

200802013A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・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20年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・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20年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成21(2009)年 3月

## 目 次

I. 平成20年度総括研究報告	1
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 研究代表者 天谷 雅行	
II. 平成20年度分担研究報告	
flaky tailマウスのフィラグリン遺伝子解析と変異の発見	11
慶應義塾大学医学部 分子生物学 准教授 工藤 純	
flaky tailマウスを用いたアトピーモデルマウスの作製	15
慶應義塾大学医学部 総合医科学研究センター 特別研究講師 久保 亮治	
フィラグリン欠損マウスの作製	21
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 天谷 雅行	
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 細胞分子医学 教授 古瀬 幹夫	
アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析	29
京都大学大学院医学研究科 皮膚科学 准教授 梶島 健治	
経皮的抗原感作による喘息マウスモデルの開発	34
慶應義塾大学医学部 呼吸器内科学 准教授 浅野 浩一郎	
簡易同定法によるアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析	37
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	39
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	45
IV. 平成20年度班会議プログラム	49
V. 平成20年度構成員名簿	63

# I . 平成 20 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

研究代表者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 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。

マウスを用いた解析では、皮膚バリア機能蛋白であり、アトピー性皮膚炎患者で欠損が認められるフィラグリンを欠失させたノックアウトマウスの作出に世界で初めて成功した。また、フィラグリン蛋白の減少が知られている *flaky tail (ft)* マウスのフィラグリン遺伝子解析により、遺伝子変異は6番目のリピートに含まれる1塩基欠失5303delAであると同定することに成功した。さらに、皮膚樹状細胞を3次元時空的動的に観察し、バリア破壊やハプテン反復塗布が表皮角化細胞や皮膚樹状細胞に及ぼす効果を解析することを可能とした。経皮抗原感作による好酸球性気道炎症惹起をC57BL/6, Balb/cマウスを用いて行い、皮膚バリア機構の破綻により喘息誘導が可能であることを示した。ヒトにおける解析では、日本人特有の遺伝子変異を効率よく検出できる簡便法を構築し、アトピー性皮膚炎患者129名においてヨーロッパ型変異は認められず、アジア型変異が計12名（9%）で検出された。京都府山間部の小・中学校の生徒を対象とした疫学調査において、小学生時にアトピー性皮膚炎や喘息、花粉症を合併せず、乾燥皮膚だけを呈したものを追跡調査したところ、数年後に花粉症を発症する率が高いことを明らかにした。本年度は、3年計画の2年目として、1年目で得られた成果を基盤として研究を大きく発展させることができた。次年度においては、フィラグリン欠損による皮膚バリア機能破綻に関する分子メカニズムの解明が期待される。

### 研究分担者

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  
准教授  
加藤則人 京都府立医科大学大学院医学研究科  
皮膚科学 准教授

梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚科学  
准教授  
浅野浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学  
准教授  
海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科学  
専任講師  
久保亮治 慶應義塾大学医学部総合医科学研究  
センター 特別研究講師

## 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2年目として、1年目で得られた成果をさらに発展させる。マウスを用いた解析では、フィラグリン蛋白の減少が知られている *flaky tail (ft)* マウスのフィラグリン遺伝子の解析を行い、遺伝子変異を同定する。*ft* マウスを用いて、フィラグリン減少による角質層の透過性異常と抗原感作に関する免疫学的解析を行う。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。皮膚のバリア機能として知られるタイトジャンクションと角層と相互作用を検討する。バリア破壊やハプテン反復塗布が表皮角化細胞や皮膚樹状細胞に及ぼす効果を検証し、皮膚樹状細胞を3次元時空的動的に観察する。さらに、経皮抗原感作による好酸球性気道炎症惹起を C57BL/6, Balb/c マウスを用いて行い、皮膚バリア機構の破綻と気管支喘息の発症の関係を検討する。ヒトにおける解析では、日本人特有の遺伝子変異を効率よく検出できる簡便法を構築し、日本人データの蓄積を行う。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、アトピー性疾患発症を予防できる可能性を検討する。

## B. 方法

### 1) *flaky tail (ft)* マウスのフィラグリン遺伝子の解析

我々の開発した FLG-shotgun 法を応用し、*ft* マウスの *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子変異の検出を試みた。*ft* マウスから構築した BAC ライブラリーより *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子を含む BAC クローンを単離し、Tn5 トランスポゾン法により、をランダムに挿入させ、Tn5 の両端からシーケンシングを行い、*Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子変異を同定した。

### 2) *ft* マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

*ft* マウスマウス耳翼に OVA をアジュバントと共に繰り返し塗布し、耳翼腫脹反応の推移を観察した。

### 3) 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複雑な構造を持っているため、確実にターゲティングを行うために2種の targeting vector (VT) を構築した。C57BL/6 の ES 細胞、及び BA1 ハイブリッド (129SvEv と C57BL/6 のハイブリッド) の ES 細胞を用いて、VT のエレクトロポレーションを行った。得られたフィラグリン欠損マウスを用いて、ウエスタンブロット、免疫組織染色を行い、蛋白レベルでのフィラグリン発現の有無を確認した。

### 4) 皮膚のバリア機能としてタイトジャンクションの解析

クローディン1ノックアウトマウスの皮膚における角化タンパク質、角質の脂質組成の解析を行った。

### 5) 皮膚ランゲルハンス細胞の3次元での時空的動的観察

Langerin プロモーター領域に EGFP を遺伝子導入した Langerin-EGFP マウスにハプテン塗布処置を行った。その後、耳介皮膚を *ex vivo* あるいは *in vivo* にて二光子励起顕微鏡で観察した。

## 6) 経皮的抗原感作による喘息誘導

C57BL/6およびBALB/cの背部に卵白アルブミン (OVA) をしみこませたパッチを貼付 (週 1 回、3 回) した後、OVA吸入暴露を行い、気道炎症を誘導した。感作成立および気道炎症の指標として血清中のOVA特異的免疫グロブリン、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の好酸球、肺病理組織像およびメサコリンに対する気道過敏性を評価した。

## 7) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

報告された既知のヨーロッパ型、アジア型の各遺伝子変異と、フィラグリン遺伝子の3種類のバリエーションについて解析を行うための簡易同定法を、それぞれPCR、制限酵素処理、sequencingを組み合わせることによって確立した。

## 8) 疫学的解析

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) flaky tail (*ft*) マウスのフィラグリン遺伝子の解析

*ft*マウスからフィラグリン遺伝子の塩基配列を決定したところ、4組のプライマー由来のPCR産物で同一の1塩基欠失 (delA) を検出したが、700bp以上の同一配列を含む領域が複数箇所存在したため、全体の再構築は不可能であった。次に *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子を含むBACから得た exon3 を含む約13kbのサブクローンをを用いて、*Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子は15単位のFlgリピートからなることが明らかになり、1塩基欠失の位置は、6番目の

リピートに含まれる5303delAと確定し、フレームシフトの結果、154コドン下流に終止コドンが出現し、205kDaの短いプロフィラグリンが生成されることを明らかにした。

### 2) *ft*マウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルマウスの作成

マウス耳翼にOVAをアジュバントと共に隔日で繰り返し塗布したところ、2週間を経過しても野生型マウスでは耳翼腫脹反応が見られないのに対し、flaky tailマウスではday3, 5頃から耳翼腫脹が生じた。また試葉塗布部位の組織学的検討を行ったところ、day18ではflaky tailマウスで表皮肥厚、真皮浅層に軽度の細胞浸潤の所見が認められたのに対し、野生型マウスではいずれも所見が軽度だった。

### 3) 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、GeneBridges社のsRed/ETシステムを用いてtargeting vector (VT) 構築に必要なフィラグリン遺伝子を含むgenomic 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TV1及びTV2を作製した。TV1を用いてC57BL/6のES細胞にエレクトロポレーションを行ったが、陽性細胞を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し、それぞれTV1、TV2にターゲットされたハイブリッドES細胞を得た。これらのES細胞をマウス胚に注入し、キメラマウスを作製した。そして、このキメラマウスを交配することでフィラグリンノックアウトマウスを作製した。TV1を用いた変異ホモマウスは、ウエスタンブロット、免疫組織染色により、蛋白レ



ベルでのプロフィラグリン・フィラグリンを完全に消失していることが確認された。TV2を用いたものに関しては、現在F1ヘテロマウスを交配している段階である。

#### 4) 皮膚のバリア機能としてタイトジャンクションの解析

クローディン1ノックアウトマウスでは、野生型、ヘテロマウスに比べて角化マーカーのうちフィラグリンのプロセッシングに異常が見られた。また、総脂質量にほとんど差がみられなかったが、脂質組成では角質層の脂質ラメラの主成分であるセラミド各種が増加していた。

#### 5) 皮膚ランゲルハンス細胞の3次元での時空的動的観察

二光子顕微鏡を用いて、①耳介を切除して還流しながら観察する系、②in vivoで麻酔をかけながら観察する系、共にランゲルハンス細胞の動態を3次元で捉えることに成功した。表皮ランゲルハンス細胞は、ハプテン刺激により樹状突起を伸展させ、さらにZ軸方向にも遊走がみられた。

#### 6) 経皮的抗原感作による喘息誘導

C57BL/6およびBalb/cとも3回の経皮感作によって血清中のOVA特異的IgG1値の上昇、OVA暴露後の気道好酸球数の増加・気道上皮の杯細胞化生をきたした。Balb/cマウスではそれに加えてOVA特異的IgE値の上昇、OVA暴露後のメサコリン気道過敏性の亢進が確認された。

#### 7) 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129名におけるフィラグリン遺伝子解析を行った。遺伝子変異については、ヨーロッパ型変異(1537C/T, 2282del14, 3702del1G)はみとめられず、アジア型変異では8666-8667 CC>GA:4名(3%)、9887 C>A:4名(3%)、7661 C>G:2名(1.5%)、3321del1A:2名(1.5%)が認められた。フィラグリン遺伝子変異を有す

る患者は計12名で、患者全体の9%であった。これらの症例において、フィラグリン遺伝子変異と臨床型との明らかな関連性は認められなかった。

#### 8) 疫学的解析

今年度のアトピー性皮膚炎の有病率は11.6%、乾燥皮膚のみを呈する小児は4.6%であった。以前のデータから小学生時にアトピー性皮膚炎や喘息、花粉症を合併せず、乾燥皮膚だけを呈したものを追跡調査したところ、数年後に花粉症を発症する率が高かった。

#### D. 考察

本年度は、モデルマウスの作成、解析に大きな進展が見られた。まずは、フィラグリンノックアウトマウスの作成に成功したことである。世界で、7、8カ所の研究施設が作成を試みているが、フィラグリン遺伝子構造が特殊であるため困難を伴っていた。本抄録作成時点(平成20年12月)において、他の施設からの報告はなく、世界で初めてフィラグリンノックアウトマウスの作成に成功したことになる。同マウスは、フィラグリンの蛋白発現を完全に欠失しており、フィラグリンの角層バリアにおける機能解析が初めて可能となる。また、アトピー性皮膚炎を発症するには、角層バリア障害があるだけでは不十分であり、免疫応答、遺伝背景が重要になる。作成されたフィラグリンノックアウトマウスは、129とC57/BL6の混合遺伝子背景をもつため、C57/BL6およびBalb/cに戻し交配を開始している。次年度には、角層バリア障害によるアトピー性疾患モデルマウスの作成が可能となり、本研究課題における大きな課題をひとつ達成したことになる。また、フィラグリン蛋白の減少が知られているflaky tail(ft)マウスのフィラグリン遺伝子の解析にも、世界で初めて成功した。繰り返し配列が多い遺伝子構造のため解析ができな

かったマウスフィラグリン遺伝子を、我々の開発したFLG-shotgun法により解析することに成功した。ftマウスでは5303delAの変異があり、一部のフィラグリンリピートは翻訳されるため、フィラグリン蛋白発現は減弱しているが完全に消失していない。完全消失しているフィラグリンノックアウトマウスと組み合わせで解析することにより、より詳細にアトピー性疾患も病態を解析できることになる。

皮膚バリアの分子機構は、まだまだ未解明な部分も多い。皮膚バリアのメカニズムを解明するとともに、皮膚のバリア機能障害による種々の抗原に対する経皮的感作、慢性的刺激が、アトピー性皮膚炎、さらに喘息の根本的原因であるという概念の確立にむけて着実に成果を積み重ねている。

## 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本研究の1年目では、アトピー性皮膚炎患者を対象とした遺伝子解析、臨床的疫学的解析の基盤を整備し、2年目では、フィラグリンノックアウトマウスの作成、flaky tailマウスでのフィラグリン遺伝子変異の同定を達成することができ、本来の病態に近いアトピー性疾患モデルマウス作成へと大きく前進した。3年目では、マウスでの解析結果とヒトでの解析結果を総合的に考察し、皮膚バリアからみたアトピー性疾患発症機序の解明が期待される。

## 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. 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 Dermatol Sci.**51.113-120.2008

2. Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals. **J Dermatol Sci.**49.21-31.2008
3. Nakashima D, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Kobayashi T, Yoshiki R, Tokura Y. Impaired initiation of contact hypersensitivity by FTY720. **J Invest Dermatol.**128.2133-2141.2008
4. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. **J Invest Dermatol.**128.2625-2630.2008
5. Atarashi K, Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y. Skin application of the nonsteroidal anti-inflammatory drug ketoprofen downmodulates the antigen-presenting ability of Langerhans cells in mice. **Br J Dermatol.**159.306-313.2008
6. 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.**128.1719-1727.2008
7. Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K. Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. **Exp Dermatol.**17.81-90.2008
8. Katoh N, Hirano S, Kishimoto S. Prognostic factors in adult patients with atopic dermatitis. **J Dermatol.**35.477-483.2008
9. Ueta M, Hamuro J, Ueda E, Katoh N, Yamamoto M, Kinoshita S. Stat6 independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of Ikbz<sup>-/-</sup> mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**49.3387-3394.2008
10. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Elevated platelet activation in patients with atopic dermatitis and psoriasis: increase in plasma levels of b-thromboglobulin and platelet factor 4. **Allergol Int.**57.391-396.2008
11. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects

- tricellular localization of tricellulin. **Mol Biol Cell.**19.4687-4693.2008
12. Miyamoto T, Momoi A, Kato K, Kondoh H, Tsukita S, Furuse M, Furutani-Seiki M. Generation of transgenic medaka expressing claudin7-EGFP for imaging of tight junctions in living medaka embryos. **Cell Tissue Res.**335.465-471.2008
  13. 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.**180.541-549.2008
  14. Suzuki Y, Asano K, Niimi K, Miyata J, Shiraishi Y, Fukunaga K, Shiomi T, Nakajima T, Oguma T, Sayama K, Ishizuka A. TP receptor-mediated release of eosinophil chemotactic activity from human bronchial smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol.**600.133-139.2008
  15. Asano K, Ishizaka A. Pharmacogenetics of anti-leukotriene drugs. **Clin Exp Allergy Rev.**8.45-49.2008
  16. Oguma T, Asano K, Ishizaka A. Role of prostaglandin D2 and its receptors in the pathophysiology of asthma. **Allergol Int.**57.307-312.2008
  17. Kamiya A, Tan PL, Kubo K, Engelhard C, Ishizuka K, Kubo A, Tsukita S, Pulver AE, Nakajima K, Cascella NG, Katsanis N, Sawa A. PCMI is recruited to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4 and is a candidate for psychiatric illness. **Archives of General Psychiatry.**65.996-1006.2008
  18. Katoh N. Platelet as versatile regulators of cutaneous inflammation. **J Dermatol Sci.**53.89-95.2009
  19. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg J, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WHI. A homozygous frameshift mutation in the murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. **Nature Genetics.** in press
  20. Yoshiki R, Kabashima K, Sugita K, Atarashi K, Shimauchi T, Tokura Y. IL-10-Producing Langerhans Cells and Regulatory T Cells Are Responsible for Depressed Contact Hypersensitivity in Grafted Skin. **J Invest Dermatol.** in press
  21. Katoh N. Future perspectives in the treatment of atopic dermatitis. **J Dermatol.** in press
  22. Wakamori T, Katoh N, Hirano S, Kishimoto S, Ozasa K. Atopic dermatitis, dry skin and serum IgE in children in a community in Japan. **Int Arch Allergy Immunol.** in press
  23. Nin M, Katoh N, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T, Kishimoto S. Dichotomous effect of ultraviolet B on the expression of corneodesmosomal enzymes in human keratinocytes. **J Dermatol Sci.** in press
  24. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S. Platelets play important roles in the late phase of the immediate hypersensitivity reaction. **J Allergy Clin Immunol.** in press
  25. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Platelet-derived microparticles and soluble P-selectin as platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. **Clin Immunol.** in press
  26. Nakai A, Katoh N, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. **J Dermatol Sci.** in press
  27. Nakai A, Katoh N, Kitagawa T, Ueda E, Takenaka H, Kishimoto S. Evaluation of survival in Japanese stage IV melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cells. **J Dermatol.** in press
  28. Furuse M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. **Biochim Biophys Acta.** in press
  29. Furuse M. The role of claudin-based tight junctions in morphogenesis. **Ann New York Acad Sci.** in press
  30. Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 downregulates claudins from tight junctions in MDCK cells. **J Cell Sci.** in press
  31. Asano K, Nakade S, Shiomi T, Nakajima T, Suzuki Y, Fukunaga K, Oguma T, Sayama K, Fujita H, Tanigawara Y, Ishizuka A. Impact of pharmacokinetics on pharmacogenetic association of pranlukast

in Japanese asthmatics. **Respirology**. in press

32. Kobayashi M, Yoshiki R, Sakabe J, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. **Br J Dermatol**. in press

#### <日本語論文>

1. 川崎洋, 天谷雅行. 【アレルギーマーチを検証する】 気道アレルギー発症への経皮感作の影響. **Topics in Atopy**. 7, 37-42. 2008
2. 栢島健治. 樹状細胞による免疫制御と臨床応用 「皮膚の樹状細胞サブセットと機能」. **実験医学**. 26, 3250-3255. 2008
3. 栢島健治. 皮膚の抗原提示細胞の分類と免疫・アレルギーの制御. **西日本皮膚科**. 70, 475-477. 2008
4. 栢島健治. 樹状細胞のプロスタグランジン E2 による Th1 細胞の分化誘導. **臨床免疫・アレルギー科**. 50, 339-344. 2008
5. 加藤則人. QOL を考えることで何が変わるか? **Progress in Medicine**. 28, 774-775. 2008
6. 加藤則人. 接触皮膚炎マニュアル. いわゆる手湿疹をめぐって. -原因・悪化因子と対処法-. **Monthly Book Derma**. 139, 65-69. 2008
7. 上田英一郎, 加藤則人, 岸本三郎. 皮膚疾患「難病」診療の最前線. **京都府立医大雑誌**. 117, 613-620. 2008
8. 岩本典子, 古瀬幹夫. 細胞間接着装置タイトジャンクションと上皮透過性. **生体の科学**. 59, 336-337. 2008
9. 堀内奈緒, 浅野浩一郎. 気管支喘息と気道炎症 -研究の歴史的展開-. **The Lung Perspectives**. 16, 21-24. 2008
10. 浅野浩一郎. 脂質メディエーターと呼器疾患. **BioClinica**. 23, 26-30. 2008
11. 浅野浩一郎. ウイルス感染による喘息・COPD 急性増悪の病態生理. **呼吸**. 27, 96-102. 2008
12. 浅野浩一郎. ロイコトリエン受容体拮抗薬およびステロイドの薬理遺伝. **アレルギー・免疫**. 15, 928-933. 2008
13. 浅野浩一郎. ロイコトリエン受容体拮抗薬反応性を規定する因子 -遺伝素因

と環境要因-. **Progress in Medicine**. 28, 2806-2811. 2008

14. 加藤則人. アトピー性皮膚炎の治療・最近の進歩. **日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌**. 印刷中
15. 加藤則人. かゆみを止めるにはどうすればいいのか? **Minophargen Medical Review**. 印刷中

#### 2. 学会発表

##### <英語発表>

1. Furuse M. Internalization of claudins from tight junctions. **International conference Berlin 2008 "Molecular structure and Function of the tight junction**, Berlin, Germany. 2008 April
2. Furuse M. The role of tight junctions in epithelial barrier function. **Post IID 2008 Satellite international Meeting on Autoimmune Disease**, Otsu, Japan. 2008 May
3. Shiraishi N, Kabashima K, Tokura Y. Prostaglandin E2-EP3 signaling, as a negative regulator of skin immune responses by suppressing cutaneous dendritic cell functions. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May
4. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May
5. 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-g-upregulated keratinocytes Th1 chemokines and IFN-g-downregulated Langerhans cell Th2 chemokine. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May
6. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Tokura Y. Inducible nitric oxide synthase regulates dendritic cell migration and contributes to contact hypersensitivity. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May
7. Katoh N, Tamagawa-Mineoka R, Kotani H, Masuda K, Kishimoto S. CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> myeloid suppressor cells increase in chronic contact dermatitis by repeated hapten application. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May

8. Nin M, Katoh N, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T, Kishimoto S. Dichotomous effect of ultraviolet B on the expression of corneodesmosomal enzymes in human epidermal keratinocytes. **The 5th International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, Japan. 2008 May
9. Kabashima K. Langerhans cells and prostaglandins: contribution to the etiology and pathogenesis of atopic dermatitis and related disorders **The 5th Georg-Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, Kyoto, Japan. 2008 April
10. Katoh N, Hirano S, Kishimoto S. Prognostic factors of adult patients with atopic dermatitis. **The 5th Georg-Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, Kyoto, Japan. 2008 May
11. Wakamori T, Katoh N, Hirano S, Kishimoto S, Ozasa K. Atopic dermatitis, dry skin and serum IgE in children in a community in Japan. **The 5th Georg-Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, Kyoto, Japan. 2008 May
12. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, Masuda K, Kishimoto S. Increased platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. **The 5th Georg-Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, Kyoto, Japan. 2008 May
13. Ueda E, Kugo S, Katoh N, Kishimoto S. EMDR, a more developed method, for controlling habitual scratching from traumatic memories of AD patients. **The 5th Georg-Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis**, Kyoto, Japan. 2008 May
14. Iwamoto N, Takahashi S, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX-1 downregulates claudins from tight junctions. **Gordon Conference: SIGNALING BY ADHESION RECEPTORS**, USA. 2008 June
15. Asano K. Susceptibility genes for allergic diseases. **International symposium**. University of Sao Paulo and Keio University. Sao Paulo, Brasil. 2008 August
16. Furuse M. Remodeling of claudin-based tight junctions. **NAIST Global COE Symposium on Cell Signaling**, Ikoma, Japan. 2008 November
17. Furuse M, Takahashi S, Iwamoto N. Internalization and degradation of claudins during the remodeling of tight junctions. **CSHL Meeting on Blood/Brain Barrier Physiology: Neural Boundary and the Molecular Mechanisms of CNS Protection**, Cold Spring Harbor, USA. 2008 December
18. Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX-1 downregulates claudins from tight junctions. **48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting**, San Francisco, USA. 2008 December
19. Asano K, Nakade S, Oguma T, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of pranlukast in Japanese adult patients with asthma. **64rd AAAAI Annual Meeting**, Washington DC, USA. 2009 March

<日本語発表>

1. 栴島健治. 脂質メディエーターの皮膚における新たな役割. 第4回 JSI-RCAI 免疫ワークショップ, 甲府, 2008年5月
2. 加藤則人, 若森健, 小笹晃太郎, 岸本三郎. 小・中学生の入浴習慣と暖房についての質問票による調査. 第20回日本アレルギー学会春期臨床大会ミニシンポジウム, 東京都, 2008年6月
3. 峠岡理沙, 加藤則人, 上田英一郎, 益田浩司, 岸本三郎. アトピー性皮膚炎患者における血小板由来マイクロパーティクルの検討. 第20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病態, 東京都, 2008年6月
4. 栴島健治. 接触皮膚炎と樹状細胞. 第346回日本皮膚科学会福岡地方会, 北九州, 2008年9月
5. 古瀬幹夫. 細胞間隙をシールする分子機構. 第56回ウイルス学会学術集会特別講演, 岡山, 2008年10月
6. 加藤則人. アトピー性皮膚炎の診療に役立てたい知見とスキル. 第59回日本皮膚科学会中部支部学術大会 教育講演, 名古屋市, 2008年10月
7. 古瀬幹夫. 細胞間をシールする分子基盤の解明. 平成20年度北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 札幌, 2008年10月
8. 栴島健治. 脂質メディエーターの免疫における新たな役割. 分子生物・生化学会合同集会 (BMB2008) シンポジウム, 神戸, 2008年11月
9. 栴島健治. Th17 とアトピー性皮膚炎. 日本アレルギー学会 シンポジウム, 東京, 2008年11月
10. 栴島健治. 皮膚アレルギーの新しい知

見と臨床応用の可能性について。第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 ランチョンセミナー，大阪，2008 年 11 月

11. 梶島健治, IL-17 と Th2 型免疫応答。第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 シンポジウム，大阪，2008 年 11 月
12. 峠岡理沙、加藤則人、上田英一郎、竹中秀也、喜多正和、岸本三郎。The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation。第 72 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 イブニングセミナー，東京都，2009 年 2 月
13. 古瀬幹夫。タイトジャンクション：細胞間隙をシールする分子機構。日本薬学会第 129 回年会 シンポジウム，京都，2009 年 3 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 特許出願

1. 発明の名称：アレルギー疾患モデル動物  
出願番号： 特願 2008-129597  
発明者： 天谷雅行、久保亮治  
出願日： 2008/05/16  
出願人： 学校法人 慶應義塾

## II. 平成 20 年度分担研究報告

## flaky tail マウスのフィラグリン遺伝子解析と変異の発見

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学 医学部 分子生物学 准教授

**研究要旨** 近年アトピー性皮膚炎患者からフィラグリン遺伝子の変異が発見され、フィラグリンの減少による皮膚バリア機能の障害がアトピー性皮膚炎の発症原因の一つとして注目されている。今回我々は、プロフィラグリンの低分子量化とフィラグリンの極度の減少が知られているアトピー性皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*) についてフィラグリン遺伝子変異の有無を解明するために塩基配列を決定した。その結果、ヒト FLG 遺伝子変異と類似した、Flg 繰り返し配列中に 1 塩基欠失(5303delA)を同定した。これにより、ヒトと同様に *ft* マウスではフィラグリン遺伝子変異によってプロフィラグリンの低分子量化とフィラグリンの極度の減少がおきており、アトピー性皮膚炎発症モデルの研究対象となることを明らかにした。

共同研究者  
佐々木 貴史  
慶應義塾大学 医学部 分子生物学 助教  
久保亮治  
慶應義塾大学 医学部 皮膚科学 助教  
川崎 洋  
慶應義塾大学 医学部 大学院生

カ所の変異が存在していた。この配列を補正して解析したところ、*Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子は 3 回の exon からなり、exon3 には 738~765bp を単位とした 16 単位の Flg リピートと、その前後に不完全なリピートを含むヒト FLG 遺伝子に類似した構造が推定された(図 1)。この配列に基づき Flg リピート 1 単位を増幅する 6 組のプライマーを設計し、ヒトフィラグリン遺伝子解析で用いた FLG-shotgun 法を応用し *ft* マウスの *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子変異の検出を試みた。exon1 と exon2 については、通常の PCR で増幅した産物の塩基配列を決定した。さらに、ダンディー大 McLean らとの共同研究で、*ft* マウスから構築した BAC ライブラリーから選択した *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子を含む BAC から Red/ET 法で得た exon3 を含む約 13kb のサブクローンに対し、Tn5 トランスポゾンランダムに挿入させ、Tn5 の両端からシーケンシングを行い、Flg リピートを含むコーディング領域の配列を決定した。

### A. 研究目的

近年アトピー性皮膚炎患者からフィラグリン遺伝子の変異が発見され、フィラグリンの減少による皮膚バリア機能の障害が、アトピー性皮膚炎の発症原因の一つとして注目されている。今回我々は、プロフィラグリンの低分子量化とフィラグリンの極度の減少が知られているアトピー性皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*) についてフィラグリン遺伝子変異の有無を解明するために塩基配列を決定した。

### B. 研究方法

C57BL/6 マウスのフィラグリン遺伝子 *Flg<sup>ft</sup>* を含む BAC クローン RP23-227A12 の塩基配列 (AC158361) は完成配列として登録されているものの Flg リピート部位には解読不能の繰り返し配列との注釈がついており、さらにシーケンシングエラーと思われる数

### C. 研究結果

*ft* マウスから Flg リピートを増幅し、576 サンプル(1152 リード)の塩基配列を決定したところ、4 組のプライマー由来の PCR 産物で同一の 1 塩基欠失(de1A)を検出したが、



700bp 以上の同一配列を含む領域が複数箇所存在したため、全体の再構築は不可能であった(図 2)。次に *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子を含む BAC から得た exon3 を含む約 13kb のサブクローンについては、平均重複度 8.7 リードでカバーする完全な塩基配列が決定できた。*Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子は 15 単位の Flg リピートからなり、*Flg<sup>657</sup>* 遺伝子と比較し 1 単位少ないことが明らかになったが、これは *Flg<sup>ft</sup>* の起源が C3H マウスであるため単なる多型とみなされた。1 塩基欠失の位置は、6 番目のリピートに含まれる 5303delA と確定し、フレームシフトの結果、154 コドン下流に終止コドンが出現し、205kDa の短いプロフィラグリンが生成することが示唆された。

#### D. 考察

マウスのフィラグリンは約 500kDa のプロフィラグリンとして発現し、その後にプロセッシングを受け、約 30kDa のフィラグリンとなり、皮膚バリアを形成する。しかし *ft* マウスでは、フィラグリンの C 末端領域を認識する抗体では検出されない約 215kDa のプロフィラグリンが発現し、また約 30kDa のフィラグリンはほとんど発現していないことが知られていた。今回同定した変異(5303delA)から予想されるプロフィラグリンのサイズは 205kDa であり、観察されるサイズとよく一致した。また、C 末端領域が欠失した結果プロセッシングが受けられなくなると推定され、類似の変異を有するアトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン減少の原因を解明する為にも重要なモデルとなることが示唆された。

#### E. 結論

*ft* マウスの *Flg* 遺伝子の塩基配列を決定し、アトピー性皮膚炎患者の FLG 遺伝子変

異と類似の 5303delA 変異を同定した。これにより、*ft* マウスをフィラグリン遺伝子変異によるアトピー性皮膚炎発症モデルとして研究対象とすることに科学的根拠を固めることができた。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表(平成 20 年度)

##### 1 論文発表

英語論文

1. Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, Sundberg J, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, and McLean WHI. A homozygous frameshift mutation in the murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet in press*

##### 2 学会発表

なし

#### 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

## 図とその説明

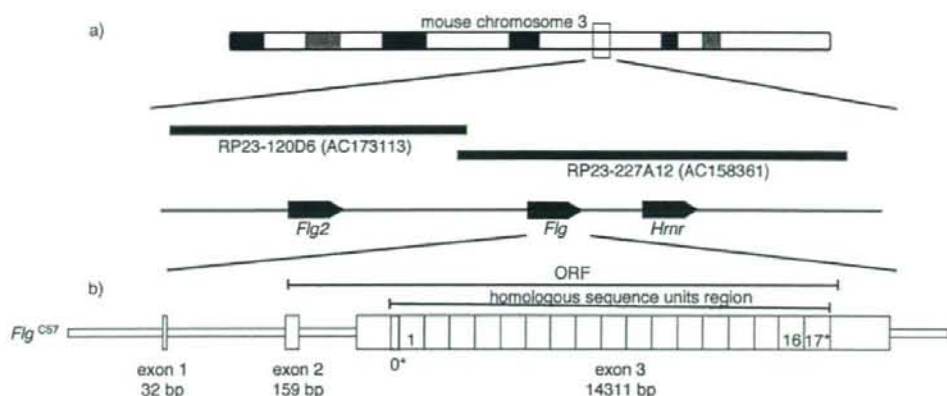


図1 マウスフィラグリン遺伝子のゲノム構造解析

a) マウスフィラグリン遺伝子。マウスフィラグリン遺伝子は、ヒトフィラグリンと同様に *Hnr* と *Flg2* の間に存在し、BAC クローン RP23-227A12 内の完成配列として登録されている。b) マウスフィラグリン遺伝子の構造。第3エクソンに 738~765bp からなる繰り返し配列を 16 単位 (1~16) とその前後に不完全なリピート (0\* 及び 17\*) を含んでいる。

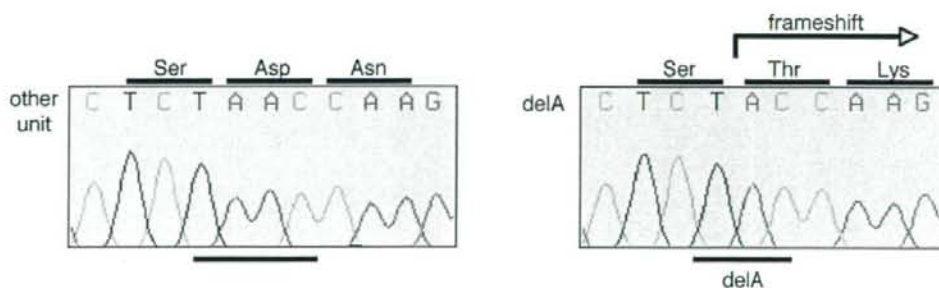


図2 マウス FLG-shotgun 法による *ft* マウスの *Flg<sup>ft</sup>* 遺伝子変異の検出

*ft* マウスから *Flg* リピートを増幅し、576 サンプル (1152 リード) の塩基配列を決定したところ、4 組のプライマー由来の PCR 産物で同一の 1 塩基欠失 (*delA*) を検出したが、700bp 以上の同一配列を含む領域が複数箇所存在したため、*Flg* リピート領域全体の連続配列を再構築することはできなかった。

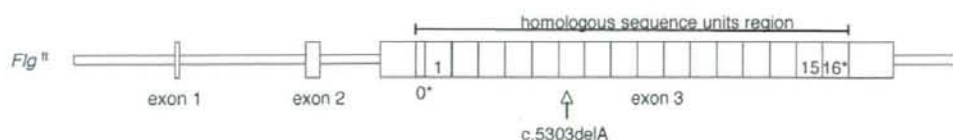


図3 *ft* マウスの *Ft<sup>ft</sup>* 遺伝子の構造と変異の検出

*ft* マウスから作成された BAC クローン由来 *ft* マウス *Ft* exon3 の配列と *ft* マウスゲノムから増幅されたエクソン 1、2 の配列を元に決定した *ft* マウスの *Ft<sup>ft</sup>* 遺伝子構造。第 3 エクソンに 738~765bp からなる繰り返し配列を 15 単位 (1~15) とその前後に不完全なリピート (0\* 及び 16\*) を含んでいる。また、6 番目の繰り返し配列に 1 塩基欠失 (5303delA) を含んでいた。

## flaky tail マウスを用いたアトピーモデルマウスの作製

研究分担者 久保亮治 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター 特別研究講師

**研究要旨** 本研究は、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、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に有用となる新しいアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目的とする。マウス皮膚への色素浸透性の評価や、刺激性接触皮膚炎誘導物質単回塗布後の耳翼腫脹反応の観察から、フィラグリンの発現量により物質の皮膚透過性に差が生じる可能性が示唆された。また、OVA を adjuvant と共にマウス耳翼に反復塗布することで、フィラグリン変異が存在すると慢性的な抗原刺激により感作が成立しやすく、皮膚炎の形成につながることを示唆する所見が得られた。

共同研究者

天谷雅行 慶應義学医学部皮膚科学 教授  
川崎 洋 慶應義学医学部 大学院生

### A. 研究目的

表皮角層の主要構成成分であるフィラグリン遺伝子変異に基づく皮膚バリア機能異常が、アトピー性皮膚炎発症の主要因であるという仮説が注目されている。しかし、フィラグリンが関与する皮膚バリア機能の詳細は明らかでない。アトピー性皮膚炎の発症に最も影響する皮膚のバリア機能は、外界の抗原が体内へ侵入するのを防ぐ物質移動の障壁としての作用と考えられる。そこで本研究では、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、物質の外から内への皮膚透過に対するフィラグリンの関与を明らかにする。そして、この知見を元に上記仮説を検証する、新しいアトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指す。本研究で目指すマウスモデルは、人為的な皮膚バリア破壊の過程を省き自然な発症過程をとるモデルであり、その作製に成功すれば、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に有用となる。

### B. 研究方法

1. フィラグリンの物質皮膚透過性に関する解析

メタノールを用いて脱脂処理した胎児期のマウスにトルイジンブルーを塗布し、その浸透性を評価した。

刺激性接触皮膚炎誘導物質である croton oil をマウス耳翼に単回塗布したときの耳翼腫脹反応を、計時的に測定した。

2. アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製  
flaky tail マウスに OVA を繰り返し暴露することで、アトピー性皮膚炎の発症メカニズムを再現するマウスモデルを作製する。  
(a) OVA patch 貼付試験

剃毛したマウスの腹部に OVA を塗布したガーゼを貼付し、フィルム剤により 5 日間密閉保護した。その後、9 日間の観察期間を設け、これを 1 サイクルとカウントし、抗原暴露を計 3 サイクル行った。肉眼的皮膚炎形成の有無、抗原特異的 IgE 値の推移を評価した。

(b) OVA 単回塗布試験

OVA を alum と共に腹腔内投与し感作したマウスと未感作のマウスの耳翼に、OVA を adjuvant と共に単回塗布した。塗布後の耳翼腫脹反応の推移を計時的に観察した。

(c) OVA 反復塗布試験

OVA を adjuvant と共にマウス耳翼に隔日で反復塗布し、耳翼腫脹反応の推移を計的に観察した。

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