HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Suprabasin-null mice retain skin barrier function and show high contact hypersensitivity to nickel upon oral nickel loading

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2020-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中澤, 慎介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003779

博士（医学）　中澤　慎介
論文題目
Suprabasin-null mice retain skin barrier function and show high contact hypersensitivity to nickel upon oral nickel loading
（スプラバシンノックアウトマウスは皮膚バリア機能を保持し経口ニッケル負荷でニッケル接触過敏症が亢進する）

論文の内容の要旨
［はじめに］
　スプラバシンは皮膚、舌、食道、および前胃の上皮細胞に発現する分泌タンパク質であり、表皮角化細胞の分化や皮膚バリア機能に関与していると考えられる。
　アトピー性皮膚炎（AD）の病態には、皮膚バリアの機能異常が関わっている。AD は、血中 IgE 値が高い外因性アトピー性皮膚炎と IgE 値が正常の内因性アトピー性皮膚炎に分けることができる。多くの AD 患者は外因性に属し、内因性は AD 全体の約 20%と報告されている。内因性 AD は女性に多く、皮膚バリア能が比較的保たれ、ニッケル、クロム、コバルトの金属アレルギーの合併が多いという特徴を持つ。内因性 AD 患者は血中ニッケル濃度が外因性および健常者に比べ高いことに我々は着目した。
　我々は AD 患者において角層中のスプラバシンの発現が低下しており、さらには血中スプラバシン濃度がとくに内因性 AD 患者で低いことを見出した。そこで、スプラバシンノックアウトマウスを樹立し、皮膚バリアの状態・機能、血中のニッケル濃度、ニッケルに対する接触過敏反応を検討した。
［材料ならびに方法］
　マウス: C57BL/6N において clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9 法で exon 1 の hetero 変異体（c.57delA）を得た。サンガー法で homo 個体を同定し、ノックアウトマウスを樹立した。C57BL/6N を野生型として比較対照とした。実験には 6~10 週齢のメスと生後 24 時間以内の新生仔を用いた。本研究は浜松医科大学組み換え実験安全委員会（承認番号: 26-39）、動物実験委員会（承認番号: 2015005、2017077、2017104、2017105、2019015、2019016）の承認を得て実施した。
　スプラバシン抗体: マウススプラバシン抗体は REVEKIFGELSNMGSQAGKNVEHGLDKVAHD を標的とし作成した。
電子顕微鏡像: 新生仔マウスの腹部表皮を採取し透過電子顕微鏡で観察した。
皮膚バリア機能: 胎児ならびに新生仔をエタノール処理後 0.0125%トルイジンブルーで染色した。新生仔を 1mM ルシファーイエロー溶液で染色し、染色部皮膚を蛍光顕微鏡で観察した。剃毛した背部皮膚から tewameter TM 300 で TEWL を

測定した。新生仔の表皮からコーニファイドエンベロープを分離し、超音波処理の前後で検鏡した。

タンパク質抗原感作能試験: オボアルブミンを含む濾紙をテープストリッピングしたマウス背部皮膚に反復貼布することにより感作した。採血検体からオボアルブミン特異的 IgG および IgE を enzyme-linked immuno-sorbent assay 法で測定した。

接触過敏症: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene、オキサゾリンは経皮的に、ニッケルは皮下注で、それぞれマウスを感作し、耳介に感作物質を塗布することにより接触皮膚炎を惹起した。耳翼厚を惹起前後で測定し、耳介腫脹を算出した。

ニッケル血中濃度: 100 ppm Ni (1.7 mM $NiSO_4$)を飲水に付加し、経時的に採血した。Plasma mass spectrometry で血中ニッケル濃度を測定した。

ニッケル経口負荷でのニッケル接触過敏症: ニッケル飲水負荷を感作 2 週間前から開始し、負荷状態でニッケルを感作惹起し、耳翼腫脹を測定した。

リンパ球表面形質: ニッケル飲水したマウスの脾細胞を CD3-FITC、CD4-APC、CD25-PE の各抗体で染色し FACS CantoII を用いてフローサイトメトリー解析した。

［結果］

スプラバシンノックアウトマウスは、スプラバシンの発現は消失していたが、ロリクリン、インボルクリン、フィラグリンの発現に異常は無かった。超微形態的に角層の菲薄化とケラトヒアリン顆粒の未成熟がみられ、粘膜上皮は菲薄化していた。ノックアウトマウスは、胎生 16.5 日における皮膚バリア機能の低下や、cornified envelope の脆弱性を示した。しかし、出生後の皮膚バリア機能は野生型と同等であり、タンパク質抗原に対する感作性も野生型と同等であった。ノックアウトマウスは各種ハプテンに対する接触過敏反応が野生型と比べ弱かったが、この理由は本研究では解明されていない。

ニッケルを 2 週間飲水負荷するとノックアウトマウスの血中ニッケル濃度が野生型に比べ有意に高まった(P=0.0002)。さらにニッケル負荷状態と非負荷状態でニッケルに対する接触過敏反応を比較すると、野生型ではニッケル負荷により過敏反応が減少するが、ノックアウトではニッケル負荷で過敏反応が増強した。ニッケル飲水負荷により脾細胞中の制御性 T 細胞は、野生型では増加したが、ノックアウトでは変化しなかった。

［考察］

スプラバシンをノックアウトすると、表皮は超微形態的に異常があるものの、皮膚バリア機能の障害は胎生期にみられるのみであった。一方でスプラバシンノックアウトマウスの上部消化管粘膜上皮は菲薄化しており、血中ニッケル濃度が有意に上昇したことから、スプラバシン欠乏は金属吸収を促進するものと考えられた。

低濃度のニッケル飲水負荷は経口免疫寛容を誘導することが知られている。しかしニッケル負荷したノックアウトマウスでは、ニッケル接触過敏反応が無負荷よりも増加し、脾細胞中の制御性 T 細胞の増加がみられなかった。このことはスプラバシンが経口免疫寛容に関与し、その欠乏により経口免疫寛容が成立しなかった可能性を示唆する。

［結論］

内因性 AD は、皮膚バリア機能が比較的保持され、血中ニッケル濃度が高値で、ニッケルをはじめとする金属アレルギーを高率に示す。こうした特徴をスプラバシンノックアウトマウスが示すことから、スプラバシンの発現低下が内因性 AD の一因になる可能性が示唆された。