



Title	掻痒軽減を考慮したアトピー性皮膚炎モデルマウスの開発
Author(s)	北村, 彩佳
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/70741">https://hdl.handle.net/11094/70741</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 （ 北村彩佳 ）	
論文題名	掻痒軽減を考慮したアトピー性皮膚炎モデルマウスの開発
<p>論文内容の要旨</p> <p>本論文では、動物愛護の観点から実験手法を再考し、アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis; AD）モデルマウス作出手法の改善を行った。</p> <p><b>第1章 緒論</b>においては、動物実験が医学研究において必須である一方で、動物実験を行う研究者たちに指摘されてきた問題点について言及した。医薬品開発においては動物実験が必須であり、これまでに多数の疾患モデル動物が作出され、薬効評価に用いられてきた。それに伴い、動物の福祉の重要性についても世界的に認識され、3R（Replacement；代替法の使用、Reduction；動物数の削減、Refinement；実験動物の苦痛削減）の原則に則って実験を行うよう規定されてきた。また、第1章ではアトピー性皮膚炎という疾患の背景を説明し、診断の指標（血清中Immunoglobulin E (IgE) 値の上昇、皮膚の組織学的特徴、掻痒）や免疫学的な特徴（T helper type 2 (Th2) 優位な免疫応答、サイトカインなどの遺伝子発現変化）について記した。</p> <p><b>第2章は「マウスへの負荷を考慮した塗布条件の探索」と題し、従来法を基にしてアトピー性皮膚炎症状を呈する実験条件の検討を行った結果を記した。</b>これまでに報告された、ハプテンを繰り返しマウスに塗布することでアトピー性皮膚炎モデルマウスを作出した多くの論文において、1ヶ月以上に亘って週1回以上の頻度で低分子（例えば 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)）をマウス頸背部に塗布していた。本論文では、まず初めにマウス頸背部に連続的にDNFBを塗布し、血清中IgE値が上昇することを指標としてモデルマウス作出を行い、塗布条件の検討を行った。その結果、14日間隔で2回感作を行うことにより血清中IgE値の上昇が認められることや、感作2時間後には従来法（週1回感作）で作出したマウスと同程度の引っ掻き行動（掻痒の指標）を示すことを見出した。</p> <p><b>第3章は「AD様症状の確認と従来法との比較」と題し、作出されたマウスがAD様症状を呈していることを確認した。</b>ADは皮膚症状を主体とする疾病であることから、皮膚の炎症状態を組織学的に観察した。その結果、2回目のDNFB塗布翌日から5日後に亘って上皮が有意に肥厚化していることが確認された。また、2回目の塗布5日後において、リンパ球や肥満細胞などの各種免疫細胞の有意な浸潤が認められた。さらに、皮膚炎症部位における免疫応答の種類を調べるため、組織よりトータルRNAを抽出しADに関連して発現が変化する遺伝子（<i>IL-4</i>、<i>IL-6</i>、<i>IL-10</i>、<i>TNF-<math>\alpha</math></i>、<i>IL-1<math>\beta</math></i>、<i>IFN-<math>\gamma</math></i>、<i>IL-17A</i>、<i>Filaggrin</i>）の発現量をDNFB塗布後24時間後において確認した。1回目の感作24時間後には<i>IL-4</i>の発現上昇は認められないのに対し、2回目及び3回目では発現が顕著に上昇していることが確認された。このことから、塗布部位における免疫学的背景は、1回目の塗布から14日後に行った2回目の塗布により、Th1型からTh2型へとシフトしている可能性が示唆された。また、2回目及び3回目の感作後に<i>IL-6</i>、<i>IL-10</i>、<i>TNF-<math>\alpha</math></i>、<i>IL-1<math>\beta</math></i>、<i>IFN-<math>\gamma</math></i>、<i>IL-17A</i>は上昇傾向にあった。AD患者の皮膚で発現が減少していると報告されている<i>Filaggrin</i>遺伝子の発現量は顕著に低下していた。フィラグリンの発現量は従来法によりDNFBを繰り返し塗布した場合むしろ増加する、ということが報告されており、本手法により作出されたマウスは従来法で作出されたマウスよりAD症状を反映していると考えられた。</p> <p>また、引っ掻き行動や掻痒、それらによって引き起こされる睡眠障害はAD患者のQuality of Lifeの低下に最も影響を与えることが報告されていることから、マウスに与えられた苦痛が軽減されたことを調べるため、マウスを経時的に観察し、引っ掻き行動を観察した。その結果、従来法で感作を行ったマウスは永続的な掻痒を示すのに対し、本手法では一定期間が経過すると定常状態にまで落ち着くことが分かった。</p> <p><b>第4章 総括</b>において、本手法（14日間隔で塗布を行い、およそ2週間程度を要する）によりアトピー性皮膚炎モデルマウスが作出されたことによる意義を記した。わずか2回の塗布でIgE値の上昇、引っ掻き行動の増加、皮膚の組織学的な特徴、免疫細胞の浸潤、炎症部位におけるサイトカイン遺伝子の発現上昇及び<i>Filaggrin</i>遺伝子の発現低下といったアトピー性皮膚炎症状を呈した。以上より、従来法（1ヶ月以上に亘り計5回以上の塗布を行う）よりもはるかに時間的・人的なコストが削減され、なおかつマウスに与えられていた不要な苦痛が軽減され、Refinementが達成されたと結論付けた。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 北 村 彩 佳 )			
論文審査担当者		(職)	氏 名
	主 査	(教授)	渡 邊 肇
	副 査	(教授)	福 崎 英一郎
	副 査	(教授)	内 山 進
	副 査	(教授)	村 中 俊哉
	副 査	(教授)	紀ノ岡正博
	副 査	(教授)	大 政 健史
	副 査	(教授)	藤 山 和仁
	副 査	(教授)	永 井 健治

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、動物愛護の観点から実験手法を再考し、アトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis; AD）モデルマウス作出手法の改善を行っている。

第 1 章 緒論においては、動物実験が医学研究において必須である一方で、動物実験を行う研究者たちに指摘されてきた問題点について言及している。医薬品開発においては動物実験が必須であり、これまでに多数の疾患モデル動物が作出され、薬効評価に用いられてきている。それに伴い、動物の福祉の重要性についても世界的に認識され、3R（Replacement；代替法の使用、Reduction；動物数の削減、Refinement；実験動物の苦痛削減）の原則に則って実験を行うよう規定されてきている。また、第 1 章ではアトピー性皮膚炎という疾患の背景を説明し、診断の指標（血清中 Immunglobulin E (IgE) 値の上昇、皮膚の組織学的特徴、掻痒）や免疫学的な特徴（T helper type 2 (Th2) 優位な免疫応答、サイトカインなどの遺伝子発現変化）について記している。

第 2 章は「マウスへの負荷を考慮した塗布条件の探索」と題し、従来法を基にしてアトピー性皮膚炎症状を呈する実験条件の検討を行った結果を記している。これまでに報告された、ハプテンを繰り返しマウスに塗布することでアトピー性皮膚炎モデルマウスを作出した多くの論文においては、1 ヶ月以上に亘って週 1 回以上の頻度で低分子（例えば 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)）をマウス頸背部に塗布している。本論文では、まず初めにマウス頸背部に連続的に DNFB を塗布し、血清中 IgE 値が上昇することを指標としてモデルマウス作出を行い、塗布条件の検討を行っている。その結果、14 日間隔で 2 回感作を行うことにより血清中 IgE 値の上昇が認められることや、感作 2 時間後には従来法（週 1 回感作）で作出したマウスと同程度の引っ掻き行動（掻痒の指標）を示すことを見出している。

第 3 章は「AD 様症状の確認と従来法との比較」と題し、作出されたマウスが AD 様症状を呈していることを確認している。AD は皮膚症状を主体とする疾病であることから、皮膚の炎症状態を組織学的に観察した。その結果、2 回目の DNFB 塗布翌日から 5 日後に亘って上皮が有意に肥厚化していることが確認されている。また、2 回目の塗布 5 日後において、リンパ球や肥満細胞などの各種免疫細胞の有意な浸潤が認められている。さらに、皮膚炎症部位における免疫応答の種類を調べるため、組織よりトータル RNA を抽出し AD と関連して発現が変化する遺伝子（IL-4、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A、Filaggrin）の発現量を DNFB 塗布後 24 時間後において確認している。1 回目の感作 24 時間後には IL-4 の発現上昇は認められないのに対し、2 回目及び 3 回目では発現が顕著に上昇していることが確認された。このことから、塗布部位における免疫学的背景は、1 回目の塗布から 14 日後に行った 2 回目の塗布により、Th1 型から Th2 型へとシフトしている可能性が示唆されている。また、2 回目及び 3 回目の感作後に IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A は上昇傾向にあった。AD 患者の皮膚で発現が減少していると報告されている Filaggrin 遺伝子の発現量は顕著に低下していることを見出している。Filaggrin の発現量は従来法により DNFB を繰り返し塗布した場合むしろ増加する、ということが報告されており、本手法により作出されたマウスは従来法で作出されたマウスよ

り AD 症状を反映していると考えられる。

また、引っ掻き行動や搔痒、それらによって引き起こされる睡眠障害は AD 患者の Quality of Life の低下に最も影響を与えることが報告されていることから、マウスに与えられた苦痛が軽減されたことを調べるため、マウスを経時的に観察し、引っ掻き行動を観察している。その結果、従来法で感作を行ったマウスは永続的な搔痒を示すのに対し、本手法では一定期間が経過すると定常状態にまで落ち着くことを明らかにしている。

第 4 章 総括において、本手法（14 日間隔で塗布を行い、およそ 2 週間程度を要する）によりアトピー性皮膚炎モデルマウスが作出されたことによる意義を記している。わずか 2 回の塗布で IgE 値の上昇、引っ掻き行動の増加、皮膚の組織学的な特徴、免疫細胞の浸潤、炎症部位におけるサイトカイン遺伝子の発現上昇及び Filaggrin 遺伝子の発現低下といったアトピー性皮膚炎症状を呈した。以上より、従来法（1 ヶ月以上に亘り計 5 回以上の塗布を行う）よりもはるかに時間的・人的なコストが削減され、なおかつマウスに与えられていた不要な苦痛が軽減され、Refinement が達成されたと結論付けている。

以上のように、本論文は近年急速に重要性が認識され、その遵守が求められている動物愛護の観点から動物への負担を軽減したモデルマウスの作製法を提案するものであり、その意義は大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。