

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明
に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 天谷 雅行

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 平成19年度総括研究報告	1
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 主任研究者 天谷 雅行	
II. 平成19年度分担研究報告	
フィラグリン欠損マウスの作製	9
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 天谷雅行	
フィラグリン発現低下flaky tailマウスを用いたアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製	12
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 助教 久保亮治	
アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析	16
産業医科大学医学部 皮膚科 准教授 梶島健治	
経皮的抗原感作と喘息誘導	22
慶應義塾大学医学部 呼吸器内科 講師 浅野浩一郎	
上皮バリア機能障害における表皮タイトジャンクションの異常の検討	25
神戸大学大学院医学系研究科 教授 古瀬幹夫	
アトピー性皮膚炎における皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析	30
慶應義塾大学医学部 分子生物学 准教授 工藤 純	
皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子変異を持つアトピー性皮膚炎患者の臨床的解析	38
慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師 海老原 全	
皮膚の乾燥を防ぐ適切な生活習慣と保湿スキンケアの教育によるアトピーマーチの予防に関する小・中学生を対象とした検討	40
京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学 准教授 加藤 則人	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 平成19年度班会議プログラム.....	51
V. 平成19年度構成員名簿	61

I . 平成 19 年度総括研究報告

バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明に関する研究

主任研究者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科教授

研究要旨 本研究では、皮膚バリア機能障害による慢性抗原刺激が、アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的原因であるという新しい仮説のもとに、新規モデルマウスを用いた免疫学的基礎的検討と、患者遺伝子解析および特定地域の疫学的調査による臨床的検討を総合的に行い、未解決であるアトピー性疾患の発症機序を解明する。さらに、出生時からのバリア機能を保持することによる疾患予防の確立を目指す。

本年度は、3年計画の1年目として免疫学的基礎的研究と臨床的疫学的解析を総合的に行う本研究の基盤固めを行った。新規のアトピー性皮膚炎モデルを作成するため、アトピー性皮膚炎患者で欠損が認められる皮膚バリア機能蛋白であるフィラグリンを欠失させたノックアウトマウスを作成中である。バリア破壊やハプテン反復塗布が表皮角化細胞や皮膚DCに及ぼす効果を検証し、アトピー性皮膚炎発症における皮膚構成細胞の役割を免疫学的見地から解析した。さらに、皮膚バリア機構の破綻が、気管支喘息の発症に及ぼす影響を検討し、経皮抗原感作により好酸球性気道炎症が成立する可能性が示された。また、アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン、ロリクリン、インボルクリンなど皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子を独自のショットガンPCR法にて解析し、日本人特有の新規遺伝子変異2種を同定した。さらに、バリア機能低下とアレルギー性疾患発症の疫学的解析を京都府山間部にて行い、教育資材を用いて、全児童・生徒及びその保護者に対して教育介入を行う準備を整えた。

分担研究者

古瀬幹夫 神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学 教授
工藤 純 慶應義塾大学医学部分子生物学 準教授
加藤則人 京都府立医科大学医学部皮膚科 準教授
梶島健治 産業医科大学皮膚科 準教授

浅野浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科 専任講師
海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科 専任講師
久保亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科助教

A. 研究目的

本研究では、皮膚バリア機能障害による慢性抗原刺激が、アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的原因であるという新しい仮説のもとに、新規モデルマウスを用いた免疫学的基礎的検討と、患者遺伝子解析および特定地域の疫学的調査による臨床的検討を総合的に行い、未解決であるアトピー性疾患の発症機序を解明する。さらに、出生時からのバリア機能を保持することによる疾患予防の確立を目指す。

本年度は、3年計画の1年目として以下の研究活動の基礎固めを行う。新規のアトピー性皮膚炎モデルを作成するため、アトピー性皮膚炎患者で欠損が認められる皮膚バリア機能蛋白であるフィラグリンを欠失させたノックアウトマウスを作成する。バリア破壊やハプテン反復塗布が表皮角化細胞や皮膚DCに及ぼす効果を検証し、アトピー性皮膚炎発症における皮膚構成細胞の役割を免疫学的見地から解析する。さらに、皮膚バリア機構の破綻が、気管支喘息の発症に及ぼす影響を検討する。気道のアレルギー炎症成立・維持に皮膚病変を介した抗原認識・免疫賦活が関与している可能性を提示する。また、アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン、ロリクリン、インボルクリンなど皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子を独自のショットガンPCR法にて解析し、日本人特有の遺伝子変異を効率よく解析する。さらに、バリア機能低下とアレルギー性疾患発症の疫学的解析をある特定地域を対象に行い、適切なスキンケアを指導しバリア機能を保持することにより、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎などの発症を抑制できることを実証する。

B. 方法

1) フィラグリンノックアウトマウスの作成

マウスフィラグリン遺伝子は、non-coding regionである短い exon1、翻訳開始点を含むexon2、およびフィラグリンに特有な10000bpを超える巨大なexon3からなっており、exon3はイントロンを含まない長大なcoding regionと終止コドンを含む特徴的な構造を持っている。確実にターゲティングを行うために2種のベクターを構築した。

2) 新規皮膚バリア機能評価法の開発

FITC等の蛍光色素でラベルした様々な分子量のデキストランあるいはnanoparticleをマウス皮膚に塗布する。皮膚を外から内へ通り抜けた色素標識した物質の量を、皮膚樹状細胞を介して所属リンパ節内に移動した蛍光色素陽性皮膚樹状細胞数としてflow cytometryで定量的に評価する。

3) 抗原感作の免疫学的検討

バリア破壊は、アセトンなどの有機溶媒による角層間脂質の除去とテープストリッピングなどの角層そのものを剥離させるような破行動に近い物理的刺激的の2種類に分類できる。マウスの腹部にアセトン刺激、あるいはテープストリッピング刺激を行い、その後の表皮角化細胞から産生される各種サイトカインやケモカインを定量PCRやELISAにて検証した。

4) 経皮的抗原感作による喘息誘導

C57BL/6マウスを用い、卵白アルブミンを抗原として感作・曝露し、喘息モデルを作成した。感作の条件は、1) 正常皮膚に抗原（ハプテンなし）を吸収させたパッチを貼付、2) ガムテープにより物理的に傷害した皮膚にパッチを貼付、とし、曝露は卵白アルブミンエアロゾル（2%）吸入によって行った。気道炎症の指標として気管支肺胞洗浄（BAL）液中の好酸球数、および肺組織病理像を評価した。

5) 重層扁平上皮におけるタイトジャンクションの構造と機能

正常マウス、皮膚バリア異常を発症するモデルマウスにおけるタイトジャンクションの構築、分布を調べた。また、皮膚からの著しい脱水を示すクロロゲン1遺伝子欠失マウスにおける角質層バリアの異常の有無を解析した。

6) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

フィラグリン遺伝子の2つのアレルを区別してそれぞれ再構成できる新規解読法FLG-shotgun法を開発し、この方法を用いて日本人アトピー性皮膚炎患者24人の配列決定を行った。さらに、今回新たに発見した2種の変異を含む7種のフィラグリン遺伝子変異を簡便に検出する方法を確立し、日本人アトピー性皮膚炎患者105人に対して変異の有無を解析した。

7) 疫学的解析

4月から5月に京都府山間部の一小・中学校の全児童・生徒を対象として、アトピー性皮膚炎、乾燥皮膚、喘息、アレルギー性鼻炎の有無について質問票による調査を行った。また全児童・生徒から血液を採取し、血清総IgE値やダニ・スギ特異IgE値を測定し、乾燥皮膚と血清IgE値の関係について解析した。

C. 結果

1) フィラグリンノックアウトマウスの作成

マウスフィラグリン遺伝子座を含むBAC clonesより、フィラグリン遺伝子を含むgenomic DNAをサブクローニングした。Neoカセットを挿入する位置に必要な制限酵素切断部位を作成し、Frt/loxP-neoカセットを挿入してターゲティングベクター(TV1)を作成した。C57BL6のES

細胞にTV1を用いてエレクトロポレーションを行ったが陽性細胞が取得できなかったため、BA1ハイブリッドのES細胞でのエレクトロポレーションに変更すると共に、TV2の作成を開始した。その後、TV1をエレクトロポレーションしたBA1ハイブリッド細胞で陽性クローンが得られたため、このクローンをマウス胚に移植し、現在キメラマウスを得ている。現在、このキメラマウスを交配中である。

2) 新規皮膚バリア機能評価法の開発

マウス皮膚を通過したFITC(分子量389)量を、FITCを取り込んだ皮膚樹状細胞数として定量評価することに成功し、FITCがアセトンなどによる皮膚バリアの破壊がなくても皮膚を通過することを確認した。FITCでラベルしたデキストラン(分子量4000)は、flaky tailマウス、野生型マウス共に皮膚を通過しなかった。今後分子量をうまく調節することでフィラグリン欠損マウス、あるいはflaky tailマウスと野生型マウス間の皮膚バリア機能の差を明らかにできる可能性が示唆された。

3) 抗原感作の免疫学的検討

表皮角化細胞はアセトン刺激によりMig, IP-10などのTh1系ケモカインを優位に、またテープストリッピング刺激によりTARCなどのTh2優位のケモカインを産生した。アセトン刺激に比べ、皮膚そう破に近いテープストリッピング刺激はアトピー性皮膚炎の本態とも言えるTh2優位へと皮膚の環境をシフトさせ、アトピー性皮膚炎そのものの誘導や増悪に関与する可能性が示唆された。

4) 経皮的抗原感作による喘息誘導

アラム・百日咳菌ワクチンとともに腹腔内感作したマウスではBAL中好酸球数の著明な増加を認め、組織学的

にも気道周囲の好酸球数の集積と気道上皮の杯細胞化生を認めた。一方、皮膚感作モデルでも腹腔内感作マウスに比して程度は軽いものの同様のBAL中好酸球数の増加と気道周囲の好酸球数の集積、気道上皮の杯細胞化生を認めた。対象としてリン酸緩衝食塩水を吸収させたパッチを貼付した後に卵白アルブミンエアロゾルを吸入させた群では、このような好酸球性気道炎症、気道リモデリングは全く認められなかった。テープによる皮膚の物理的傷害の有無では好酸球性気道炎症の程度に差を認めなかった。従って、経皮抗原感作により好酸球性気道炎症が成立する可能性が示された。

5) 重層扁平上皮におけるタイトジャンクションの構造と機能

生後1日のマウス、成体マウスともに、表皮にオクルディン、クローディン1, クローディン4, トリセルリンの発現を蛍光抗体法レベルで確認できた。オクルディンは顆粒層のタイトジャンクションに限局するのに対し、クローディンは顆粒層以外の細胞層、およびタイトジャンクション以外の細胞膜にも強いシグナルが見られた。トリセルリンはトリセルラーゼジャンクションと思われる部位に染色が観察された。以上より、オクルディンの染色を指標とすることで、成体マウスの皮膚においてもタイトジャンクションを光学顕微鏡レベルで同定することができた。

6) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

日本人アトピー性皮膚炎患者24人のフィラグリン遺伝子の全コーディング領域の配列を解析した結果、繰り返し配列の数の違い(11~13個)と配列の類似性によって、長さの異なる4つの主要な遺伝子型(A, B, Bs, C)に分類された。さらに2種類の新規ナンセン

ス変異をそれぞれ2症例ずつから発見した。B型遺伝子の10番目の繰り返し配列にS2899Xをもたらす8666-8667CC>GAと、Bs型遺伝子の9番目の繰り返し配列にS3296Xをもたらす9887C>Aである。この2種類および5種類の既知変異(7661C>G, 3321delA, 1537C>T, 3702delG, 2282del4)の有無を日本人アトピー性皮膚炎患者105人で調べたところ、計7人(8666-8667CC>GA 2人, 9887C>A 3人, 7661C>G 2人)に変異が見つかった。

7) 疫学的解析

今年度のアトピー性皮膚炎の有病率は7.8%、乾燥皮膚のみを呈する小児は16.7%であった。皮膚の乾燥を防ぐ適切な入浴法や暖房法、保湿のスキンケアの意義と具体的な方法に関する教育資料もすでに完成しており、入浴法や暖房法などの生活習慣、保湿スキンケアの実態に関する質問票を回収した後に、この教育資料を用いて、全児童・生徒及びその保護者に対して教育介入を行う。2008年2月に再度質問票調査を行い生活習慣に変化、教育効果を検討する予定である。

D. 考察

フィラグリンノックアウトマウスは、遺伝子の構造が特殊でありターゲティングが困難であり、複数のベクターを構築するなど対処を要したが、ほぼ順調に作成過程を経過している。皮膚のバリア機能評価法は、TEWL(経皮水分蒸散量)、dye penetration assayなどが従来より用いられているが、分子メカニズムを解析するには不十分であり、FITCでラベルした分子量の異なるデキストラン、シリコン、ナノパーティクルを皮膚に塗布し、膚樹状細胞を介して所属リンパ節内に移動した蛍光色素陽性皮膚樹状細胞数を定量化するバリア機能評価

法を検討し、良好な結果を得ている。フィラグリンの発現が完全に欠損していないものの著しく低下しているflaky tailマウス、及び野生型マウスを用いて、OVAを抗原とした反復感作により、アトピー性皮膚炎惹起のプロトコールを確立しつつある。また、日本人アトピー性皮膚炎患者においても、フィラグリン遺伝子変異が新規の変異を含め複数検出され、欧州患者と同様にアトピー性皮膚炎発症の一因となっている事が明らかにされた。しかし、欧州とは変異の起源も変異保有率も低く、今後はフィラグリン以外の皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析も含めて、皮膚バリア機能障害の原因となる遺伝的要因のさらなる追究が必要である。京都府山間部の疫学的解析においては、全児童・生徒に対して皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣に関する教育介入を行い、その後経時的に臨床所見のみでなく血液データを採取して、アトピー疾患の発症に対する予防効果を一自治体のほぼすべての小児を対象にして検討する研究は新たな試みであり、その結果が期待される。

E. 結論

アトピー性皮膚炎、気管支喘息発症の根本的原因を明らかにする3年計画の1年目として、免疫学的基礎的研究と臨床的疫学的解析を総合的に行う本研究の基盤が整ったと思われる。アトピー性疾患の発症を皮膚バリア機能改善により抑制、予防する方法論を確立するために、着実に研究を進めることが重要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

<英語論文>

1. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E,

Takenaka H, Kita M, Kishimoto S: The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Am J Pathol* 170 (6), 2019-2029, 2007.

2. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y: CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 171 (4), 1249-1257, 2007.
3. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, Tamamura H, Fujii N, Tokura Y: CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 361 (4), 1012-1016, 2007.
4. Soga F, Katoh N, Kishimoto S: Histamine prevents apoptosis in human monocytes. *Clin Exp Allergy* 37 (3), 323-330, 2007.
5. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 147 (1), 176-183, 2007.
6. Namura K, Hasegawa G, Egawa M, Matsumoto T, Kobayashi R, Yano T, Katoh N, Kishimoto S, Ohta M, Obayashi H, Ose H, Fukui M, Nakamura N, Yoshikawa T: Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor level with other markers of disease severity in patients with atopic dermatitis. *Clin Immunol* 122 (2), 181-186, 2007.
7. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Kishimoto S: Narrow-band ultraviolet B phototherapy in patients with recalcitrant nodular prurigo. *J Dermatol* 34 (10), 691-695, 2007.
8. Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y: Inhibitory effects of epinastine on chemokine production and MHC class II/CD54 expression in keratinocytes. *J Dermatol Sci* 45 (2), 144-146, 2007.
9. Atarashi K, Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y: Stimulation of Langerhans cells with ketoprofen plus UVA in murine photocontact dermatitis to ketoprofen. *J Dermatol Sci* 47

- (2), 151-159, 2007.
10. Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, Furuyashiki T, Murata T, Segi-Nishida E, Soontrapa K, Matsuoka T, Miyachi Y, Narumiya S: Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med* 204 (12), 2865-2874, 2007.
 11. Niimi K, Asano K, Shiraishi Y, Nakajima T, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Suzuki Y, Fukunaga K, Shiomi T, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Natori Y, Matsumoto M, Seya T, Yamaya M, Ishizaka A: TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol* 178 (1), 489-495, 2007.
 12. Soga F, Katoh N, Inoue T, Kishimoto S: Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J Invest Dermatol* 127 (8), 1947-1955, 2007.
 13. Dekio I, Sakamoto M, Hayashi H, Amagai M, Suematsu M, Benno Y: Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis. *J Med Microbiol* 56 (Pt 12), 1675-1683, 2007.
 14. Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S: Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest* 87 (1), 49-55, 2007.
 15. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M: Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp Cell Res* 314 (5), 939-949, 2008.
 16. Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K: Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp Dermatol* 17 (2), 81-90, 2008.
 17. Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriawaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S, Tsukita S: Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 134 (2), 523-534, 2008.
 18. Sasaki T, Kudoh J, Ebihara T, Shiohama A, Asakawa S, Shimizu A, Takayanagi A, Dekio I, Sadahira C, Amagai M, Shimizu N: Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. *J Derm Sci* in press, 2008.
 19. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y: Fexofenadine downmodulates antigen-presenting ability of murine epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 49 (1), 88-91, 2008.
 20. Shiraishi Y, Asano K, Niimi K, Fukunaga K, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Ueda S, Nakajima T, Oguma T, Suzuki Y, Shiomi T, Sayama K, Kagawa S, Ikeda E, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Miyasho T, Ishizaka A: Cyclooxygenase-2/prostaglandin D2/CRTH2 pathway mediates double-stranded RNA-induced enhancement of allergic airway inflammation. *J Immunol* 180 (1), 541-549, 2008.
 21. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y: Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol* in press, 2008.
- <日本語論文>
1. 森脇一将, 古瀬幹夫: クローデインに関わる分子間相互作用. *生体の科学* 58 (5), 424-425, 2007.
2. 学会発表
- <英語発表>
1. Kabashima K: Mechanism of plasma cell homing and localization. Seoul National University, Seoul, 2007
 2. Kabashima K: Lipid mediators and the skin. **1st annual symposium at the Institute of Dermatological Science**, Seoul, 2007
 3. Furuse M: Epithelial and endothelial tight junctions. **4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery**, Kanazawa, Japan, 2007
 4. Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Soga F, Kishimoto S: Platelet as versatile regulators of

- cutaneous inflammation. **The 8th Meeting of German-Japanese Society of Dermatology. Satellite Symposium on Immunodermatology.**, Yokohama, Japan, 2007.
5. Furuse M: Identification of novel protein components of the junctional complex by the fluorescence localization-based expression cloning (FL-REX) method. **10th International Symposium on "Signal transduction in the blood-brain barriers"**, Potsdam, Germany, 2007
 6. Ueda E, Katoh N, Ando T, Nakai Y, Kishimoto S: Treatment for severe atopic dermatitis patients by psychosomatic approach. **The 12th Congress of the European Society for Dermatology and Psychiatry**, Wroclaw, Poland, 2007.
 7. Amagai M: Animal models - Do they tell us about human disease? **21st World Congress of Dermatology**, Buenos Aires, Argentina, 2007
 8. Asano K, Shiraishi Y, Kagawa S, al. e: Enhanced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in response to TLR3 ligand in murine models of asthma. **63rd AAAAI Annual Meeting**, 2008.
 9. Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Nara T, Soga F, Asai J, Masuda K, Kishimoto S: Topical P2Y₁₂ purinoreceptor antagonists reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. **2007 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, 2007
 10. Masuda K, Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Soga F, Kishimoto S: The expression of Foxp3⁺ T cells in the elicitation phase of murine contact hypersensitivity. **2007 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, 2007
 11. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, Mori T, Uemura A, Tokura Y: CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells. **Society for Investigative Dermatology Annual Meeting**, Los Angeles, USA, 2007
 12. Asano K, Shiraishi Y, Niimi K, al. e: Double-stranded RNA- induced exacerbation of allergic airway inflammation. **World Asthma Meeting 2007**, 2007
 13. Ueda E, Katoh N, Kishimoto S: Educational Lecture) Pshychosomatic Dermatology for female patients. **The XV International Congress of the International Society of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology**, Kyoto, Japan, 2007.
 14. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, Mori T, Uemura A, Tokura Y: CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells. **第18回樹状細胞研究会**, 淡路, 2007
 15. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, Mori T, Uemura A, Tokura Y: CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells. **第32回日本研究皮膚科学会**, 横浜, 2007
- <日本語発表>
1. 加藤則人: 日常診療に役立てたいアトピー性皮膚炎の病態研究の進歩. **平成19年度日本皮膚科学会中部支部生涯教育セミナー**, 京都市, 2007.
 2. 加藤則人: 教育講演) 現代医学的立場からみたアトピー性皮膚炎の診断と治療. **第28回全日本鍼灸学会京都地方会**, 京都市, 2007.
 3. 椋島健治, 長町美野子, 坂田大治, 成宮周: Facilitation of Th1 mediated immune response by PGE receptor EP1. **17th Kyoto T cell conference**, Kyoto, Japan, 2007
 4. 椋島健治: 皮膚免疫・アレルギー疾患におけるupdate. **福井アレルギー疾患研究会**, 福井, 2007
 5. 椋島健治, 古賀千律子, 島内隆寿, 日野亮介, 戸倉新樹: 接触アレルギー性および光接触アレルギー性の多項目代替法の開発. **第25回産業医科大学学会**, 北九州, 2007
 6. 椋島健治, 杉田和成, 白石紀子, 稲葉カヨ, 戸倉新樹: 皮膚樹状細胞におけるCXCR4の接触皮膚炎形成における役割. **第57回日本アレルギー学会秋期学術大会**, 横浜, 2007

7. 榎島健治: 皮膚免疫・炎症を調節する. **第59回日本皮膚科学会西部支部学術大会**, 宮崎, 2007
8. 榎島健治: 脂質メディエーターと皮膚疾患. **第106回日本皮膚科学会総会**, 横浜, 2007
9. 榎島健治: 抗菌剤の特性を生かす. **第106回日本皮膚科学会総会**, 横浜, 2007
10. 榎島健治: 樹状細胞の遊走とホメオスタシスについて. **第三回箱根カンファレンス**, 箱根, 2007
11. 天谷雅行: 自己免疫 最近の進歩. **第106回日本皮膚科学会総会**, 横浜, 2007
12. 古瀬幹夫: 特別講演) タイトジャンクションと皮膚のバリア機能. **第32回日本化粧品学会**, 東京, 2007
13. 若森健, 加藤則人, 平野眞也, 岸本三郎, 小笹晃太郎: 小・中学生皮膚検診におけるアトピー性皮膚炎, 乾燥皮膚とIgE抗体価の関係. **第19回日本アレルギー学会春期臨床大会(ミニシンポジウム「アトピー性皮膚炎の新知見」)**, 横浜市, 2007
14. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンの新規解読法の確立及び日本人集団におけるフィラグリン遺伝子変異の同定. **第14回日本遺伝子診療学会大会**, 松山, 2007
15. 榎島健治: スフィンゴシン1リン酸によるリンパ球トラフィック機序の新たな知見. **第28回日本炎症・再生医学会**, 東京, 2007
16. 古瀬幹夫: タイトジャンクションとバリア障害. **第71回日本皮膚科学会東部支部学術大会シンポジウム**, 札幌, 2007
17. 加藤則人, 平野眞也: アトピーって治りますか? シンポジウム アトピー性皮膚炎患者からの“よくある質問”に答える. **第58回日本皮膚科学会中部支部学術大会**, 京都市, 2007
18. 佐々木貴史, 工藤純, 海老原全, 塩濱愛子, 浅川修一, 高柳淳, 清水厚志, 渋谷和憲, 天谷雅行, 清水信義: アトピー性皮膚炎原因遺伝子フィラグリンのshotgun法による変異解析. **BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)**, 横浜, 2007
19. 古瀬幹夫: タイトジャンクションの分子構築と機能発現のメカニズム. **第32回角膜カンファレンス・第24回日本角膜移植学会フェアウェルセミナー**, 東京, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

ファイラグリン遺伝子改変によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成 (予定)

II. 平成 19 年度分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

フィラグリン欠損マウスの作製

分担研究者 天谷雅行 慶應義塾大学皮膚科学 教授

研究要旨 フィラグリン遺伝子変異がアトピー性皮膚炎発症の主要因として報告されている。フィラグリンは正常な角層形成に必須の蛋白質であり、皮膚のバリア機能に対し重要な役割を担う。本研究では、皮膚角層のバリア機能異常に基づく慢性的な抗原刺激がアトピー性皮膚炎の根本的発症要因の一つであるという仮説に基づき、フィラグリン欠損マウスを作製し、抗原に暴露されてから疾患が発症するまでの発症機序の解析を可能とする初めてのアトピー性皮膚炎マウスモデルを作製する。

分担研究者

久保亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科助教

研究協力者

川崎 洋 慶應義塾大学医学部大学院生

A. 研究目的

本研究では、アトピー性皮膚炎患者で欠損が認められる皮膚バリア機能蛋白であるフィラグリンを遺伝子欠損させたマウス（フィラグリンノックアウトマウス）を作成し、新規アトピー性皮膚炎モデルを開発することをひとつの研究目的としている。フィラグリンは正常な角層形成に必須の蛋白質であり、皮膚のバリア機能に対し重要な役割を担うとされているが、フィラグリンが皮膚のバリアを形成する分子的なメカニズムには未だ不明な点が多々残されている。フィラグリンの分子生物学的解析および新規アトピー性皮膚炎モデルマウス作成に利用するため、フィラグリンノックアウトマウスの作成を行った。

B. 研究方法

1、ターゲッティングベクタのデザイン
マウスフィラグリン遺伝子は、non-coding regionである短い exon1、翻訳開始点を含む exon2、およびフィラグリンに特有な 10000bp を超える巨大な exon3 からなっており、exon3 は長大な coding region と終止コドンを含んでいる。ターゲッティングベクタ (TV) 1 は Exon2 に含まれる翻訳開始点から、exon3 の開始直後にあるインフレームの ATG までが Neo 耐性遺伝子と置き換わるようにデザインした。なお、この ATG 以降終止コドンに至るまでインフレームの ATG は存在しない。Exon3 は、5' 側端と 3' 側の短い特異的配列に挟まれて、極めて相同性の高い繰り返し配列が 12 個連続して存在する特殊な構造を持っている。繰り返し配列間での相同性が非常に高いため、ターゲッティング時の相同組み換えにより予測不能な変化が起こりやすいと考えられた。そこで、exon3 側に short arm、exon1 側に long arm を設定して、TV 1 をデザインした。TV 2 は、exon1 と exon2 を全て含む約 6 kb

にわたる領域が Neo 耐性遺伝子と置き換わるようにデザインした。

2、ターゲッティング

C57BL6 の ES 細胞、および BA1 ハイブリッド (129SvEv と C57BL6 のハイブリッド) ES 細胞を用いて TV のエレクトロポレーションを行った。

C. 研究結果

1、ターゲッティングベクタの構築

マウスフィラグリン遺伝子座を含む BAC clones より、GeneBridges 社の sRed/ET システムを用いて TV 構築に必要なフィラグリン遺伝子を含む genomic DNA (chromosome 3 において上記プライマーによって挟まれた範囲のゲノム DNA) を Backbone ベクターにサブクローニングした。Neo カセットを挿入する位置に in vitro mutagenesis により必要な制限酵素切断部位を作成し、Frt/loxP-neo カセットを挿入して TV 1 および 2 を作成した。C57BL6 の ES 細胞にエレクトロポレーションを行ったが陽性細胞が取得できなかつたため、BA1 ハイブリッドの ES 細胞でのエレクトロポレーションに変更した。

2、フィラグリン欠損マウスの作製

TV1 によりターゲットされた BA1 ハイブリッド ES 細胞が得られた (図 1)。この ES

細胞をマウス胚に注入することでキメラマウスを得ている。現在、このキメラマウスを交配中である。

D. 考察・結論

アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製に関しては、まだ最適な抗原塗布条件の検討を開始したばかりであるが、OVA 塗布後の TEWL に関し flaky tail マウスと野生型マウス間で有意差を認めている。今後フィラグリン欠損マウスを解析に加え、疾患発症機序の解析に有用となるアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指す。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

フィラグリン遺伝子改変によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成 (予定)

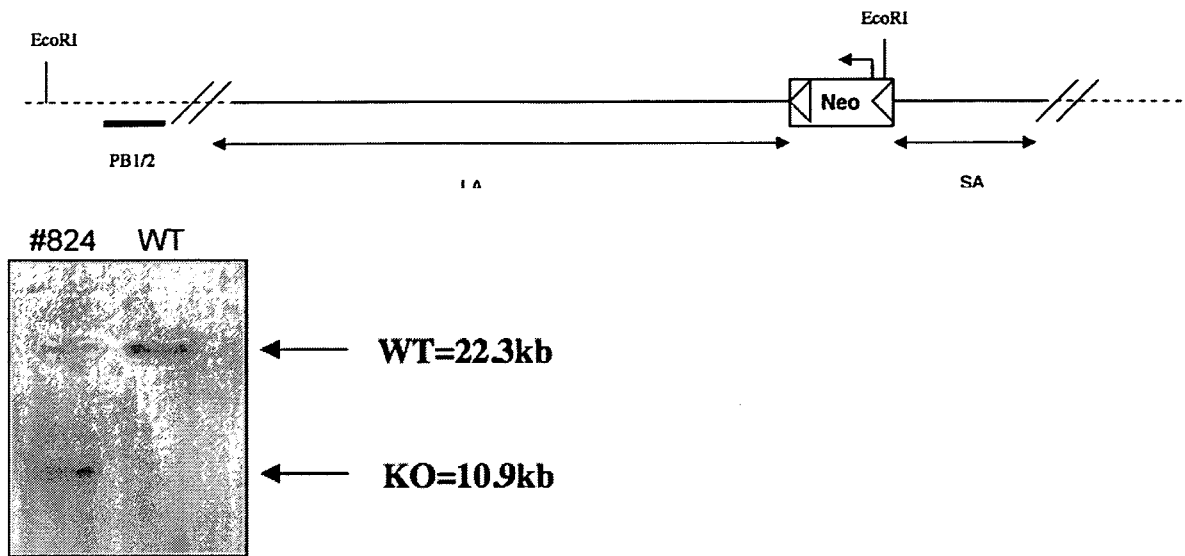


図1 相同組換え ES 細胞の確認

ターゲティングベクタのロングアームの外側にプローブを設定し、サザンブロットを行った。EcoRI 切断により出現が予想されるバンドの理論値は、WT=22.3kb、KO=10.9kb である。#824 の ES 細胞において相同組換えが確認された。

フィラグリン発現低下 flaky tail マウスを用いた アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

分担研究者 久保亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨 フィラグリン遺伝子変異がアトピー性皮膚炎発症の主要因として報告されている。フィラグリンは正常な角層形成に必須の蛋白質であり、皮膚のバリア機能に対し重要な役割を担う。本研究では、皮膚角層のバリア機能異常に基づく慢性的な抗原刺激がアトピー性皮膚炎の根本的発症要因の一つであるという仮説に基づき、フィラグリン欠損マウス及びフィラグリンの発現が著しく低下している flaky tail マウスを用いて、抗原に暴露されてから疾患が発症するまでの発症機序の解析を可能とするアトピー性皮膚炎マウスモデルを作製することを主目的とする。

研究協力者
川崎 洋 慶應義塾大学医学部大学院生

本研究ではこれを可能とする新規バリア機能評価法の確立も行う。

A. 研究目的

本研究では、皮膚角層のバリア機能異常に基づく慢性的な抗原刺激がアトピー性皮膚炎の根本的発症要因の一つであるという仮説に基づき、フィラグリン欠損マウス及びフィラグリンの発現が著しく低下している flaky tail マウスを用いて、抗原に暴露されてから疾患が発症するまでの発症機序の解析を可能とする初めてのアトピー性皮膚炎マウスモデルを作製することを主目的とする。

また、本研究では皮膚バリア機能という新しい観点に着目したモデルの作製を目指す。本研究で考える皮膚バリア機能とは外界からの抗原暴露に対し、体内への侵入を皮膚がどの程度食い止めることができるかという物質移動の障壁としての作用である。既存の皮膚バリア機能評価法において、外から内への皮膚バリア機能を定量的に評価する手法はいまだ確立されていないため、

B. 研究方法

1. 新規皮膚バリア機能評価法の確立

FITC でラベルした様々な分子量のデキストランあるいは nanoparticle をマウス皮膚に塗布する。皮膚を外から内へ通り抜けた色素標識した物質の量を、皮膚樹状細胞を介して所属リンパ節内に移動した蛍光色素陽性皮膚樹状細胞数として flow cytometry で定量的に評価する。

2. フィラグリン欠損マウス・flaky tail マウスを用いた新規アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

flaky tail マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) の背部の毛を適宜 5~7 日おきに剃毛し、同部に卵白アルブミン (OVA) を PBS、acetone、ペペーローション(ジョンソン・エンド・ジョンソン)の各種試薬に溶き、繰り返し塗布する。既存のモデルと比し、できるだけ tape

stripping や有機溶媒を使用するなどの人為的手段による皮膚バリア機能の破壊を用いずに皮膚炎を誘導するものとする。成体マウスだけでなく、新生仔マウスを用いたモデル作製も試みる。

本研究にて用いられるマウスは全て SPF 環境において管理され、オートクレーブされたケージ、床敷、水、 γ 線照射飼料を用いて飼育されている。全ての動物実験は、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って遂行され、慶應義塾大学医学部動物実験委員会により、動物実験計画が動物福祉の精神に則った適正な計画であることが承認されている。

C. 研究結果

1. 新規皮膚バリア機能評価法の確立

マウス皮膚を通過した FITC(MW 389)量を、FITC を取り込んだ皮膚樹状細胞数として定量評価することに成功し、FITC がアセトンなどによる皮膚バリアの破壊がなくても皮膚を通過することを証明した(図 1a)。FITC でラベルしたデキストラン(MW4000)は、flaky tail マウス、野生型マウス(C57BL/6)共に皮膚を通過しなかった(図 1b)。

2. flaky tail マウスを用いた新規アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製

成体マウス(6 週齢)と新生仔マウスの背部に OVA を PBS、acetone、ベビーローション(ジョンソン・エンド・ジョンソン)に溶き、連日塗布した。いずれのマウスでも、Day 40~50 で肉眼的・病理学的に明らかな皮膚炎の発症は認めなかった。しかし、新生仔マウスに OVA を塗布した群では、flaky tail マウスは野生型マウスに比べ有意に TEWL の上昇を認めた(図 2a)。成体マウスに OVA を塗布した群では、flaky tail マウスと野生型マウス間の TEWL 値に有意差を認めなかった(図 2b)。

D. 考察・結論

これまでのアトピー性皮膚炎モデルは、いずれもアトピー性皮膚炎様の病態作製には成功しているものの、抗原暴露から感作が成立するまでの疾患発症機序を正しく反映したモデルの作製には至っていない。そこで本研究では、皮膚バリア機能異常という新しい観点に着目し、人為的操作が不要でより自然な発症過程をとる、今まで研究の進まなかった抗原暴露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明に大きく貢献する普遍的モデルの作製を目指している。アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製に関しては、まだ最適な塗布条件の検討を開始したばかりであるが、新生仔マウスに OVA を塗布した際の TEWL に関し、flaky tail マウスと野生型マウス間で有意差を認めた。本結果は、フィラグリン変異が存在すると、抗原暴露により皮膚への抗原の侵入が容易となる可能性を示唆する。

今後は新規皮膚バリア機能評価法に関する実験において、MW をうまく調節することでフィラグリン欠損マウス、あるいは flaky tail マウスと野生型マウス間の皮膚バリア機能の差をより明らかなものとする。また、今回同実験にて、単純塗布では MW4000 の物質は皮膚を通過し得なかったことから、塗布抗原のサイズを変更する、あるいは皮膚の透過を促進する条件検討を行うことで、疾患発症機序の解析に有用となるアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指す。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

ファイラグリン遺伝子改変によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成(予定)

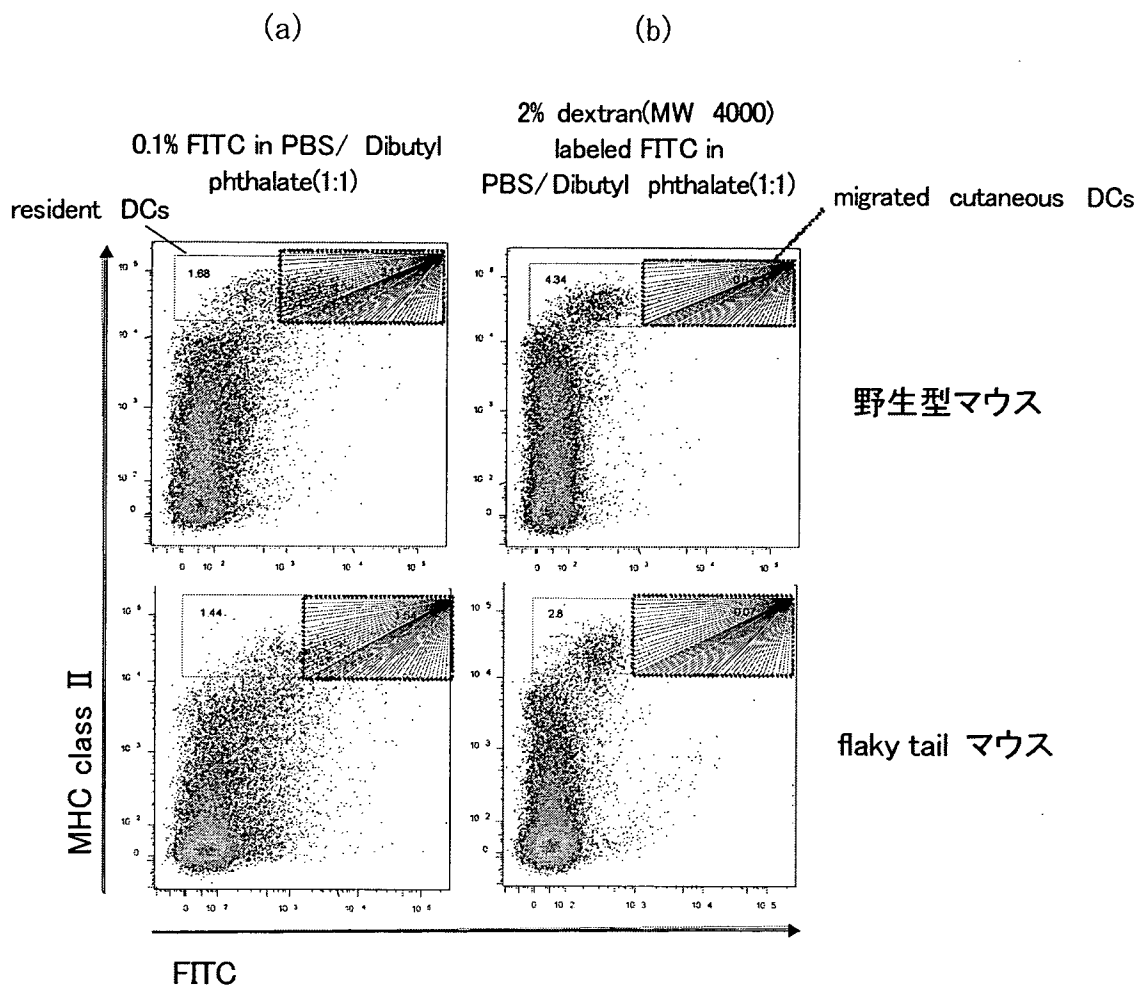


図1 FITCを用いた皮膚バリア機能評価

- (a) 0.1%FITCを両下肢に塗布し、24時間後の鼠経リンパ節をflow cytometryで解析したところ、flaky tailマウス、野生型マウス(C57BL/6)共にFITC陽性の皮膚樹状細胞数(migrated cutaneous DCs)の増加を認めた。
- (b) FITCにてラベルしたデキストラン(MW4000)を両下肢に塗布し、24時間後の鼠経リンパ節をflow cytometryで解析したところ、flaky tailマウス、野生型マウス(C57BL/6)共にFITC陽性の皮膚樹状細胞数(migrated cutaneous DCs)の増加は見られなかった。

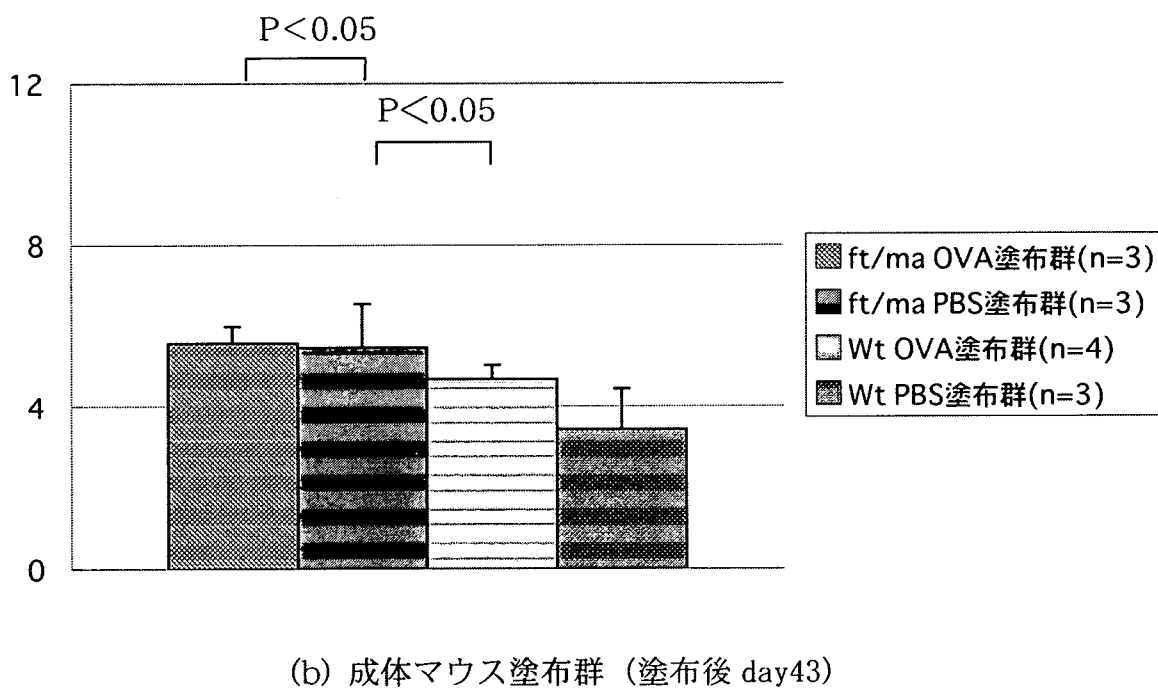
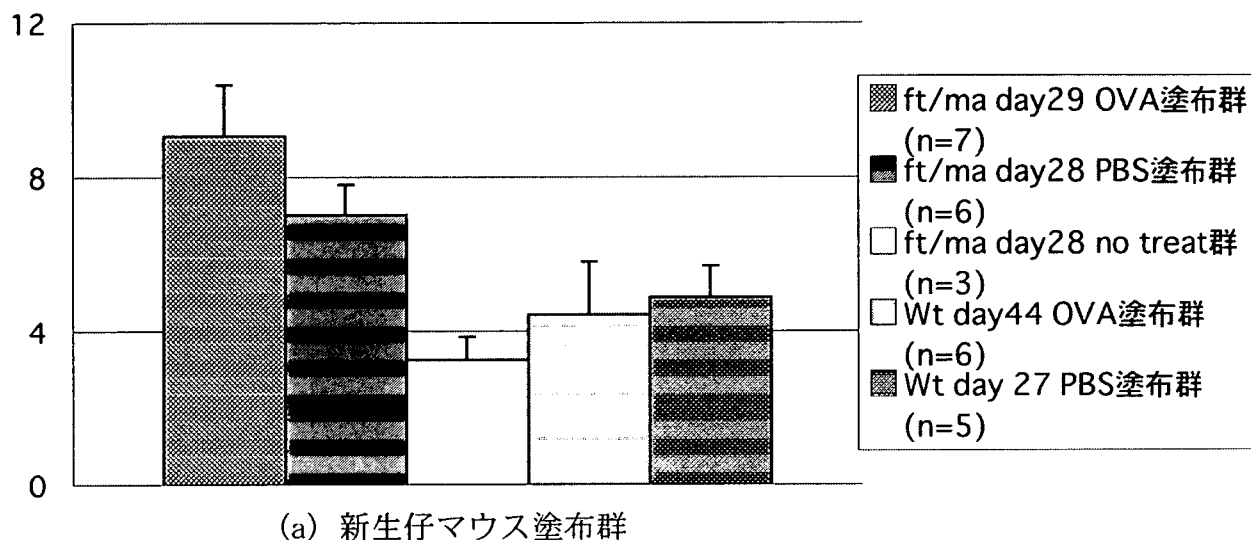


図2 OVA 塗布後の TEWL

(a) 新生仔マウスに OVA ($200 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)、及びコントロールとして PBS ($20 \mu\text{l}$) 塗布を連日行った。flaky tail マウスは野生型マウスに比し、OVA 塗布、PBS 塗布後の TEWL の上昇が著しい。

(b) 成体マウスに OVA ($200 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)、及びコントロールとして PBS ($20 \mu\text{l}$) 塗布を連日行った。flaky tail マウス、野生型マウス間の TEWL に有意差を認めなかった。