリシンからセリンへの、*Ht* 変異はシステインへの置換と予測される。(c) TPRV3 蛋白質構造の模式図と、変異の位置（赤丸で示した）。

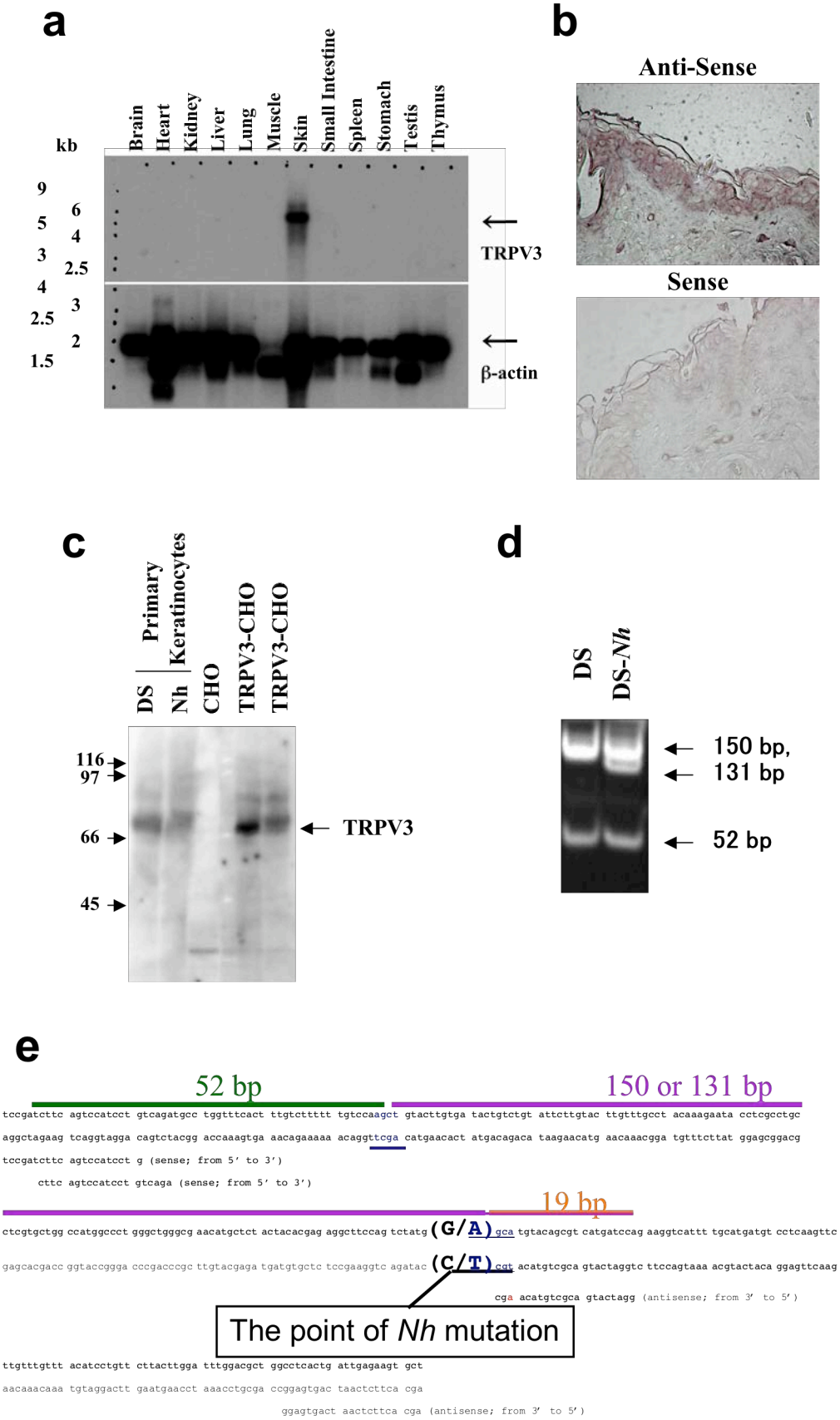

Figure 4

TRPV3 の遺伝子および蛋白質の、DS-*Nh* マウスでの検出

(a) DS-*Nh* マウスの多組織ノザンブロット解析。TRPV3 の発現を上段、コントロールとしてβアクチンの発現を下段に示した。TRPV3 は皮膚領域において発現していた。(b) DS-*Nh* マウス皮膚組織の TRPV3 の *In situ* ハイブリダイゼーション解析。TRPV3 は DS-*Nh* マウスの皮膚ケラチノサイトにおいて発現していることを示した。それぞれの条件において一般的に見られるイメージを 40 倍拡大にて示した。(c) DS、DS-*Nh* マウスのケラチノサイトを用いた TRPV3 発現のウエスタンブロッティング解析。それぞれのレーンには 20ug の蛋白質をロードした。コントロールとして TRPV3 を発現した CHO 細胞の蛋白質 1，5ug をそれぞれのレーンにロードした。TRPV3 蛋白質は、両方の系統で検出された。(d) 皮膚組織における、*Nh* 変異 TRPV3 の発現。150bp のバンドは野生型 TRPV3 を、131bp のバンドは *Nh* 変異 TRPV3 を示す。(e) PCR-RFLP 解析に用いたプライマー配列。材料と方法参照のこと。

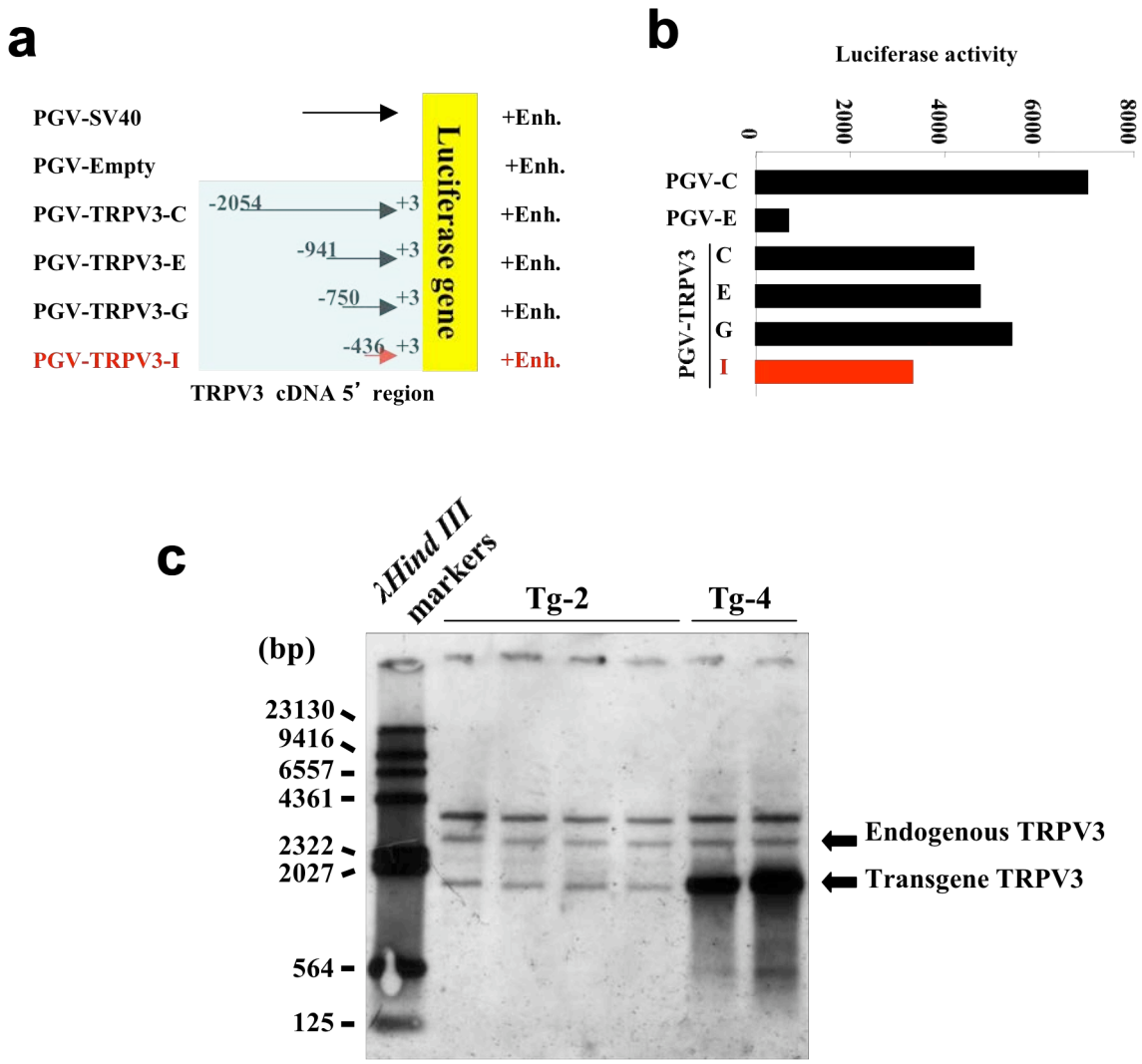

Figure 5

TRPV3 の 5' 領域の想定されるプロモーター領域およびトランスジェニックマウスの内在性遺伝子および導入遺伝子発現のサザンブロット解析

(a) プロモーター解析のためのルシフェラーゼとプロモーター領域のコンストラクトの概略図。(b) プロモーター配列は、マウスケラチノサイト由来の XB-2 細胞と様々な長さの仮想プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより決定した。(c) サザンブロット解析により、得られたトランスジェニックマウスの TRPV3 内在性および導入遺伝子を検出した。上のバンドは内在性の TRPV3 であり、そのコピー数は約 2 である。導入遺伝子のコピー数はバンドの濃度測定法 (Quantity One; Bio-Rad Laboratories) により、内在性のバンドを 2 コピーとして推測した。Tg-2 と Tg-4 株の導入遺伝子のコピー数はそれぞれ、1-2、そして 10 以上と推測した。

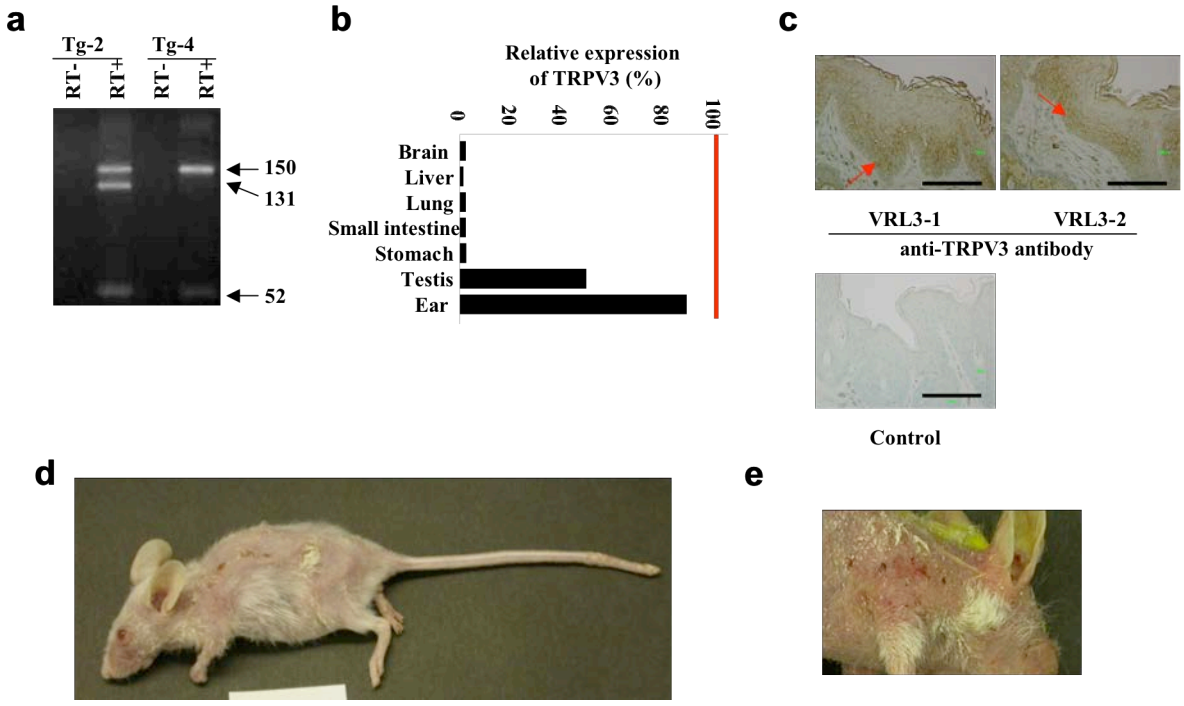

Figure 6

トランスジェニックマウスの評価

(a) トランスジェニックマウスにおける変異型 TRPV3 遺伝子発現。Tg-2 と Tg-4 の変異 TRPV3 の発現レベルを調べるため、皮膚組織から RNA を抽出して RT-PCR の鋳型として使用した。変異 TRPV3 の発現量は、PCR 制限酵素断片長多型法 (PCR-SSCP) を用いて推測した。*Nh* 変異 TRPV3 遺伝子の発現は、131, 52 bp のバンドで示され。野生型 TRPV3 を持たないマウスでは、150 bp と 52 bp のバンドで示される。 (b) TRPV3 の発現部位。トランスジェニックマウスの末端組織での TPRV3 の発現を、TaqMan リアルタイム PCR 法により測定した。GAPDH を遺伝子発現の内部標準として使用した。TRPV3 の相対的な発現量は以下の式により算出した。TRPV3 の相対的な発現量 (%) = それぞれの組織での TRPV3 発現レベル/皮膚での TRPV3 発現レベル×100。(c) 皮膚での TRPV3 の発現。30 週齢のトランスジェニックマウスの皮膚切片を、2 種類の抗 TRPV3 抗体 (VRL3-1, VRL3-2) で免疫染色した。赤い矢印は皮膚の基底層を示す。バーは 100 μ m。(d) SPF 環境下で 30 週飼育されたトランスジェニックマウス Tg-2 系統の全身写真。(e) 同患部の写真。

Map Position (cM)	Marker name (D11 is omitted)	Strain						
		C57BL/6	BALB/c	C3H	CTS	DBA	KK	NC
39.8	Mit30	NT	NT	NT	NT	◎	NT	◎
40.0	Mit15	NT	NT	NT	NT	◎	NT	×
40.0	Mit29	NT	NT	NT	NT	◎	NT	◎
40.0	Mit31	NT	NT	NT	NT	◎	NT	◎
40.0	Mit60	NT	NT	NT	NT	○	NT	◎
40.0	Mit298	◎	◎	◎	◎	◎	×	◎
40.0	Mit90	×	○	○	○	◎	×	◎
40.0	Mit210	○	×	×	×	◎	×	◎
43.0	Mit219	×	×	×	×	◎	×	○
43.0	Mit243	×	×	×	×	◎	◎	◎
43.0	Mit245	◎	×	×	×	×	×	×
43.0	Mit279	×	×	×	×	◎	×	○
43.0	Mit280	×	×	×	×	×	×	×
43.0	Mit319	×	×	×	×	×	×	×
43.0	Mit320	◎	◎	◎	NT	◎	◎	◎
43.0	Mit321	○	×	○	○	○	×	×
43.77	Mit65	○	×	×	○	×	×	○
44.0	Mit372	×	×	×	×	×	×	◎
44.0	Mit364	×	×	×	×	×	◎	◎
44.0	Mit194	◎	×	×	◎	×	×	○
44.0	Mit352	◎	×	×	◎	×	×	◎
44.0	Mit116	○	×	×	×	×	×	○
44.0	Mit244	×	×	×	×	×	×	◎
44.0	Mit299	×	×	×	×	×	×	×
44.0	Mit322	○	×	○	○	○	○	×
44.3	Mit7	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
45.0	Mit353	×	×	×	×	×	×	×
45.4	Mit34	NT	NT	NT	NT	◎	NT	×
45.4	Mit117	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
45.6	Mit144	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.0	Mit8	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.0	Mit32	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.0	Mit40	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
46.0	Mit68	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
46.0	Mit91	NT	NT	NT	NT	NT	NT	○
46.0	Mit94	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.0	Mit96	NT	NT	NT	NT	◎	NT	○
46.0	Mit262	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
46.3	Mit92	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.3	Mit95	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.3	Mit118	NT	NT	NT	NT	×	NT	×
46.5	Mit33	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
46.5	Mit93	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit37	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit56	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit66	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit97	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit119	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit120	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit121	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit178	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit195	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit211	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit220	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×
47.0	Mit221	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
47.0	Mit248	NT	NT	NT	NT	NT	NT	×

◎：DS-Nhとの間で明瞭な判定が可能なマーカー
○：PCR産物の移動度の差が小さく、多型マーカーとしての利用には改善の必要があるマーカー
×：DS-Nhとの間で多型が認められないマーカー
NT：未検討

Table 1

11 番染色体 *Nh* 領域付近の多型マーカーにおける、DS-*Nh* マウスと各マウス間の多型の有無

考察

1. ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の同定

本研究では、高解像度の遺伝的、物理的マッピング法により、無毛形質を指標に *Nh* 領域の最小遺伝的領域を約 1,000kb に同定した。この領域について DS、DS-*Nh* マウスのゲノム配列を比較して、1 塩基置換を見いだした。この変異は今回実験に用いた他の系統のマウス (BALB/c, C57BL/6, DBA, DS, NC/Nga, and NOD) には存在しなかった (data not shown)。この塩基の変化は TRPV3 遺伝子のコード領域中に存在し、573 番目のアミノ酸のグリシンををセリンに変化 (Gly573Ser) させるものであった。

一方 WBN/Kob-*Ht* ラットは、無毛で皮膚炎を自然発症するラットとして報告されている。これまでの報告で、その遺伝子が、マウス 11 番染色体の相同領域を含むラットの 10 番染色体上に存在すること、常染色体優性遺伝をすることが示されていた (Akimoto *et al.*, 2000)。その表現型と遺伝様式の類似性から同一遺伝子の変異を疑った筆者は、WBN/Kob-*Ht* ラットの TRPV3 領域の塩基配列を決定し、親株と比べて 2 塩基の突然変異を同定した。変異の一つは DS-*Nh* マウスに見られたものと同じ位置、573 番目のグリシンをシステインに置換する変異 (Gly573Cys) で、もう一つはアミノ酸の置換を伴わない変異であった (Figure 3d)。

独立した 2 種の無毛齧歯類から同一部位への突然変異が同定されたことから、この変異は無毛形質の原因となっていることが強く示唆された。さらに 1,000 匹の無毛形質を持つ DS-*Nh* バッククロス個体の観察において、すべての個体がコンベンショナル環境下で皮膚炎を発症した (data not shown)。このことは無毛の原因と皮膚炎の原因が密接に連鎖していることを示すが、*Nh* 領域として単離された 1,000kb のゲノム領域には他の変異は見いだせなかったため、皮膚炎と無毛形質両方をこの変異が担っていることが強く示唆された。

2. TRPV3^{Gly573Ser} 発現トランスジェニックマウス作成による原因遺伝子の特定

DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットより同定された TRPV3 の変異は、皮膚における発現や、ケラチノサイトの温度刺激に対する閾値の変化、出生直後の皮膚のマスト細胞数の変化などから無毛、皮膚炎表現型の原因となっていることが強く示唆されたが、より直接的に関与を示すために、変異 TRPV3 を発現するトランスジ

ェニックマウスを作製し評価した。

トランスジェニックマウスにおいて、外来遺伝子の発現を部位、時間、量的に制御することは重要なことである。そのため本研究では内在性プロモーターに近い配列を使用するため TRPV3 遺伝子上流の想定上のプロモーター領域を評価してケラチノサイト細胞株でプロモーター活性を持つ 436 bp 断片を遺伝子上流にクローニングして挿入遺伝子とした (Figure 5)。得られたトランスジェニックマウスのうち、変異遺伝子の発現が確認できたのは 1 系統のみであり、この系統はゲノム上に 1、2 コピーの外来遺伝子が挿入されていて、全 TRPV3 発現量の 50% 程度を変異 TRPV3 が占めていた。他に 10 コピー以上の外来遺伝子のゲノムへの挿入が見られた系統も得られたが、変異 TRPV3 の発現は確認できなかった。変異 TRPV3 遺伝子は、安定発現細胞株を作製することが非常に困難で、一時的発現のために発現ベクターを細胞にトランスフェクションした際も、大多数の細胞の細胞死が確認された (data not shown)。これらの現象は、過剰発現した際の、変異 TRPV3 の細胞に対する毒性を示唆する。そのため、トランスジェニックマウスでも導入遺伝子を大量発現する株は淘汰された可能性が考えられた。

作製したトランスジェニックマウスは、一部で発毛が見られるが、一部無毛領域が見られる体毛異常形質があり、さらに SPF 環境下での飼育でも皮膚炎を自然発症した。このことは、TRPV3^{Gly573Ser} が無毛、皮膚炎両方の形質に深く関与していることを直接的に示している。DS-*Nh* マウスと異なり、SPF 環境下でも皮膚炎を起こすという表現型は、TRPV3 の発現量が関与している可能性がある。DS-*Nh* マウスの TRPV3 遺伝子はゲノム上に 2 コピーで、変異 TRPV3 はそのうちの 1 コピーである。一方トランスジェニックマウスは TRPV3 遺伝子の全のコピー数は 3 ないし 4 であり、そのうち 1 ないし 2 コピーが変異 TRPV3 である。 TRPV3 の mRNA 量の野生型と変異体の比率は、DS-*Nh* マウスの皮膚組織で 2 : 1 (Figure 4d)、トランスジェニックマウスの皮膚組織で 1 : 1 (Figure 6a) であり、全体の TRPV3 の発現量はトランスジェニックマウスの方が多かった (data not shown)。

トランスジェニックマウスでは、TRPV3 の発現は皮膚ケラチノサイトと精巣で見られた。本研究では、精巣での TRPV3 の役割については新たな情報を付け加えることは出来なかったものの、雌のトランスジェニックマウスは正常に妊娠するにもかかわらず、雄のトランスジェニックマウスは不稔であった (data not shown)。興味深いことに正常な精巣の機能にとって、体温から 2-4 度低い温度は必須であり (Thonneau *et al.*, 1998)、精巣における高温は不稔を誘発する (Wright *et al.*, 1997)。これらを合わせると、TRPV3 の活性状態の持続に伴う毒性は精巣の高温下による雄の不稔化に重要な役割を負っている可能性がある。

以上の知見より、TRPV3 の 573 番目のアミノ酸変異が、DS-*Nh* マウス、

WBN/Kob-*Ht* ラットにおいて無毛、皮膚炎形質を起こしていることが明らかとなった。

この遺伝子変異の、無毛、皮膚炎形質への関与の仕方を明らかにするために、次に TRPV3 の 573 番目のアミノ酸に変異を持つ動物の皮膚炎についての解析を行った。

第二章　TRPV3^{Gly573Ser} 変異によりおこる皮膚炎の解析

材料と方法

1. TRPV3 変異による皮膚の変化

1-1 DS-*Nh* マウスと DS マウスの病理組織学的解析

組織におけるマスト細胞数を数えるために、5 週齢の DS-*Nh* マウスおよび DS マウスの皮膚、肺、腸組織のパラフィン切片をトルイジンブルー染色し、顕微鏡観察下でマスト細胞数を計数した。

1-2 皮膚組織のヒスタミン測定

0, 1, 2, 3 週齢の DS-*Nh* マウスおよび DS マウスの皮膚組織を採取し、ホモジェナイザーにより懸濁した。懸濁液を 80 度 10 分間加熱し、12,000 rpm 5 秒間の遠心処理を行い、上清のヒスタミンレベルを測定した。測定は Enzyme-linked color developing kit (Kikkoman) を用いて行った。

1-3 細胞内カルシウム流入の測定

TRPV3 の変異の有無による、温度刺激による細胞内カルシウム流入の変化を測定した。 DS-*Nh* マウスおよび DS マウスのケラチノサイトの初代培養細胞を 96 穴プレートに培養し、TRPV3 の特異的活性化剤である2- アミノメトキシジフェニルホウ酸 (2-APB) を 100 μM 含んだ室温の 4 μM Fura2-AM またはFluo3-AM (Invitrogen) / ハンクス平衡塩溶液を加え、室温 30 分静置後、ハンクス平衡塩溶液にて洗浄した。その後、蛍光測定器 FDSS3000 (HAMAMATSU Japan) により蛍光強度を測定した。温度刺激は、好適な温度のハンクス平衡塩溶液 20 μl を測定系に加えることにより与えた。

2. トランスジェニックマウスの解析

2-1 遺伝子解析

トランスジェニックマウスへの TRPV3^{Gly573Ser} 断片の挿入は、サザンブロット解析により解析した。各系統のトランスジェニックマウスの尾端よりゲノム DNA を抽出し、そのうち 7-8 μg を制限酵素 *Pvu*II により消化し、1% アガロースゲル電

気泳動後、Hybond-N+ nylon membrane (GE Healthcare Bio-Science) に転写した。477 bp の TRPV3 遺伝子の PCR 産物をプローブとして用いた。

トランスジェニックマウスの TRPV3 遺伝子発現は、リアルタイム定量 RT-PCR により調べた。マウス各組織を、TRIzol (Invitrogen) を用いて溶解後、Rneasy カラム (Qiagen) により全 RNA を抽出した。リアルタイム定量 RT-PCR のためのプライマーと SYBR Premix Ex Taq は Takara Bio より購入した。反応はプロトコール通り行い、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase を内部標準としてデータを標準化した。

2-2 血清 IgE とサイトカインの測定

SPF 環境下で飼育した 30 週齢の DS マウスおよびトランスジェニックマウスから採取した血清は、-80 度で保存した。血清中の全 IgE 量は、サンドイッチ ELISA キット (YAMASA) により測定した。血清中の CCL11, IL-13 IL-17, IFN-γ, MCP-1 濃度は Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。また、血清中の CCL-17 濃度は ELISA キット (R&D Systems) を用いて測定した。それぞれの実験は独立して 3-4 回行った。

2-3 病理組織学的、免疫組織学的解析

適切な週齢の DS-*Nh* マウス、トランスジェニックマウスおよび DS マウスの皮膚組織よりパラフィン切片を作製した。切片は、ヘマトキリシン、エオシンそしてトルイジンブルーにより染色後、光学顕微鏡下での病理組織学的解析に供された。パラフィン切片はまた、免疫組織学的解析にも使用された。これらの切片は、2.5 μg/ml 精製マウス IgG (BD Pharmingen)、1% BSA と Dako Protein Block (Dako) を含む PBS 溶液で前処理した後、ウサギ抗マウス PGP9.5 抗体 (Millipore) を用いて PGP9.5 発現細胞を標識した。PBS での洗浄の後、切片を UltraAvidi Nhorseradish Peroxidase (Leinco Technology) 処理し、酵素染色により抗体で標識された細胞をを可視化した。

凍結切片は 2.5 μg/ml 精製マウス IgG (BD Pharmingen)、1% BSA と Dako Protein Block (Dako) を含む PBS 溶液で前処理した後、抗マウス CD4 抗体 (clone H129.9; BD Pharmingen)、抗マウス NGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、または抗マウス TRPV3 ポリクローナル抗体 2 種類（TRPV3由来のポリペプチド、VRL3-1 (RTTAPGGNPVVLTEKC) または VRL3-2 (NPVVLTECRPADLTPC) をウサギに免疫して得た抗血清) を用いてハイブリダイズした後、PBS 洗浄し、適したビオチン結合二次抗体 (Pharmingen) で処理した。可視化はパラフィン切片と同様に行った。

2-4　皮膚組織の NGF 測定と皮膚組織の温度刺激後の NGF 反応

神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) 放出レベルの測定は、マウスの耳組織サンプルで行った。6-8 週齢のトランスジェニックマウスと DS マウスの耳を、8-mm biopsy punch (Kai Industries) で切り抜き、サンプルをイソジン (Meiji Seika kaisha) で滅菌した後 PBS で洗浄した。皮膚シートはそれぞれのサンプルよりピンセットを用いて剥離し、 24 穴プレート (Corning Coster) 内で 10％FCS、100 u/ml ペニシリン、100 μg/ml　ストレプトマイシンを含む 500 μl Dulbecco's modified Eagle's medium 中で 37 度 24 時間培養した。その後上清を回収し、NGF 濃度を ELISA キット (Millipore)を用いてマニュアルに従い測定した。

細胞内の NGF 量の測定は、以下の通りに行った。トランスジェニックマウスと DS マウスから採取した皮膚組織サンプルは Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER; Pierce) 中でホモジェナイズし、12,000 rpm 1 分の遠心分離によりデブリを沈殿させ、上清の NGF 濃度を ELISA キットにより測定した。

2-5　自発的スクラッチング行動の測定

かゆみの評価は、15 週齢、30 週齢の C57BL/6 と C57BL/6-*Nh* マウスおよび 30 週齢の DS マウス、トランスジェニックマウスを用いて、10 分間の観察中での累積スクラッチング時間を測定し評価した。

結果

1. WBN/Kob-*Ht* ラットにおける皮膚炎の性状

1-1 WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の性状

DS-*Nh* マウスと WBN/Kob-*Ht* ラットは、体毛異常、皮膚炎の自然発症と類似の表現型を持ち、また TRPV3 遺伝子上の 1,717 番目のグアニンが他の塩基に変化することによりアミノ酸置換が生じるという、類似の遺伝子型を持つ。よって、この 2 種の齧歯類の皮膚炎は、同一の原因がもたらしている可能性がある。しかしながら、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の病理学的性状についての詳細な解析は行われていない。筆者は、所属研究グループが報告した DS-*Nh* マウスの皮膚炎の病理学的性状と、WBN/Kob-*Ht* ラットでのそれとを比較するため、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の病理学的性状について調べた。

コンベンショナル環境下で飼育された 25 週齢の WBN/Kob-*Ht* ラットは、頸部での浮腫、紅斑を含む顕著な皮膚炎の症状を示した (Figure 7a)。皮膚炎は、コンベンショナル環境下に移行して 20 週間以降のすべてのラットに見られたが、SPF 環境下のラットでは見られなかった (Figure 7b)。

1-2 WBN/Kob-*Ht* ラットの組織病理学的解析

炎症部位における細菌の関与を検討するため、コンベンショナル環境および SPF 環境で飼育した WBN/Kob-*Ht* ラット顔面の皮膚表面から細菌単離を試みた。サンプルは塩と卵黄を含む寒天プレートに接種し、出現した細菌のコロニーから、各ラット 10 コロニーをランダムに選び、*Staphylococci* の亜種を同定した。その結果、SPF 環境下で飼育しているラットからは、黄色ブドウ球菌は検出されなかった。また、コンベンショナル環境下でもまだ皮膚炎を発症していないマウスから単離された菌は、70% が一般的なブドウ球菌 (*S. cohniiB, S.xylosus*) であり、そのほかは同定が出来なかった。一方、コンベンショナル環境下で 25 週間飼育して皮膚炎を発症しているラットから単離された細菌は、そのすべてが黄色ブドウ球菌であった (Table 2)。この結果から、黄色ブドウ球菌は WBN/Kob-*Ht* ラットでの皮膚炎の増悪に重要な役割を果たしていると考えられる。

さらに、皮膚炎を発症したあるいはしていない WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚領域より作製した切片を、組織病理学的所見のためにヘマトキリシン-エオジン (HE) 染色を、マスト細胞を染色するためにトルマリンブルー染色を、また好酸球を観察するために Lune 法による染色を行った。WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚の凍結切片は、

抗ラット CD4 抗体、抗ラット CD8a 抗体を用いて免疫染色を行った。

WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚で、重要な組織病理学的変化として以下の症状が見られた。過角化、表皮肥厚, 軽微な好酸球の細胞内浮腫、軽微な表皮細胞の膨張、そして炎症細胞の存在 (Figure 8A) 。好酸球と通常あるいは脱顆粒したマスト細胞は、皮膚炎領域において健常領域よりも高レベルに検出された。(Figure 8Ac, Figure 8Ad, Table 2)。コンベンショナル環境下に置かれたラットにおいて、CD4 産生 T 細胞の数は増加していた。一方、CD8 産生 T 細胞は軽微に増加していただけだった。CD4 と CD8 の比は一定して高かった。SPF 環境下の WBN/Kob-*Ht* ラットでは、CD4,CD8 ともにほとんど見られなかった (Figure 8Ae, Figure 8Af, Table 2)。

また、ヒト AD あるいは DS-*Nh* における皮膚炎発症時の血中 IgE, IL-4 レベルが上昇していることが知られているため、筆者は WBN/Kob-*Ht* ラットの血清 IgE, IL-4 レベルを測定した。コンベンショナル、SPF 環境下のラットから血清サンプルを集め、総 IgE と IL-４ レベルをサンドイッチ ELISA 法により測定した。血清 IgE のレベルは、SPF 環境の WBN/Kob-*Ht* ラットでは増加していなかったが、コンベンショナル環境下で皮膚炎を発症しているラットにおいて顕著に高レベルであった。IL-4 は皮膚炎の WBN/Kob-*Ht* ラットのみで検出された (Figure 8B)。血清 IFN-γ はどのラットにおいても検出されなかった (data not shown)。

WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎における特徴は、報告されている DS-*Nh* のそれと以下の点において類似していた。 (１) 黄色ブドウ球菌が皮膚炎領域から単離された。 (２) IgE と IL-4 の血清レベルが著しく増加している。 (３) マスト細胞と CD4 産生 T 細胞の数が著しく増加している。これらの特徴は、両齧歯類の皮膚炎が同じ原因によって起こることを示唆するものである。

これらの特徴は、ヒトのアトピー性皮膚炎とも共通する特徴である。

2. TRPV3 変異による皮膚の変化

TRPV3 遺伝子の同一部位に変異を持つ 2 系統の齧歯類、DS-*Nh* マウスと WBN/Kob-*Ht* ラットにおいて自然発症する皮膚炎の組織病理学的所見が類似していることを先に示した。ここでは、TRPV3 遺伝子変異の皮膚炎発症への関与を明らかにするために、変異の導入によって起こる皮膚領域の変化について解析した。

2-1 Nh 変異により起こされる組織学上の変化

TRPV3 の変異の表現型への影響を明らかにするために、DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットとそのそれぞれの親株について、皮膚組織の組織病理学的解析

を行った。観察したのはいずれも、SPF 環境下で飼育した 5 週齢の動物であり、皮膚炎は発症していない。TPRV3 の変異を持つ DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットでは、毛包の数が増えており、その配置が不規則になっているという変化が観察された (Figure 9a)。また、トルイジンブルーで染色した像から皮膚組織中のマスト細胞数を計数したところ、TRPV3 変異を持つ DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットは、持たない親株に比べて優位にマスト細胞数の増加が確認された (Figure 9b)。一方、皮膚以外でマスト細胞の存在している肺と小腸では、DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットでのマスト細胞の増加は見られなかった (data not shown)。

2-2 DS および DS-*Nh* マウスの皮膚領域のヒスタミンレベル

マウスにおいて、脱毛後の皮膚ヒスタミンレベルは変化を起こすことが知られている。そこで、筆者は DS および DS-*Nh* マウスの出生直後から 0, 1, 2, 3 週齢での皮膚のヒスタミンレベルを測定した。DS マウスにおいては、皮膚のヒスタミンレベルは 0 週齢の時に最も高く、その後 3 週間にわたってほぼ同じレベルを保っていた。一方 DS-*Nh* マウスでは、ヒスタミンレベルは出生後顕著に変化し、どの時点でも DS マウスよりも高かったが、2 週齢で最も高くなっていた (Figure 10)。その後、5 週齢では DS マウスからのヒスタミン検出は出来なくなっていたが、DS-*Nh* マウスでは 150 nmol/g 程度の濃度を保っていた (data not shown)。

2-3 ケラチノサイトの電気生理的解析

TRPV3 は、33 度程度の熱刺激で活性化されるカルシウムイオンチャネルとして知られている。また、その生理的リガンドは知られていないが、2- アミノメトキシジフェニルホウ酸 (2-APB) が TRPV3 の活性化剤、あるいは温度刺激に対する感度を向上させることが報告されている (Chung *et al.*, 2004)。そこで筆者は、TRPV3 を発現しているケラチノサイトの初代培養細胞を用いて、変異あるいは野生型 TRPV3 の温度刺激に対する感受性を調べた。予備検討として、2-APB が室温でのケラチノサイト上に発現する TRPV3 の活性化にあたえる影響を調べた。室温に置いて、変異型、野生型共に 100 μM の 2-APB では活性化されず、200 μM 以上の濃度では、濃度依存的な活性化が見られた (Figure 11a)。この結果を受けて、100 μM の 2-APB 存在化で、ケラチノサイトに 33 度の熱刺激を繰り返し与えたところ、DS-*Nh* マウス由来のケラチノサイトのみが、熱に反応してカルシウムの細胞内への取り込みが見られた (Figure 11b)。またこの取り込みは、繰り返しの熱刺激に対して反応の増大が見られた。

2-4　出生直後のマスト細胞数

TRPV3^{Gly573Ser} の変異は、熱刺激の閾値を低下させ、生理的な皮膚の温度でも活性化されていることが示唆された。一方、マウスの外的環境は出生前後で劇的に変化する。つまり、出生前は胎内で 37 度以上の環境にいたものが、出生後には室温環境となる。皮膚に発現している TRPV3 にとっては、胎内での環境は、野生型、変異型共に活性化されている温度なので機能的に変化が無く、出生後に活性が、野生型においてはオフにされるが、変異型においては活性化状態が持続して、その影響で種々の差が出てくるものと思われる。

筆者は、出生前後の TPRV3 の働きの違いを確かめるため、皮膚に浸潤するマスト細胞数の経時的推移を測定した (Figure 12)。DS-*Nh* マウスの皮膚のマスト細胞数に対する、DS マウスのそれの相対的変化を Figure 12 B に示した。DS マウスでは、DS-*Nh* マウスに比べて、出生後 1 日目から 3 日目にかけてマスト細胞数の顕著な減少が起こっていた。

この結果は、活性化状態にある TRPV3 がマスト細胞数の維持に寄与していることを示唆するものである。

これらの結果より、TRPV3 の変異は、皮膚ケラチノサイトの熱に対する反応を変化させること、また TRPV3 変異を持つ動物では、毛包数の増大などの形態的変化や、マスト細胞数の増大、ヒスタミン濃度の上昇などの変化が皮膚領域見らることを示した。

これらの変化が TRPV3 の変異によるものであることを直接的に証明するために、変異 TRPV3 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を試みた。

3.　トランスジェニックマウスの解析

3-1　トランスジェニックマウスと DS マウスの血清学的解析

トランスジェニックマウスに見られる皮膚炎の基本的な特徴を調べるために、筆者は SPF 環境下で飼育した 30 週齢のトランスジェニックマウス、DS マウスより血液を採取し、血清中の総 IgE、ケモカインリガンド (CCL11, CCL17, IL-13, IL-17, IFN-γ, MCP1) の濃度を測定した。皮膚炎を発症しているトランスジェニックマウスでは、同週齢の DS マウスよりも、血中総 IgE、および IFN-γ を除く測定したすべてのケモカインリガンドの発現が顕著に上昇していた (Figure 13)。これらの特徴は DS-*Nh* マウスに見られる皮膚炎発症時の挙動と類似していた。

3-2　トランスジェニックマウスの組織学的解析

マスト細胞と CD-4 産生 T 細胞の浸潤は、ヒト AD あるいは DS-*Nh* マウスの

発症する皮膚炎の重要な特徴である。筆者はこれらの炎症細胞のトランスジェニックマウスの皮膚炎発症における関与を明らかにするために、組織学的解析を行った。その結果、DS マウスと比較して肥厚や角化、多数のマスト細胞の浸潤などの顕著な組織学的変化が皮膚炎を発症しているトランスジェニックマウスの皮膚組織に観察された (Figure 14a-f)。さらに、多数の CD4 産生 T 細胞の浸潤も見られた (Figure 14g,h)。これらの特徴は、ヒト AD や DS-*Nh* マウスに見られる皮膚炎発症時の特徴と一致した。

3-3 熱刺激に対する NGF 反応と神経密度

近年の報告で、TRPV3 はケラチノサイトの NGF 産生に影響を与えていることが示唆されている (Gopinath *et al.*, 2005)。 一方で、ケラチノサイトからの NGF 産生は、炎症の悪化、あるいはかゆみの誘発を介してヒト AD および DS-*Nh* マウスの AD 様皮膚炎発症に重要であると知られている。トランスジェニックマウスにおける TRPV3 と NGF 産生の関連の可能性について調べるために、SPF 環境下で飼育した 6-8 週齢のトランスジェニックマウスと DS マウスから皮膚シートを単離して、33 度と 37 度でインキュベーションしたときの培養上清の NGF レベルを測定した (Figure 15a)。両マウス共に 37 度で NGF 産生が増したが、33 度においてはトランスジェニックマウスの方が優位に発現が多かった。このことは、 *Nh* 変異を持つ TRPV3 は、野生型 TRPV3 と異なり 33 度という皮膚の生理的温度で活性化していることを示唆する。またその結果皮膚で起こっている NGF 産生は、トランスジェニックマウスのアレルギー反応とかゆみを伴う皮膚炎発症に関連していると考えられる。

次に *in vivo* での導入遺伝子の NGF 産生に与える実際の影響を見るために、トランスジェニックマウスと DS マウスの背中の皮膚組織の NGF 量を測定した。トランスジェニックマウスの背中皮膚の NGF 含量は、同週齢の DS マウスのそれに比べて顕著に高かった (Figure 15b)。

トランスジェニックマウスにおいて、皮膚の NGF 量が顕著に上昇していることと、NGF には本来神経保護作用があることを考え合わせ、筆者はトランスジェニックマウスの皮膚組織における神経繊維の密度は高いだろうと推測し、30 週齢のマウスの皮膚切片の神経組織を、抗 NGF 抗体とアンチ蛋白遺伝子産物 9.5 (PGP9.5) 抗体を用いて免疫染色した。トランスジェニックマウスにおいて、NGF はケラチノサイト層に多く見られ、また多くの PGP9.5 陽性細胞が皮膚炎を発症したトランスジェニックマウスで見られた (Figure 15c)。しかし、皮膚炎を発症していない DS マウスからはほとんど検出されなかった。トランスジェニックマウスに見られる皮膚での神経細胞の増加には、高濃度の NGF が必須であると考えられる。

筆者はまた、TRPV3 とかゆみの関係を調べるため、30 週齢のトランスジェニックマウスと DS マウスのスクラッチ行動を調べた。10 分間の観察でのトランスジェニックマウスの累積スクラッチ行動は、DS マウスのそれに比べて顕著に増加していた (Figure 15d)。筆者は、TRPV3 の活性昂進はケラチノサイトの NGF 産生に関連し、またこのことが皮膚での NGF 濃度上昇とそれに伴う神経細胞数の上昇を引き起こし、それがマウスにおいてアレルギー反応とかゆみを伴う皮膚炎発症に関連していると考えている。

3-4　他の遺伝的バックグラウンドにおける TRPV3^{Gly573Ser} の影響

既に見てきたとおり、TRPV3 の変異は様々な系統のマウスにおいて無毛形質を引き起こす (Figure 1)。しかしながら、この遺伝子変異の、皮膚炎発症における役割はすべて解明された訳ではない。現在までの解析のほとんどは、DS マウス、DS-*Nh* マウス、そしてトランスジェニックマウスを用いてなされてきた。トランスジェニックマウスは DS マウスへの戻し交配を重ねて、DS の遺伝的バックグラウンドを持つマウスであるから、これらの解析は DS の遺伝的バックグラウンドを前提として行われてきたものであると言える。

TRPV3^{Gly573Ser} 変異が引き起こす表現型の、遺伝的バックグラウンドによる違いを調べるために、筆者は DS-*Nh* マウスの、C57BL/6 マウスへの戻し交配を繰り返し、TRPV3^{Gly573Ser} 変異以外は C57BL/6 の遺伝的バックグラウンドを持つマウスを作製した (C57BL-*Nh*)。AD における Th バランスは、Th2 優位であると考えられている。DS が Th2 優位なバランスを示し、アレルギー反応感受性であるのに対して、C57BL/6 は Th1 優位のバランスを持つマウスであり、アレルギー反応に対して抵抗性を示す。

C57BL-*Nh* マウスは、無毛であるが、30 週間コンベンショナル環境下で飼育しても、皮膚炎を発症しなかった (Figure 16a-d)。しかしながら、C57BL-*Nh* マウスのスクラッチ行動は、コンベンショナル環境下 15 週の時点から、C57BL/6 に比べて顕著に増加していた (Figure 16f)。

また、組織学的所見として、C57BL-*Nh* マウスにおいては、ケラチノサイト層の肥厚、浸潤マスト細胞数の増加、また神経細胞の増加が見られた (Figure 16e)。

図表

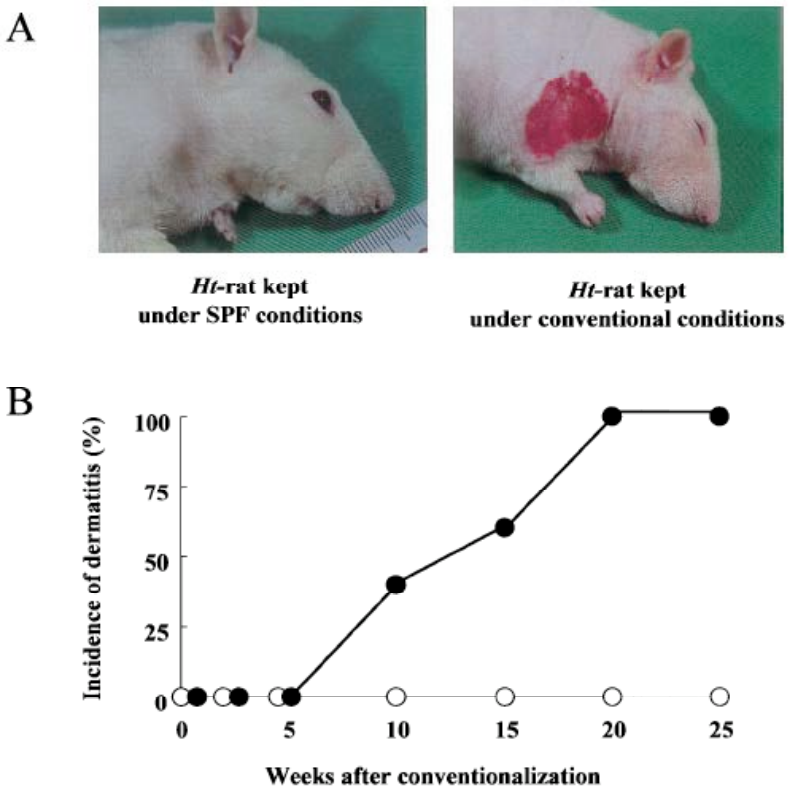

Figure 7

WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎

(A) SPF およびコンベンショナル環境下で 25 週齢まで飼育した WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎領域。(B) 雄 WBN/Kob-*Ht* ラットの、コンベンショナル環境移行後の皮膚炎発症率。ラットは 5 週齢時にコンベンショナル環境に移し飼育された。○：SPF 環境に維持されたラット (n=5)。●：コンベンショナル環境に移されたラット (n=5)

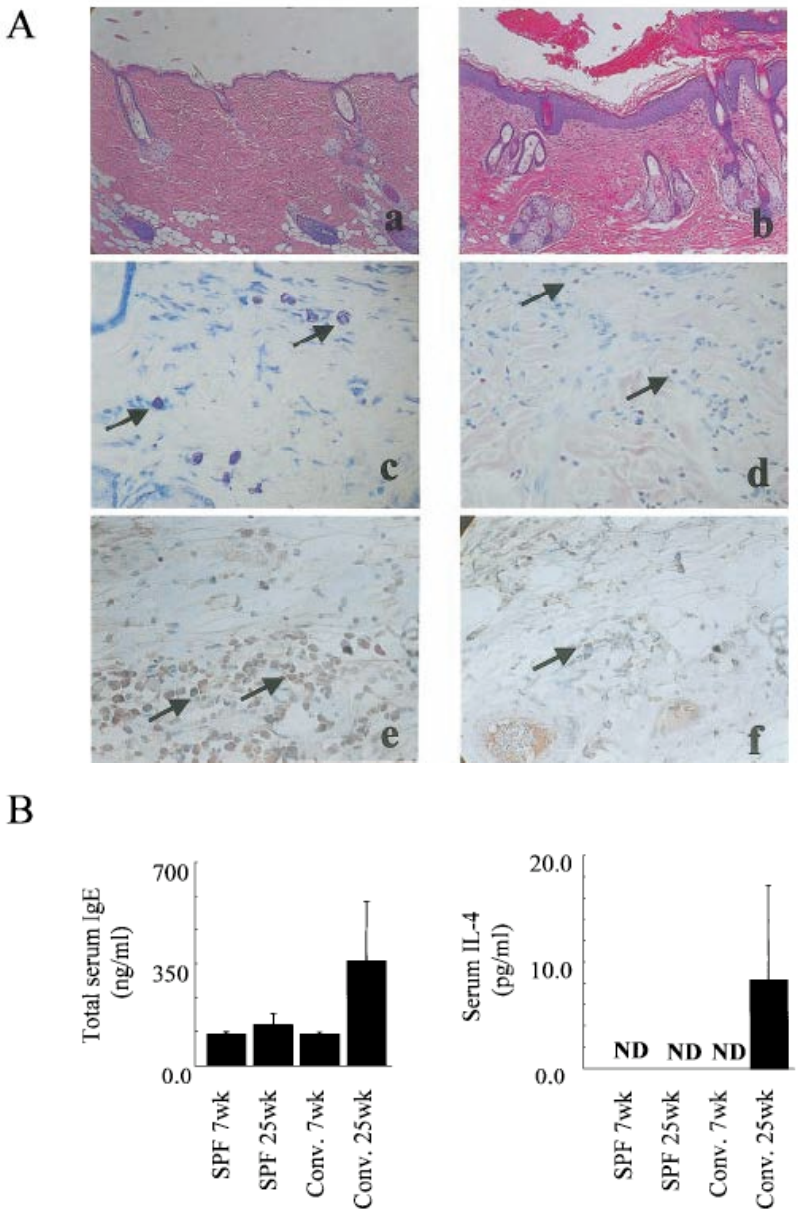

Figure 8

WBN/Kob-*Ht* ラットの組織学、免疫組織化学的特徴

(A) コンベンショナル環境下で飼育された 25 週齢 WBN/Kob-*Ht* ラットの組織学、免疫組織化学的特徴。SPF 環境飼育された (a)、またはコンベンショナル環境で飼育された (b)、24 週齢 WBN/Kob-*Ht* ラット皮膚のパラフィン切片。acidic TB (c)、または Luna method (d)で染色された、24 週齢ラットの皮膚炎発症部位のパラフィン切片。ラット CD4 (e)、CD8 (f) 抗体で免疫染色された凍結切片。矢印はマスト細胞、好酸球、T 細胞をそれぞれ示す。(B) それぞれのグループの WBN/Kob-*Ht* ラットの IgE、IL-4 の血清中の量。ND：not detected。

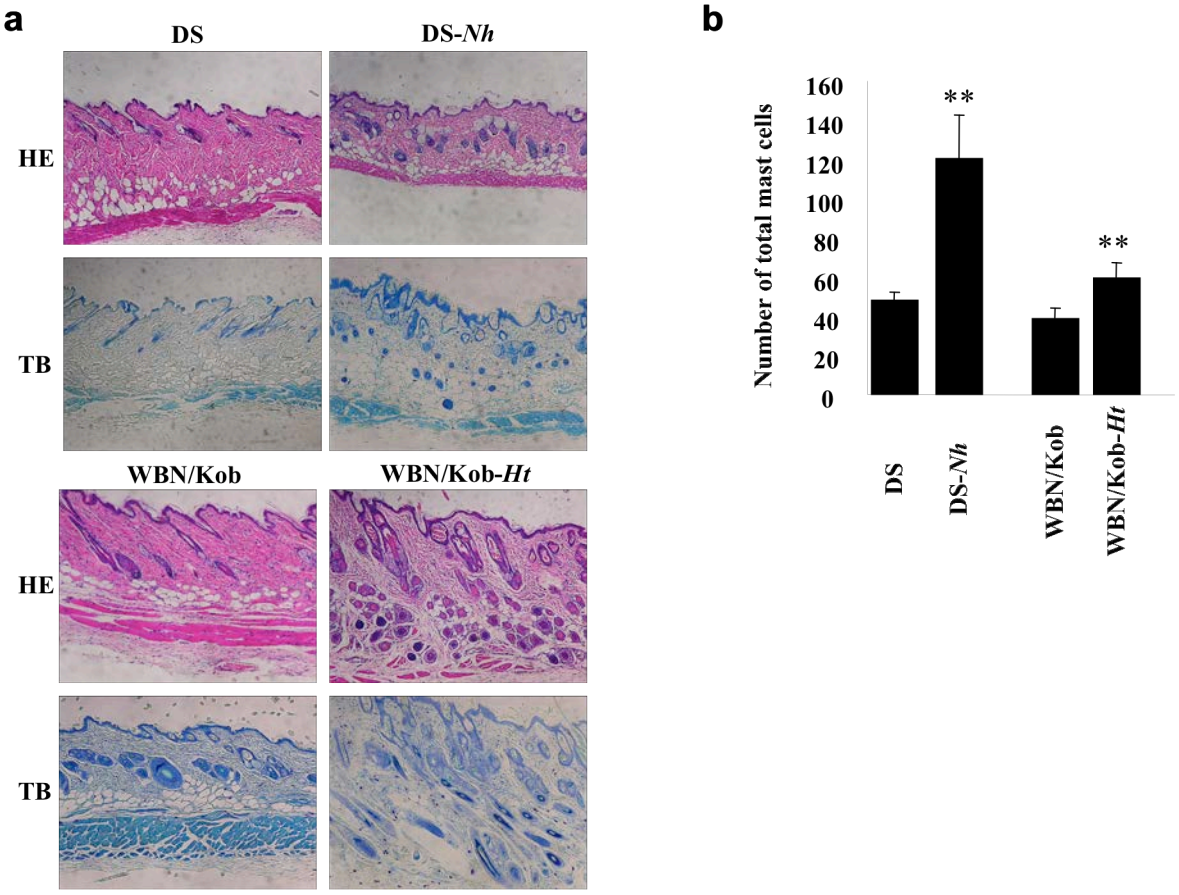

Figure 9

SPF 環境で飼育された 5 週齢の DS、DS-*Nh*、WBN/Kob、WBN/Kob-*Ht* 株の組織学的特徴

(a) パラフィン切片をヘマトキシリン/エオジン (HE)、またはトルイジンブルー (TB)で染色した。それぞれのパネルは、一般的に観察されるイメージを、視野を広くするために 10 倍に拡大して示した。(b) 皮膚領域の 2 mm 四方に存在するマスト細胞の数を、顕微鏡下で eyepiece squared micrometer を用いて 20 倍拡大で数えた (n=5)。統計的有意性を t 検定により決定した。**:同週齢の DS,WBN/Kob と比較した時の $P<0.01$

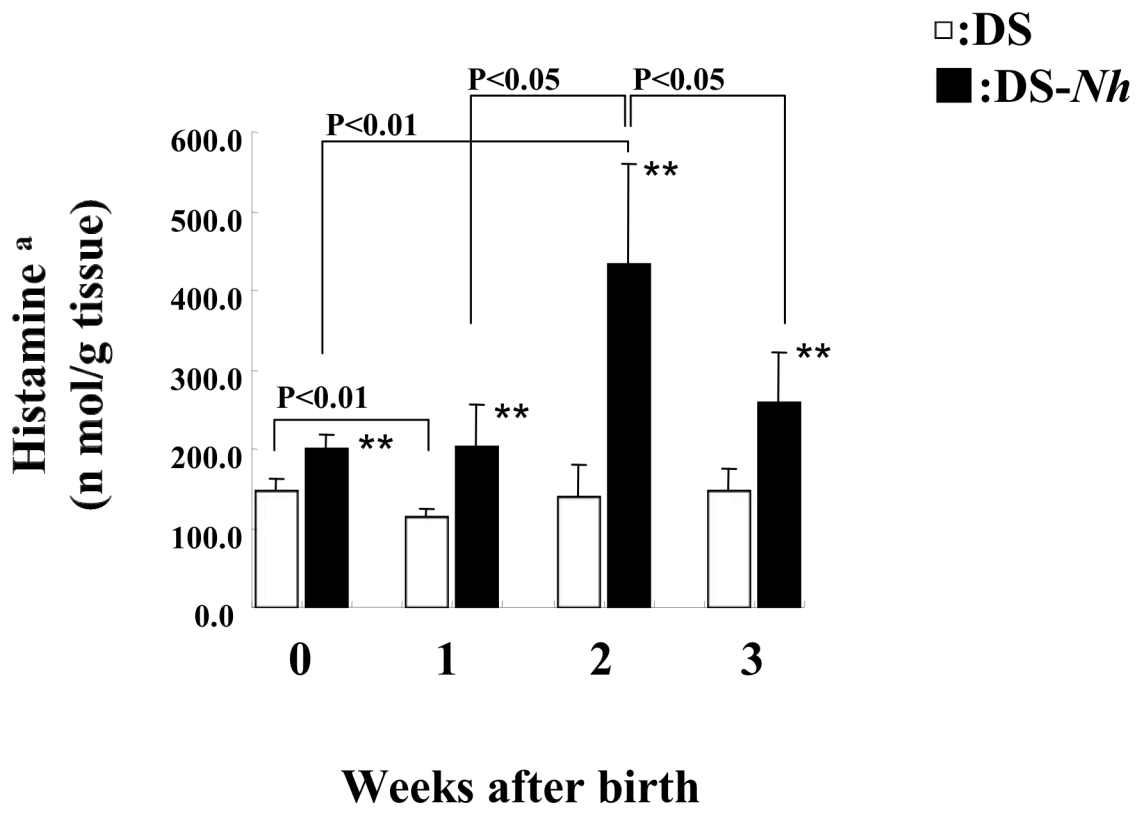

Figure 10

SPF 環境下で飼育した 0，1，2，3 週齢 DS および DS-*Nh* マウスの皮膚組織のヒスタミン濃度

それぞれの値は 5 匹のマウスの標準偏差を示した。統計的有意性を t 検定により決定した。

**:同週齢の DS マウスと比較した時の P<0.01。DS-*Nh* マウスの皮膚のヒスタミンのレベルは、同週齢の DS マウスに比べて有意に高かった。

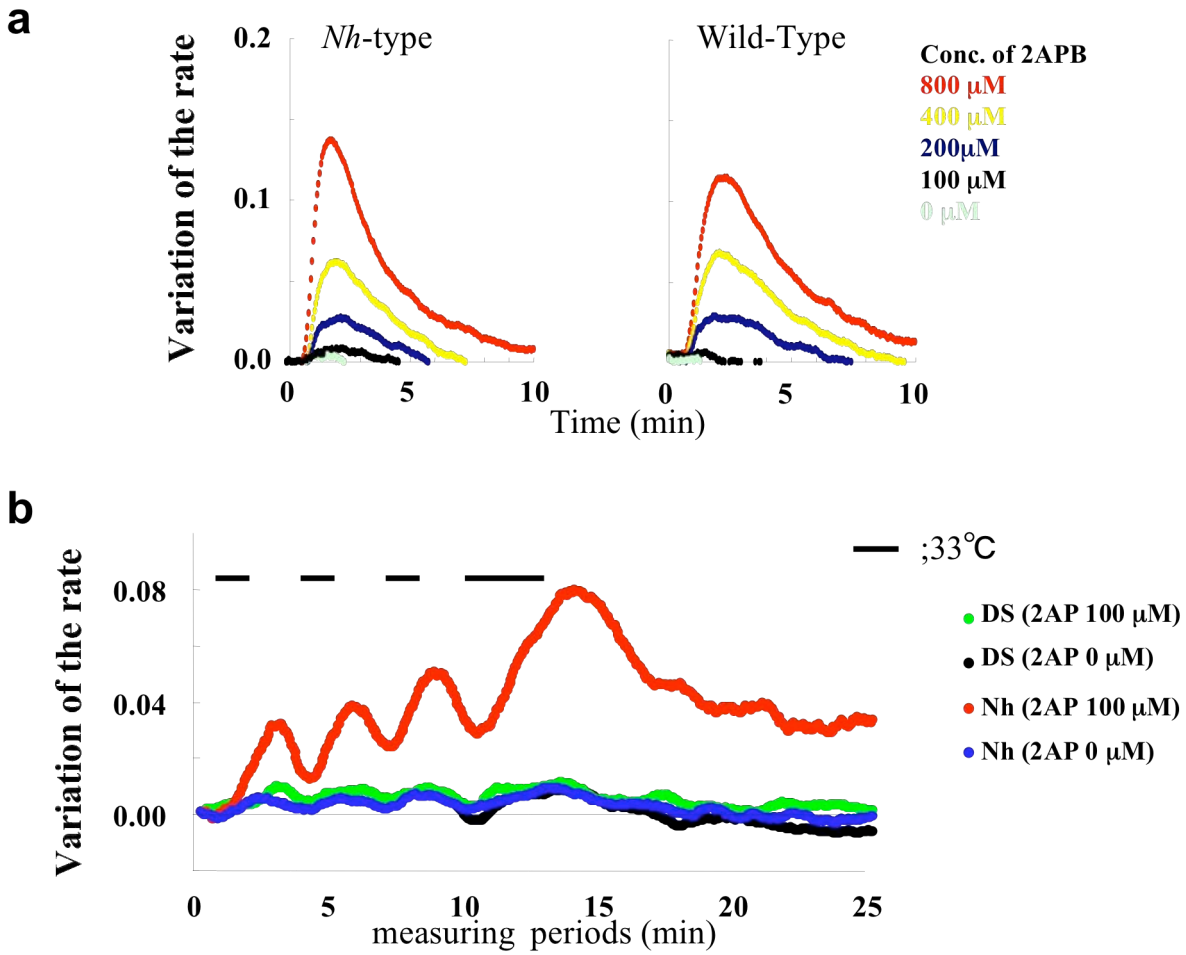

Figure 11

2-APB 存在下における DS,DS-*Nh* 由来のケラチノサイト中の TRPV3 の熱による活性化

(a) 室温でのケラチノサイトの Ca2+ 取込に与える 2-APB の影響。 2-APB 添加後の細胞内へのカルシウムの取込を FDSS2000 マイクロプレートリーダーを用いて測定した。縦軸は Ca2+ の細胞への取り込み量を示す蛍光強度の変化を示す。横軸は計測してからの時間 (分) を示す。高濃度の 2-APB 存在下ではケラチノサイトへのカルシウム流入が見られたが、100 µM 以下ではほとんど見られなかった。 (b) 熱刺激によるケラチノサイトへのカルシウム流入。細胞を、室温から 33 度へ連続して温度変化を与え、細胞内のカルシウム濃度を蛍光強度により測定した。33 度の温度刺激では、DS-*Nh* 由来のケラチノサイトの、変異を持った TRPV3 しか活性化しなかった。図中の横線は、33 度の熱刺激を与えたタイミングを示す。この実験はそれぞれ 5 回以上行ったが、結果はいずれも同様であった。

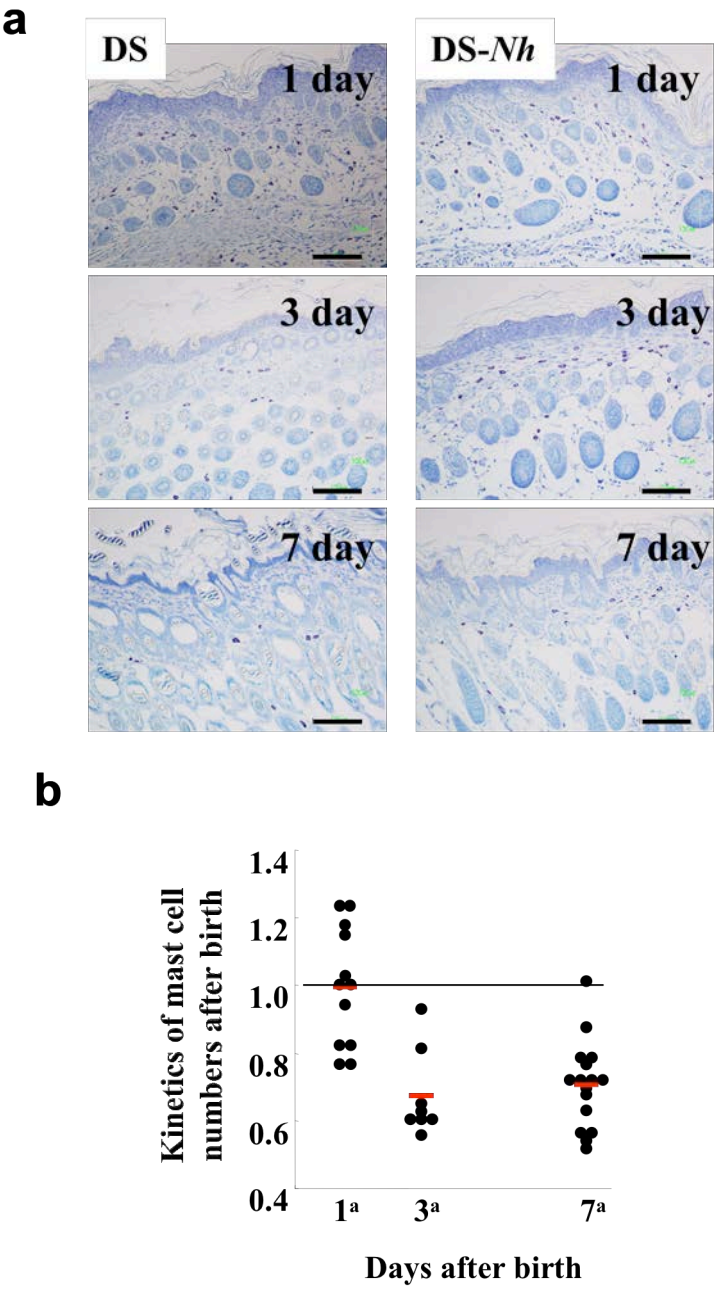

Figure 12

マスト細胞数の増加におけるGly573Serの影響

(a) 皮膚組織のパラフィン切片をトルマリンブルーで染色した。バーは 100 μm を示す。(b) DS および DS-*Nh* マウスの皮膚領域のマスト細胞数を、1, 3, 7 日齢マウス由来の皮膚切片を用いて、20 倍拡大の顕微鏡下で数えた。それぞれのドットの数値は以下のように計算した。ドットの数値 = DS マウスの皮膚におけるマスト細胞数/同一週齢の DS-*Nh* マウスの皮膚のマスト細胞数 (n=8-16)。a: P<0.01 同一齢の DS-*Nh* マウスとの比較において。統計的有意差は、T 検定により検出した。

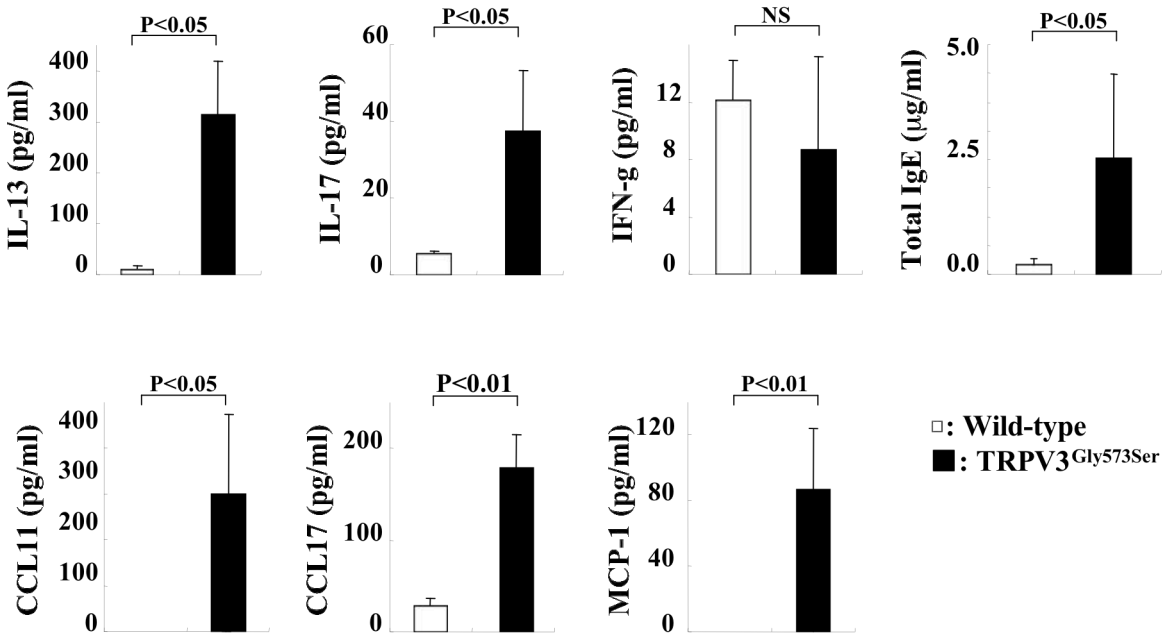

Figure 13

TRPV3^{Gly573Ser} トランスジェニックマウスの血清学的解析

30 週齢の SPF 環境下で飼育したマウスから採取した血清の CCL11, CCL17, IL-13, IL-17, IFN-γ,MCP-1 含量について調べた。それぞれの価は 3 から 4 回の実験の標準偏差を示した。統計的有意差は、T 検定により検出した。NS; 優位ではない。

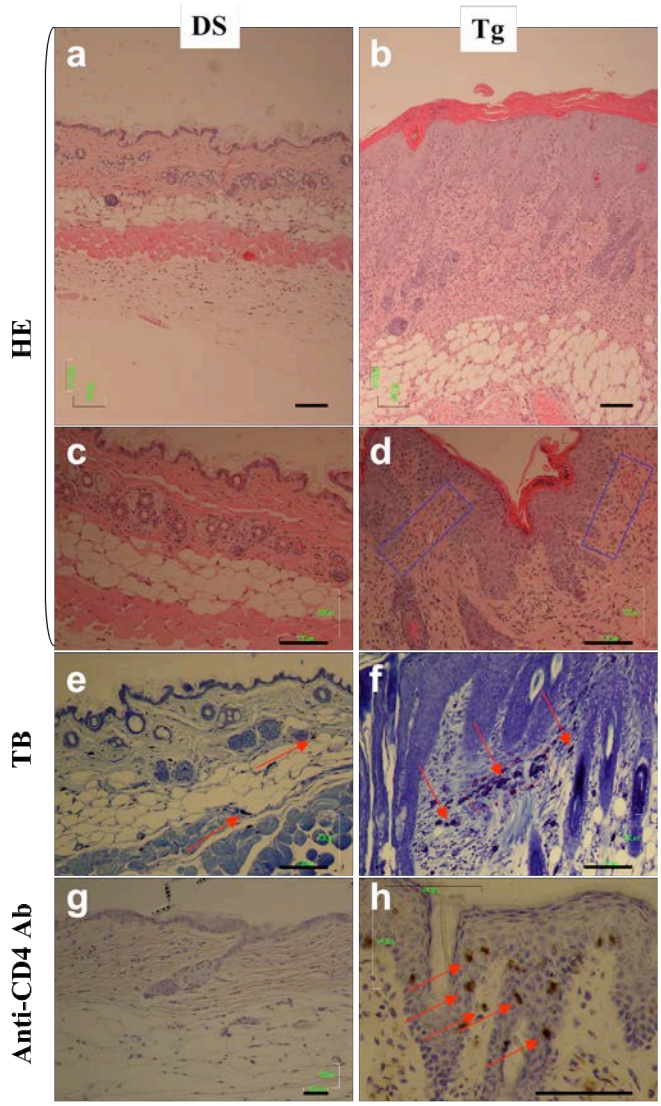

Figure 14

トランスジェニックと DS マウス皮膚の組織学的 (a, b, c, d, e および f)、 免疫学的 (g, h) 特徴

パラフィン切片および凍結切片を、SPF 環境下で 30 週齢まで飼育したトランスジェニックおよび DS マウスの背中の皮膚より作製した。H&E 染色 (a,b) は、トランスジェニックマウスでは過角化および皮膚の肥厚が起こっているのに対して、DS では起こっていないことを示した。a,b のケラチノサイト部位の強拡大像 (c,d) は、トランスジェニックマウスへの炎症細胞の浸潤と表皮肥厚が起こっていること (DS では起こっていないこと) を示す。青い四角形は多数の炎症細胞と血管新生の存在を示す。トルイジンブルー染色 (e, f) は、トランスジェニックマウスの DS マウスに比べてのマスト細胞数の多さを示している。赤い矢印と長方形は、マスト細胞とマスト細胞の多数存在する部位を示している。凍結切片 (g, h) は抗マウス CD4 抗体により免疫染色された。赤い矢印は CD4 産生 T 細胞を示す。 図中のバーは 100 μ m を示す。

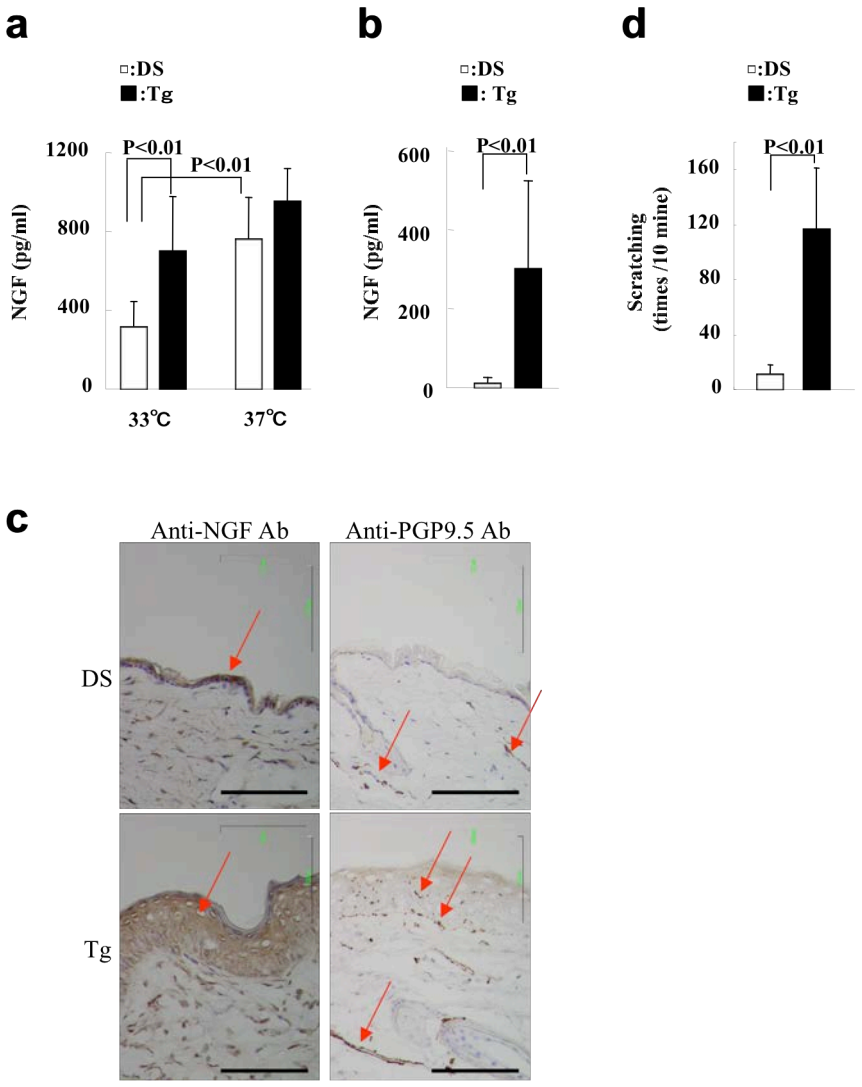

Figure 15

TRPV3^{Gly573Ser} 変異の、引っ掻き行動における影響

(a) DS およびトランスジェニックマウス皮膚の熱刺激後の NGF 反応。皮膚シートの培養上清を回収して ELISA 法により NGF 濃度を測定した。それぞれの値は 5 匹のマウスを用いた実験の標準偏差を示す。(b) トランスジェニックおよび DS マウスの皮膚サンプルをホモジェナイズし、その上清の NGF 濃度を ELISA 法により測定した。それぞれの価は 5-7 匹のマウスを用いた実験の標準偏差を示す。(C) 背中皮膚サンプルの免疫組織化学的特徴。SPF 環境下で 30 週齢まで飼育したトランスジェニックおよび DS マウスの背中より作製した凍結切片を、抗 NGF および抗 PGP9.5 抗体を用いて免疫染色を行った。矢印はそれぞれ、NGF および PGP9.5 発現細胞を示す。バーは 100 μ m を示す。(d) トランスジェニックマウスのスクラッチ行動。SPF 環境下で 30 週齢まで飼育したトランスジェニックおよび DS マウスの 10 分間の累積スクラッチ時間を観察した。それぞれの値は 5-7 匹のマウスを用いた実験の標準偏差を示す。

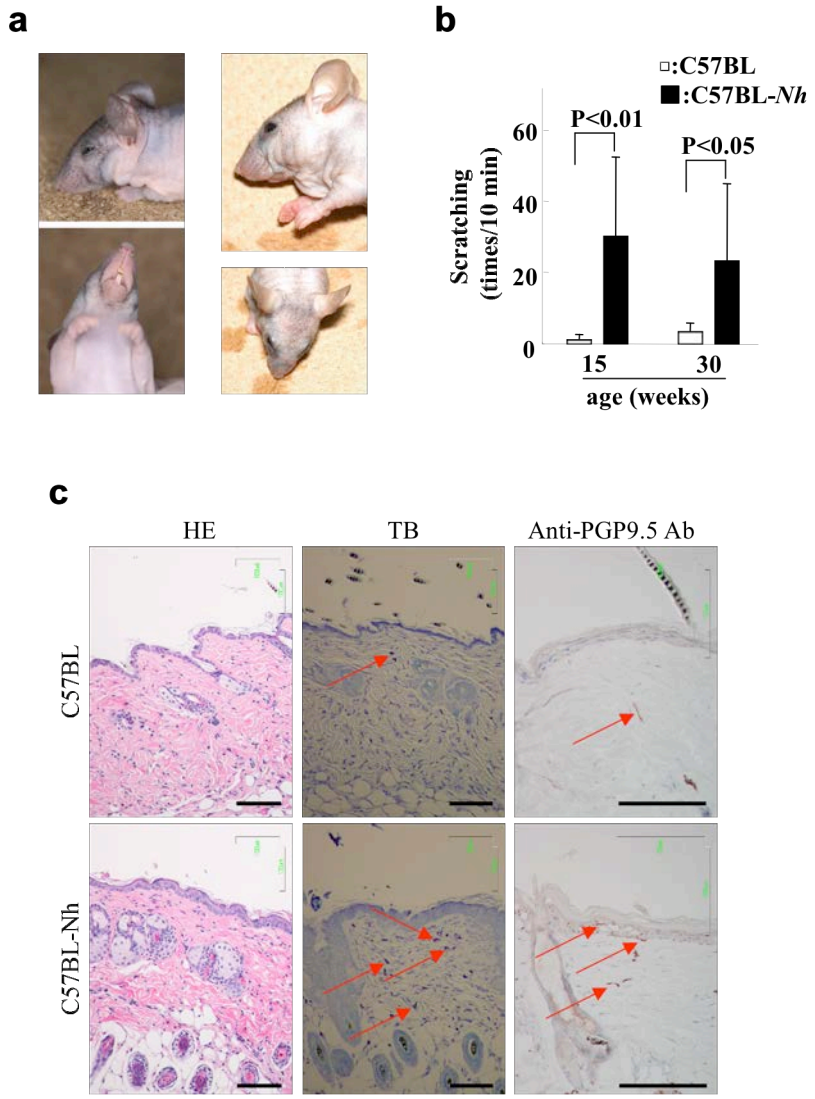

Figure 16

C57BL-*Nh* マウスの解析

(a) C57BL-*Nh* マウスの臨床的特徴。マウスは 30 週間コンベンショナル環境下で飼育しても、皮膚炎を発症しなかった。(b) C57BL と C57BL-*Nh* マウスの累積引っ掻き時間は、コンベンショナル環境下にて飼育している 15 週齢、30 週齢マウスの、10 分間の観察により求めた。それぞれの値は 5-7 匹のマウスを用いた実験の標準偏差を示す。 (c)背中皮膚サンプルの組織学的、免疫組織化学的特徴。パラフィンおよび凍結切片を、コンベンショナル環境下で飼育した 15 週齢の C57BL-*Nh* および C57BL マウスの背中皮膚から作製した。ヘマトキシンおよびエオシン染色は、C57BK-*Nh* マウスにおいてケラチノサイト層の肥厚が観察されたが、C57BL ではされなかった。ットルマリンブルー染色では、C57BL-*Nh* マウスにおいて、C57BL マウスよりも多数のマスト細胞の浸潤が観察された。矢印はマスト細胞を示す。凍結切片は抗マウス PGP9.5 抗体により免疫染色された。矢印は PGP9.5 陽性細胞を示す。バーは 100 μ m を示す。

	Nh-mouse (*Nh*/+) (b)		Ht-rat (*Ht*/+)	
	SPF	Conventional	SPF	Conventional
% Frequency of *S.aureus*	0.0±0.0	100.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0（c）
Number of cells (a)				
Mast Cells	40.0±11.6	101.7±28.2（c）	5.9±1.8	16.1±3.8（c）
Eosinophils	0.0±0.0	7.2±4.2	3.0±2.6	35.6±8.1（c）
CD4-bearing cells	16.1±10.1	81.0±68.6（c）	0.0±0.0	54.1±37.1（c）
CD8-bearing cells	5.4±8.2	23.5±15.3	0.0±0.0	27.8±26.1

Table 2

24 週齢の SPF とコンベンショナル環境下で飼育した無毛マウスとラットの、*S. aureus* 検出、マスト細胞数、好酸球、CD4-、CD8-産生細胞数の比較

(a): 皮膚組織 1mm 平方の領域における細胞数

(b): 文献 (Hikita et al., 2002; Yoshioka et al., 2003) より

(c): SPF 環境下と比較し、優位の増加 (P<0.05)が見られた

考察

1. TRPV3^{Gly573Ser} 変異の生理機能への影響

TRPV3 は、温度感受性カルシウムイオンチャネル TRPV1 (VR1) と相同性を持つ遺伝子として単離された、6 回膜貫通型のイオンチャネルである (Peier *et al.*, 2002b)。皮膚ケラチノサイトと神経細胞に主に発現し、33 度以上の温度で活性化する (Peier *et al.*, 2002b) が、生体での機能などは未だ十分には解明されていない。

今回同定された TPRV3 の Gly573Ser または Gly573Cys 置換は、4 回目と 5 回目の膜貫通領域を結ぶ細胞質側のループ構造中に存在し、3 次元的には TRPV3 のポール領域付近に存在する。また、グリシンという単純な構造のアミノ酸からより複雑な構造を持つセリンやシステインへの置換は、イオンチャネルの構造変化の柔軟性を損ない、温度刺激による応答性の変化を引き起こす可能性があると考えられた。本研究では、変異型 TPRV3 を発現するケラチノサイトは、温度刺激に対して感受性が高くなっている事が示された (Figure 11)。

ケラチノサイトでは、TRPV3 と同じファミリーに属し、TRPV3 よりもやや低い温度（27～35 度）の温度刺激で活性化される TRPV4 も発現していることが報告されており (Chung *et al.*, 2003) 今回の結果に TRPV4 が関与している可能性も疑われるが、以下の理由より、筆者は今回見られた温度感受性の変化は TRPV3 の変異により起こされたものと考えている。(1) DS-*Nh* 由来のケラチノサイトが、100 μM の 2-APB 存在下のみで 33 度の温度刺激で活性化され、2-APB 非存在化では活性化されなかったたこと。(2) 2-APB のこの時の濃度 (100 μM) では、TRPV3 の選択的活性化剤として働くことが報告されていること (Chung *et al.*, 2004)。(3) 繰り返しの温度刺激に対して反応の上昇が見られたが、この反応の上昇は TRPV1 と TRPV3 の特長であり(Peier *et al.*, 2002b)、TRPV4 には見られないことの 3 点である。

TRP ファミリーの変異とマウス皮膚の形態的変化の関係については Di Palma の報告で興味深い考察がされている (Di Palma *et al.*, 2002)。これは 6 回膜貫通型の陽イオンチャネルで、TRP イオンチャネルファミリーとの相同性を持ち、TRPML サブファミリーに分類されている Mcoln3 の変異が、皮層の毛細胞の形態的変化を通じて varitint-waddler (Va) マウスの聴覚障害に関連しているという報告である。ここでの Mcoln3 のアミノ酸変化は、4 番目と 5 番目の膜透過領域の間に存在し、それは TRPV3 の *Nh* や *Ht* 変異の部位に近く、TRPV3 の変異が皮膚組織の形態変化を惹起する可能性を示唆する。

筆者は構造上のフレキシビリティの減少により起こされた TRPV3 が、野生型よ

りも低い温度で活性化されるようになり、その結果、皮膚における体毛欠失などの形態学的変化を誘導したのではないかと考えている。

この仮説を検証するため、筆者は、出生直後の仔マウスを用いて皮膚組織のマスト細胞数の経時的変化を、DS および DS-*Nh* マウスで比較した。仔マウスの皮膚組織は、親マウスの胎内にあるときは 37 度以上の高温環境で、出生以後は室温に近い環境に置かれる。そのため野生型の TRPV3 は胎内では活性化状態にあり、室温環境では不活性化していると考えられる。

野生型 TRPV3 を持つ DS マウスの皮膚組織のマスト細胞数は、DS-*Nh* マウスに比較して出生直後は変わらないものの、日数が経つに従い減少が見られた (Figure 12b)。この結果は、熱刺激により活性化した TRPV3 は皮膚のマスト細胞数を維持することに働き、胎内ではその働きにより皮膚のマスト細胞数は多く保たれているが、出生後は環境温度の低下から TRPV3 の不活性状態となり、マスト細胞数は減少する。一方変異 TPRV3 を持つ DS-*Nh* マウスでは、環境温度でも TRPV3 が活性化状態にあり、そのためにマスト細胞数が多く維持されている、と言う仮説を支持するものである。

加えて、ヒトの TRPV3 は皮膚の毛包周辺に発現しており (Xu *et al.*, 2002)、また TRPV3 欠損マウスでは体毛異常を起こすことが報告されている (Moqrich *et al.*, 2005)。これらの報告は TRPV3 が正常な体毛成長に何らかの役割を果たしていることを示唆している。

2. WBN/Kob-*Ht* ラットと DS-*Nh* マウスの皮膚炎の類似性について

WBN/Kob-*Ht* ラットは無毛で皮膚炎を自然発症するラットであり、その皮膚炎発症には黄色ブドウ球菌が関与していることが知られている (Tani *et al.*, 1998) が、組織学的な詳細は明かなっていない。そこで本研究では、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の組織学的状態を調べた。その結果、(1) 黄色ブドウ球菌が皮膚炎領域から単離された。(2) IgE と IL-4 の血中濃度が著しく増加している。(3) マスト細胞と CD4 産生 T 細胞の数が著しく増加していた。以上の点で DS-*Nh* マウス (Hikita *et al.*, 2002)、あるいはヒトの AD (Laberge *et al.*, 1998; Leyden *et al.*, 1974; Roosje *et al.*, 2002; Sampson, 1990) と類似していた。

これらの特徴は、 TRPV3^{Gly573Ser} を導入したトランスジェニックマウスについても見られ、これらの形質が TRPV3 の変異によって起こることを示している。

一方、相違点も存在した。皮膚炎を発症している DS-*Nh* マウスから単離されるすべての黄色ブドウ球菌は SE を分泌していた (Yoshioka *et al.*, 2003) が、

WBN/Kob-*Ht* ラットから単離された黄色ブドウ球菌ではスーパー抗原 (SEA, SEB, SEC, SED, SEE そして toxic shock syndrome toxin) を分泌しなかった (data not shown)。加えて、好酸球の数はコンベ下で飼育したラットでのみ大幅に増加したが、マウスでは増加が見られなかった。

また、トランスジェニックマウスにおいては SPF 環境下での皮膚炎発症という相違点があった。

これらの相違点は、TRPV3^{Gly573Ser} と TRPV3^{Gly573Cys} の機能の違い、発現量の違いによることが考えられるが、DS-*Nh* マウスと WBN/Kob-*Ht* ラットにおいては、動物種、親株の遺伝的背景の違いが影響していることも考えられる。

3. C57BL 遺伝背景下での TRPV3^{Gly573Ser} の影響について

AD における免疫異常として、ヘルパー T 細胞のバランスが Th2 側にシフトしていることが知られている (Cho *et al.*, 2001; Kaminishi *et al.*, 2002)。Th2 は液性免疫に関与し、Th1 は細胞性免疫に関与している (Mosmann, 1992) が、多くの微生物に対する感染防御反応が Th1 に依存していることから、AD の病変部位において細菌感染が起こりやすくなるといわれている (Baker, 2006)。DS-*Nh* マウスおよびトランスジェニックマウスの親株である DS マウスは Th2 優性のバランスを持っており (Hikita *et al.*, 2002)、どちらかといえば AD に親和性の高いバックグランドであると考えられる。

この、遺伝的バックグラウンドの違いによる TRPV3^{Gly573Ser} の皮膚炎への関与を調べるため、戻し交配によって C57BL/6 マウスに *Nh* 変異を導入した。7 世代以上の戻し交配により、遺伝的バックグランドはほぼ C57BL/6 であると考えられる C57BL-*Nh* を作成した。

この C57BL-*Nh* マウスは、無毛であるが、コンベンショナル環境下においても皮膚炎を発症しなかった。トランスジェニックマウスの結果から TRPV3^{Gly573Ser} が無毛と皮膚炎の原因であることが示されているので、C57BL-*Nh* マウスが皮膚炎を発症しないのは、C57BL/6 の遺伝的バックグランドが原因であると考えらえる。AD の発症にはアトピー素因と呼ばれる遺伝的バックグラウンドが必須であるが、ヒトにおいて AD の発症率と関連している遺伝子がマスト細胞キマーゼ (Iwanaga *et al.*, 2004; Pascale *et al.*, 2001)、高親和性 IgR 受容体 (Fc ε RI) (Cox *et al.*, 1998; Iizuka *et al.*, 2002)、RANTES/CCL5 (Bai *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006)、IL-4 (Kawashima *et al.*, 1998b; Söderhäll *et al.*, 2002)、IL-12 (Takahashi *et al.*, 2005)、IL-18 (Kim *et al.*, 2007), IL-4 受容体など多数報告されていること、そして、これらの遺伝子に関しても関連の欠

如 (RANTES (Kozma *et al.*, 2002)、マスト細胞キマーゼ (Kawashima *et al.*, 1998a)、IL-4 (Chang *et al.*, 2006)) も報告されていることは、この遺伝的バックグラウンドが単一の遺伝子によるものではなく、多数の遺伝子多型が複合的に少しずつ影響し合っているものであることを示唆する。

その中でも、C57BL-*Nh* マウスは、皮膚炎の発症は見られなかったが、コンベンショナル環境下においてかゆみを示すスクラッチ行動の増加が見られた (Figure 16)。このことは、TRPV3^{Gly573Ser} が C57BL/6 マウスの遺伝的バックグランドにおいてもかゆみの発生に関与していることを示すのみならず、TRPV3^{Gly573Ser} の誘発する皮膚炎が、かゆみを起点として発症することを示唆している。

4. 無毛、皮膚炎形質のメカニズムについて

DS-*Nh* マウス、WBN/Kob-*Ht* ラットでは、皮膚炎を発症していない状態でも、それぞれの親株と比べて有毛無毛の表現型の他に皮膚領域における形態的変化 (Figure 8)、およびマスト細胞数 (Figure 9)、ヒスタミン濃度の上昇 (Figure 10)などの差異が認められた。また、トランスジェニックマウスでは、温度刺激に対する NGF の産生が DS マウスよりも高く、皮膚における NGF にも顕著な差が見られた (Figure 15)。

4-1 無毛形質について

- マスト細胞数の増加に関して

DS-*Nh* マウスと WBN/Kob-*Ht* ラットは、5 週齢において、その親株と比べてマスト細胞数の増加を示した (Table 2)。しかしながら、マスト細胞は体毛成長に関して必要とは思われない、なぜならマスト細胞欠損マウスは正常な体毛発達を示しているからである (Mukai *et al.*, 2005)。いくつかの研究グループが組織リモデリングに際してのマスト細胞の一般的な役割を提唱している (Irani *et al.*, 1992; Kendall *et al.*, 1997; Levi-Schaffer, 1995)。また、マスト細胞の体毛成長のコントロールへの関与を強力に示唆する報告もある (Maurer *et al.*, 1997; Sundberg, 1994)。例えば、Asebia マウスはほとんどヘアレスであり、皮膚でのマスト細胞数の顕著な増加が見られる (Brown and Hardy, 1988)。加えて、hr/hr, nu/nu マウスといった無毛のマウスでも、皮膚のマスト細胞数が BALB/c と比べて多いという報告もある(Keller *et al.*, 1976; Sundberg, 1994)。さらに、ヒトにおいてマスト細胞が毛髪欠損の発生に関与するという臨床的示唆も存在する (Fiedler and Alaiti, 1996; Lattanand and Johnson, 1975; Xu

et al., 2003)。

- 無毛表現型に関して

体毛発生において、成長期に入る直前、皮膚領域のヒスタミンレベルが一時的に上昇する。そして、体毛成長が始まる頃に通常の濃度に戻ることが報告されている (Hamada and Suzuki, 1996)。実際に、DS マウスのヒスタミンレベルは、0 週で一時的に 1，2，3 週齢と比べると高い (Figure 10)。筆者は、この一時的なヒスタミン濃度の上昇は、誕生後の正常の体毛成長に重要であると考えた。一方で、DS-*Nh* マウスの場合には、いずれの週齢でも DS マウスのヒスタミンレベルよりも高く、また、0 週齢においての一時的なヒスタミン濃度の増加も見られない。この、高い濃度でのヒスタミンの推移が、DS-*Nh* マウスの無毛形質を引き起こしていると考えられる。AD 様皮膚炎の視点から見ると、低マグネシウムダイエットした HR-1 マウスにおいて、ヒスタミンの濃度の上昇がひっかき行動を通して AD 様の兆候を誘導するという報告があり (Hossen *et al.*, 2005)、この症状は DS-*Nh* マウスにおける皮膚炎と類似している。

DS-*Nh* マウスのヒスタミンレベル上昇のメカニズムは明らかになっていないが、ヒスタミンはケラチノサイトの NGF 産生を H1 レセプターの活性化を通して誘導することが出来る (Kanda and Watanabe, 2004)。ヒスタミンの役割と NGF のヘアレスへの関与から、皮膚での NGF の高い濃度は成長期への移行や成長期の保持を通じて、体毛生育サイクルに重要な役割を果たしていると考えられる。体毛生育サイクルにおける成長期の延長はマウスでヘアレスと関連があると報告されている。筆者は TRPV3 の変異の有無における毛包の様子示した (Figure 9a)。筆者の結果は変異体の毛包は成長期にあり、野生株ではそうでないことを示している。これらのことから、TRPV3 の活性の増大は、皮膚領域での高濃度のヒスタミン NGF の産生を通じて、異常な体毛成長に関連しており、成長期の延長がヘアレスを起こすと考えられる。

4-2 皮膚炎発症について

マスト細胞は IgE を介した I 型アレルギー反応に深く関与している (Miescher and Vogel, 2002; Robinson, 2000)。マスト細胞内にはヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターと呼ばれる各種化学伝達物質があり、マスト細胞表面に結合した IgE と抗原の結合により引き起こされる脱顆粒によりヒスタミンなどケミカルメディエーターの放出が起こり、アレルギー反応が惹起される。放出されたヒスタミン、セロトニンなどのケミカルメディエーターは血管拡張、透過性昂進などを起こ

し、浮腫、掻痒などの症状が起こると考えられている。

また、ヒスタミンはケラチノサイトの NGF 産生を H1 レセプターの活性化を通して誘導することが出来る (Kanda and Watanabe, 2003)。最近、いくつかの研究グループが NGF は AD の発達に重要な役割をしていると示唆した (Tanaka and Matsuda, 2005; Toyoda *et al.*, 2002)。また、TRPV3 の発現量の増大はケラチノサイトの NGF 産生に影響を及ぼすと考えられている (Gopinath *et al.*, 2005)。この説によれば、常時活性化状態にある TRPV3 を持つトランスジェニックマウスでの高濃度の NGF が説明できる。

さらに、血中および皮膚での NGF 濃度は、DS-*Nh* マウスが皮膚炎を発症している時のみ上昇し、皮膚炎を発症していない DS-*Nh* マウスや DS マウスでは上昇していないことが示された (Yoshioka *et al.*, 2006)。DS-*Nh* マウスの NGF レベルは、H-1 アンタゴニストにより、ケラチノサイトからの NGF 産生阻害を通して減少する。そしてその減少は、皮膚の AD 様皮膚炎を改善することが示された (Yoshioka *et al.*, 2006)。

4-3 かゆみについて

抗かゆみ剤として用いられる loraladine (Yoshioka *et al.*, 2006), Eurax Cream (Scheinfeld, 2004) などの投与により、マウスにおいてスクラッチ行動の減少が見られるため、スクラッチ行動は、かゆみの強弱を反映していると考えられる。また、無毛マウスのスクラッチ行動と皮膚の損傷は、AD 患者に見られる慢性的なかゆみによるそれと似ているとの報告もある (Ueda *et al.*, 2006)。さらに、コンパウンド 48／80 およびサブスタンス P の注射によるスクラッチ行動はかゆみによるもので痛みによるものではないこと、そしてこのスクラッチ行動は抗かゆみ剤の生理学的、薬理学的評価に有用な指標であるであることが報告され (Kuraishi *et al.*, 1995)、かゆみと痛みの分子機構が異なることが示唆されている。これらの理由から、筆者は、これらのマウスにおけるスクラッチ行動はかゆみの評価によいツールであると考えている。

かゆみは AD の典型的な症状であり (Kimura and Miyazawa, 1989; Wahlgren, 1999)、かゆみとそれに伴うスクラッチ行動の低減は、AD 患者の皮膚の損壊を防ぎ、クオリティオブライフの向上に最適なアプローチであると認識されるようになってきている (Koblenzer, 1999)。興味深いことに、ケラチノサイトの TRPV3 は、生理学的な温度刺激（31 度以上）(Xu *et al.*, 2002)、炎症仲介物質 (Hu *et al.*, 2006)、そして nitric oxide (Yoshioka *et al.*, 2006) などで活性化される。これらの事実を考えるに、炎症性の皮膚炎部位で活性化されている TRPV3 は、NGF の産生誘導を通じて AD 患者

のかゆみにダイレクトに関係していると仮定するのが妥当であると考えられる。

TRPV3 の役割と関与に関する筆者の仮説を検証するため、筆者は Th1 優位でアレルギー性皮膚炎に耐性を持つ C57BL/6 マウス (Betts and Wilson, 1998) を遺伝的バックグラウンドに持つ C57BL-*Nh* マウスを作成した。C57BL-*Nh* マウスは DS-*Nh* マウスと異なり、コンベンショナル環境下においても皮膚炎を発症しなかったものの、スクラッチ行動は顕著に増加した。遺伝的バックグラウンドにより、皮膚炎は起こさないがかゆみを感じている状態を TRPV3 の *Nh* 変異が創り出したことは、DS-*Nh* マウスにおいても、かゆみの誘発それ自体が皮膚炎発症に重要な役割を果たしていることを示唆する。

それ故、TRPV3 はかゆみの発達に重要な役割を果たしていると考えられる。

現在のところ、TRPV3^{Gly573Ser} の人での発見や、遺伝的調査による TRPV3 とアトピー性皮膚炎の関連を示唆する報告はなされていない。しかしながら、TRPV3 の活性昂進と皮膚におけるマスト細胞数の増加、ヒスタミン濃度上昇の関連が強く示唆されることから、野生型の TRPV3 においても、その活性を調節することにより皮膚炎の発症、増悪を抑制できる可能性がある。

まとめ

DS-*Nh* マウスは、ヒト AD 様の皮膚炎をコンベンショナル環境下に自然発症することが知られる無毛マウスで、筆者の過去の報告により AD モデルマウスとして提唱されている (Yoshioka *et al.*, 2003)。また、その無毛形質は常染色体優性遺伝をし、11 番染色体上に原因遺伝子が存在し、皮膚炎発症の形質も密接に連鎖することが所属研究グループにおいて過去に報告されている (Watanabe *et al.*, 2003b)。

本研究において、筆者は、DS-*Nh* マウスにおける、ヒトの AD と類似の症状を示す AD 様皮膚炎の発症機構の解明と、それを通じてのヒト AD の新たな治療用標的分子の発見のために、DS-*Nh* マウスの変異遺伝子をポジショナルクローニングにより決定し、その遺伝子変異の皮膚炎に対する影響について調べた。

その結果、以下の知見が得られた。

1, DS-*Nh* マウスの TRPV3 において、Gly573Ser のアミノ酸置換を伴う 1 塩基の突然変異を見いだした。

2、DS-*Nh* マウスと同様、無毛・皮膚炎自然発症の表現型を持つ WBN/Kob-*Ht* ラットの TRPV3 遺伝子についても、TRPV3 遺伝子上の *Nh* 変異と同じ位置に変異が見いだされた。こちらはシステインへの置換であった。

3, 同じ位置への遺伝子変異を持つ動物が自然発症する皮膚炎として、WBN/Kob-*Ht* ラットの皮膚炎の病理学的解析を行い、DS-*Nh* マウスおよびヒト AD 患者の皮膚炎と類似のものであることを示した。

4, 皮膚炎発症以前の TRPV3 変異による皮膚組織の変化として、毛包数の増加などの皮膚の組織学的変化、マスト細胞数、ヒスタミン濃度の増加などを見いだした。さらに、変異 TRPV3 を発現しているケラチノサイトを用いての電気生理学的解析により、変異 TRPV3 は熱刺激に対する活性が昂進していることを示した。

5, TRPV3 の変異と無毛、皮膚炎表現型の関連を直接的に証明するため、変異 TRPV3 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスは一部無毛のまだらな体毛を持ち、DS-*Nh* マウスでは皮膚炎を発症しない SPF 環境下でも皮膚炎を発症した。皮膚炎の様子は、DS-*Nh* マウスのそれと類似していた。

6, また、トランスジェニックマウスでは DS-*Nh* マウスと同様に、皮膚の NGF 濃度が上昇しており、皮膚領域での神経細胞数の上昇が見られた。

7, 一方で、C57BL を遺伝的背景として *Nh* 変異を持つ C57BL-*Nh* マウスは、コンベンショナル環境下においても皮膚炎を自然発症しないことを示した。しかしながらこのマウスは、コンベンショナル環境下においてかゆみを示すスクラッチ行動の上昇が見られた。

今回得られた知見より、DS-*Nh* マウスにおける皮膚炎の発症は、以下のようにして起こると考えられる。

すなわち、TRPV3 の *Nh* 変異体は、野生型 TRPV3 よりも温度刺激に感受性が強く、通常状態の皮膚でも活性化状態にある。そのために野生株で起こる、出生後の環境温度低下による TRPV3 の非活性化状態への移行とそれに伴うマスト細胞の減少が起こらず、アレルギー刺激に対して敏感な状態を保つと共に、ヒスタミンの高濃度状態を保つ。高濃度のヒスタミンおよび/または TRPV3 の活性化は、ケラチノサイトの NGF 産生を誘導し、高濃度の NGF は神経細胞を誘導して、かゆみを誘発する。かゆみに対するマウスのスクラッチ行動が皮膚の損壊、細菌感染を起こし、皮膚炎が憎悪する。

それゆえ、TRPV3 の活性は、*Nh* 変異の有無にかかわらず AD の発症に深く関与していると考えられる。そのため、TRPV3 の活性を適切に調節することは、質の高い AD 治療法となることが考えられる。

よって、今回の研究の成果として、TRPV3 をアトピー性皮膚炎の新たな治療ターゲットとして提唱する。

文献

主要論文

1. Asakawa M, Yoshioka T, Hikita I, Matsutani T, Hirasawa T, Arimura A, Sakata T, Horikawa T: WBN/Kob-*Ht* rats spontaneously develop dermatitis under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. Experimental Animals, 54:461-5, 2005

2. Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, Sakata T : Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. Journal of Investigative Dermatology, 126:2664-72, 2006

3. Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, Suzuki M, Oshima I, Hirasawa T, Sakata T, Horikawa T, Arimura A : Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. Journal of Investigative Dermatology, 129:714-22, 2009

参照文献

Akimoto T, Suzuki H, Nakama K, Suzuki K (2000) Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. *Exp Anim* 49:137-40.

Bai B, Tanaka K, Tazawa T, Yamamoto N, Sugiura H (2005) Association between RANTES promoter polymorphism -401A and enhanced RANTES production in atopic dermatitis patients. *J Dermatol Sci* 39:189-91.

Baker B (2006) The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 144:1-9.

Betts C, Wilson R (1998) Th1 cytokine mRNA expression dominates in the skin-draining lymph nodes of C57BL/6 mice following vaccination with irradiated Schistosoma mansoni cercariae, but is down-regulated upon challenge infection. *Immunology* 93:49-54.

Bradley M, Kockum I, Söderhäll C, Van Hage-Hamsten M, Luthman H, Nordenskjöld M*, et al.* (2000) Characterization by phenotype of families with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 80:106-10.

Brown W, Hardy M (1988) A hypothesis on the cause of chronic epidermal hyperproliferation in asebia mice. *Clin Exp Dermatol* 13:74-7.

Caterina M, Rosen T, Tominaga M, Brake A, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-41.

Chang Y, Lee W, Yu C, Liu H, Lin M, Huang C*, et al.* (2006) No association of cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 31:419-23.

Cho S, Strickland I, Tomkinson A, Fehringer A, Gelfand E, Leung D (2001) Preferential binding of Staphylococcus aureus to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol* 116:658-63.

Chung M, Lee H, Caterina M (2003) Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308

keratinocytes. *J Biol Chem* 278:32037-46.

Chung M, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina M (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24:5177-82.

Coleman R, Trembath R, Harper J (1997) Genetic studies of atopy and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 136:1-5.

Cox H, Moffatt M, Faux J, Walley A, Coleman R, Trembath R*, et al.* (1998) Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br J Dermatol* 138:182-7.

Di Palma F, Belyantseva I, Kim H, Vogt T, Kachar B, Noben-Trauth K (2002) Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14994-9.

Fiedler V, Alaiti S (1996) Treatment of alopecia areata. *Dermatol Clin* 14:733-7.

Fukai K, Hosomi N, Oiso N, Kato A, Ishii M, Kunimoto H*, et al.* (2004) Proximal promoter polymorphisms of the interleukin-4 receptor alpha are associated with psoriasis in Japan: inverse association pattern compared with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 35:78-80.

Furue M, Saeki H, Furukawa F, Hide M, Ohtsuki M, Nakamura T*, et al.* (2008) Guideline for Management of Atopic Dermatitis. *Jpn J Dermatol* 118:325 - 42.

Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis J, Smith G*, et al.* (2005) Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Womens Health* 5:2.

Hamada K, Suzuki K (1996) Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. *Exp Anim* 45:251-6.

Hikita I, Yoshioka T, Mizoguchi T, Tsukahara K, Tsuru K, Nagai H*, et al.* (2002) Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*

30:142-53.

Hossen M, Fujii Y, Ogawa M, Takubo M, Tsumuro T, Kamei C (2005) Effect of loratadine on mouse models of atopic dermatitis associated pruritus. *Int Immunopharmacol* 5:1331-6.

Hu H, Xiao R, Wang C, Gao N, Colton C, Wood J*, et al.* (2006) Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids. *J Cell Physiol* 208:201-12.

Iizuka M, Katsuyama Y, Mabuchi T, Umezawa Y, Matsuyama T, Ozawa A*, et al.* (2002) Genetic association analysis using microsatellite markers in atopic dermatitis. *Tokai J Exp Clin Med* 27:51-6.

Irani A, Gruber B, Kaufman L, Kahaleh M, Schwartz L (1992) Mast cell changes in scleroderma. Presence of MCT cells in the skin and evidence of mast cell activation. *Arthritis Rheum* 35:933-9.

Isidoro-García M, Davila I, Moreno E, Laffond E, Lorente F, González-Sarmiento R (2005) [IL4RA gene polymorphism (Q576R) is associated with higher total IgE levels in Spanish patients with family history of atopy]. *Med Clin (Barc)* 124:211-2.

Iwanaga T, McEuen A, Walls A, Clough J, Keith T, Rorke S*, et al.* (2004) Polymorphism of the mast cell chymase gene (CMA1) promoter region: lack of association with asthma but association with serum total immunoglobulin E levels in adult atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 34:1037-42.

Kaminishi K, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M (2002) Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *J Dermatol Sci* 29:19-25.

Kanda N, Watanabe S (2003) Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 121:570-7.

Kanda N, Watanabe S (2004) Histamine enhances the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via protein kinase Calpha and

extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:863-72.

Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Kobayashi K, Otsuka F, Hamaguchi H (1998a) No evidence for an association between a variant of the mast cell chymase gene and atopic dermatitis based on case-control and haplotype-relative-risk analyses. *Hum Hered* 48:271-4.

Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F*, et al.* (1998b) Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 35:502-4.

Keller R, Hess M, Riley J (1976) Mast cells in the skin of normal, hairless and athymic mice. *Experientia* 32:171-2.

Kendall J, Li X, Galli S, Gordon J (1997) Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J Allergy Clin Immunol* 99:113-23.

Kim E, Lee J, Namkung J, Park J, Kim S, Shin E*, et al.* (2007) Association of the single-nucleotide polymorphism and haplotype of the interleukin 18 gene with atopic dermatitis in Koreans. *Clin Exp Allergy* 37:865-71.

Kimura T, Miyazawa H (1989) The 'butterfly' sign in patients with atopic dermatitis: evidence for the role of scratching in the development of skin manifestations. *J Am Acad Dermatol* 21:579-80.

Koblenzer C (1999) Itching and the atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 104:S109-13.

Kono Y, Yamamoto S (2008) *Guideline for Management of Atopic Dermatitis 2008.*

Kozma G, Falus A, Bojszkó A, Krikovszky D, Szabó T, Nagy A*, et al.* (2002) Lack of association between atopic eczema/dermatitis syndrome and polymorphisms in the promoter region of RANTES and regulatory region of MCP-1. *Allergy* 57:160-3.

Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M (1995) Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 275:229-33.

Laberge S, Ghaffar O, Boguniewicz M, Center D, Leung D, Hamid Q (1998) Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 102:645-50.

Lattanand A, Johnson W (1975) Male pattern alopecia a histopathologic and histochemical study. *J Cutan Pathol* 2:58-70.

Levi-Schaffer F (1995) Mast cell/fibroblast interactions in health and disease. *Chem Immunol* 61:161-85.

Leyden J, Marples R, Kligman A (1974) Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 90:525-30.

Matsuda H, Watanabe N, Geba G, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J*, et al.* (1997) Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9:461-6.

Maurer M, Fischer E, Handjiski B, von Stebut E, Algermissen B, Bavandi A*, et al.* (1997) Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab Invest* 77:319-32.

Miescher S, Vogel M (2002) Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med* 23:413-62.

Montgomery J, Silverman K, Buchberg A (1997) Chromosome 11. *Mamm Genome* 7 Spec No:S190-208.

Moqrich A, Hwang S, Earley T, Petrus M, Murray A, Spencer K*, et al.* (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307:1468-72.

Mosmann T (1992) T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci* 664:89-92.

Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K*, et al.* (2005) Basophils

play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* 23:191-202.

Pascale E, Tarani L, Meglio P, Businco L, Battiloro E, Cimino-Reale G*, et al.* (2001) Absence of association between a variant of the mast cell chymase gene and atopic dermatitis in an Italian population. *Hum Hered* 51:177-9.

Peier A, Moqrich A, Hergarden A, Reeve A, Andersson D, Story G*, et al.* (2002a) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-15.

Peier A, Reeve A, Andersson D, Moqrich A, Earley T, Hergarden A*, et al.* (2002b) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046-9.

Robinson D (2000) Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull* 56:956-68.

Roosje P, Dean G, Willemse T, Rutten V, Thepen T (2002) Interleukin 4-producing CD4+ T cells in the skin of cats with allergic dermatitis. *Vet Pathol* 39:228-33.

Sampson H (1990) Atopic dermatitis and cromolyn. *Clin Exp Allergy* 20:243-4.

Scheinfeld N (2004) Controlling scabies in institutional settings: a review of medications, treatment models, and implementation. *Am J Clin Dermatol* 5:31-7.

Sundberg J (1994) *Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities; animal models and biomedical tools*, 1st edn. CRC press: New York.

Söderhäll C, Bradley M, Kockum I, Luthman H, Wahlgren C, Nordenskjöld M (2002) Analysis of association and linkage for the interleukin-4 and interleukin-4 receptor b;alpha; regions in Swedish atopic dermatitis families. *Clin Exp Allergy* 32:1199-202.

Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K*, et al.* (2005) Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet* 14:3149-59.

Tanaka A, Matsuda H (2005) Expression of nerve growth factor in itchy skins of atopic

NC/NgaTnd mice. *J Vet Med Sci* 67:915-9.

Tanaka K, Roberts M, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Hopkin J (2006) Upregulating promoter polymorphisms of RANTES relate to atopic dermatitis. *Int J Immunogenet* 33:423-8.

Tani S, Noguchi M, Hosoda Y, Sugibayasi K, Morimoto Y (1998) Characteristics of spontaneous erythema appeared in hairless rats. *Exp Anim* 47:253-6.

Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R (1998) Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* 13:2122-5.

Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M (2002) Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 147:71-9.

Ueda Y, Inoue T, Rahman M, Yatsuzuka R, Jiang S, Kamei C (2006) A new chronic itch model accompanied by skin lesions in hairless mice. *Int Immunopharmacol* 6:1609-15.

Wahlgren C (1999) Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol* 26:770-9.

Watanabe A, Takeuchi M, Nagata M, Nakamura K, Hirasawa T, Nakao H*, et al.* (2003a) Spontaneous development of dermatitis in DS-Nh mice under specific pathogen-free conditions. *Exp Anim* 52:77-80.

Watanabe A, Takeuchi M, Nagata M, Nakamura K, Nakao H, Yamashita H*, et al.* (2003b) Role of the Nh (Non-hair) mutation in the development of dermatitis and hyperproduction of IgE in DS-Nh mice. *Exp Anim* 52:419-23.

Watanabe O, Natori K, Tamari M, Shiomoto Y, Kubo S, Nakamura Y (1999) Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis. *J Hum Genet* 44:173-6.

Wright E, Young G, Goldstein M (1997) Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 50:257-9.

Xu H, Ramsey I, Kotecha S, Moran M, Chong J, Lawson D*, et al.* (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181-6.

Xu X, Solky B, Elenitsas R, Cotsarelis G (2003) Scarring alopecia associated with mastocytosis. *J Cutan Pathol* 30:561-5.

Yoshioka T, Hikita I, Asakawa M, Hirasawa T, Deguchi M, Matsutani T*, et al.* (2006) Spontaneous scratching behaviour in DS-Nh mice as a possible model for pruritus in atopic dermatitis. *Immunology* 118:293-301.

Yoshioka T, Hikita I, Matsutani T, Yoshida R, Asakawa M, Toyosaki-Maeda T*, et al.* (2003) DS-Nh as an experimental model of atopic dermatitis induced by Staphylococcus aureus producing staphylococcal enterotoxin C. *Immunology* 108:562-9.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ひとかたならぬご指導をいただいた、坂田恒昭教授ならびに神戸大学の先生方、ありがとうございました。

塩野義創薬研究所の吉岡さん、疋田さん、平沢さんを始めとする共同研究者の方々。根気強いご指導と叱咤激励、本当にありがとうございました。

私に科学の面白さとその基礎を叩き込んでくれた、東京理科大学の瀬戸裕之教授と、金沢大学の山口和男教授。出来の悪い生徒でしたが、先生の教えは忘れることがありません。ありがとうございました。

公私ともに支え合った同級生の井村君と森元さん。私一人では挫折していたかも知れません。ありがとうございました。

堀川先生を始めとして、神戸大学に入学する以前から、この研究に携わっていただいたすべてのかたに、心から御礼申し上げます。