

## アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析

分担研究者：梶島 健治 産業医科大学 医学部 皮膚科 准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎の原因の一つとしてフィラグリン遺伝子の異常が提唱されて以来、バリア機能の皮膚免疫に及ぼす影響の検証の必要性が問われている。そこで我々はバリア刺激の代表として細胞間脂質を失わさせて引き起こすアセトン刺激と、角層細胞を脱失させてバリアを損傷させるテープストリッピング刺激の2種類の刺激を行い、皮膚免疫における影響を検証した。すると、アセトン刺激に比べ、テープストリッピング刺激はケラチノサイトそのものに作用し、Th2を誘導するケモカインを誘導して、好酸球浸潤を伴う強いTh2を誘導した。これらの実験結果はバリア破壊、特にそう破によるようなものの場合、Th2を強く誘導し、アトピー性皮膚炎を増悪させる方向に作用することが示された。

研究協力者：吉木 竜太郎  
産業医科大学医学部皮膚科 助教

### A. 研究目的

ハプテン反復塗布誘発マウスアトピー性皮膚炎(atopic dermatitis; AD)モデルでは、ハプテン塗布時のアセトンによるバリア破壊とハプテンの反復塗布、すなわち抗原の慢性暴露が不可欠である。また、バリア破壊にはアセトンのような有機溶媒によるものとテープストリッピングのような角層そのものを剥離させるそう破行動に近いタイプの刺激の2種類に分類できる。この2種類のバリア破壊は各々角層間脂質の除去によるバリア破壊と、搔爬による角層ごと除去してしまうバリア破壊と考えられ、2つのバリア破壊が免疫系に及ぼす影響が異なっている可能性がある。一方、皮膚には抗原提示細胞としてランゲルハンス細胞(Langerhans cell; LC)と真皮樹状細胞(dermal dendritic cell; dDC)の2種類のDCが存在するが、ADの発症における皮膚DCの役割分担は不明で

ある。そこで、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、AD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明することを本研究の目的とする。

### B. 方法

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、Th1, Th2のどちらに皮膚の免疫環境をシフトさせる傾向があるかを調べた。

また、アセトン刺激とテープストリッピング刺激後の耳介における好酸球数を経時的に定量し、Th2へのシフトのしやすさの違いを検証した。

次に、アセトン刺激とテープストリッピングの外来抗原に対する免疫応答へのin vivoでの効果を検証した。蛍光ハプテンであるFITCを腹部に塗布して感作し、感作の成立した5日後にFITCで惹起し、惹起後1, 4, 8, 24時間後

の耳介腫脹反応を測定した。耳介腫脹後 1 時間後は即時型過敏反応、2 - 8 時間後は late phase reaction、24 時間後は Th1 型過敏反応である遅延型過敏反応を示しているとされる。

さらに、FITC 塗布後の所属リンパ節における FITC 陽性細胞における LC と dDC 分画を LC に特異的な Langerin 抗体を用いて分別し、CD11c, CD11b や MHC class II などの表面抗原を flowcytometry により解析した。

### C. 結果

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 (図 1)。

また、テープストリッピング刺激はアセトン刺激に比して強い好酸球の皮膚への浸潤を誘導した (図 2)。この結果と合致して、FITC 塗布による皮膚免疫応答反応は、テープストリッピング刺激により、より強い Th2 型反応である late phase reaction をアセトン刺激に比べて誘導した (図 3)。

最後に、FITC 塗布 24 時間後の所属リンパ節中の FITC 陽性分画において Langerin 陽性 LC は CD11c<sup>high+</sup> CD11b<sup>low+</sup> であり、Langerin 陰性 dDC は CD11c<sup>high+</sup> CD11b<sup>high+</sup> あるいは CD11c<sup>low+</sup> CD11b<sup>low+</sup> であった (図 4)。

### D. 考察

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 AD の本態とも言える Th2 優位へと皮膚の環境をシフトさせ、AD そのものの誘導や増悪に関与する可能性がある。今後は各バリア破壊のもつ意義とその破壊による生体への影響を検証することが重要であると考える。また Langerin の染色に

は細胞膜を permeabilize させるために LC と dDC を生きたまま分離できなかったが、今回の CD11c と CD11b での二重染色により、生きたままでの分離が可能となった。これらの細胞を用いて各刺激下における両者の抗原提示能などの機能を今後検証していきたい。

### E. 結論

そう破行動は Th2 優位な皮膚状態を誘導し、アトピー性皮膚炎そのものを増悪、誘導する可能性があることが示された。また、皮膚の dDC と LC を生きたまま分離できる方法を確立した。

### F. 研究危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Atarashi K, Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y. 2007. Stimulation of Langerhans cells with ketoprofen plus UVA in murine photocontact dermatitis to ketoprofen. *J Dermatol Sci* 47: 151-9
2. Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. 2007. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 156: 830-7
3. Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S. 2007. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest* 87: 49-55
4. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y. 2007. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 171: 1249-57
5. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N,

- Tamamura H, Fujii N, Tokura Y. 2007. CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 1012-6
6. Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y. 2007. Inhibitory effects of epinastine on chemokine production and MHC class II/CD54 expression in keratinocytes. *J Dermatol Sci* 45: 144-6
  7. Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, Furuyashiki T, Murata T, Segi-Nishida E, Soontrapa K, Matsuoka T, Miyachi Y, Narumiya S. 2007. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med* 204: 2865-74
  8. Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. 2007. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci* 48: 25-33
  9. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, Tokura Y. 2007. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 121: 2585-90
  10. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. 2007. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* 147: 176-83
  11. Sugita K, Kabashima K, Nakashima D, Tokura Y. 2007. Oral allergy syndrome caused by raw fish in a Japanese sushi bar worker. *Contact Dermatitis* 56: 369-70
  12. Sugita K, Kabashima K, Nishio D, Hashimoto T, Tokura Y. 2007. Th2 cell fluctuation in association with reciprocal occurrence of bullous pemphigoid and psoriasis vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21: 569-70
  13. Tokura Y, Sugita K, Kabashima K, Ito T, Yagi H. 2007. Alopecia universalis associated with impaired interleukin-4 production and low serum IgE level. *J Am Acad Dermatol* 57: S22-5
  14. Tokura Y, Sugita K, Yagi H, Shimauchi T, Kabashima K, Takigawa M. 2007. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with fatal leukemic outcome in association with CLA and CCR4-negative conversion. *J Am Acad Dermatol* 57: S92-6
  15. Kabashima K, Sugita K, Tokura Y. 2008. Increment of circulating plasmacytoid dendritic cells in a patient with Kaposi's varicelliform eruption. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22: 239-41
  16. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, Sugita K, Shiraishi N, Onoue A, Kuroda E, Kobayashi M, Yamashita U, Tokura Y. 2008. Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol*
  17. Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, Isoda H, Abe S, Yamada Y, Hino R, Ogata M, Kabashima K, Tokura Y. 2008. Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon-gamma and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol Sci*
  18. Sugita K, Kabashima K, Nakashima D, Tokura Y. 2008. Papuloerythroderma of Ofuji induced by furosemide. *J Am Acad Dermatol* 58: S54-5
  19. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y. 2008. Fexofenadine downmodulates antigen-presenting ability of murine epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 49: 88-91
  20. Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K. 2008. Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp Dermatol* 17: 81-90

## 2.学会発表

### 国外学会

1. Kenji Kabashima Lipid mediators and the skin 1st annual symposium at the Institute of Dermatological Science, Seoul,2007
2. Kenji Kabashima Mechanism of plasma cell homing and localization. Seoul National

University, Seoul, 2007

3. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, Los Angeles, 2007

## 国内学会

4. 梶島健治：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. 梶島健治. 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
6. 梶島健治. 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
7. 梶島健治, 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
8. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. 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
9. 梶島健治, 島内隆寿, 大島孝一, 戸倉新樹: 皮膚原発B細胞性リンパ腫における chemokine receptor 発現の検討、第47回日本リンパ網内系学会、淡路、2007
10. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. 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
11. 梶島健治, 長町美野子, 坂田大治, 成宮周: Facilitation of Th1 mediated immune response by PGE receptor EP1, 17<sup>th</sup> Kyoto T cell conference、京都、2007
12. 梶島健治: スフィンゴシン1リン酸によるリンパ球トラフィッキング機序の新たな知見, 第28回日本炎症・再生医学会、東京、2007
13. 梶島健治, 坂部純一, 山田陽子, 戸倉新樹: 長島型掌蹠角化症の一例, 第22回角化症研究会、東京、2007
14. 梶島健治, 吉木竜太郎, 坂部純一, 戸倉新樹: pachydermoperistosis における DKK-1 の役割, 第22回角化症研究会、東京、2007
15. 梶島健治: 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
16. 梶島健治, 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
17. 梶島健治: 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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1：アセトン刺激、テープストリッピング刺激の6, 12, 24時間後の表皮ケラチノサイトより産生されるTh1 chemokine (IP-10, Mig)とTh2 chemokine (TARC, MDC) mRNAをreal time PCRにより定量した。

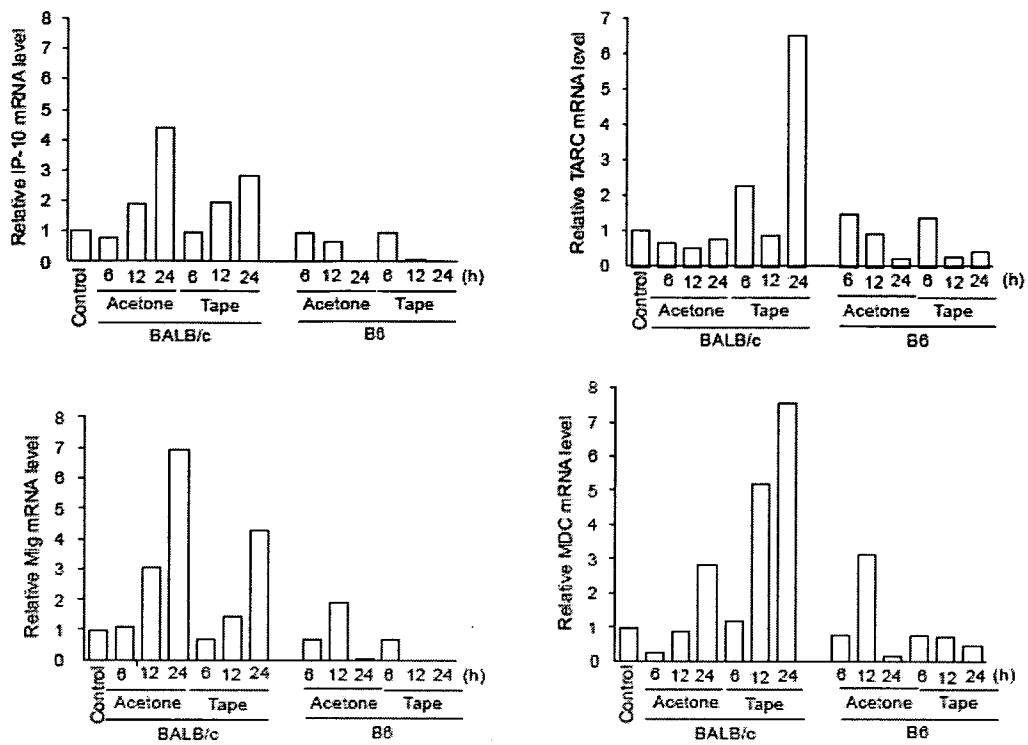
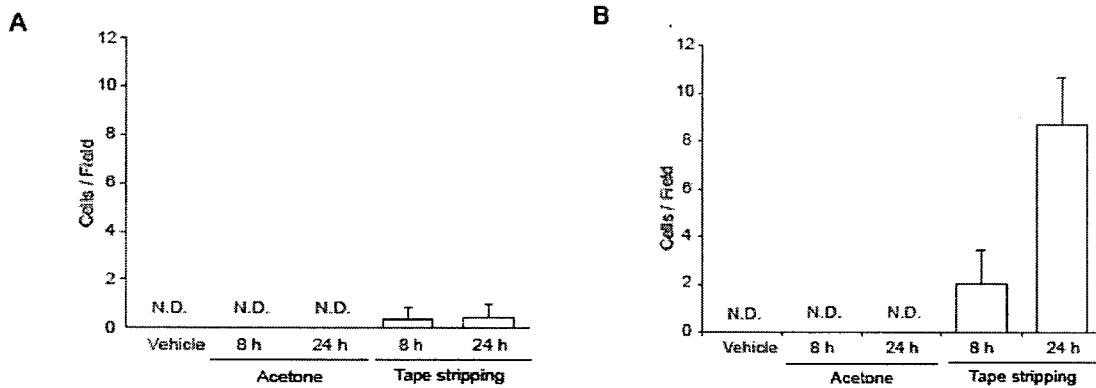


図2：アセトン、テープストリッピング刺激8, 24時間後の耳介への浸潤好酸球数を定量した。



C

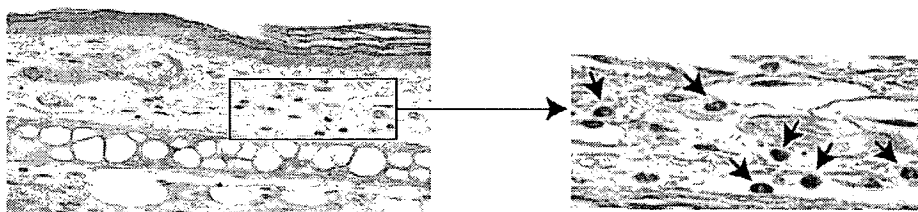


図3：FITC感作5日後に、アセトン、テープstripping刺激の後にFITC惹起を行い、その後の耳介腫脹の変化を測定した。

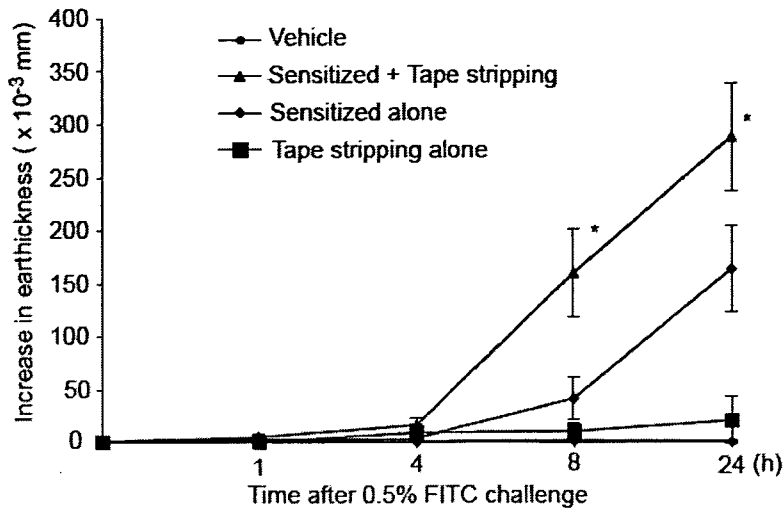
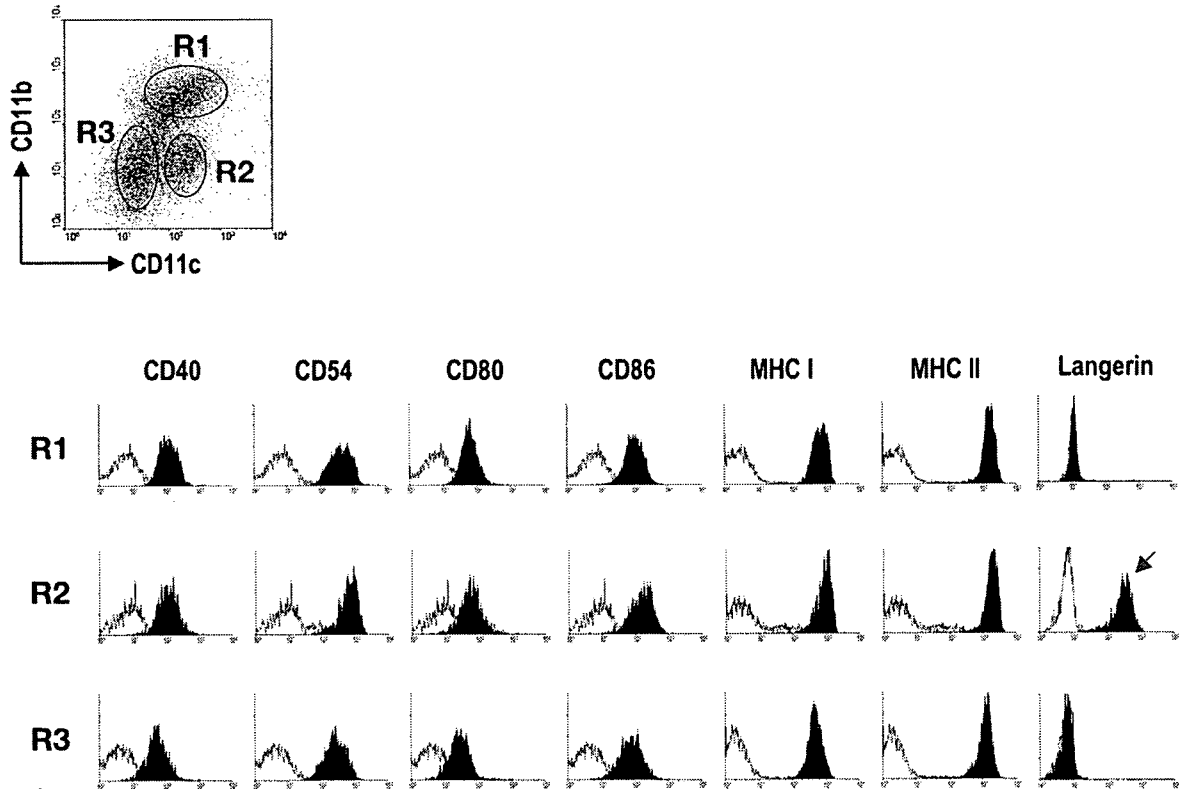


図4：FITCを腹部に塗布24時間後に所属リンパ節を採取し、CD11cとCD11bで展開し、ランゲリン陽性ランゲルハンス細胞の細胞表面マーカーの特徴を調べた。



## 経皮的抗原感作による喘息誘導

分担研究者氏名 浅野 浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科 講師

**研究要旨** バリア機能が破綻した皮膚からの抗原感作によりハプテンなしで喘息を発症するマウスモデル作成を目標とした。卵白アルブミンを吸収させたパッチを正常あるいは物理的に傷害した皮膚に貼付し、その後に抗原吸入曝露を行った。その結果、傷害皮膚から抗原感作したモデルでは抗原曝露後の好酸球性気道炎症、気道上皮の杯細胞化生を認めたが、正常皮膚に感作した群、あるいは傷害皮膚に PBS 吸収パッチを貼付した群ではそのような反応は認められなかった。これにより、フィラグリンの異常によって生じた皮膚バリア機能の障害が喘息の発症に及ぼす影響について検討可能なマウスモデルが確立した。

### 研究協力者

小熊 剛 慶應義塾大学医学部呼吸器内科

助教

樹神元博 慶應義塾大学医学部呼吸器内科

### A. 研究目的

重症のアトピー性皮膚炎を発症した乳幼児が喘息を併発した場合、しばしば気道炎症の難治化をきたし最終的にはリモデリングによる不可逆性気流閉塞にいたることが多い。これは経皮的な抗原感作が気道病変の病態に影響する可能性を示唆している。実際、皮膚バリア機構を司るフィラグリンの遺伝子異常がある場合、喘息とアトピー性皮膚炎を伴うことが多いとの疫学的データがある。従来のマウス喘息モデルでは抗原をハプテンとともに全身投与しなければ感作が成立せず、抗原のみを経気道的に曝露しても感作が生じない。皮膚バリアが傷害されている場合には経皮抗原感作によってハプテンなしでも喘息様の気道炎症を発症する、との仮説の元にマウスを用いて検討を行った。

### B. 研究方法

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) ハプテンであるアラムとともに腹腔内投与、(2) 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、(3) バリアを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。

### C. 結果

アラム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（図 1 A, D）。一方、バリアを傷害した皮膚への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（図 1 C, F）。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(図1B、E)。皮膚バリアの傷害方法のうち、脱毛クリームを塗布してから物理的に擦過する方法が最も再現性良く好酸球性気道炎症を誘導し、テープによる傷害はかえって気道炎症を抑制する場合もあった。

#### D. 考察

ハプテンなしでも脱毛クリーム処置などにより皮膚バリアが傷害されていれば経皮抗原感作により好酸球性気道炎症が成立することが明らかになった。今後、さらにこのモデルに改良を加えるとともに、フィラグリンのノックアウトマウスを用いて、皮膚のバリア機構の破綻が気道炎症の成立、難治化に影響を及ぼす影響を検討する。

#### E. 結論

バリア機能が破綻した皮膚からの抗原感作により、ハプテンなしで喘息を発症するマウスモデルを作成できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Y Shiraishi, K Asano, K Niimi, et al. Cyclooxygenase-2/Prostaglandin D<sub>2</sub>/CRTH2 pathway mediates double-stranded RNA-induced enhancement of allergic airway inflammation. *J Immunol* 180: 541-549, 2008.
2. K Niimi, K Asano, Y Shiraishi, et al. Toll-like receptor 3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol* 178: 489-495, 2007

学会発表

1. K Asano, Y Shiraishi, K Niimi, et al. Double-stranded RNA-induced exacerbation of

allergic airway inflammation. World Asthma Meeting 2007, 2007. 6

2. K Asano, Y Shiraishi, S Kagawa, et al. Enhanced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in response to TLR3 ligand in murine models of asthma. 63rd AAAAI Annual Meeting, 2008. 3

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得                   なし
2. 実用新案登録           なし
3. その他                   なし



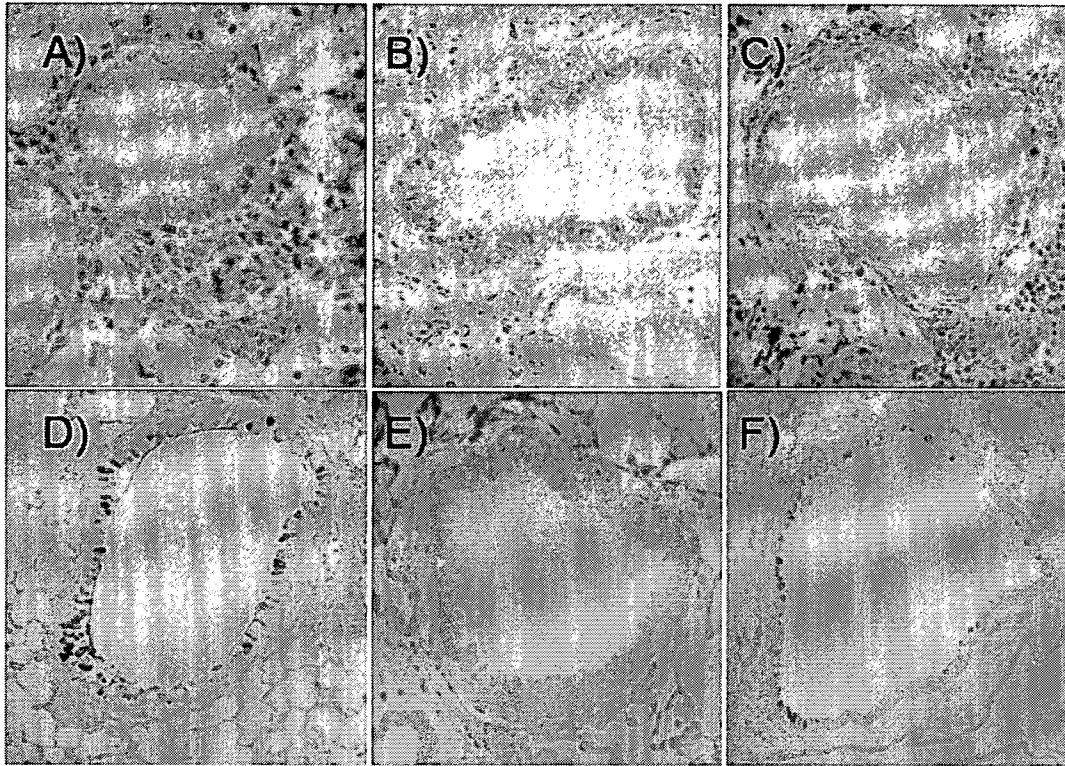


図1. 腹腔内あるいは経皮抗原感作マウスにおける気道炎症  
 卵白アルブミンをハプテン（アラム・百日咳菌ワクチン）とともに腹腔内投与  
 （A、D）、正常皮膚に卵白アルブミンのみを吸収させたパッチを貼付（B、E）、  
 バリアを傷害した皮膚に卵白アルブミンのみを吸収させたパッチを貼付（C、F）  
 して感作を行い、3週目に2%卵白アルブミンを吸入させた。OVA吸入24時間  
 後に肺を摘出し、ギムザ染色（A - C）、PAS-アルシアン青染色（D - F）を行っ  
 た。

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

分担研究者 古瀬幹夫 神戸大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** バリア異常を伴うマウス皮膚疾患モデルにおける細胞間接着装置タイトジャンクションの異常を形態学的・機能的に解析するための基礎実験として、マウス皮膚におけるタイトジャンクション関連分子の発現、および、細胞間隙におけるトレーサー浸透アッセイを野生型マウスにおいて検討した。タイトジャンクション関連分子抗体を用いた蛍光抗体法により、仔マウス、成体マウスともに背表皮におけるタイトジャンクションの存在を光学顕微鏡レベルで確認できた。一方、トレーサー浸透アッセイは、仔マウスでタイトジャンクションのバリア機能を明確に視覚化することができたが、幼マウス、成体マウスの適用には技術的な問題が残った。また、タイトジャンクションの接着分子であるクローディン1の遺伝子欠失マウスにおける皮膚バリア機能破綻の原因として、角質層バリア機能異常の可能性について検討を開始し、角質層が野生型マウスと比較して生化学的に異なることを見出した。

**A. 研究目的**

最近、細胞間接着構造タイトジャンクションの機能解析から、表皮顆粒層細胞に細胞間隙の拡散バリアとして機能的なタイトジャンクションが存在すること、その構成分子であるクローディン1の遺伝子欠失マウスが皮膚バリアの異常による脱水から致死となることが明らかになった。そこで、本研究では表皮のタイトジャンクションがバリア障害を介してアトピー性皮膚炎に関与する可能性を検討する。具体的には、正常マウス、アトピー性皮膚炎を含む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、分布を調べる。また、皮膚からの著しい脱水を示すクローディン1遺伝子欠失マウスにおいて、これまで検討されていない角質層バリアの異常を解析する。

**B. 研究方法**

1) 安楽死させた正常マウスの背皮膚を採取し、無固定のまま OCT コンパウンドに包

埋、厚さ 6-8 ミクロンの凍結切片を作製した。95%エタノールとアセトン処理により固定した後、蛍光抗体法により、タイトジャンクション構成分子であるオクルディン、クローディンファミリーを染色し、その発現と分布を蛍光顕微鏡で解析した。

2) 麻酔下で剃毛したマウス背皮下に、NHS-Sulfo-Biotin (Pierce 社)10mg/ml in PBS をトレーサーとして注射し、30 分間後に安楽死させて皮膚を採取して OCT コンパウンドに包埋、厚さ 6-8 ミクロンの凍結切片を作製した。1) と同じ方法によりオクルディンを蛍光抗体法で可視化するとともに、蛍光標識ストレプトアビジンによりトレーサーを蛍光顕微鏡下で同時に検出し、トレーサーが表皮顆粒層細胞のタイトジャンクションを透過するか否かを検討した。

3) 安楽死させた出生直後の同腹のクローディン遺伝子欠失マウス、野生型、ヘテロマウスを X-gal 溶液 (PBS, pH4.5) に浸

して皮膚内在性の beta-galactosidase によって発色させた後、皮膚を採取し、凍結切片を作成して皮膚の発色部位を検討した。

### C. 研究結果

1) 生後1日、4日、4週、8週のマウスにおいて、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(図1)。文献上、成体マウスで発現が報告されているクローディン6、クローディン11については、この方法では発現が検出できなかった。抗オクルディンモノクローナル抗体 MOC37 を用いる限りオクルディンは顆粒層のタイトジャンクションに局限するのに対し、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 junction と思われる部位に染色が観察された。新生児マウスに比べて成体マウスでは表皮細胞層の数が少なく、有棘層、顆粒層、角質層の区別が不明瞭であった。

2) 生後1日、4日のマウスでは、皮下投与したトレーサーが表皮細胞間隙をたどって顆粒層のオクルディン濃縮部位まで到達したところでそれより外側への浸透が阻まれ、タイトジャンクション部位における拡散バリアの存在が可視化できた(図2)。ところが、生後4週以降のマウスでは、表皮細胞層が少ない上、角質層が仔マウスと比較してきわめて薄い。そのため、実験操作上皮膚外側に付着するトレーサーに蛍光標識ストレプトアビジンが結合して発する強い蛍光シグナルがバックグラウンドとなり、タイトジャンクション部分のトレーサー浸透を確実に検出することが困難であった。

3) クローディン1遺伝子欠失マウスの皮膚は、X-gal を基質とする内在性 beta-galactosidase 活性によって強く発色した。その発色は角質層の外側に見られた(図3)。

### D. 考察

顆粒層細胞のタイトジャンクションの同定には、クローディンよりも局在の厳密なオクルディンの染色(モノクローナル抗体 MOC37)を指標にするとよいことが確認された。ただし、仔マウスでは表皮層が厚く、基底層、有棘層、顆粒層、角質層が明確に区別できるのに対し、4週を越えたマウスでは、表皮層が薄く、有棘層、顆粒層の違いは不明瞭で角質層もきわめて薄いため、従来のトレーサー浸透アッセイでタイトジャンクションのバリアを示すことが難しかった。クローディン1遺伝子欠失マウス皮膚における顕著な beta-galactosidase 活性には、バリアの破綻という観点からは基質である X-gal の皮膚外側からの浸透が角質層バリアの破綻によりクローディン1遺伝子欠失マウスで亢進していると考えられることができるが、もう一つの解釈として、クローディン1欠失によって角質層の beta-galactosidase 活性が何らか理由により増したという可能性も否定できない。クローディン1欠失マウスの角質層が野生型マウスと比較して生化学的に異なることが示されたが、今後詳細な検討が必要である。

### E. 結論

オクルディンの染色を指標とすることで、仔マウス、成体マウスの皮膚において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る。皮膚の内側から外側へのタイトジャンクションのバリア機能を従来のトレーサー浸透アッセイで評価するためには、表皮層が厚い仔マウスで病態を呈する皮膚疾患モデルが望まれる。クローディン1遺伝子ノックアウトマウスについては、今後、角質層のバリア機能を本格的に解析する必要がある。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表(平成19年度)

#### 1. 論文発表

英語論文

1. Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M: Tight junctions containing claudin 4 and 6 are

essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 312:509-522, 2007

2. Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita Sh, Tsukita Sa: Megaintestine in claudin-15-deficient mice.

*Gastroenterology* 134:523-534, 2008

3. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita J K, Nishi E, Tsukita S, Furuse M: Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp. Cell Res.* 314:939-949, 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

2. 学会発表

国際学会

1. Furuse M: Epithelial and endothelial tight junctions. 4<sup>th</sup> World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery. June 20-22, 2007 (Kanazawa, Japan)

2. Furuse M: Identification of novel protein

components of the junctional complex by the fluorescence localization-based expression cloning (FL-REX) method. 10<sup>th</sup> International Symposium on "Signal transduction in the blood-brain barriers", September 13-16, 2007 (Potsdam, Germany)

国内学会

1. 古瀬幹夫：タイトジャンクションと皮膚のバリア機能 第32回日本化粧品学会特別講演 2007年6月8日 東京

2. 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 2007年9月23日 札幌

3. 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 2008年3月1日 東京

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし

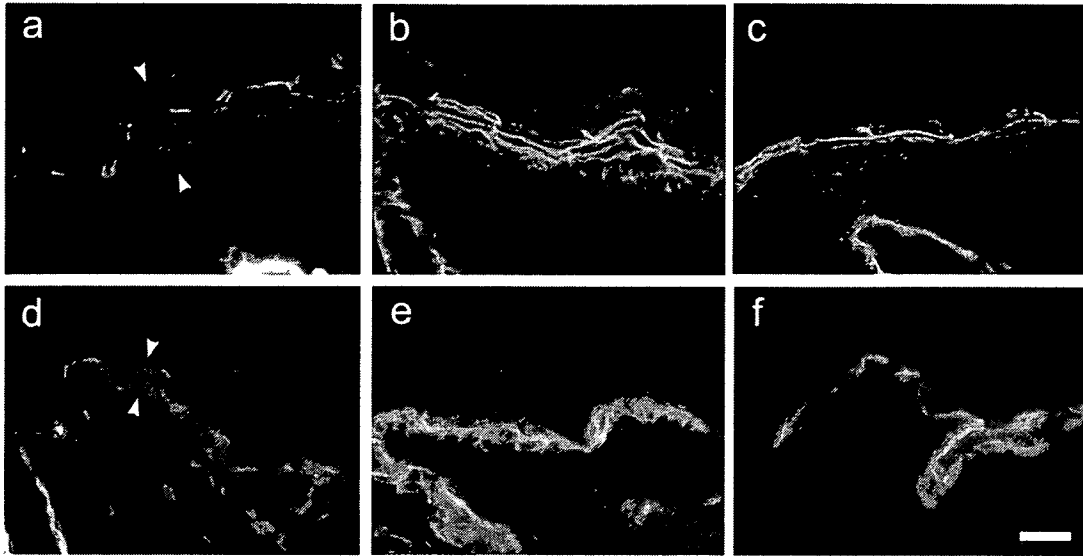


図1 生後4日(a-c), 4週(d-e)マウス背表皮における抗オクルディンモノクローナル抗体 MOC37 (a, d), クローディン1ポリクローナル抗体(b, e), クローディン4ポリクローナル抗体(c, f)による蛍光抗体染色像。角質層付近にみられるオクルディンの線状の濃縮により表皮のタイトジャンクションが可視化できる。クローディン1は基底層から角質層、クローディン4は角質層の細胞周囲全体に発現している。矢頭(a, c)は表皮細胞層の厚さを示す。生後4日の表皮層は基底層から角質層までの細胞が明確に識別できるのに対し、生後4週の表皮では細胞層の数が少なくきわめて薄い。スケールバー：20 mm

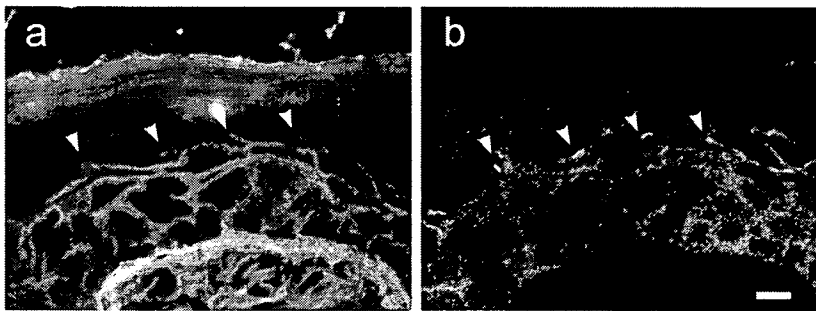


図2 マウス表皮におけるトレーサー浸透アッセイ。生後4日マウスの皮下に注射したトレーサーが細胞間隙を角質層方向へ拡散し、タイトジャンクションのバリア機能によって顆粒層細胞で拡散が止まっている様子を可視化。トレーサーの浸透が矢頭の位置で止まっている(a)。同じ試料でタイトジャンクションの位置を抗オクルディン抗体による蛍光抗体法で可視化すると(b)、タイトジャンクションとトレーサー浸透の先端が一致していることがわかる。スケールバー：20 mm

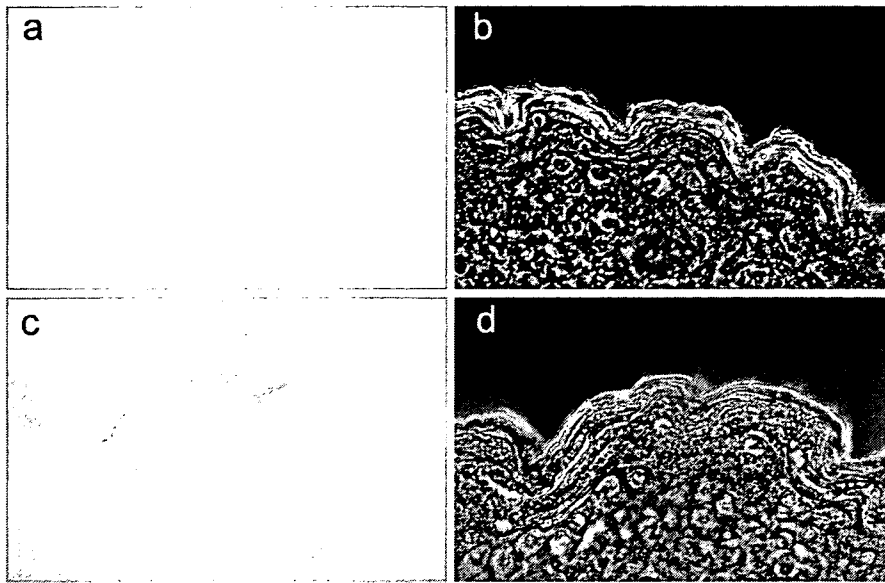


図3 生後1日目の野生型マウス(a, b)、クローデイン1欠失マウス(c, d)表皮の外から投与した基質に対する内在性beta-galactosidase活性(X-galの発色a, c)と位相差像(b, d)。クローデイン1欠失マウスの角質層に強いbeta-galactosidase活性がみられる。

## 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

分担研究者 工藤 純 慶應義塾大学医学部分子生物学教室 准教授

**研究要旨** 欧州のアトピー性皮膚炎患者の約 50%にフィラグリン遺伝子の変異が発見されたことから、フィラグリン蛋白の減少により皮膚バリア機能が障害される可能性が示された。我が国のアトピー性皮膚炎患者群におけるフィラグリン遺伝子変異の寄与の度合いを評価するために、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、フィラグリン遺伝子の変異同定および多型解析を行なった。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）に分類し、さらに 2 種類の新規ナンセンス変異（8666-8667CC>GA と 9887C>A）をそれぞれ 2 症例ずつから発見した。新規に同定した変異を含む 7 種のフィラグリン遺伝子変異を日本人患者群 105 人で解析した結果、計 7 名（6.7%）しか変異を有していなかった。

以上の結果から、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の変異は存在し、欧州の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示唆されたが、欧州とは変異の起源も変異保有率も全く異なっていた。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。

### 共同研究者

佐々木 貴史

慶應義塾大学医学部助教

河野 通良

慶應義塾大学医学部特別研究助教

リサーチレジデント

### A. 研究目的

現在までに欧州のアトピー性皮膚炎患者の約 50%にフィラグリン遺伝子の変異が発見されている。この事からフィラグリン蛋白の減少により皮膚バリア機能が障害されることが、アトピー性皮膚炎の発症の根底にあるのではないかという可能性が示された。今回我々は、我が国のアトピー性皮膚炎患者群におけるフィラグリン遺伝子変異の寄与の度合いを評価するために、フィラグリン遺伝子の変異および多型解析を行なった。

### B. 研究方法

フィラグリン遺伝子は 972bp あるいは 975bp を単位とする配列が 11～13 回繰り返す領域を含むために通常の DNA 配列決定法では解読が困難である（図 1）。そこで我々は、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（図 2）、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た（表 1、図 3）。8666-8667CC>GA 変異は、FLGREPU8-841F 及び FLGREP-215R プライマーで PCR 後、増幅産物を Bam HI を用いて切断し、Bam HI 非感受性(変異有り)、感受性(変異無し)を検出した(図 3A)。

9887C>A は FLGREPU10-119F 及び FLGREPU10B-368R プライマーで PCR 後、増幅産物を *Sau* 3AI を用いて切断し、切断片長の違いで変異を検出した (図 3B)。野村ら (*J. Allergy Clin. Immunol.* **119**:434-440, 2007) が報告した 7661C>G 変異は FLGREPU7-849F 及び FLGREPU8-46R で PCR 後、増幅産物を *Hpy* 188I を用いて切断し、切断片長の違いで変異を検出した (図 3C)。野村らが同定した 3321delA 及び Sandilands ら (*Nat. Genet.* **39**:650-654, 2007) が同定した 3702delG 変異は、FLGREPU3-327F 及び FLGREP-965R1 プライマーで PCR 後、増幅産物の配列を決定して、変異を検出した。Palmer ら (*Nat. Genet.* **38**:441-446, 2006) が同定した 1537C>T は FLGREPU1-465F 及び FLGREP-965R1 プライマーで PCR 後、増幅産物を *Nla* III を用いて切断し、切断片長の違いで変異を検出した。Palmer らが同定した。2282del4 は、RPT1P7 及び RPT2P1 プライマーで PCR 後、増幅産物を *Dra* III を用いて切断し、切断片長の違いで変異を検出した。これらの方法を用いて、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。アトピー性皮膚炎患者の収集は分担研究者の海老原らが担当した。

### C. 研究結果

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 (図 4、表 2)。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) の有無を簡便検出法 (表 1、図 3) を用いて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 (表 3)。

### D. 考察

今回、変異の出現頻度解析を行った 7 種類のフィラグリン遺伝子変異のうち 3 種類 (1537C>T, 3702delG, 2282del4) は欧州人患者から発見された主要な変異であり、欧州においてはアトピー性皮膚炎患者の 50% が、いずれかの変異を有する事が報告されているが、日本人患者 105 人中では 1 人も有しておらず、人種によって変異遺伝子の起源が全く異なる事が示された (表 3)。日本人アトピー性皮膚炎患者の変異は、我々が今回発見した 2 種類

(8666-8667CC>GA, 9887C>A) および北大・皮膚科グループが報告した 2 種類 (7661C>G, 3321delA) の計 4 種類であるが、今回の解析では、日本人患者群 105 人中計 7 名 (6.7%) しか変異を有していなかった (表 3)。この顕著な違いが生じた原因として (1) 日本人においては、皮膚バリア機能の障害が原因となる患者が少ない (2) 日本人においてはフィラグリン以外の皮膚バリア機能蛋白の欠損が主要な原因となっている等の可能性も示唆されたが、(3) 日本人フィラグリン遺伝子変異の主要なものをまだ検出していない可能性も否定できず、さらなる検討が必要である。

### E. 結論

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の変異は存在し、欧州の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示唆された。しかし、欧州とは変異の起源も変異保有率も全く異なっていた。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。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表 (平成 19 年度)

1. 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.*

2. 学会発表

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年7月

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年12月

**H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

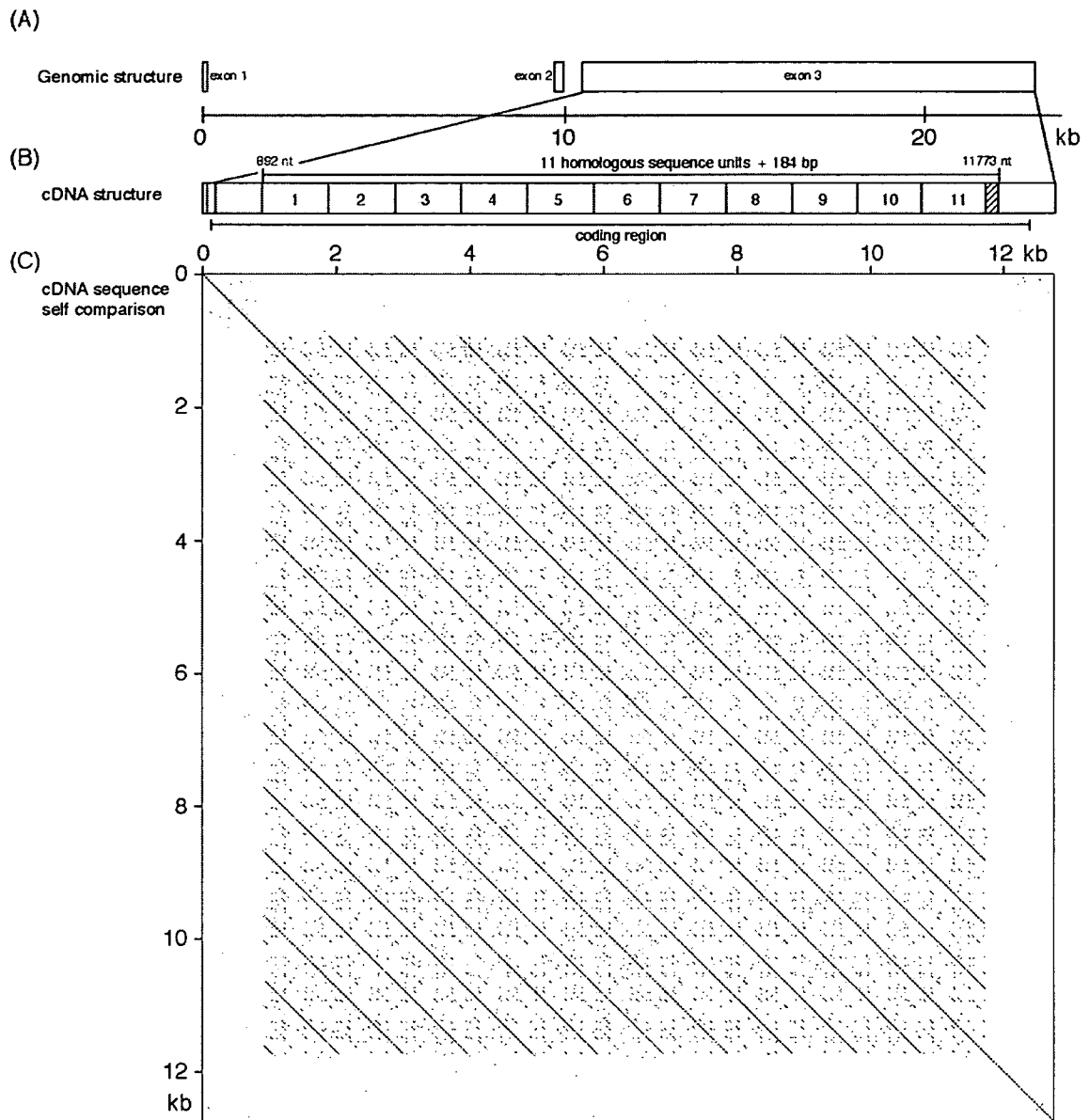
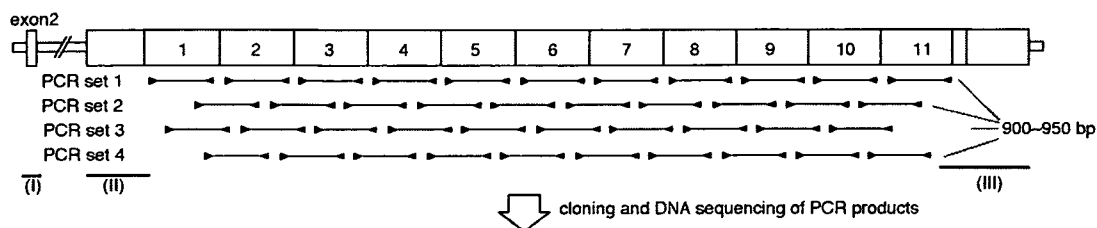


図1 ヒトフィラグリン遺伝子のゲノム構造解析

(A) ヒトフィラグリン遺伝子のゲノム構造。ヒトフィラグリン遺伝子は、3個のエキソンから成る。(B) ヒトフィラグリン遺伝子のcDNA構造。この例では、第3エクソンに975あるいは972bpからなる繰り返し配列を11単位含んでいる。(C) ヒトフィラグリン遺伝子cDNA配列のドットマトリクスDNA配列比較解析の結果。繰り返し配列間で塩基配列が高度に保存されている事を示す。

First Step: Amplification of each FLG homologous sequence unit



Second Step: Assembly of DNA sequence of PCR products

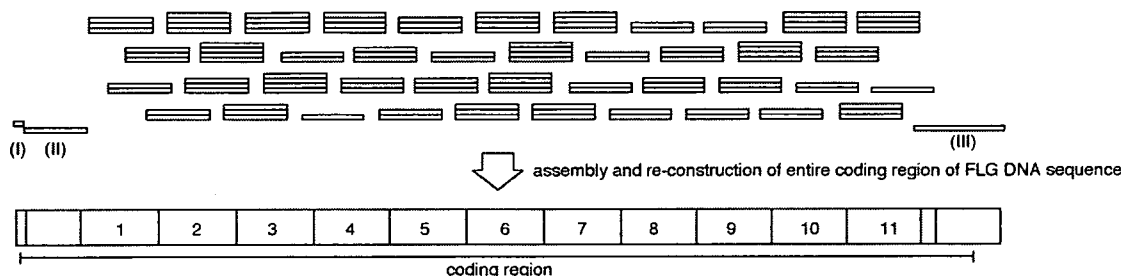


図2 フィラグリン遺伝子新規解読法 FLG-shotgun 法

FLG-shotgun 法の第一ステップでは、繰り返し配列の共通配列に基づいて作成した4組のPCR primer を用いたPCR法により、繰り返し配列を単位ごとにバラバラに増幅し、それぞれをクローニングして、配列を決定する。第二ステップでは、繰り返し配列間の塩基配列の違いを利用して、決定した繰り返し配列同士を正しい順番に並べ、元のフィラグリン遺伝子配列の再構成を行う。

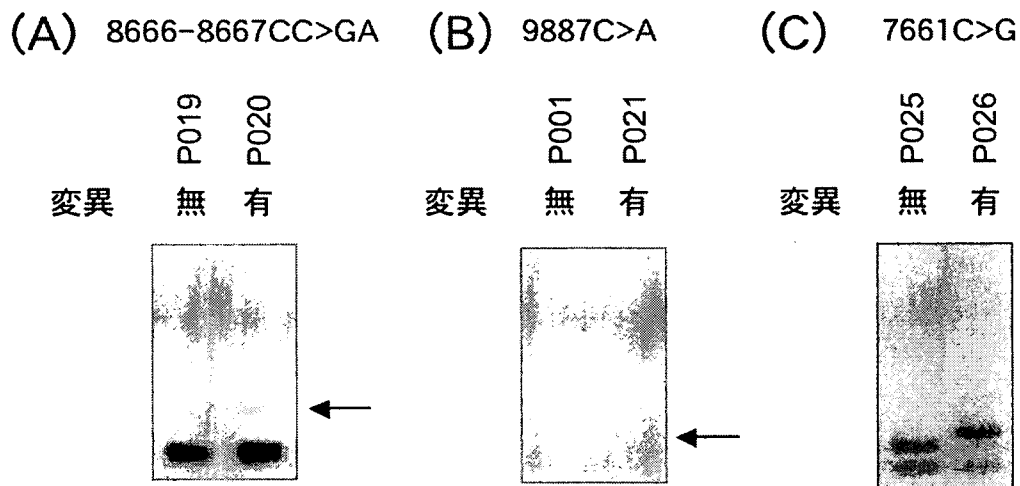


図3 簡便検出法を用いたフィラグリン遺伝子変異の解析

表1に示したプライマーを用いて増幅したPCR産物を(A) 8666-8667CC>GAは*Bam*HI、(B) 9887C>A変異は*Sau*3AI、(C) 7661C>G変異は*Hpy*188Iを用いて切断し、アガロースゲル電気泳動で切断片長を解析した。各図右の矢印は、変異に特異的な切断片の位置を示す。残りの4種(3702delG、3321delA、1537C>T及び2282del4)は、今回対象とした日本人アトピー性皮膚炎患者105人からは検出されなかった。

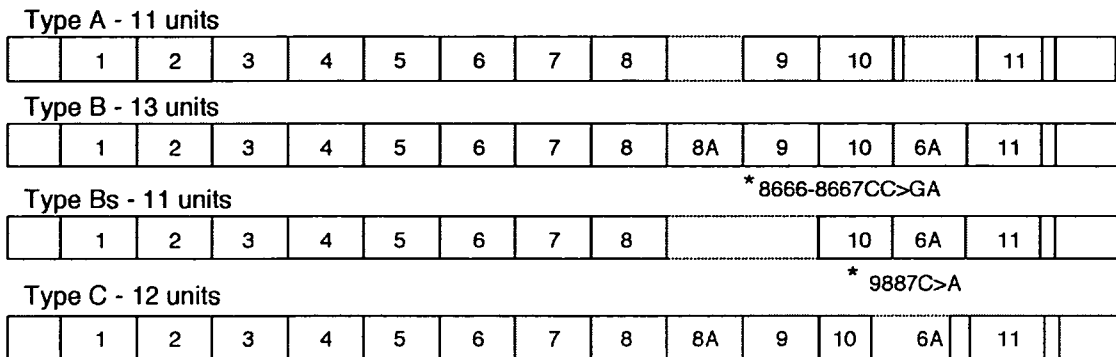


図4 日本人フィラグリリン遺伝子の4種の遺伝子型と2種の新規ナンセンス変異

日本人アトピー性皮膚炎患者24人のフィラグリ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(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)を2症例ずつ発見した。

表1 FLG変異解析で用いたPCRプライマーと判定方法

FLG変異	PCRプライマー名	PCRプライマー塩基配列	判定方法
8666-8667CC>GA	FLGREPU8-841F	AGAAGTGCAAGCAGAACAACAC	<i>Bam</i> HI切断
	FLGREP-215R	CCTGATTGTCTGGAGCTGTCTGCAGAGTGCC	
9887C>A	FLGREPU10-119F	TTCAGGAGCAGTCAAGGCAC	<i>Sau</i> 3AI切断
	FLGREPU10B-368R	GATGAAGCCTGTCTGCGCGG	
7661C>G	FLGREPU7-849F	AAGCAGACAAACTCGTAACGAT	<i>Hpy</i> 188I切断
	FLGREPU8-46R	GTCTGGCTAAACTGGATCCCCA	
3321delA, 3702delG	FLGREPU3-327F	CAGCTCCAGACACTCAGGCATTCC	DNA 配列決定
	FLGREP-965R1	CCCTGGCCCACCTGTGAGTGTCTAGA	
1537C>T	FLGREPU1-465F	CCACGAAAGGCTGGGCTGAGA	<i>Nla</i> III 切断
	FLGREP-965R1	CCCTGGCCCACCTGTGAGTGTCTAGA	
2282del4	RPT1P7	AATAGGTCTGGACACTCAGGT	<i>Dra</i> III 切断
	RPT2P1	GGGAGGACTCAGACTGTTT	