

河野通良 1、海老原全 1、佐々木貴史 2、工藤 純 2

1 慶大皮膚科、2 慶大分子生物

慶大皮膚科外来を受診されたアトピー性皮膚炎患者における、フィラグリン遺伝子の遺伝子型 (A, B, C) および、アジア型変異 (S2889X, S3296X, S2554X, 3321delA)、ヨーロッパ型変異 (R501X, 2284del4, 3338delG) について、PCR と制限酵素処理を組み合わせることによって開発された簡易同定法を用いて解析を行った。

⑧アトピー性皮膚炎における皮膚バリア機能臨床的解析

海老原 全 1、定平知江子 1、川崎 洋 1、河野通良 1、出来尾 格 2、天谷雅行 1

1 慶大皮膚科、2 島根大皮膚科

日本人アトピー性皮膚炎患者 112 名について、その臨床型 (アトピー性皮膚炎発症の時期や臨床経過、その他のアレルギー性疾患併発の有無、および血清 IgE 値や好酸球数、血清 LDH 値などの血液学的検査所見) と、患者末梢血から抽出された DNA を用いて解析された皮膚バリア機能蛋白遺伝子変異との関連について検討した。現段階では、フィラグリン遺伝子の変異が 8 例、ロリクリン遺伝子の変異が 1 例認められたが、アトピー性皮膚炎の臨床型との一定の関連性は認められなかった。

⑨小・中学生の入浴習慣と暖房に関する質問票による調査

加藤則人 1、若森健 1、岸本三郎 1、小笹晃太郎 2

1 京都府立医大皮膚科、2 同・保健予防医学

京都府山間部の和束町立小中学校の全児童・生徒を対象に、入浴習慣と暖房に関する質問票による実態調査を行った。「冬季の暖房の設定温度が 25℃以上」、「寝るときも電気毛布をつけたまま寝る」など皮膚の乾燥につながる暖房がされている頻度が少なくなく、反対に「暖房中は部屋が乾燥しすぎないように気を配っている」と回答した割合はきわめて低かった。入浴については、「体を洗う際にナイロンタオルを使用している」割合が高かった。皮膚の乾燥を防ぐための適切な暖房や入浴の方法に関する保健教育が必要と考えた。

平成 20 年度
厚生労働省科学研究費補助金 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

第 2 回班会議

研究代表者 天谷雅行

日時：平成 20 年 11 月 26 日（水）14:00-18:00

場所：慶應義塾大学医学部 教育研究棟
（4 階 講堂 3）

連絡先： 〒160-8582 新宿区信濃町 35
慶應義塾大学医学部皮膚科
TEL：03-5363-3822
FAX：03-3351-6880
E-mail：nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp



プログラム（発表時間 10 分、討論 10 分）

14:00 開会の辞

天谷雅行

14:05-14:10 本研究班の今後の方向性と目標

天谷雅行（慶大皮膚科）

アトピー性皮膚炎及び喘息モデルマウスの作製・解析

14:10-14:30 flaky tail マウスのフィラグリン遺伝子解析と変異の発見

工藤 純、佐々木貴史(慶大分子生物・先導研 GSP センター)

14:30- 14:50 フィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患マウスモデルの作製

川崎 洋、久保亮治、天谷雅行(慶大皮膚科)

14:50- 15:10 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

古瀬幹夫、明石昌也（神戸大細胞生物）

15:10- 15:30 アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析

梶島 健治 1、吉木 竜太郎 2、坂部 純一 2
(1 京都大皮膚科 2 産業医大皮膚科)

15:30- 15:50 経皮感作喘息モデルの確立

樹神元博、小熊剛、加川志津子、友松克允、浅野浩一郎（慶大呼吸器内科）

- 休憩（30 分） -

アトピー性皮膚炎患者における 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子解析と疫学解析

16:20- 16:40 アトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析

河野通良 1、海老原全 1、佐々木貴史 2、工藤 純 2
(1 慶大皮膚科、2 慶大分子生物)

16:40- 17:00 アトピー性皮膚炎における皮膚バリア機能の臨床的解析

海老原 全1、定平知江子2、川崎 洋1、河野通良1、天谷雅行1
(1 慶大皮膚科、2 国立成育医療センター皮膚科)

17:00- 17:20 皮膚の乾燥とアトピーマーチの関係についての疫学的検討

加藤則人1 若森健2 小笹晃太郎3
(1 京都府立医大皮膚科、2 済生会滋賀県病院皮膚科、3 京都府立医大保健予防医学)

17:20-18:00 総合討論

18:00-18:10 事務連絡

海老原 全

18:10- 閉会の辞

天谷雅行

18:30- 懇親会

演題抄録

① flaky tail マウスのフィラグリン遺伝子解析と変異の発見

工藤 純、佐々木貴史

慶大分子生物・先導研 GSP センター

6組のプライマーを用いた mFlg-shotgun 法で flaky tail (*ft*) マウスから 1塩基の欠失 *delA* を検出したが、Flg リピート配列を完全には再構築できず、変異の位置は決定出来なかった。そこで、ダンディー大 McLean らとの共同研究で、*ft* マウスから作成した *Flg^{ft}* を含む BAC クローンを用いて配列を決定した。exon3 の Flg リピートを含む約 13kb のサブクローンについて transposon を利用して配列を決定したところ、*Flg^{ft}* 遺伝子は 738~765bp を単位とした 15 単位の完全な Flg リピートを含み、これは C57BL/6 由来の *Flg^{C57}* より 1 単位少なかった。また、欠失の位置は、6 番目のリピートに含まれる 5303*delA* となった。この変異から予想されるプロフィラグリンのサイズは 205kDa であり、これまでに蛋白質の電気泳動から推定された 215kDa とよく一致した。

② フィラグリン欠損マウスを用いたアトピー疾患マウスモデルの作製

川崎 洋、久保亮治、天谷雅行

慶大皮膚科

フィラグリン欠損が皮膚バリア破綻を招き、その結果、皮膚において繰り返す慢性の抗原刺激がアトピー疾患の発症を招く、という仮説を検証するために、フィラグリン欠損マウスの作製を行った。ターゲッティングベクターは、マウスフィラグリン遺伝子の 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。相同組換えによりフィラグリン遺伝子が破壊された ES 細胞より F1 ヘテロマウスを作製し、フィラグリン遺伝子の破壊をサザンプロットにより確認した。F1 ヘテロマウスを交配し、得られたフィラグリン (-/-) マウスにおいて、ウエスタンプロット、免疫組織染色を行い、タンパクレベルでのプロフィラグリン・フィラグリンの完全な消失を確認した。今後、本マウスにおける皮膚バリア機能異常の評価を行うと共に、本マウスを各種組み換え抗原に暴露することで、アトピー性皮膚炎・喘息を発症するアトピー疾患マウスモデルの作製を目指す。

③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

古瀬幹夫、明石昌也

神戸大細胞生物

皮膚バリア機能に異常が見られるクローディン1遺伝子欠失マウスの表皮の生化学的変化を解析した。タンパク質レベルでは、角化マーカのうちフィラグリンのプロセッシングに異常が見られ、マウスで27kDとされる最終産物の代わりに約50kDの産物が検出された。脂質レベルでは脂質ラメラの主成分であるセラミドの量が有意に増加していた（脂質の測定はカネボウ化粧品、菅原智子氏、杉山義宣氏による）。したがって、顆粒層上皮細胞のタイトジャンクションの構成分子であるクローディン1の欠失により、表皮細胞角質層の生化学的変化を介して角質層のバリア機能が減弱している可能性が示された。

④アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析

梶島 健治¹、吉木 竜太郎²、坂部 純一²

¹京都大皮膚科 ²産業医大皮膚科

①近年 caspase-14 ノックアウトマウスにおいて、プロフィラグリンからフィラグリンが生成されないこと、プロフィラグリンのC末端領域の欠損により、フィラグリンの生成が減弱することが報告された。そこで、プロフィラグリンのC末端領域を発現するコンストラクトを2種類作成し、これをマウス由来ケラチノサイト株(PAM212)へ形質導入した。そして、形質導入して24時間後のcaspase-14の発現を評価したので報告する。

②前回我々は、ハプテンを反復塗布すると、所属リンパ節への皮膚樹状細胞の遊走が見られなくなることを報告した。今回はこの慢性的な抗原塗布状態が樹状細胞自体の機能の変化をもたらすのか、あるいは皮膚リンパ管・所属リンパ節の機能変化によるものなのかを検討した。また、慢性的抗原暴露時におけるLangerhans cell、Langerin陽性と陰性の真皮樹状細胞サブセットの変化についても検証した。

⑤経皮感作喘息モデルの確立

樹神元博、小熊剛、加川志津子、友松克允、浅野浩一郎

慶大呼吸器内科

【目的】経皮的な抗原感作と喘息発症のリスクがフィラグリンノックアウトマウスにおいて増加させるかどうかを評価可能なマウスモデルを確立する。【方法】C57/BL6 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。【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。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。【考察】今後、野生型マウスでは喘息病態が認められない1-2回の感作で、フィラグリンノックアウトマウスでは上記の病態が生じうるかを検討する。

⑥アトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析

河野通良 1、海老原全 1、佐々木貴史 2、工藤 純 2

1 慶大皮膚科、2 慶大分子生物

慶大皮膚科外来を受診されたアトピー性皮膚炎患者における、フィラグリン遺伝子の遺伝子型 (A, B, C) および、アジア型変異 (S2889X, S3296X, S2554X, 3321delA)、ヨーロッパ型変異 (R501X, 2284del14, 3338delG) について、PCR と制限酵素処理を組み合わせた簡易同定法を用いて解析を行った。これまでに行ってきた 131 名のアトピー性皮膚炎患者 DNA の解析結果を報告する。

⑦アトピー性皮膚炎における皮膚バリア機能の臨床的解析

海老原 全 1、定平知江子 2、川崎 洋 1、河野通良 1、天谷雅行 1

1 慶大皮膚科、2 国立成育医療センター皮膚科

当科に通院している日本人アトピー性皮膚炎患者 128 名について、その臨床型 (アトピー性皮膚炎発症の時期や臨床経過、その他のアレルギー性疾患併発の有無、および血清 IgE 値や好酸球数、血清 LDH 値などの血液学的検査所見) と、患者末梢血から抽出された DNA を用いて解析された皮膚バリア機能蛋白遺伝子変異との関連について検討した。これらの症例のうち、フィラグリン遺伝子の変異が 11 例、ロリクリン遺伝子の変異が 1 例認められた。これらの遺伝子変異を有する症例と、その他の症例を比較したところ、アトピー性皮膚炎の臨床型に有意差は認められなかった。

⑧皮膚の乾燥とアトピーマーチの関係についての疫学的検討

加藤則人 1、 若森健 2、 小笹晃太郎 3

1 京都府立医大皮膚科、 2 済生会滋賀県病院皮膚科、 3 京都府立医大保健予防医学

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。過去10年間と同様に、喘息や花粉症を合併せず、アトピー性皮膚炎の診断基準を満たす湿疹病変がみられない乾燥皮膚のみを呈する小児においても血清総IgE値やダニ・スギ特異IgE値が有意に上昇していた。

また、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。教育介入は、より早い時期から行った方がアトピーマーチへの予防効果が高いと考え、教育の対象を乳幼児検診に参加する保護者全員へと拡大するとともに、教育資材による教育では明らかな生活様式の変化という効果がみられなかったことから、今年度からは教育効果を高めるため個別対面指導を行うこととした。

V. 平成 20 年度構成員名簿

班員構成

区分	氏名	所属	職名
研究代表者* ¹	天谷雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科学	教授
研究分担者* ¹	古瀬幹夫 工藤 純 加藤則人 栢島健治 浅野浩一郎 海老原 全 久保亮治	神戸大学大学院医学系研究科細胞分子医学 慶應義塾大学医学部分子生物学 京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 慶應義塾大学医学部呼吸器内科学 慶應義塾大学医学部皮膚科学 慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター* ³	教授 准教授 准教授 准教授 准教授* ² 専任講師 特別研究講師* ³
事務局	岡嶋万里子	慶應義塾大学医学部皮膚科学 〒160-8582 新宿区信濃町 35 TEL: 03-5363-3823 FAX: 03-5363-3596 E-mail: nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp	秘書
経理事務連絡 担当責任者	鈴木文子	慶應義塾大学医学部 信濃町研究支援センター 〒160-8582 新宿区信濃町 35 TEL: 03-5363-3879 FAX: 03-5363-3610 E-mail: fumiko.suzuki@adst.keio.ac.jp	係主任

*1 平成20年度から、呼称が下記のように変更された。

主任研究者→研究代表者

分担研究者→研究分担者

*2 平成21年2月1日 職位変更

*3 平成20年11月1日 所属と職位が変更