【総 説】

5. *Inaba* ラット：疾患発症時期がヒトと類似している アトピー性皮膚炎モデルトランスジェニックラット

金子 涼 輔^{1,2,3)} 加 藤 めぐみ¹⁾ 石 川 綾 子¹⁾
平 林 敬 浩^{1,2,3)} 濱 田 俊^{2,3)} 八 木 健^{1,2,3)}
平 林 真 澄¹⁾

自然科学研究機構 生理学研究所¹⁾, 大阪大学大学院 生命機能研究科²⁾,
科学技術振興機構 CREST³⁾

Inaba Rat: Transgenic Atopic Dermatitis-like Rat Model

Ryosuke KANEKO^{1,2,3)}, Megumi KATO¹⁾, Ayako ISHIKAWA¹⁾,
Takahiro HIRABAYASHI^{1,2,3)}, Shun HAMADA^{2,3)},
Takeshi YAGI^{1,2,3)} and Masumi HIRABAYASHI¹⁾

*National Institute for Physiological Sciences¹⁾,
Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University²⁾,
CREST of Japan Science and Technology Agency³⁾*

Summary

Atopic dermatitis (AD) is one of the most common and severe skin diseases, and is primarily a disease of infancy and childhood. Although a number of mouse models for human AD have been developed, they all have significant disadvantage, such as a different timing of onset and remission from human AD. We generated transgenic (Tg) rats overexpressing telomerase in ubiquitous tissues. The Tg rats developed skin lesions that are in accordance with those of human AD, and this Tg rats was named '*Inaba*'. Clinical signs and symptoms seen in Tg rats began at 2 weeks of age with superficial erosion and deep excoriation followed by itching, erythema, hemorrhage, edema, scaling and dryness of the skin. Their skin lesion was begun to improve by 8 weeks of age. The *Inaba* rats showed elevated serum IgE. The histopathological examination of dorsal skin of *Inaba* rat revealed significant histologic changes, including hyperkeratosis, acanthosis, parakeratosis, telangiectasia, spongiosis, and infiltration of inflammatory cells were observed. Thus, we consider that *Inaba* rat is a useful model to investigate the pathogenesis of AD especially appeared in infancy to childhood, and to develop a new generation of therapeutic strategies for the intervention of allergic diseases.

緒 言

アトピー性皮膚炎 (AD) は皮膚炎における代表的な疾患であり、乳児期から小児期にかけて発症することが多い。多くの AD は小児期までに治癒してゆくが、一部の患者においては成人になっても皮膚炎が持続する。AD 症状が年齢とともに変化するという事実

は広く知られているが、その変化のもととなる分子基盤はほとんど解明されていない¹⁾。

AD の病因や病態の理解には種々の AD モデル動物が大きく貢献してきた。純系モデルマウスである NC/Nga マウス²⁾ は松田らによって 1997 年に報告されて以来、有用な AD モデル動物として市販もされて

おり広く用いられている。この他の純系モデルマウスとしては NOA マウス³⁾ や DS-Nh マウス⁴⁾ も重要である。また、通常のマウスに対してハプテンを塗布することによって皮膚炎を誘発するモデル実験系も報告されている⁵⁾。さらに近年では遺伝子工学技術の発展に伴って種々の遺伝子改変マウスが作成されている。例えば IL-18 トランスジェニックマウス⁶⁾、RelB ノックアウトマウス⁷⁾、カテプシン E ノックアウトマウス⁸⁾、MAIL ノックアウトマウス⁹⁾ などが近年報告された。今後、ここに挙げたような種々のモデルマウスを用いた解析によって AD の病因や病態の理解が進むと思われる。しかしながら、これら全てのモデルマウスにはヒトの病態とは異なる点や解析には不利な点が存在する。それは、冒頭で述べたようにヒトのアトピー性皮膚炎の多くは乳児期から小児期にかけて発症するのだが、これらモデルマウスの発症時期はいずれも成体になってからであり発症時期がヒトの場合と異なるのは問題と考えられる。さらに、マウスの体サイズは小さいために、血液サンプルを繰り返し採取することは困難である。したがって、AD 症状の経年変化の分子基盤を明らかにし、そしてまた AD 全般の病因や病態の理解をさらに深めるためには、これらの欠点を克服しうようなモデル動物が必要となると思われる。

一方、最近アトピー性皮膚炎患者の T 細胞においてテロメラーゼ活性が上昇していることが報告された¹⁰⁾。テロメラーゼとは染色体末端のテロメア配列に TTAGGG という配列を付加する酵素であり、細胞分裂に伴うテロメア配列の減少を妨げる活性を持つ。テロメア配列の減少は老化やガン化との関わりが指摘されており、その関係の研究が数多くなされている¹¹⁾。しかしながら、アトピー性皮膚炎におけるテロメラーゼの役割はほとんど調べられていない。そこで、我々はテロメラーゼのアトピー性皮膚炎における役割を調べるとともに、先に述べた欠点を克服しうような動物モデルを作製することを目的として、テロメラーゼ過剰発現トランスジェニック (Tg) ラットの作製を試みた。

ラットテロメラーゼ遺伝子のクローニングと Tg ラットの作製

研究を開始した時点においてはヒトやマウス、酵母などいくつかの種においては報告されていたものの、ラットにおいては全長 cDNA の報告はなかった。そ

Fig. 1 The schematic drawing of transgene. Abbreviations: CAG; CAG promoter, rTERT; rat telomerase reverse transcriptase, ires; internal ribosomal entry site, tauGFP; tau-tagged GFP, pA; poly A site.

こで、RT-PCR 法を用いてラット精巣 cDNA からラットテロメラーゼ遺伝子 (rat telomerase reverse transcriptase catalytic subunit, GenBank No. AY539717) をクローニングすることから始めた。クローニングしたラットテロメラーゼ遺伝子は DNA 配列をラットゲノム配列と比較することによってクローニングした配列が正しいものであることを確認し、さらに培養細胞への強制発現によってテロメラーゼタンパク質の発現およびテロメラーゼ活性の増加を確認した後に、Fig. 1 に示す発現コンストラクトを作製した。このコンストラクトでは CAG プロモーター¹²⁾ によってラットテロメラーゼ遺伝子が強力かつ恒常的に発現されるのみでなく、マーカー遺伝子として tau-tagged GFP¹³⁾ を共発現できるように設計されている。発現ユニットを制限酵素 SalI および XhoI によって切断後、精製を行い、高橋らの方法¹⁴⁾ にしたがって Wistar ラット前核期受精卵にマイクロインジェクションを行った。323 個の受精卵に注入し、得られた 49 匹の産仔のうち 4 匹に外来遺伝子が導入されていた。不幸にも、これら 4 匹のうち 3 匹は不妊であった。しかしながら、残る 1 匹 (founder) は仔を作ることができ、次世代 (G1) への導入遺伝子の伝達も確認されたため、このラインを用いて以下の実験を行った。また、このラインではテロメラーゼ活性の増加が脾臓、胸腺、精巣で確認されたことから、目論み通りにテロメラーゼの過剰発現が達成されたと思われる。

Inaba ラットの皮膚病変

次に、Tg ラットが皮膚病変を発症するか否かを検討した。まず、第一世代である founder 個体を観察したところ、2 週齢頃から背側部の皮膚に異変が認められた。その後、3 週齢頃には背側部において脱毛および出血が観察された。4 週齢から 5 週齢にかけては、首から背側部、生殖器付近にわたる広い範囲で脱毛と

Fig. 2 Clinical skin features of skin lesions in *Inaba* rats. Transgenic (Tg) and wild-type (wt) female rats, 4 weeks of age.

出血が認められた。その後は症状が軽減してゆき、20週齢をすぎる頃にはよほど注意深く観察しなければ皮膚病変を認めることができなくなった。この founder 個体を野生型 Wistar ラットと交配させて G1 世代を得て、その後は、皮膚炎を発症している Tg 個体同士の兄妹交配を続けることによってラインの維持を行った。ここで得られた G1 世代～G5 世代には Tg 個体が 89 匹いたのだが、その中で 50 匹が founder 個体と同様の皮膚炎を発症した（発症率 56%）。その一方で、Tg 個体と同一ケージで飼育していた同腹の野生型個体では 1 匹も皮膚炎を発症しなかった (Fig. 2)。これらのことから本 Tg ラットは皮膚炎を発症することが明らかとなった。そこで、日本の神話「因幡の白うさぎ」に因んで、本 Tg ラットのことを *Inaba* ラットと名付けることにした。

Inaba ラットの皮膚炎は表皮の浸食や剥脱から始まり、その後、かゆみ、紅班、出血、浮腫、皮膚の乾燥などが見られる。皮膚炎の重症度を数値化¹⁵⁾したグラフを Fig. 3 に示す。このグラフが示すように、*Inaba* ラットの皮膚炎は 4 週齢時点で最も重症であり、その後は軽減してゆく。また、3 週齢時点で皮膚炎を発症していない個体は Tg ラットであっても、その後に皮膚炎を発症することはない。次に、ヒトのアトピー性皮膚炎においては血清 IgE 値の上昇がしばしば観察

Fig. 3 Clinical score for skin conditions. Skin lesions were scored as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe). Closed circles, Tg rats showing dermatitis at 3 weeks of age; Open circles, Tg rats without showing dermatitis at 3 weeks of age; Closed squares, wt rats. Each value represents the mean $\pm$ SE of ten to 16 rats per group.

されることから、*Inaba* ラットの 9～12 週齢時点での血清 IgE 値を測定した。皮膚炎重症度が重度の個体では 358.6 ± 60.1 ng/ml であり、重症度が軽くなっていくにつれて、中度: 81.9 ± 13.8 ng/ml, 軽度: 37.1 ± 10.4 ng/ml, なし: 18.4 ± 5.1 ng/ml と血清 IgE 値も低くなっていた。病理組織学的解析を行うため、4 週齢メスラットの背側部皮膚のヘマトキシリン-エオジン標本を作製した。その結果、*Inaba* ラットの病変部においては不全角化、表皮肥厚、毛細血管拡張、海綿状態が認められ、真皮への好酸球および肥満細胞の浸潤が観察された (Fig. 4)。

考 案

今回の解析で示された *Inaba* ラットが呈する病変はヒトのアトピー性皮膚炎において見られるそれと良く一致している。このことからテロメラーゼ活性の増加がアトピー性皮膚炎を引き起こすと考えられる。しかしながら、得られた 4 ラインの Tg ラットのうち *Inaba* ラットと名付けた 1 ラインは皮膚炎を呈したものの、残りの 3 ラインは皮膚炎を呈しなかったことから結論を出すには注意を要すると考えている。ラインによって皮膚炎の発症に差異が見られた原因としては 3 つの可能性が考えられる。*Inaba* ラットにおいても発症率は 56% であることから、皮膚炎を発症しなかった 3 ラインにおいても交配により仔を得ることが可能であったならば皮膚炎を発症する個体が見られた可能性が考えられる。もう一つの可能性とし

Fig. 4 Histological features of skin tissue. Hematoxylin & eosin-stained sections of 4 weeks old wt rat ($\times 200$) (A), *Inaba* rat ($\times 200$) (B). (C) Higher-magnification image of the region enclosed by square in (B).

ては、皮膚炎を発症しなかった3ラインにおいては挿入部位の影響などによってテロメレース遺伝子の発現が不適切（発現量の過多や過少，発現時期や部位が好ましくない，など）であった可能性がある。さらに別の可能性としては，今回の *Inaba* ラットにおいて見られた皮膚炎は，テロメレース遺伝子が偶然にもアトピー性皮膚炎の発症に関わる遺伝子座を破壊してしまったことによって引き起こされた可能性も考えられる。これらについては，現在詳細な解析を進めており，近い将来に結論を出したいと考えている。

さらに興味深いことに，*Inaba* ラットと Brown-Norway ラット，あるいは *Inaba* ラットと WKY ラットとの交配で産まれた仔の中において皮膚炎を発症する個体は現在のところ得られていない。このことは，*Inaba* ラットで見られる皮膚炎に対して発症を抑制する遺伝子が Brown-Norway ラットや WKY ラットには存在する可能性を示唆している。*Inaba* ラットにおいてはその遺伝子座に変異が存在することが予想され，この遺伝子座を明らかにすることによって新たなアトピー性皮膚炎の原因遺伝子の解明へつながる可能

性も考えられる。前述のように、これまでのモデル動物の皮膚炎発症時期はヒトのアトピー性皮膚炎の発症時期とは異なっている。ところが今回の結果が示すように、*Inaba* ラットは発症開始時期および寛解時期がヒトの場合と良く似ている。したがって、*Inaba* ラットはヒトのアトピー性皮膚炎と発症時期が似ている初めてのアトピー性皮膚炎モデルトランスジェニックラットと言える。*Inaba* ラットにおいて発症開始時期から寛解時期にかけての遺伝子の発現変動パターンを網羅的に解析することによって、皮膚炎の病態推移を遺伝子レベルで明らかにできると思われる。さらに解析が進めば、乳児期で発症したアトピー性皮膚炎が今後治癒してゆくのか、あるいは成長してからでも治らないのかなどの予後の予測も可能になるかもしれない。

本文中では触れていないが、*Inaba* ラットは飼育環境が SPF であってもコンベンショナルであっても同様の皮膚炎を発症する。このことから *Inaba* ラットの皮膚炎の発症には飼育環境の影響はさほど大きくないと考えられる。実際に、我々は独立した複数の動物施設において飼育している *Inaba* ラットが同様の皮膚炎を発症することを確認しており、実験の再現性や普遍性を考える上でも重要であろう。

おわりに

以上のことから、*Inaba* ラットは優れたアトピー性皮膚炎モデル動物に成りうると考えられる。今後、*Inaba* ラットの特徴を活かした研究が多くの研究者によって進められることで、特に乳児期から小児期にかけてのアトピー性皮膚炎の病態および病因の解明、さらには新たな治療薬や治療方法の開発が進むことを期待している。

文 献

- 1) Levy RM, Gelfand JM, Yan AC. The epidemiology of atopic dermatitis. *Clin. Dermatol.* **21**: 109-115, 2003.
- 2) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, et al. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* **9**: 461-466, 1997.
- 3) Watanabe O, Natori K, Tamari M, et al. Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis. *J. Hum. Genet.* **44**: 173-176, 1999.
- 4) Hikita I, Yoshioka T, Mizoguchi T, et al. Characterization of dermatitis arising spontaneously in DS-Nh mice maintained under conventional conditions: another possible model for atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* **30**: 142-153, 2002.
- 5) Kitagaki H, Fujisawa S, Watanabe K, et al. Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J. Invest. Dermatol.* **105**: 749-755, 1995.
- 6) Konishi H, Tsutsui H, Murakami T, et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11340-11345, 2002.
- 7) Barton D, HogenEsch H, Weih F. Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2323-2332, 2000.
- 8) Tsukuba T, Okamoto K, Okamoto Y, et al. Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**: 893-902, 2003.
- 9) Shiina T, Konno A, Oonuma T, et al. Targeted disruption of MAIL, a nuclear IkappaB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J. Biol. Chem.* **279**: 55493-55498, 2004.
- 10) Wu K, Higashi N, Hansen ER, et al. Telomerase activity is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J. Immunol.* **165**: 4742-4747, 2000.
- 11) Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**: 2034-2043, 2003.
- 12) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193-199, 1991.
- 13) Rodriguez I, Feinstein P, Mombaerts P. Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* **97**: 199-208, 1999.
- 14) Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M. Production of transgenic rats using cryopreserved pronuclear-stage zygotes. *Transgenic Res.* **8**: 397-400, 1999.
- 15) Matsuoka H, Maki N, Yoshida S, et al. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* **58**: 139-145, 2003.