

プして角質層の一部を剥がしとると、皮膚の TJ バリアを保ったまま、ランゲルハンス細胞を活性化させることができる。この時、活性化したランゲルハンス細胞の樹状突起が表皮 TJ とドッキング、または表皮 TJ を突き抜けて角質層の直下にまで伸長することを発見した (図 2)。さらに、表皮 TJ バリアの外側に出た部分より、外来抗原が取り込まれ、樹状突起内を運ばれて核周辺に集積することを示した。すなわち樹状突起先端にエンドサイトーシス機構が存在すると考えられた。ランゲルハンス細胞にはバーベック顆粒と呼ばれる特異的なエンドサイトーシス顆粒が存在する。ランゲリン蛋白はバーベック顆粒に特異的に存在し、バーベック顆粒形成に必須の蛋白である。TJ とドッキングした樹状突起先端にランゲリン蛋白が集積すること、TJ バリアの外側から取り込まれた外来抗原がランゲリン蛋白と共局在することを示し、活性化したランゲルハンス細胞がバーベック顆粒によるエンドサイトーシス機構により、TJ バリアの外側から外来抗原を取り込むことを示した。さらに、TJ とドッキングした樹状突起とケラチノサイトの間に機能的な TJ が形成され、角質層を通り抜けた外来抗原の無制限な侵入を防いでいることを示した (図 3)。

D. 考察

今回我々は、表皮内樹状細胞であるランゲルハンス細胞が表皮細胞との間に TJ を形成し、表皮 TJ バリアを損なうことなく樹状突起を表皮 TJ の外側に伸ばして外来抗原を取得することを示した (図 4)。これは皮膚バリア機構の概念を一新する成果である。すなわち皮膚は、角層・TJ・TJ と相互作用するランゲルハンス細胞の 3 つから構成されるバリアを持つ。これまで単に、角質を通り抜けた抗原がアレルギー疾患の原因となると漠然と考えられてきた。しかし、よりエレガントで美しいバリアシステムが皮膚には存在することが明らかとなった。

E. 結論

フィラグリン変異を持つアトピー性皮膚炎患者では、脆弱化した角層バリアを抗原が通過しやすくなっていると考えられる。すなわち、今回発見されたランゲルハンス細胞の新たな抗原取り込み機構により、角層バリアを通過した抗原が高頻度にランゲルハンス細胞に取り込まれている可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

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 JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH: A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*. 2009, 41:602-8
2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med* 2009, 206:2937-46
3. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe JI, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky Tail Mouse Denotes Human Atopic Dermatitis in the Steady State and by Topical Application with Dermatophagoides pteronyssinus Extract. *Am J Pathol*: Epub ahead of print, 2010.

日本語論文

なし

2. 学会発表

1. A. Kubo, K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki and M. Amagai: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. **11th International Workshop on Langerhans Cells**: Sep 3-6, 2009 Funchal/ Madeira/ Portugal
2. A. Kubo, K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki and M. Amagai: Activated Langerhans cells capture external antigens by sending their dendrites out through epidermal tight junctions. **39th Annual ESDR (European Society for Dermatological Research) Meeting**: Sep 9-12, 2009 Budapest, Hungary
3. 久保亮治、永尾圭介、天谷雅行: External

antigen uptake by Langerhans cells across epidermal tight junction barriers. 第39回日本免疫学会総会・学術集会：2009年12月2-4日 大阪

4. 川崎 洋, 久保亮治, 永尾圭介, 畑毅, 天谷雅行: Filaggrin Knockout Mice as a Tool for Understanding the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2009
5. A. Kubo, K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki, M. Amagai, External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. 第34回日本研究皮膚科学会学術大会: 2009年12月4-6日 福岡
6. Moniaga C, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for**

Investigative Dermatology, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4-6.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
国際出願番号：PCT/JP2009/002161
（国際出願日：2009年5月15日）
基礎出願番号：特願2008-303926
（出願日：2008/11/28）
国際公開番号：WO2009/139191
（国際公開日：2009年11月19日）
特許出願日：2009年5月15日
出願人：学校法人 慶應義塾
発明者：天谷雅行、久保亮治
発明の名称：アレルギー疾患モデル動物

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図とその説明

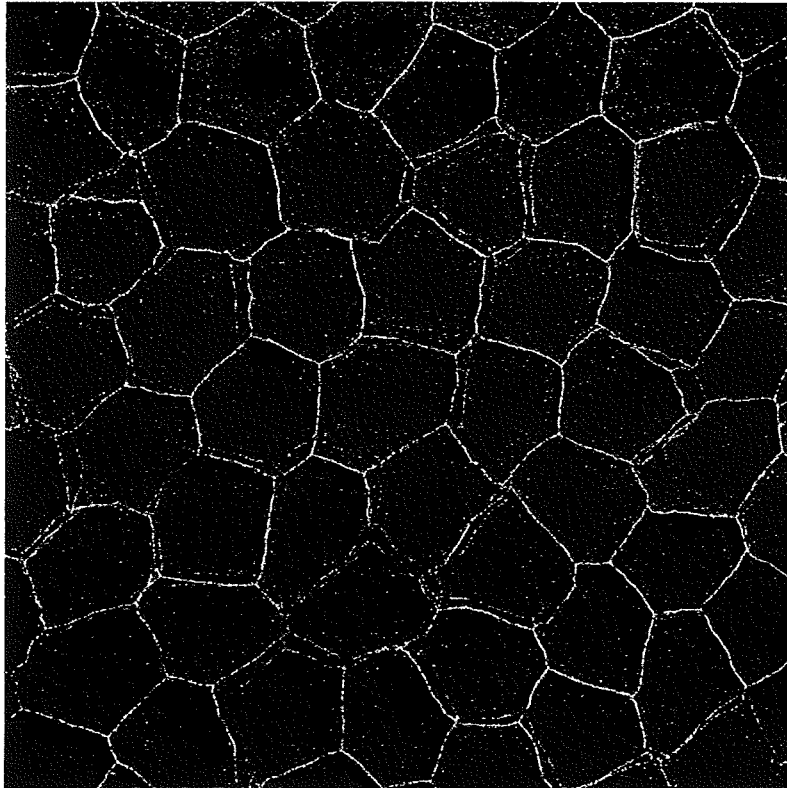


図1 マウス耳より単離した表皮を whole mount にて染色することにより、初めて表皮 TJ バリアを立体的に可視化することが可能となった

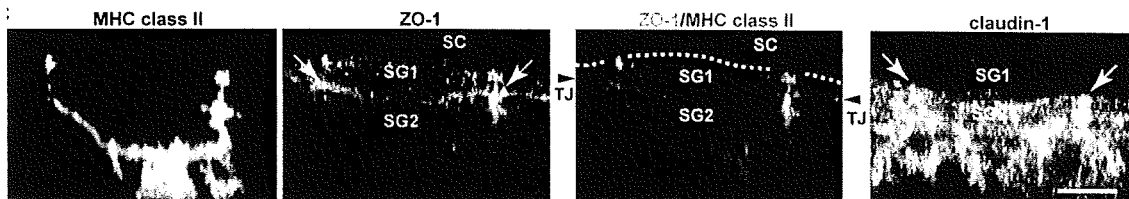


図2 活性化したランゲルハンス細胞 (MHC class II 陽性) の樹状突起は、顆粒層の1層目の細胞 (SG1) と2層目の細胞 (SG2) の間に存在する皮膚タイトジャンクションバリア (ZO-1 陽性) を超えて、角層 (SC) の下にまで至る。

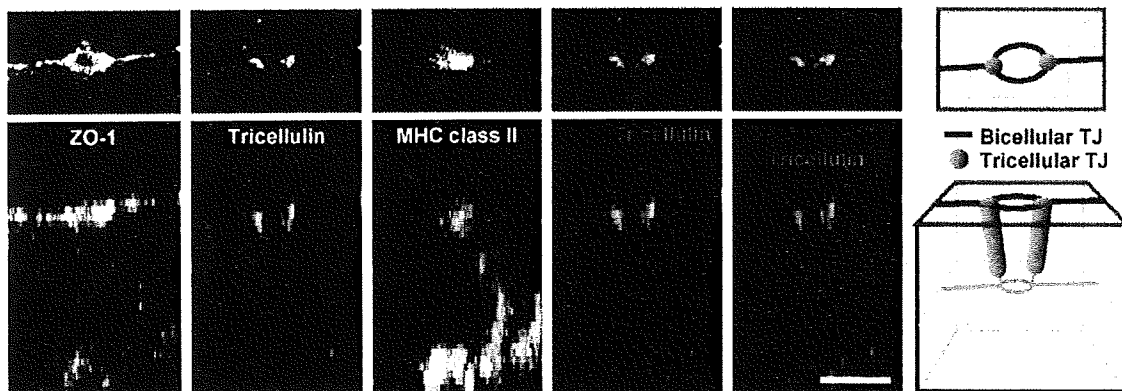


図3 活性化したランゲルハンス細胞 (MHC class II) の樹状突起と、皮膚タイトジャンクションバリアがドッキングした箇所では、皮膚ケラチノサイトとランゲルハンス細胞樹状突起の間に2細胞間タイトジャンクションバリア (ZO-1) と3細胞間タイトジャンクションバリア (tricellulin) が新たに形成される。

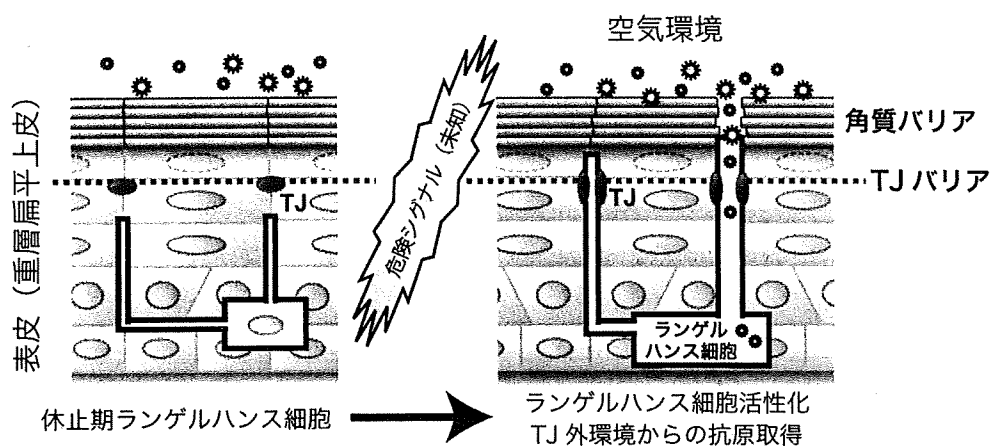


図4 休止期のランゲルハンス細胞 (左) が表皮 TJ バリアの内側に留まるのに対し、刺激に伴い活性化したランゲルハンス細胞 (右) は、表皮 TJ バリアを超えて外側に樹状突起を伸ばし、TJ バリア外の抗原を取得する機能を持つと考えられる。

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 京都大学医学研究科皮膚科 准教授

研究要旨 近年アトピー性皮膚炎発症の原因の一つにフィラグリン遺伝子異常があることが解明され、バリア機能破綻による免疫系への影響を解明することが重要課題となっている。そこで、アトピー性皮膚炎の発症機序を解明するために、フィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスを用いて新規アトピー性皮膚炎モデルの確立を試みた。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、高 IgE、バリア破綻を呈するアトピー性皮膚炎類似の新規マウスモデルを確立した。また皮膚に存在する 3 種類の樹状細胞サブセットの接触過敏反応形成における役割分担は不明の点が多いが、各サブセットを欠損させるアッセイ系を確立し、互いの代償機構を明らかにした。

研究協力者

本田 哲也

京都大学医学研究科皮膚科 助教

坂部 純一

産業医科大学医学部皮膚科 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。近年フィラグリン遺伝子異常に伴うバリア異常が 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。この課題に取り組むためには、ヒトのアトピー性皮膚炎をより正確に繁殖するマウスモデルが重要である。そこで、ヒトアトピー性皮膚炎の原因遺伝子として知られるフィラグリン遺伝子に変異を有する flaky tail マウスを用いた新規マウスアトピー性皮膚炎モデルの確立を行うことを本研究の目的とする。

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 classII+ 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、これらの樹状細胞サブセットの皮膚免疫応答誘導における役割の詳細は不明である。そこで各サブセットを独立して欠失させるモデルの開発は、今後各樹状細胞サブセットの機能解明を行う上での重要なツールとなりうるため、その開発を行うことを本研究の目的とする。

B. 方法

バリア機能の維持に重要な役割を果たすフィラグリンの発現が低下した flaky tail マウスにおいて、バリア破壊を行わずにダニ抗原を耳介や背部に塗布し、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。

また、Langerin-ジフテリア毒素受容体 (DTR) マウス、Langerin-DTR の骨髓を B6 マウスに移植したマウスに DT を投与すると、ランゲルハンス細胞と Langerin 陽性真皮樹状細胞の両者、

真皮樹状細胞のみを除去することができる。これらのマウスを用いて接触過敏反応を施行する。また、Langerin-DTR マウスに DT を塗布 10 日後には Langerin 陽性真皮樹状細胞のみ回復するので、ランゲルハンス細胞のみ欠失したモデルとなる。

C. 結果

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。さらに、flaky tail マウスでは血清 IgE 値の上昇、経皮水分蒸散量 (TEWL) の上昇を認め、バリア機能の低下をみとめた。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 1)。

低容量のハプテン塗布による接触過敏反応モデルにおいて、Langerin-DTR マウスに DT を投与したマウスでは免疫反応の減弱を認めたが、Langerin-DTR の骨髄を B6 マウスに移植したマウスに DT を投与したマウスにおいては、接触過敏反応は減弱しなかった。また、ランゲルハンス細胞のみ、あるいは Langerin 陽性真皮樹状細胞のみを欠失させたマウスにおいても接触皮膚炎反応は減弱しなかった (図 2)。

D. 考察

flaky tail マウスにバリア破壊を行わず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。また、血清 IgE 値や FITC の皮膚透過性が flaky tail マウスにおいて亢進していることも認められたことより、flaky tail マウスにダニ抗原を塗布することにより皮膚炎を誘発するモデルは、アトピー性皮膚炎に近いモデルと考えられる。

一方、ランゲルハンス細胞と

Langerin 陽性真皮樹状細胞をともに除去したマウスに

通常量のハプテンを塗布しても接触過敏反応は減弱せず、低容量のハプテンを塗布したモデルでは接触過敏反応が減弱したことから、通常量では Langerin 陰性真皮樹状細胞が compensate する。しかしながら低容量ハプテン投与では、ランゲルハンス細胞と Langerin 陽性真皮樹状細胞は接触過敏反応の形成に partial であるが重要である。ところが Langerin 陽性真皮樹状細胞のみを欠失させても接触過敏反応は減弱しないことからランゲルハンス細胞が補うことが推測される。以上のように接触過敏反応の形成において皮膚に存在する樹状細胞サブセットは、ハプテンの容量によって異なる相互の補いあいをしていることが明らかとなった。今後は慢性ハプテン塗布による Th2 へのシフトにおいて各サブセットの役割を明らかにし、アトピー性皮膚炎発症に必要な樹状細胞サブセットの同定を試みたい。

E. 結論

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。また、Langerin 陽性真皮樹状細胞のみを欠失させるマウスモデルを確立し、接触過敏反応形成における各サブセットの役割を解明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K*. Activated regulatory T cells are major T cell type emigrating from sensitized skin. *J Clin Invest* (in press)
2. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K*. 2009. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact

hypersensitivity. **J Allergy Clin Immunol** (in press)

3. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe JI, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K* Flaky Tail Mouse Denotes Human Atopic Dermatitis in the Steady State and by Topical Application with Dermatophagoides pteronyssinus Extract. **Am J Pathol** (in press)

2. 学会発表

1. K Kabashima: What's new in immunology of metal allergy. **17th International Contact Dermatitis Symposium**, Kyoto, Japan, 2009. 11. 5- 8.
2. K Kabashima (symposist): Actin cytoskeleton formation through mDia1 is essential for DC-T cell interaction and T cell motility in the lymph nodes. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Osaka, Japan. 2009-12. 2- 4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

出願番号：特願 2009-195002（出願日 2009年8月26日）

出願人：国立大学法人京都大学

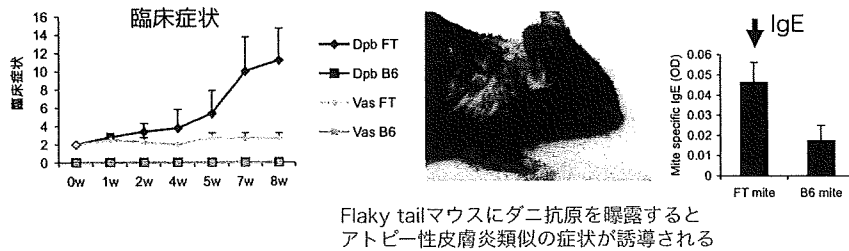
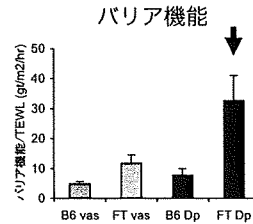
発明の名称：皮膚バリア機能の測定方法

発明者：梶島健治、竹馬真理子、Catharina Moniaga

Flaky tailマウスを用いた新規アトピー性皮膚炎モデルの確立

Flaky tailマウス：

ヒトのアトピー性皮膚炎患者と同様にプロフィラグリン遺伝子のフィラグリンリピートの途中に遺伝子変異が生じ、フィラグリンの産生が減弱したマウス
 →このマウスにダニ抗原を曝露して新規アトピー性皮膚炎モデルを確立する
 (従来、適切なアトピー性皮膚炎モデルは存在せず)



Flaky tailマウスにダニ抗原を曝露するとアトピー性皮膚炎類似の症状が誘導される

図1 : flaky tail (ft/ft) マウスにダニ抗原を週2回ずつ耳介に投与し、その後の臨床症状、血清 IgE 値などを測定した。

DNFBによる接触過敏反応

0.3% sensitization, 0.15% elicitation with DNFB

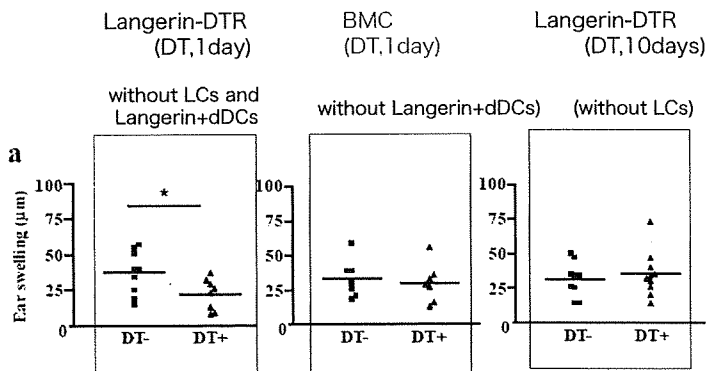


図2 : 接触過敏反応を Langerin-DTR マウス、Langerin DTR BM→B6 BM キメラマウス、Langerin-DTR マウスに DT 投与 10 日後のマウスに適用し、耳介腫脹を測定した。

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研究科 教授

研究要旨 皮膚バリア機能の形成に様々な細胞外・細胞膜結合型プロテアーゼが関与することが明らかにされてきている。そこで、皮膚バリア機能の担う要素の一つであるケラチノサイトのタイトジャンクション (TJ) の形成における細胞外プロテアーゼ活性の役割を検討した。TJ の接着分子クローディン 1 を発現するが、TJ をもたないケラチノサイト細胞株 A431 に、トリプシン等のプロテアーゼを細胞外から作用させたところ、短時間のうちに発達した TJ が形成された。この TJ 形成は接着分子カドヘリンの活性に依存せず、本来顆粒層細胞に存在する細胞周囲を取り巻くタイプとは異なり、細胞接着面にパッチ状であった。乾癬で表皮有棘層に異所的に形成される TJ との関係が示唆された。

A. 研究目的

表皮タイトジャンクション (TJ) を構成する TJ の接着分子クローディン 1 の遺伝子欠失マウスは、表皮 TJ のバリア機能が破綻し、表皮からの脱水により致死である。このマウスでは角質層の分化にも異常が見られ、フィラグリンのモノマーへのプロセッシングが観察されないことをこれまでの研究により明らかにしてきた。一方、表皮に発現する膜結合型あるいは分泌型のプロテアーゼである CAP1/Prss8、Matriptase/MT-SP1 の遺伝子欠失マウスがクローディン 1 の遺伝子欠失マウスと類似する表現型を示し、CAP1/Prss8 遺伝子欠失マウスでは表皮顆粒層の TJ マーカーが消失することが報告されている (Leyvraz et al., J. Cell Biol. 170:487, 2005; List et al., J. Cell Biol. 163:901, 2003)。さらに、表皮バリア機能に異常が見られる乾癬において、TJ が表皮細胞に異所形成されること (Yoshida et al., Arch. Dermatol. 293:239, 2001)、膜結合型トリプシン様セリンプロテアーゼ Marapsin が強く発現することが報告された (Li et al., J. Biol. Chem. 284:213, 2009)。以上の観察は、表皮の TJ 形成にプロテアーゼが関与する可能性を示唆する。そこで、本研究では、皮膚バリア機能の一端を担う表皮 TJ の形成メカニズムを解明することを目的として、表皮 TJ 形成における細胞外プロテアーゼ活性の役割を培養細胞レベルで解析した。

B. 研究方法

クローディンを発現しているが TJ を形成していないケラチノサイトの培養細胞系として、ヒト表皮癌細胞 A431 細胞を実験に用いた。細胞外より無血清培地に加えたトリプシン等のプロテアーゼを作用させたのち、細胞を固定して、TJ 形成を抗クローディン 1 抗体による蛍光抗体法および凍結割断レプリカ法で観察した。TJ 形成における細胞接着の役割、シグナル伝達系の関与について種々の阻害剤を用いて解析した。

C. 研究結果

A431 細胞は正常皮膚と同様、クローディン 1、クローディン 4 を発現しているが、通常これらは細胞膜上に広く分布して TJ を形成していない。ところが A431 細胞にトリプシンを作用させると、クローディンのパッチ状の濃縮が誘導され、TJ 形成が誘導された。TJ 形成には 0.025% トリプシン、37°C 15 分間の処理で十分であった。低カルシウム濃度条件、抗ヒト E, P カドヘリン抗体添加による細胞接着の阻害にかかわらずクローディンの濃縮が観察されたことから、この TJ 形成はカドヘリンによる細胞接着とは独立である。クローディンはトリプシンによる消化を受けない。トリプシンによる TJ 形成に関わるシグナル伝達を明らかにするために、以下の酵素阻害剤を作用させたが、TJ 形成は阻害されなかった (チロシンキナーゼ、PKA、PKC、PI3 キナーゼ、c-*Src*、MAPK キナーゼなど)。キモトリプシン処理によっても TJ 形成

が誘導された。

D. 考察

今回トリプシン処理によって観察された TJ 形成は、細胞接着面にパッチ状に起こるものであり、顆粒層に存在する細胞周囲を取り巻く TJ ではなかった。したがって、プロテアーゼは、乾癬のような病態に付随する異所的な TJ の形成に関与する可能性がある。この TJ 形成におけるプロテアーゼの直接の標的は不明である。TJ の中心的接着分子であるクローディンはトリプシンによる切断を受けなかったため、クローディンは直接の標的ではないと思われる。特定の分子への作用だけでなく、プロテアーゼ処理が細胞膜の性質を変化させる可能性も考慮する必要がある。今後、個体皮膚組織で実際にプロテアーゼ処理による TJ 形成が起こるか、また Marapsin などの表皮に実際に発現するプロテアーゼが今回の実験系において TJ 形成を誘導できるかについて検証する必要がある。表皮では基底層、有棘層、顆粒層にわたりケラチノサイトの細胞膜上に TJ を形成しないクローディンが大量に存在する。表皮の損傷や炎症等の非常事態に際し、プロテアーゼを介してこれらのクローディンが動員されて異所的な TJ を形成することにより皮膚バリア機能を強化する可能性が考えられる。

E. 結論

ケラチノサイトが、細胞外プロテアーゼ活性によって容易に異所的な TJ を形成する性質をもつことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

英語論文

1. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M,

Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight junction proteins. *Mol. Cell Biol.*29:2372-2389, 2009.

日本語論文

1. 古瀬幹夫、岩本典子：細胞間をシールする分子メカニズム *最新医学* 64:2450-2455, 2009.

2. 学会発表

1. Furuse M: Claudin downregulation by an E3 ligase. **Gordon Research Conference "Cell Contact & Adhesion"**, Waterville Valley, USA, 2009. 6. 28- 7. 3.
2. Furuse M: Molecular basis for the barrier function of tight junctions. **The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology**. Seoul, Korea, 2009. 8. 20- 21.
3. Furuse M: Formation of tricellular tight junctions: How the extracellular space is plugged where three epithelial cells meet. **ASCB/JSCB/RIKEN Meeting. Building the Body Plan: How Cell Adhesion, Signaling, and Cytoskeletal Regulation Shape Morphogenesis**. Kyoto, Japan, 2009. 9. 21- 23.
4. 古瀬幹夫 Molecular organization of tight junctions in endothelial cells. 第 32 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ血管多様性が生み出す生体機能と疾患), 横浜, 2009. 12. 12.

G. 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

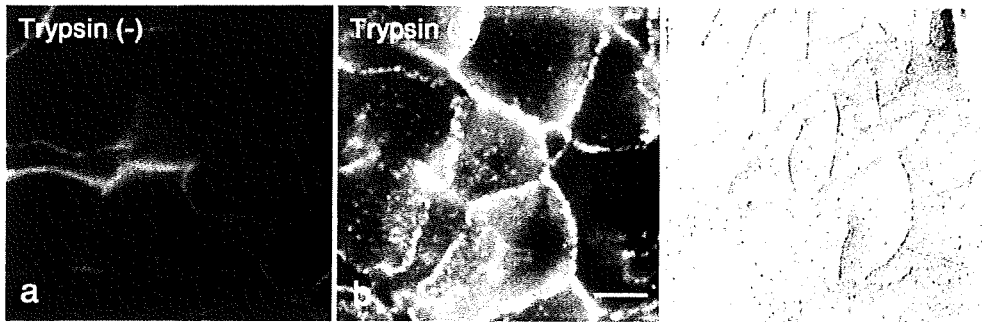


図1 (a)間接蛍光抗体法による A431 細胞のクロードイン 1 の細胞内局在。クロードイン 1 は細胞膜全体に分散して存在する。(b)0.025%トリプシンを無血清培地に添加して 37 度 15 分後の A431 細胞におけるクロードイン 1 の局在。クロードイン 1 が細胞間に強く濃縮し、TJ 形成が示唆される。(c) b の細胞の凍結切断レプリカ像。TJ が形成されている。スケールバー : a, b 10 μ m, c 100 nm.

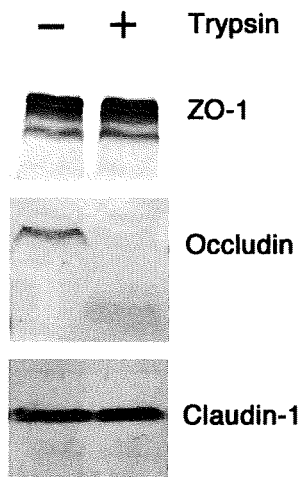


図2 細胞外より 0.025%トリプシンで処理した A431 細胞(Trypsin+)とコントロール A431 細胞(-)の TJ タンパク質抗体によるウェスタンブロット。細胞質分子 ZO-1 はトリプシンによる影響を受けない。膜タンパク質オクルディン (Occludin)はトリプシンにより分解を受け、検出できなくなるが、クロードイン 1 は変化しない。

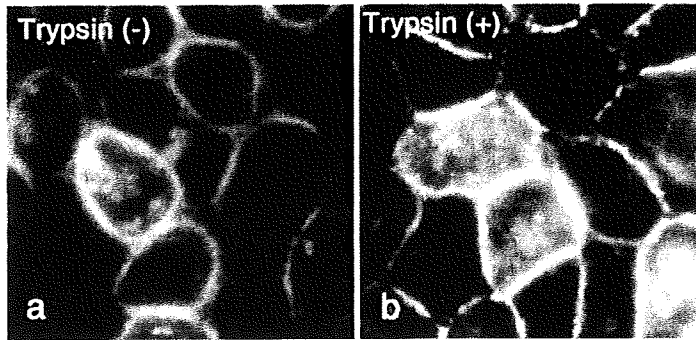


図3 EカドヘリンとPカドヘリン抗体により、A431細胞のカドヘリンによる細胞接着活性を阻害しても、トリプシン処理によってTJ形成を示すクロードイン1の強い濃縮が観察される。

経皮的抗原感作と喘息

研究分担者 浅野浩一郎 慶應義塾大学医学部呼吸器内科 准教授

研究要旨 昨年までの研究において、バリア機能が破綻した皮膚からの抗原感作により、ハプテンなしでも感作の強度に応じた Th2 型免疫応答と好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進をきたすマウスモデルを作成、報告した。今年度の検討では、この経皮感作喘息モデルが気道炎症・気道過敏性の慢性化と関連しうるかを検討した。C57BL/6 マウスに卵白アルブミン（OVA）の腹腔内感作あるいは経皮感作を行った後に吸入暴露し、最終暴露翌日、4日目、7日目に気道炎症と気道過敏性を評価した。最終暴露翌日では全身感作の方が経皮感作よりも BAL 液中 IL-13 濃度はより高値となり、BAL 液中の炎症細胞数・好酸球数も全身感作群の方が高い傾向を呈した。メサコリン気道過敏性については両群とも亢進が見られた。一方暴露7日目には、全身感作群における気道炎症、気道過敏性亢進はほぼ完全に終熄するのに対して、経皮感作群では暴露翌日とほぼ同程度の気道炎症、気道過敏性亢進が持続していた。BAL 液中 IL-13 濃度の上昇も経皮感作でのみ暴露7日目まで持続した。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慢性化・重症化に関与する可能性が示唆された。

研究協力者

小熊 剛（慶應義塾大学医学部呼吸器内科 共同
研究員）
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、感作の強度に応じた Th2 型免疫応答と、それに続く好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進をきたすことを確認した。今回の検討では全身感作と経皮感作による気道炎症の質的な違いをより明確とすることを目的とした。

B. 研究方法

C57BL/6 マウス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。全身感作群にはハプテンであるアラムと OVA をともに腹腔内に投与した。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。曝露翌日、4日目、7日目、14日目に気管支肺胞洗浄（BAL）を行い、BAL 液中の炎症細胞数およびその分画、インターロイキン 13（IL-13）濃度を評価した。メサコリン気道過敏性は FlexiVent 法で測定した。

C. 結果

昨年報告したように、全身感作の方が経皮感作よりも血清中の OVA 特異的 IgG1 値、BAL 液中 IL-13 濃度はより高値となり、BAL 液中の炎症細胞数・好酸球数も全身感作群の方が高い傾向を呈した。しかし、メサコリン気道過敏性については両群とも亢進が見られ、感作経路によって差を認めなかった。さらに、全身感作群における気道炎症、気道過敏性亢進は暴露7日目にはほぼ完全に終熄するのに対して、経皮感作群では暴露7日目でも暴露翌日とほぼ同程度の気道炎症、気道過敏性亢進が持続していた（図1）。BAL 液中 IL-13 濃度の上昇も経皮感作でのみ暴露7日目まで持続した。

暴露 1 4 日目には経皮感作群においても気道炎症、BAL 液中 IL-13 濃度とも正常化した。

D. 考察

従来は喘息動物モデルとして抗原をハプテンとともに全身投与することで強力なTh2型免疫応答を誘導する方法が使用されてきたが、これでは喘息患者にみられるような持続的な気道炎症を誘導できなかった。今回、経皮的な抗原感作が遷延性の好酸球性気道炎症を誘導することが明らかとなり、フィラグリン遺伝子変異により生じた皮膚バリアの異常が喘息の慢性化につながる可能性が示唆された。現在、その仮説を証明するためにフィラグリンノックアウトマウスを用いた解析を進めている。

E. 結論

経皮抗原感作によって遷延性の好酸球性気道炎症が生じることが明らかとなり、皮膚バリアを維持して経皮的な抗原の侵入を回避することで喘息の慢性化・重症化を予防できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. K. Asano, S. Nakade, T. Shiomi, T. Nakajima, Y. Suzuki, K. Fukunaga, T. Oguma, K. Sayama, H. Fujita, Y. Tanigawara, and A. Ishizaka. Impact of pharmacokinetics on pharmacogenetic association of pranlukast in Japanese asthmatics. *Respirology* 14(6): 822-827, 2009
2. K. Asano and H. Suzuki. Silent acid reflux and asthma control (editorial). *New Engl J Med* 360: 1551-1553, 2009.
3. H. Seki, K. Fukunaga, M. Arita, H. Arai, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Miyasho, R. Takamiya, K. Asano, A. Ishizaka, J. Takeda, and B. D. Levy. The anti-inflammatory and pro-resolving mediator Resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol* 184:836-43, 2010.
4. M. Kodama, K. Asano, T. Oguma, S. Kagawa, K. Tomomatsu, M. Wakaki, T. Takihara, S. Ueda, N. Ohmori, H. Ogura, J. Miyata, K. Tanaka, N. Kamiishi, K. Fukunaga, K. Sayama, E. Ikeda, T. Miyasho, A. Ishizaka.

Strain-specific phenotypes of airway inflammation and bronchial hyper-responsiveness induced by epicutaneous allergen sensitisation in BALB/c and C57BL/6 mice. *Int Arch Allergy Immunol Suppl.* (in press)

5. K. Asano, W. Yamada-Yamasawa, H. Kudoh, T. Matsuzaki, T. Nakajima, H. Hakuno, R. Hiraoka, K. Fukunaga, T. Oguma, K. Sayama, K. Yamaguchi, A. Nagabukuro, Y. Harada, and A. Ishizaka. ADRB2 variants associated with relative response to β_2 -agonists and anticholinergics in Japanese asthmatics. *Respirology* (in press)

学会発表

1. 樹神元博、浅野浩一郎、小熊剛、加川志津子、若木美佐、友松克充、小倉裕美、宮田純、堀内奈緒、上田壮一郎、佐山宏一、石坂彰敏 経皮抗原感作喘息モデルマウスの検討 アレルギー好酸球研究会2009, 東京, 2009. 6
2. 樹神元博、浅野浩一郎、小熊剛、加川志津子、宮田純、小倉裕美、友松克充、堀内奈緒、上田壮一郎、滝原崇久、加行淳子、新美京子、若木美佐、福永興壺、佐山宏一、石坂彰敏 経皮抗原感作喘息モデルマウスの作成 第49回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009. 6

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

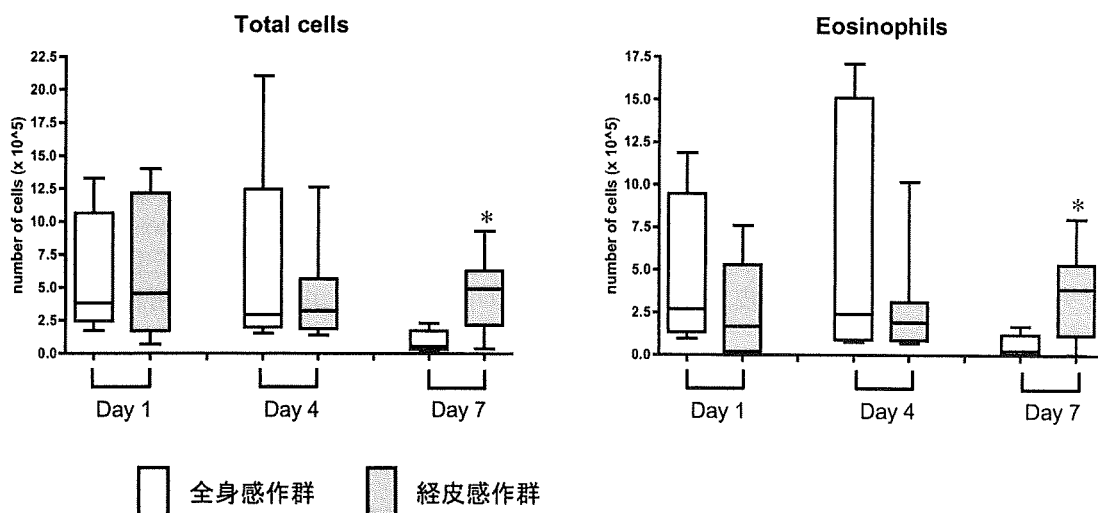


図1. 全身あるいは経皮抗原感作マウスにおける気道炎症の経時変化

全身感作群にはハプテンであるアラムと卵白アルブミン (OVA) をともに腹腔内に投与し、経皮感作群ではマウスの背部に OVA をしみこませたパッチを貼付した。OVA エアロゾル (2%) 吸入暴露翌日、4 日目、7 日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、BAL 液中の総炎症細胞数および好酸球分画を測定した。n = 6-8、* p < 0.05、全身感作群と比較。

皮膚バリア機能蛋白遺伝子の解析

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部生命情報学センター 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 (FLG) 遺伝子の変異が発見され、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。今年度はフィラグリンノックアウト (KO) マウスの野生型として重要な C57BL/6 マウスの Flg 遺伝子の構造を完全に決定した。またヒト FLG 遺伝子を含む多数の角化重層上皮関連蛋白質遺伝子が並んでいる 1q21.3 の Epidermal differentiation complex (EDC) 領域に存在する遺伝子の中から、フィラグリン様リピート配列を有するフィラグリン2 (FLG2) 遺伝子について、アトピー性皮膚炎との関連を解明するために塩基配列解析法の確立を試みた。

研究協力者
渋谷和憲
慶應義塾大学医学部分子生物学助教
宮本憲一
慶應義塾大学医学部分子生物学助教
佐々木貴史
慶應義塾大学医学部皮膚科学特任講師

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 (FLG) 遺伝子の変異が発見され、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。我々は昨年度アトピー性皮膚炎自然発症マウス flaky tail (*ft*) の Flg 遺伝子の構造を決定し、ヒトアトピー性皮膚炎患者の FLG 遺伝子変異と類似した Flg リピート中の 1 塩基欠失 (5303delA) を発見した。これにより C3H マウスについては完全な構造が決定したが、その塩基配列はすでに公開されている C57BL/6 マウスの Flg 遺伝子とかなり異なっていた。今年度はフィラグリンノックアウト (KO) マウスなど今後遺伝子改変動物の作製に最も重要となる C57BL/6 マウスの Flg 遺伝子の構造を完全に決定すること、およびヒト FLG 遺伝子を含む多数の角化重層上皮関連蛋白質遺伝子が並んでいる 1q21.3 の Epidermal differentiation complex (EDC) 領域に存在する遺伝子の中から、フィラグリン様リピート配列を有する FLG2 遺伝子についてアトピー性皮

膚炎との関連を解明することを目的として塩基配列解析法の確立を試みた。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスの Flg 遺伝子を含む BAC クローン RP23-227A12 の塩基配列 (GenBank 登録番号 AC158361) は解読完了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、未完のままであった。RP23-227A12 から Red/ET 法で得た Flg リピート部位を含む exon 3 の約 14kb のサブクローンをダンディー大 McLean から得、これに対し、Tn5 トランスポゾンランダムに挿入させた 168 クローンについて制限酵素切断地図から Tn5 挿入部位を決定し、そこから 90 クローンを選択し、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。

ヒト FLG2 遺伝子は 3 個のエキソンからなり、exon 1 (51 bp) と exon 2 (160 bp) は短い、exon 3 (8907 bp) は長い上、ホルネリンリピートに似た 75~77 アミノ酸残基から成る A 型 (9 個) とフィラグリンリピートに似た 75~77 アミノ酸残基から成る B 型 (14 個) の繰り返し配列を含んでいることから、FLG 遺伝子と同様に特異的プライマーを用いた PCR 直接シーケンシングによる変異解析は困難である。そこでアトピー性皮膚炎患者 DNA から exon 3 を丸ごと PCR で増幅させた後、物理的に剪断し、

shotgun 法による塩基配列の決定と変異解析を試みた。

C. 研究結果

C57BL/6 マウス *Flg* 遺伝子への Tn5 挿入クローン 90 個から得られた 159 リードの配列から 13,964 bp の連続配列が得られた。最終的に C57BL/6 マウスの *Flg* 遺伝子は約 750bp を単位とした 16 単位の完全な *Flg* リピートから成り、exon 3 の全長は、14,318bp となった。データベースの *Flg* リピートの塩基配列と比較すると塩基置換(計 129bp)、欠失、挿入が非常に多数見られ(288 bp/13,964 bp で 2% に及ぶ)、全体としては 7 bp 長くなった。*Flg* リピートの各単位ごとの配列を比較したところ、この大きな違いが生じた主たる原因は単なる読み間違いといった性質のエラーのみでなく、shotgun シーケンスのアセンブリーの際のエラーにより、リピートの順番を大幅に間違えたためであることが明らかとなった(図 1)。

一方患者 DNA から増幅させた FLG2 遺伝子の exon 3 を含む DNA 断片から shotgun ライブラリーを構築し、まず 48 クローン (96 リード) について塩基配列の決定と、データのアセンブリーを行った。しかし、他の染色体領域由来の DNA が混ざっていたり、有効なデータが得られなかったものもあり、実際にアセンブリーに寄与したのは 65 リードしかなく、exon 3 の配列を完全に決定するには至らなかったが、データベースに登録されている配列とは一致しない配列が見つかったことから、繰り返し配列の数に多型の存在が示唆された。

D. 考察

今年度決定した C57BL/6 マウスの *Flg* 遺伝子の構造を昨年度決定した flaky tail (*ft*) マウス (C3H 系統) の *Flg* 遺伝子の構造と比較すると、前者の方が *Flg* リピートの数が一つ多い等の違いは、正しいことが確認された。また、両系統の全 *Flg* リピートの配列を単位毎に分割して比較したところ、それぞれの系統で小さなクラスターを形成するものの、系統間で高度に保存されたリピートは存在しなかった。このことから、共通する祖先からの分岐後、それぞれの系統で、重複やジーンコンバージョンにより *Flg* リピートの配列を独自に進化させたものと考えられ

た。

FLG2 遺伝子の exon 3 の shotgun シーケンシングは上記の理由による絶対的なリード数不足のため配列決定に至らなかった。この問題はリード数を増やすことによって解決されると思われる。

E. 結論

昨年度の flaky tail (*ft*) マウス (C3H 系統) の *Flg* 遺伝子の塩基配列の完全決定に続き、C57BL/6 マウスの *Flg* 遺伝子の塩基配列を完全に決定した。これは *Flg* 遺伝子改変マウスの作製や構造の確認のために非常に有益な情報となる。ヒト FLG2 遺伝子の exon 3 の変異解析は shotgun 法でリード数を増やすことによって解決されることが期待される。その後対象患者の数を増やして変異解析を進める。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

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 JP, Presland RB, Fleckman P, Shimizu N, Kudoh J, Irvine AD, Amagai M, McLean WH: A homozygous frameshift mutation in the mouse *Flg* gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*, 41 (5): 602-608, 2009.

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

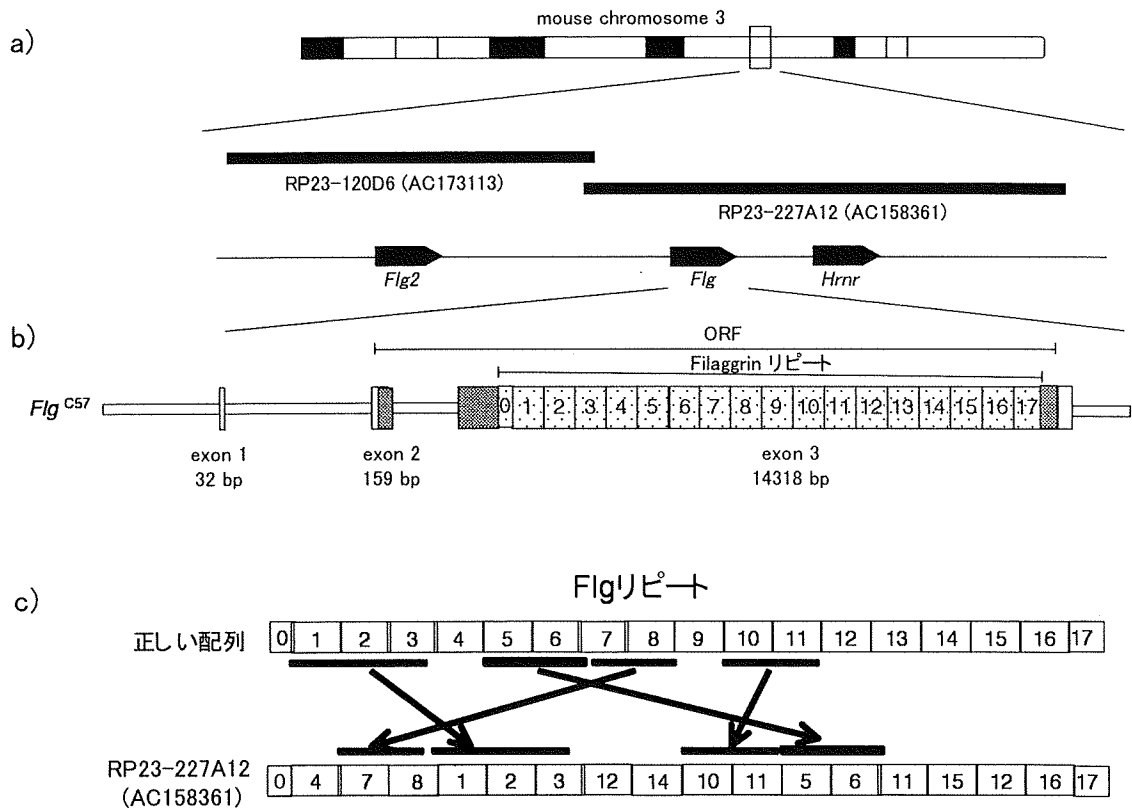


図1 C57BL/6 マウス *Flg* 遺伝子の構造解析

a) C57BL/6 マウス *Flg* 遺伝子はヒトと同様にマウス EDC 内の *Flg2* 遺伝子と *Hnrn* 遺伝子の間に位置し、BAC クローン RP23-227A12 の挿入断片中に存在する。

b) *Flg* 遺伝子は、3 エキソンから成る。エキソン 3 に *Flg* リピートが存在し、16 単位の 738-765bp の *Flg* リピート (1-16) と 2 単位の不完全な *Flg* リピート (0 及び 17) を含む。マウス BAC クローン RP23-227A12 からサブクローニングしたエキソン 3 のコーディング領域の塩基配列をトランスポゾンランダム挿入法を用いて決定した。データベースに登録された RP23-227A12 の塩基配列 (AC158361) と全体をひとつながりで比較すると非常に多くの塩基置換や欠失、挿入があり、結果としてエキソン 3 は 7bp 長くなり、14,318bp となった。

c) *Flg* リピート部分の配列を詳細に比較した結果、塩基配列が大きく異なった原因は、shotgun シーケンスのアセンブリーの際に *Flg* リピートの順番を間違えていたためであることが判明した。図中には 2 単位以上の *Flg* リピートが連続して間違っている個所のみを矢印で示したがそれ以外にも順番が入れ替わっていたり、対応がはっきりしない *Flg* リピートもあり、無茶苦茶であった。

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

研究分担者 海老原全 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

研究要旨 本研究では日本人アトピー性皮膚炎患者 DNA を用いて、日本人特有のフィラグリン遺伝子変異のデータ蓄積を目指し、これまで慶應義塾大学病院皮膚科を受診されたアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子について、その繰り返し配列のユニット数が異なる 3 種類の遺伝子バリエーションタイプ、および 3 種類のヨーロッパ型、4 種類のアジア型遺伝子変異について、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簡易同定法を用いて解析を継続しており、これまでにのべ 194 名のアトピー性皮膚炎患者の遺伝子解析を終えている。遺伝子タイプについては A/B 型が 43%（194 名中 83 名）と最多で、アレルとしては B type アレルが 59%（228/388）と最多であった。遺伝子変異解析では 4 種類すべてのアジア型遺伝子変異が認められ、ヨーロッパ型変異は見られず、その比率は患者全体のうちのおよそ 1 割で、8.8%（194 名中 17 名）であった。イングランド、アイルランドを中心としたヨーロッパ人種におけるアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異頻度と比較して、日本人患者の遺伝子変異の頻度はそれほど高くなく、日本人におけるアトピー性皮膚炎の発症にはヨーロッパ人種とは異なり、その他の因子がより深く関与しているのではないかと考えられた。

研究協力者

河野通良 日本予防医学協会リサーチレジデント
慶應義塾大学医学部皮膚科 共同研究員
工藤 純 慶應義塾大学医学部生命情報学センター 教授
佐々木貴史 慶應義塾大学医学部皮膚科 特任講師
川崎 洋 慶應義塾大学医学部皮膚科 大学院生
定平知江子 慶應義塾大学医学部皮膚科助教

遺伝子変異部位の違いと病型の違いを解析することにより、皮膚バリア機能関連遺伝子変異とアトピー性皮膚炎の病態との関連についての研究が可能となると考えられるが、これまで日本人を含むアジア民族での大規模な遺伝子解析はいまだなされておらず、新たなデータの蓄積が望まれる。本研究では日本人特有のフィラグリン遺伝子変異のデータ蓄積を目指すことを目的とし、慶應義塾大学病院皮膚科を受診されたアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析を行った。

A. 研究目的

これまでに McLean らにより、欧米の多くのアトピー性皮膚炎患者および気管支喘息患者がフィラグリン遺伝子に変異を持つことが明らかにされた（Nat Genet, 2007）。一方、野村らにより、日本人のアトピー性皮膚炎に見られる遺伝子変異は欧米患者のものとは異なることが報告されており（J Allergy Clin Immunol 2007）、同じアジア系民族である中国人や韓国人の遺伝子解析結果においても同様の遺伝子変異が報告されている。異なる民族で見られる

B. 研究方法

フィラグリン遺伝子は 972bp または 975bp を一単位とする 11~13 回の繰り返し配列を持ち、その繰り返し配列のユニット数が異なる 3 種類のバリエーション（タイプ A（11 ユニット）、B（13 ユニット）、C（12 ユニット））が存在することがわかっている。また、新たに開発された FLG-shotgun 法により同定された 2 種類の新規ナンセンス変異 8666-8667 CC>GA（S2899X）、9887 C>A（S3296X）を含む、4 種類のアジア型遺伝子変異（S2899X, S3296X, S2554X, 3321delG）と、3 種類のヨーロッパ型変異（R501X, 2282del14,

3702delG)が知られている。アトピー性皮膚炎患者 DNA を用いて、これらの遺伝子バリエーション、遺伝子変異について、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簡易同定法による解析を行った。

C. 研究結果

これまでに計 194 名のアトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子解析を行った。フィラグリン遺伝子タイプについては、A/A:18 名 (9%)、A/B:83 名 (43%)、A/C:8 名 (4%)、B/B:63 名 (32%)、B/C:19 名 (10%)、C/C:3 名 (2%)であった。アリルとしては B タイプが 228 (59%) と最も多く、次いで A タイプが 127 (33%)、C タイプが 33 (8%) であった。遺伝子変異については、3 種類のヨーロッパ型変異はみとめられず、アジア型変異では S2889X:8 名 (4.1%)、S3296X:6 名 (3.1%)、S2554X:2 名 (1.0%)、3321delA:2 名 (1.0%) 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 17 名で、患者全体の 8.8% であった。

D. 考察

フィラグリン遺伝子タイプについては、13 ユニットの繰り返し配列を持つ B タイプが 59% と最多であった。これまでにフィラグリン遺伝子タイプについての検討を行った報告はなく、今後、症例数を増やしていくことにより何らかの相関が認められることが期待される。

これまでに報告されてきたアトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析は、おもにアイルランド、イングランドにおいて行われており、その頻度はおよそ半数近くであるとされてきた。一方、ドイツ、デンマークにおいて行われた解析結果ではいずれも 1~2 割程度の頻度であり、人種間によってその頻度にばらつきが見られる。また、2009 年には日本人以外のアジア人種である中国人患者の遺伝子解析報告がなされており、それらの遺伝子変異頻度はいずれも 1 割程度であった。一方、日本人では、筑波大のグループと北大のグループによる解析がなされており、その頻度はそれぞれ 12.3% (351 名中 43 名)、27% (137 名中 37 名) であったことを報告している。本研究結果では、3 種類のヨーロッパ型変異、4 種類のアジア型変異について解析した結果、アジア型の変異のみを 8.8% (194 名中 17 名) の確率で認め、確率としては既報告例に比べて低いものの、全体の

傾向としてはこれまでの解析結果と大きな違いはないと考えられた。以上のことから、日本人を含めたアジア人種におけるアトピー性皮膚炎の発症については、アイルランド、イングランドを含むヨーロッパ人種とは異なり、その他の因子がより深く関与しているのではないかと考えられる。それを踏まえて、染色体 1q21 に存在する遺伝子群である epidermal differentiation complex (EDC) にあるフィラグリン以外の皮膚バリア機能関連分子についての解析も行ったが、これまでのところロリクリン遺伝子に変異を持つ症例を 1 例認めているのみである。今後はこれまでに集積してきたデータをもとにアトピー性皮膚炎発症に関わる新たな因子の同定も目指したいと考えている。

E. 結論

日本人アトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析の結果、アジア人種特有の変異のみが認められた。その頻度はヨーロッパ人種と比較して低く、日本人を含むアジア人種ではアトピー性皮膚炎発症に関わるフィラグリン以外の因子がある可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 21 年度)

1. 論文発表

英語論文

なし

日本語論文

なし

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