

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. フィラグリンの物質皮膚透過性に関する解析

トルイジンブルー塗布試験は、flaky tail マウス (ft/ft) と C57BL/6J マウス (wt/wt) の交配により得た ft/wt 同士をさらに交配させた littermates を用いて行った。E17.5 のマウスに色素を塗布したところ、ft/ft と wt/wt 間で皮膚透過性に明らかな差が見られた (図 1)。

croton oil をマウス耳翼に単回塗布したところ、flaky tail マウスで有意に強い耳翼腫脹反応を観察した (図 2)。

### 2. アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製 (a) OVA patch 貼付試験

1 サイクル後より、flaky tail マウス、野生型マウス共に OVA 暴露群では OVA 特異的 IgE が検出され、抗原暴露回数に応じて値が上昇した (表 1)。OVA 塗布部に一致した明らかな皮膚炎形成は認められなかった。

### (b) OVA 単回塗布試験

OVA で感作したマウス・未感作のマウスの耳翼に、OVA を adjuvant と共に単回塗布したところ、感作が成立している flaky tail マウスのみで、遅延型の耳翼腫脹反応が生じた (図 3)。一方、OVA の感作が成立しているマウスの耳翼に OVA を adjuvant と共に皮内注射したところ、flaky tail マウス、野生型マウス共に遅延型の耳翼腫脹反応が認められた。

### (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たところ、flaky tail マウスでは day4 頃より遅延型の耳翼腫脹反応が生じたが、野生型マウスでは同様の反応が認められなかった (図 4)。また、OVA 隔日塗布 day18 での flaky tail マウスと野生型マウスの抗原塗布部の病理組織所見を比較す

ると、flaky tail マウスでは著明な表皮肥厚と真皮での有意な細胞浸潤を認めた (図 5)。また、day10~15 の時点で OVA 特異的 IgE を測定したところ、flaky tail マウスに OVA を塗布した群のみで OVA 特異的 IgE が検出された。

## D. 考察

トルイジンブルーと croton oil を用いた 2 つの試験の結果は、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ことを示唆する。今後は、フィラグリン変異の有無により皮膚透過性を変化させる分子のメカニズムの解明を目指す。

また、OVA を抗原として選択し、アトピー性皮膚炎マウスモデルの作製を目指した。事前に tape stripping 等で皮膚バリアを破壊することなく、OVA を patch 貼付してマウスに塗布したところ、flaky tail マウス、野生型マウス双方で OVA の経皮感作に成功した。しかし、今後抗原感作が成立する過程を詳細に解析することを目指す際、OVA を patch 貼付により塗布する手法は、patch 自体が皮膚バリアに与える影響を評価・調節することが困難であるため、最適な抗原塗布方法ではないと考えた。

そこで OVA を adjuvant と共にマウス皮膚に単回塗布する手法を用いて、アトピー性皮膚炎モデルを作製することを試みた。OVA で感作したマウスの耳翼に、OVA を adjuvant と共に単回塗布したところ、flaky tail マウスのみで、遅延型の耳翼腫脹反応が生じた。本結果は、flaky tail マウスではフィラグリン発現量の減少により抗原が皮膚を通過しやすく、それにより野生型マウスに比べ遅延型の耳翼腫脹反応が誘導されたものと考えられた。本手法を用いて OVA の反復塗布試験を行ったところ、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。

## E. 結論

今年度は、マウスの耳翼に抗原を塗布し、その耳翼腫脹反応を観察することで、抗原感作の成立から肉眼的皮膚炎が形成されるまでの過程が詳細に観察できる可能性を示した。来年度は、最適な塗布物質、塗布方

法、皮膚炎評価法の検討を継続し、人為的皮膚バリア破壊を伴わない、肉眼的に明らかな皮膚炎を形成する系の確立を目指す。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表（平成 20 年度）

##### 1. 論文発表

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

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

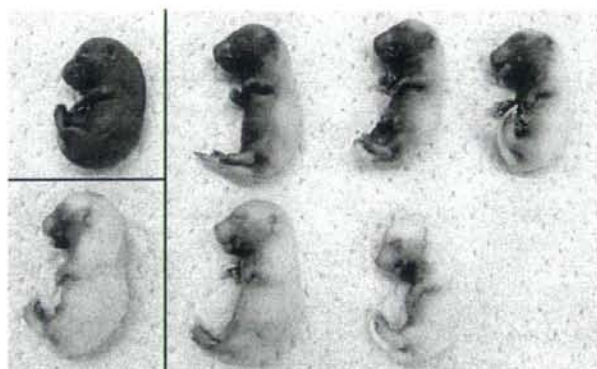


図1 ft/wt を交配した littermate マウスにトルイジンブルーを浸透させた。  
(ft: flaky tail マウス, wt: 野生型マウス)

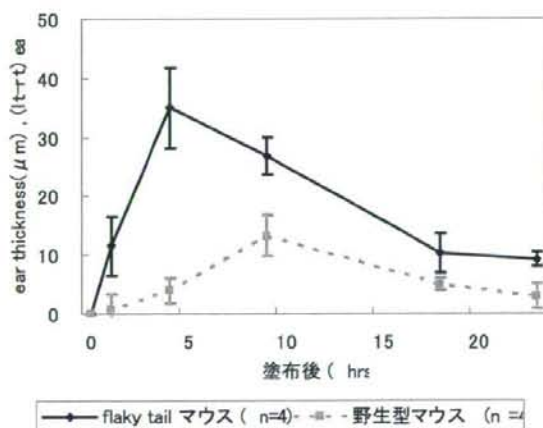


図2 刺激性接触皮膚炎における反応性の違い。

0.5% croton oil をマウスの左耳翼に、基剤を右耳翼に塗布し、計時的に耳翼の厚さを計測した。flaky tail マウスでは、野生型マウスに比べ、有意な耳翼腫脹反応が認められた。

抗原塗布回数(回目後)	0	1	2	3
flaky tail マウス(OVA)	(-)	<5	85.63	230.34
	(-)	19.3	57.2	174.63
	(-)	48.2	47.47	55.82
flaky tail マウス(PBS)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)
野生型マウス(OVA)	(-)	40.18	453.98	4047.83
	(-)	61.13	384.2	267.94
野生型マウス(PBS)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)

表1 OVA patch 貼付試験後の OVA 特異的 IgE 値の推移。

flaky tail マウス(n=6)、野生型マウス(n=4)をそれぞれ OVA 暴露群と PBS 暴露群に分け、patch 貼付による抗原塗布を計3回行った。抗原塗布前後の OVA 特異的 IgE (ng/ml) 値の推移を表に示した。flaky tail マウス、野生型マウス共に OVA 暴露群では OVA 特異的 IgE が検出された。

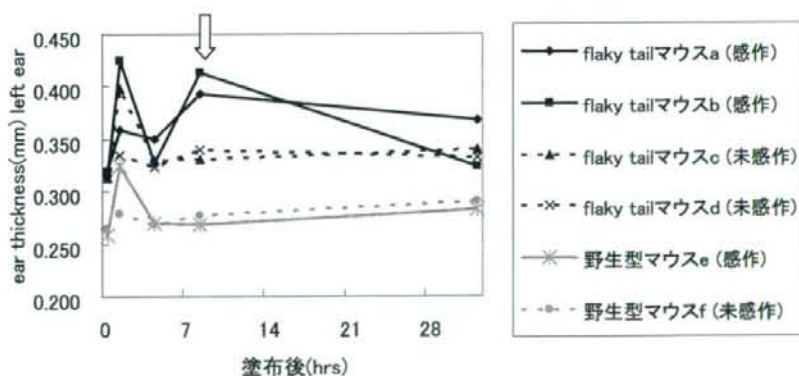


図3 OVA 単回塗布試験。

OVA で感作したマウスと未感作のマウスの左耳翼に、OVA を単回塗布した。塗布前後の耳翼腫脹反応を計時的に測定した。OVA で感作した flaky tail マウスにのみ遅延型の耳翼腫脹反応(矢印)が生じた。



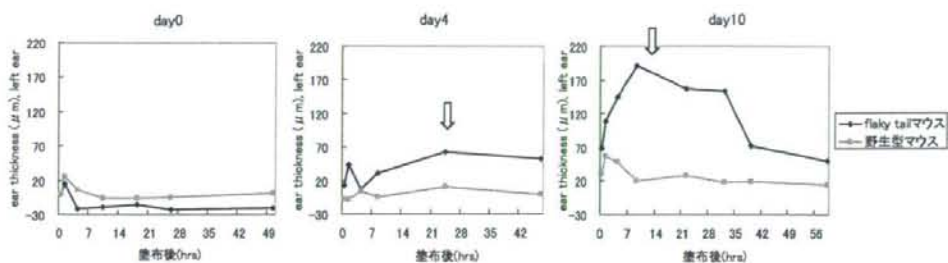
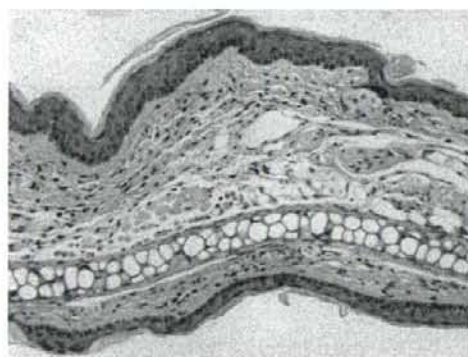
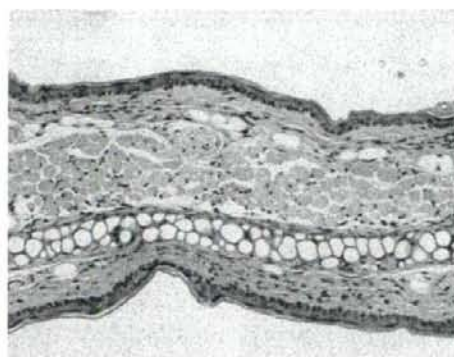


図4 OVA 反復塗布試験。

マウスの左耳翼に、OVA を隔日で反復塗布した。day0 の OVA 塗布前の耳翼厚を基準として、計時的に耳翼厚の変化を計測した。flaky tail マウスでは day4 頃から遅延型の耳翼腫脹反応(矢印)が生じたが、野生型マウスでは認められなかった。図には、代表的なデータを示した。



flaky tail マウス



野生型マウス

図5 OVA 反復塗布試験 病理組織像。

マウスの左耳翼に、OVA を隔日で反復塗布した際の day18 での組織像。OVA 塗布後、4 時間後に塗布部の組織を採取した。

## フィラグリン欠損マウスの作製

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 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。

共同研究者

久保亮治 慶應義学医学部総合医科学研究  
センター 特別研究講師  
川崎 洋 慶應義学医学部 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 ままで Neo 耐性遺伝子と置き換わるようにデザインした。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

昨年までに、TV1 を用いたターゲッティングにより、F1 ヘテロマウスを得た。本年は、TV2 にもターゲッティングに成功し、TV1、TV2 のターゲッティングベクタによる KO マウス、それぞれ 1 ラインを得ることができた。TV1 フィラグリン KO マウスの皮膚を採取して、免疫組織染色を行ったところ、フィラグリンの染色は観察されなかった (図 1)。一方、ロリクリン、インボルクリンの染色は野生型と差はなかった (図 1)。マウス皮膚抽出液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、フィラグリン KO マウスでは、フィラグリンの発現が完全に消失していた (図 2)。TV2 による KO マウスにおいても、これらと同様の結果を得ている。現在、今後の免疫学的な研究のためにバツ

ククロスを行い、B6 バックおよび BALB/C バックの2種類の遺伝的背景を持ったフィラグリン KO マウスを作製中である。

#### D. 考察

本研究の目的の1つである新規アトピー性皮膚炎モデルマウス作成のためには、フィラグリン KO マウスを得ることが絶対条件であった。今回得られた KO マウスは、免疫染色および蛋白プロットのいずれにおいてもフィラグリンの発現を完全に欠損しており、今後のアトピー性皮膚炎モデルの確立に重要な役割を果たすと考えられる。

#### E. 結論

今回、独立した2ラインのフィラグリン KO マウスを得ることができた。今後、フィラグリン KO マウスのフェノタイプの解析を進めると共に、フィラグリン KO マウスに抗原感作を行い、野生型では皮膚炎を発症しないが、KO マウスでは皮膚炎を発症する条件について探索し、アトピー性皮膚炎のマウスモデルの確立を目指す

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成 20 年度)

##### 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 (2): 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. 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.

<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*, 2008, 7 (4): 37-42.

##### 2. 学会発表

<英語発表>

なし

<日本語発表>

1. 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, 出来尾格, 定平知江子, 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病因変異簡便検出法の確立と日本人アトピー性皮膚炎患者での解析. 第15回日本遺伝子診療学会大会; 2008. 7. 31- 8. 2, 仙台.
2. 天谷雅行: 皮膚を科学する 水疱症から、とびひ、アトピー性皮膚炎へ. 慶應義塾大学薬学部特別講演会; 2008. 10. 12, 東京 (慶應義塾大学芝共立キャンパス).

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

出願中:

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

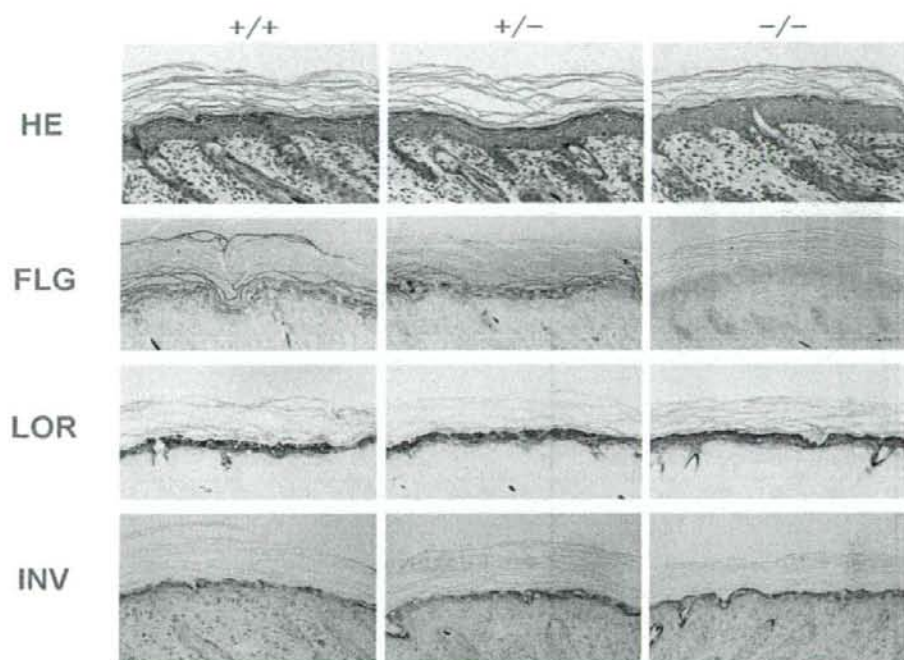
出願日: 2008/05/16

出願人: 学校法人 慶應義塾

希望の支援形態: PCT 出願



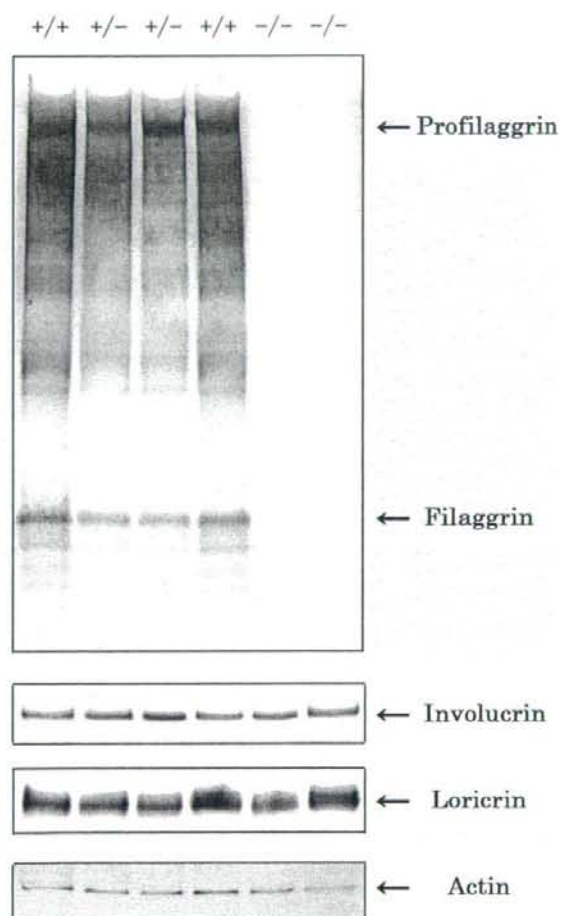
図 1



フィラグリン KO ヘテロマウスでは、表皮顆粒層でのフィラグリン発現が消失していた。フィラグリン KO ヘテロマウス、KO ホモマウスいずれも、ロリクリン、インボルクリンの発現に変化はなく、HE 染色にても野生型と比べて明らかな変化は見られなかった。



図 2



フィラグリノックアウトマウスでは、フィラグリンの前駆体のプロフィラグリンと成熟型フィラグリンのいずれも、発現が完全に消失していた。一方、ロリクリン、インボルクリンの発現に変化は見られなかった。

## 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

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

### 研究要旨

表皮顆粒層細胞のタイトジャンクションを構成する接着分子であるクローディン1の遺伝子欠失マウスは皮膚バリア機能の異常を呈する。そのメカニズムを解明するため、角質層の生化学的な異常について脂質とタンパク質の両面から検討を行った。角質層バリア重要な要素である脂質ラメラ構造の主要成分である各種セラミドの量について、野生型マウスとクローディン1遺伝子欠失マウスの間で有意な差が検出された。さらに、クローディン1遺伝子欠失マウスでは、角化タンパク質フィラグリンのモノマーが検出できないことが明らかになった。クローディン1遺伝子欠失マウスにおける角質層の生化学的変化が、角質層バリア機能の低下を介して皮膚バリア異常の原因となっている可能性が示された。

共同研究者

明石昌也

（神戸大学大学院医学研究科大学院生）

### A. 研究目的

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されている。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。その一環として、クローディン1遺伝子欠失マウスが呈する皮膚バリア異常のメカニズムの解明を目指す。このマウスでは、表皮顆粒層のタイトジャンクションのバリア機能が破綻しているが、角質層にも何らかの生化学的な異常が生じていることが前年度の解析から確認され、顆粒層のみならず角質層のバリア機能も低下している可能性が示された。そこで本年度は、クローディン1遺伝子欠失マウスの角質層における生化学的異常の有無について、脂質、タンパク質の両面から解

析を行った。

また関連して、表皮顆粒層のタイトジャンクションの性状をさらに明らかにする目的で、当研究グループで新たに同定されたタイトジャンクションの3細胞結合部位に濃縮する新規膜タンパク質（本報告書ではTRCXとする）のマウス表皮における局在を解析した。

### B. 研究方法

1) 脂質の解析：クローディン1遺伝子欠失マウスと野生型マウスの新生児の皮膚を採取し、EDTA処理によって表皮のみを単離して有機溶媒によって脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによって展開して、分離した脂質を検出試薬の発色により可視化した。同時に展開した標準脂質、および同様の方法によって発表されている文献上のデータより脂質の帰属を行った。各脂質のバンドの発色より脂質量を算出し、野生型マウスとクローディン1遺伝子欠失マウスとの間で比較した。

2) タンパク質の解析：1)と同様に採取した皮膚を、SDS、および尿素を含むバッフ

ァーによって可溶化し、SDS-PAGEにより分離し、角化マーカーであるロリクリンとフィラグリンの抗体でウェスタンブロットを行いタンパク質の発現、分子量について解析を行った。

3) 野生型マウスの皮膚の凍結切片における TRCX、オクルディンの局在を蛍光抗体法により観察した。

### C. 研究結果

1) 角質層のバリアに重要な役割を果たす脂質ラメラの主要構成成分であるセラミドについて、野生型マウスとクローディン1遺伝子欠失マウス(KOマウス)の間で総量には差がみられなかったが、セラミドのうち Cer3(NP), Cer5(AS)の量はKOマウスで増加が見られた。角質セラミドの前駆体であるグルコシルセラミドもKOマウスで有意に増加していた。一方、KOマウスで減少する脂質が一種類確認されたが、まだ脂質種の帰属には至っていない。

2) 野生型マウスとKOマウスの間で、角質層バリア形成およびアトピー性皮膚炎との関与が疑われているフィラグリンの発現を調べたところ、KOマウスでのみ、フィラグリンのモノマーが検出できなかった。すなわちフィラグリンのプロセッシングに異常が見られた(図1)。

3) タイトジャンクションの3細胞結合部位に局在する新規膜タンパク質 TRCX は顆粒層のタイトジャンクションにおいて、単層上皮細胞で見られるように3細胞結合に濃縮していた。興味深いことに、タイトジャンクションのよいマーカーであるオクルジンが濃縮する顆粒層のタイトジャンクションの一層下の細胞で TRCX が細胞接着部位と思われる部位によく濃縮することを明らかにした(図2)。

### D. 考察

角質層バリアに重要な役割を果たす脂質ラメラの主要成分である各種セラミドの量が、クローディン1遺伝子欠失マウスでは

野生型マウスに比較して変化していた。ただし、総量に大きな差が見られないことや、クローディン1遺伝子欠失マウスでも脂質ラメラ構造が電子顕微鏡レベルで観察されることを考慮すると、今回見いだされたセラミド量の異常が皮膚バリア機能にどの程度影響するかはまだ不明である。しかしながら、皮膚バリア機能における役割の重要性が提唱されているフィラグリンのプロセッシングに異常が見られたことは、クローディン1遺伝子欠失マウスで角質層バリア機能が低下している可能性を示唆する。その検証のためには角質層だけのバリア機能を測定する必要がある。また、顆粒層タイトジャンクションの機能不全に伴い、角質層周囲の溶液環境がどのような変化し、角質細胞の分化に影響を及ぼしているか検討する必要がある。顆粒層のタイトジャンクションより下層の細胞における TRCX の細胞間接着部位への濃縮は、表皮細胞分化に伴うタイトジャンクション形成機構の解明に重要な指標を与える。

### E. 結論

クローディン1遺伝子欠失マウスの角質層において、脂質ラメラの成分であるセラミドの量、角層の主要構成タンパク質であるフィラグリンのプロセッシングに異常が見られ、角質層のバリア機能が低下している可能性が示された。今後、顆粒層のタイトジャンクションの機能不全がどのようなメカニズムで角質層細胞の正常な分化に影響するかを解明する必要がある。また、角質層のみのバリア機能を測定する実験系の開発が望まれる。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表(平成20年度)

#### 1. 論文発表

<英語論文>

1. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687-93, 2008

2. 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: 465-71, 2008

3. Furuse, M. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta.* in press

4. Furuse M. The role of claudin-based tight junctions in morphogenesis. *Ann New York Acad Sci.* in press

5. 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

<日本語論文>

1. 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(5):336-337

2. 学会発表

<国際学会>

1. Furuse M: Internalization of claudins from tight junctions. International conference Berlin 2008 "Molecular structure and Function of the tight junction. April 24-27, 2008 (Berlin, Germany)

2. Furuse M: The role of tight junctions in epithelial barrier function. Post IID 2008 Satellite international Meeting on Autoimmune Diseases. May 17-19, 2008 (Otsu, Japan)

3. Furuse M: Remodeling of claudin-based tight junctions. NAIST Global COE Symposium on Cell Signaling. November 13-14, 2008 (Ikoma, Japan)

4. 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. December 1-4, 2008 (Cold Spring Harbor, USA)

5. 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. June 29, 2008 (USA)

6. 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. December 13-17, 2008 (San Francisco, USA)

<国内学会>

1. 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術交流基金群講演会 2008 年 10 月 15 日 札幌

2. 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 2008 年 10 月 15 日 岡山

3. 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 2009 年 3 月 26 日 京都

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

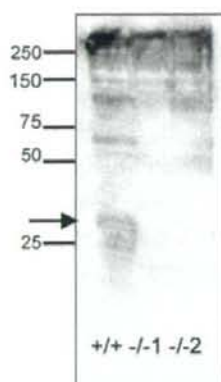


図1. クローディン1遺伝子欠失マウス角質層におけるフィラグリンの発現 (ウェスタンブロット) 左より野生型(+/+), ノックアウトマウス2個体 (-/-1, -/-2), 分子量 kD. 矢印はフィラグリンモノマー

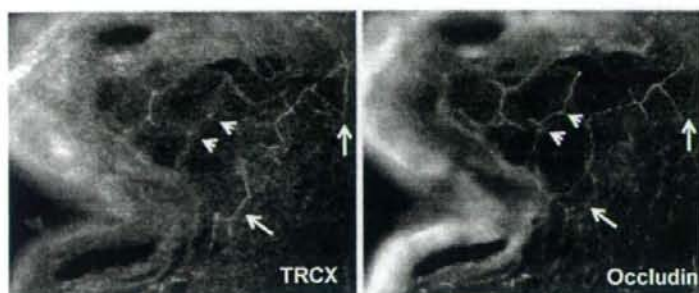


図2. マウス新生児皮膚における TRCX, オクルディンの発現 (二重蛍光抗体染色) 矢頭は3細胞結合部位 TRCX はオクルディンによって標識されるタイトジャンクションの3細胞結合部位に濃縮する以外に (矢頭)、一層下の細胞 (図の右側) においてすでに細胞間接着部位に局在する (矢印)

## アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析

研究分担者 梶島健治 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 准教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎モデルには、マウス耳介にハプテン反復塗布による即時型・遅発型反応へと免疫応答をシフトさせる慢性抗原曝露モデルがあるが、その誘導機序の詳細は不明である。そこで、バリア破壊や慢性抗原曝露による皮膚樹状細胞への影響と、バリア機能異常を呈する flaky tail マウスを用いて新たなアトピー性皮膚炎モデルの確立を試みた。ハプテン反復塗布モデルにおいて、皮膚樹状細胞が定常状態やハプテン単回塗布後の状態とは異なる遊走能を呈することを見出した。また、flaky tail マウスにバリア破壊刺激を行わずにダニ抗原を塗布することにより皮膚炎を惹起することに成功し、新たなアトピー性皮膚炎モデルの確立の基盤を築いた。

共同研究者  
吉木竜太郎 産業医科大学医学部  
皮膚科学 助教  
坂部純一 産業医科大学医学部  
皮膚科学 大学院生

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD) はバリア破壊、免疫・アレルギーの制御異常、痒み過敏などの様々な要素により誘導される。近年バリア異常が AD の発症に関与していることが明らかになったが、バリア破壊と免疫応答が AD の発症において、どのようにクロストークしているかは明らかでない。

また、マウス耳介にハプテンを反復塗布することにより、Th1 (遅延型過敏反応) から Th2 型反応 (即時型・遅発型反応) へと免疫応答をシフトさせる慢性抗原曝露モデルがある。皮膚には MHC class II+ CD11c+ 抗原提示細胞としてランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC, Langerin+ CD103- CD326+) と真皮樹状細胞 (dermal dendritic cell; dDC) の 2 種

類の DC が存在する。さらに近年、dDC にも Langerin 陽性 dDC (Langerin+ CD103+ CD326-) と Langerin 陰性 dDC (Langerin- CD103- CD326-) の 2 サブセットが存在することが明らかになった。ところが、上記の Th2 へのシフトにおいてこれらの樹状細胞がいかなる役割を有するかも不明である。

そこで、バリア破壊や慢性抗原曝露が皮膚構成細胞に与える影響を検証し、AD の病態形成における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

マウスの腹部を蛍光ハプテンである FITC (ジブチルフルタル酸: オリーブ油, 1:1, 2% x 200  $\mu$ L) にて感作し、さらに週に 2 回ずつ計 6 回反復塗布し、Th2 を誘導する。最終と塗布後 1 日、3 日後に所属リンパ節を採取し、皮膚樹状細胞の遊走能、表面マーカーの解析を行った。

また、バリア機能の維持に重要な役割を果たす filaggrin の発現が低下した flaky tail マウスにおいて、ダニ抗原



を耳介に塗布し、臨床症状、耳介腫脹反応、組織学的所見を検証した。コントロールには C57BL/6 マウスを用いた。

### C. 結果

無処置マウスに FITC を塗布すると所属リンパ節への皮膚樹状細胞の遊走が認められるが、ハブテン反復塗布後の所属リンパ節において皮膚樹状細胞のリンパ節への遊走は認められなかった(図 1)。さらに、皮膚に留まった樹状細胞の機能を評価するために、皮膚全層をコラゲナーゼ処理し、皮膚樹状細胞の 3 つのサブセットにおける IL-10, IL-12, ICOS ligand, OX40 ligand の発現を単回塗布マウスのもものと比較したが、フローサイトメーターによる解析では明らかな違いを認めなかった。

一方、flaky tail (*ft/ft*) マウスにダニ抗原を耳介周囲に反復塗布していくと耳介腫脹、scratching 回数の増加、耳介・顔面のびらんなどを認め、さらに病理組織において炎症細胞の強い浸潤を認めた。これらの所見は C57BL/6 マウスにおける同様の処置では認められなかった(図 2)。

### D. 考察

ハブテン反復塗布による AD 様皮膚免疫反応の誘導の機序の一つに、皮膚樹状細胞の機能の変化が何らかの役割を果たしていることを示唆する所見を得た。ところが、まだ、具体的にいかなる機能変化を来しているかに関しては、鍵となるものが見いだせていない。今後、ハブテン反復塗布後の皮膚樹状細胞における T 細胞刺激能、Th1 分化能、ケモカインやサイトカイン産生の profile を同定することが必須事項であり、現在解析を進めている。

また、flaky tail マウスにダニ抗原を塗布するのみで皮膚炎を発症させる

ことに成功した。この反応は C57BL/6 マウスでは認められないことより、flaky tail マウスが外来抗原刺激に対して皮膚炎を誘導しやすい状態にあることを示唆する。今後は同皮疹のサイトカイン産生 profile や血清 IgE 値などを測定することにより、アトピー性皮膚炎に近いモデルとして新たに確立すること、さらにそのモデル形成における filaggrin を介したバリア機能や免疫制御機構の解明を行うことが重要であると考えられる。

### E. 結論

ハブテン反復塗布モデルにおいて、皮膚樹状細胞が定常状態、あるいはハブテン単回塗布後の皮膚とは異なる機能を有することを見出した。また、flaky tail マウスにダニ抗原を塗布することにより皮膚炎を惹起することに成功した。今後、本モデルの AD との相違点を明らかにする作業を介して、新たな AD モデルとして今後臨床・基礎研究に役立てていくことが求められる。

### F. 研究危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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* 2008.
2. Nakashima D, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Kobayashi T, Yoshiki R, et al. Impaired initiation of contact hypersensitivity by FTY720. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2833-41.
3. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;

128:2625-30.

4. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R *et al*. Cutaneous hypersensitivities to hapten are controlled by IFN-gamma-upregulated keratinocyte Th1 chemokines and IFN-gamma-downregulated langerhans cell Th2 chemokines. **J Invest Dermatol** 2008; 128: 1719-27.
5. Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K. Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. **Exp Dermatol** 2008; 17:81-90.
6. 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** 2008.
7. 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** 2008; 159:306-13.

## 1) 総説論文

1. 著者：梶島健治  
題名：一冊でわかる光皮膚科 「紫外線と表皮角化細胞」  
掲載誌：文光堂 東京 p14-16 2008
2. 著者：梶島健治  
皮膚の抗原提示細胞の分類と免疫・アレルギーの制御  
掲載誌：西日本皮膚科 70 巻 5 号 Page475-477
3. 著者：梶島健治  
題名：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  
掲載誌：臨床免疫・アレルギー科50 巻 3号 Page339-344

## 2. 学会発表

### 国外学会

1. Prostaglandin E2-EP3 signaling, as a negative regulator of skin immune responses by suppressing cutaneous

dendritic cell functions. N Shiraishi, K Kabashima, Y Tokura (IID 2008)

2. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. C Koga, K Kabashima, N Shiraishi, M Kobayashi, and Y Tokura (IID 2008)
3. Cutaneous hypersensitivities to hapten are controlled by IFN-g-upregulated keratinocytes Th1 chemokines and IFN-g-downregulated Langerhans cell Th2 chemokine. T Mori, K Kabashima, R Yoshiki, K Sugita, N Shiraishi, A Onoue, E Kuroda, M Kobayashi, U Yamashita, and Y Tokura (IID 2008)
4. Inducible nitric oxide synthase regulates dendritic cell migration and contributes to contact hypersensitivity. K Sugita, K Kabashima, R Yoshiki, and Y Tokura (IID 2008)
5. Langerhans cells and prostaglandins: contribution to the etiology and pathogenesis of atopic dermatitis and related disorders (symposium) Kabashima K. 5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis, Kyoto, April 2008

### 国内学会

1. 梶島健治  
「脂質メディエーターの免疫における新たな役割」(シンポジウム)  
分子生物・生化学会合同集会(BMB2008)  
神戸、2008年11月
2. 梶島健治  
「Th17とアトピー性皮膚炎」(シンポジウム)  
日本アレルギー学会 東京、2008年11月
3. 梶島健治  
「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」(ランチョンセミナー)  
第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 大阪、2008年11月
4. 梶島健治  
「IL-17とTh2型免疫応答」シンポジウム  
第38回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 大阪、2008年11月
5. 梶島健治

「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

6. 梶島健治

「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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



図1：ハプテン単回あるいは反復塗布後の所属リンパ節における FITC 陽性 MHC classII 強陽性皮膚由来樹状細胞のフローサイトメーターを用いた解析

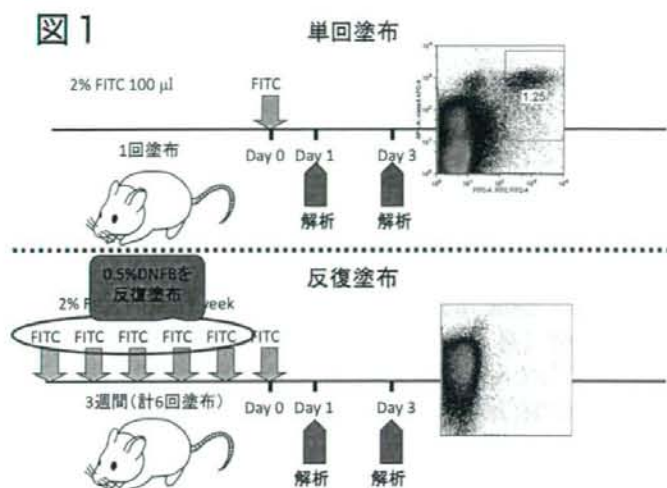
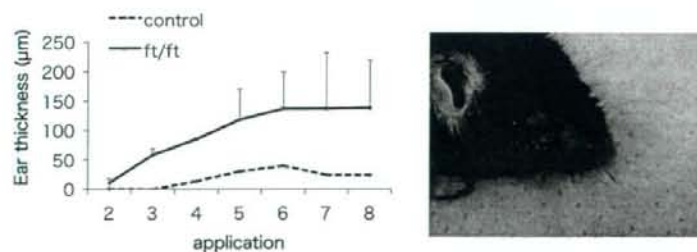


図2：flaky tail (ft/ft) マウスにダニ抗原を週2回ずつ耳介に投与し、その後の耳介厚を測定した。

**図2**



## 経皮的抗原感作による喘息マウスモデルの開発

研究分担者 浅野 浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学 准教授

**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。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 吸入暴露を行った。両系統とも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。感作の回数を1-2回に減らすことにより、OVA 特異的抗体価上昇や気道好酸球集積は減少した。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。

共同研究者

小熊 剛 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学  
共同研究員

樹神元博 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学  
大学院生

### 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しないが、われわれは、経皮抗原感作ではハプテンなしでも好酸球性気道炎症を発症することを確認した。さらにこのモデルの評価を進め、フィラグリン欠損マウスの評価に使用することが可能な、経皮抗原感作の強度依存性に抗原特異的抗体産生、好酸球性気道炎

症、気道過敏性亢進が成立するモデルの確立を目的とした。

### B. 研究方法

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、1-3回) した後、OVA 吸入暴露を行った。対照として、(1) ハプテンであるアラムと OVA をともに腹腔内に投与した動物、(2) ガムテープにより物理的に障害した皮膚に OVA をしみこませたパッチを貼付した動物を用いた。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。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。

### C. 結果

両系統とも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 (図1)。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。感作の回数を1-2回に減らすことにより、OVA 特異的抗体価上昇や気道好酸球集積は減少した(図1)。テープによる皮膚の物理的傷害は抗原感作反応をかえって減弱させた。

#### D. 考察

経皮抗原感作により、感作の強度に応じた免疫応答と、それに続く好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進が成立することが明らかとなった。今後、フィラグリンノックアウトマウスにおいて、野生型マウスよりも弱い経皮感作により喘息様の病態が成立するかどうかを検討していく。一方、強い物理的皮膚障害は皮膚局所とリンパ組織におけるサイトカインプロフィールを変化させ、感作反応と気道炎症を減弱させると考えられる。今後、さらに検討を加えていく予定である。

#### E. 結論

二系統のマウスで、経皮抗原感作によって感作の強度に応じた好酸球性気道炎症・気道過敏性亢進をきたすモデルが確立できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Y. Shiraiishi, 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. Y. Suzuki, K. Asano, K. Niimi, et al. TP receptor-mediated release of eosinophil chemotactic activity from human bronchial smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 600(1-3):133-139, 2008
3. K. Asano and A. Ishizaka. Pharmacogenetics of anti-leukotriene drugs. *Clin Exp Allergy Rev* 8: 45-49, 2008.

4. T. Oguma, K. Asano, and A. Ishizaka. Role of prostaglandin D<sub>2</sub> and its receptors in the pathophysiology of asthma. *Allergol Int* 57: 307-312, 2008.
5. K. Asano, S. Nakade, T. Shiomi, et al. Impact of pharmacokinetics on pharmacogenetic association of pranlukast in Japanese asthmatics. *Respirology* in press, 2009

学会発表

1. K. Asano. Susceptibility genes for allergic diseases. International symposium. University of Sao Paulo and Keio University. Sao Paulo, Brasil, 2008.8.
2. K. Asano, S. Nakade, T. Oguma, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of pranlukast in Japanese adult patients with asthma. 64rd AAAAI Annual Meeting, Washington DC, USA, 2009. 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