

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

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 正常な角層形成に必須の蛋白質であるフィラグリンの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。上記仮説を検証するためにフィラグリン欠損マウスを作製した。フィラグリン欠損マウスは、NMFの著しい低下を認めたものの皮膚バリア機能の指標の一つであるTEWL値に異常を認めなかった。一方、マウスの皮膚に色素を塗布し、角層の物質透過性を共焦点顕微鏡により評価したところ、フィラグリンは外から内への角層のバリア機能維持に重要であることが示唆された。フィラグリン欠損マウスは、フィラグリンの機能を正しく評価するための重要なツールとなり、皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とするマウスモデルの作製に有用である。

研究協力者

永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科講師
久保亮治 慶應義塾大学医学部・総合医学研究センター・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の多く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（フィラグリン欠損マウス）を作製する。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。フィラグリン欠損マウスを用いて、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マウスモデルの作製を行う。

B. 研究方法

1、フィラグリン欠損マウスの作製

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 までが 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。

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。

2、フィラグリン欠損マウスの機能解析

(a) 角層内アミノ酸分析

仔マウスの背部皮膚からテープストリッピングにより角層サンプルを採取し、アミノ酸分析装置(日立)を用いて角層アミノ酸分析を行った。

(b) 角層内 Natural moisturizing factor (NMF; 天然保湿因子)量測定

in vivo 共焦点ラマン分光装置(オランダ、River Diagnostic 社、Model3510)を用いて、角層内 NMF 量を深さ 2 μm 間隔で測定した。

(c) フィラグリンと物質皮膚透過性に関する解析

TEWL(trans epidermal water loss:経皮的水

分蒸散量)を測定し、内から外への水分蒸散量に対する検討を行った。

外界から表皮内への物質の皮膚透過性を調べるために、カルセイン封入りポソーム(蛍光物質)をマウスの皮膚に塗布した。フィラグリン欠損マウスと野生型マウス間での皮膚透過性の差を共焦点顕微鏡により組織学的に検討した。

C. 研究結果

1、フィラグリン欠損マウスの作製

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 TV 構築に必要なフィラグリン遺伝子を含む genomic DNA (chromosome 3 において上記プライマーによって挟まれた範囲のゲノム 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 カセットを挿入して TV1 および 2 を作成した。BA1 ハイブリッドの ES 細胞にエレクトロポレーションを行い、TV1 および 2 によりターゲットされた BA1 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することでキメラマウスを作製し、TV1、TV2 のターゲッティングベクターによる KO マウス、それぞれ 1 ラインを得ることに成功した。

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。

2、フィラグリン欠損マウスの機能解析

(a) アミノ酸分析

フィラグリンは角層内アミノ酸の主要構成成分と考えられている。フィラグリン欠損マウスでは、角層内アミノ酸量が減少しているかどうかを観察するために、アミノ酸分析を行ったところ、フィラグリン欠損マウスでは、角層内のアミノ酸量が著しく低下していた (図 3)。

(b) 角層内 NMF 量測定

NMF は、フィラグリンが分解して生じるアミノ酸が主な成分である。フィラグリン欠損マウスで NMF が減少しているかどうかを検証するために *in vivo* ラマン分光装置を用い、角層内の NMF 量を測定したところ、フィラグリン欠損マウスでは野生型マウスに比べ、著しい NMF の減少を認めた (図 4)。

(c) フィラグリンと物質皮膚透過性に関する解析

皮膚バリア機能の指標として汎用されている TEWL を測定したところ、フィラグリン欠損マウスと野生型マウス間で有意差を認めなかった (図 5)。

一方、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。外界から表皮内への物質の皮膚透過に対しフィラグリン欠損が及ぼす影響について解析した。カルセイン封入りポソームをマウスの皮膚に塗布してから 3 時間後の皮膚を組織学的に観察したところ、フィラグリン欠損マウスでは角層全層に色素が浸透した像を部分的に観察したのに対し、野生型マウスでは皮膚全周に渡り角層表面にのみ色素の沈着を認めた。

D. 考察

本研究にて、フィラグリンの発現を完全に欠損するフィラグリン欠損マウスの作製に成功した(世界初)。

フィラグリン欠損マウスは、NMF の著しい低下を認めたものの皮膚バリア機能の指標の一つである TEWL 値に異常を認めなかった。TEWL で見ているのは内から外への水分蒸散量だが、アトピー性皮膚炎で最も問題となる角層のバリア機能は体外から表皮内への物質透過能と考えられる。カルセイン封入りポソームをマウスの皮膚に塗布した結果より、フィラグリンが外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許すことが示唆された。

E. 結論

我々が作製したフィラグリン欠損マウスは、フィラグリンの機能を正しく評価するための重要なツールとなり、皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露から疾患が発症

するまでのアトピー性皮膚炎発症機序の解明を可能とするマウスモデルの作製に有用である。

F. 健康危険情報。

なし

G. 研究発表（平成 19-21 年度）

1. 論文発表

【英語論文】

1. Dekio I, Sakamoto M, Hayashi H, Amagai M, Suematsu M, Benno Y: Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis. *J Med Microbiol* 56 (Pt 12), 1675-1683, 2007.
2. 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.
3. 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 murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*, 41: 602-8, 2009
4. 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*, 206 (13): 2937-2946, 2009.
5. 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】

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 巻 4 号. 37-42, 2008
2. 古江増隆, 山崎雙次, 神保孝一, 土田哲也, 天谷雅行, 田中俊宏, 松永佳世子, 武藤正彦, 森田栄伸, 秋山真志, 相馬良直, 照井正, 真鍋求, 日本皮膚科学会学術委員会: 本邦における皮膚科受診患者の多施設横断四季別全国調査. *日本皮膚科学会雑誌*, 119 (9): 1795-1809, 2009.

2. 学会発表

【英語発表】

1. Irvine AD, Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Callanan JJ, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean W: Filaggrin-deficient mice exhibit enhanced percutaneous antigen priming. **The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Montreal, Canada, 2009. 5. 6 -9.
2. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. **11th International Workshop on Langerhans Cells**, Funchal, Madeira, Portugal, 2009. 9. 3- 6.
3. Fallon PG, Irvine AD, Sasaki T, Sandilands A, Saunders SP, Presland RB, Fleckman P, Kudoh J, Amagai M, McLean I: Filaggrin-deficient mice have an inherent skin barrier defect and recapitulate key features of atopic eczema. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
4. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: Activated Langerhans cells capture external antigens by sending their dendrites out through epidermal tight junctions. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
5. Moniaga C, Chikuma M, Kawasaki H, Nakajima S, Tanizaki H, Egawa G, Honda T, Amagai M, Miyachi Y, Kabashima K: Flaky tail mouse as a possible model of atopic dermatitis. **The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Budapest, Hungary, 2009. 9. 9- 12.
6. Kawasaki H, Kubo A, Nagao K, Hata T, Amagai M: Filaggrin knockout mice as a tool for understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. **The 39th annual meeting of the Japanese Society for Immunology**, Osaka, Japan, 2009-12. 2- 4.
7. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4- 6.
8. 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.

【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, 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. 12. 11- 15.
2. 川崎洋, 久保亮治, 海老原全, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎に関する最近のトピックス. 第4回 TAP (Tokyo scientific forum for Atopic Dermatitis and Psoriasis), 東京, 2008. 12. 13
 3. 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.
 4. 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)
 5. 川崎 洋, 久保亮治, 永尾圭介, 畑毅, 山田健人, 水野秀昭, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎病態解明のためのフィラグリン欠失マウスの作製. 第16回分子皮膚科学フォーラム, 札幌, 2009
 6. 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 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
 7. 天谷雅行: フィラグリン欠損マウスモデル. 第39回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会, 京都, 2009. 11. 6- 8.
 8. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第37回日本臨床免疫学会, 東京, 2009. 11. 13- 15.
 9. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第8回ENT病診カンファレンス, 東京, 2009. 11. 18.
 10. 河野通良, 高橋勇人, 山田健人, 天谷雅行: レトロウイルスベクターを用いてデスマグレイン3反応性T細胞受容体遺伝子を導入したCD4陽性T細胞によるinterface dermatitisの誘導. 第16回分子皮膚科学フォーラム, 札幌, 2009. 11. 20- 21.
 11. 久保亮治, 永尾圭介, 天谷雅行: 活性化した表皮ランゲルハンス細胞の樹状突起は表皮タイトジャンクションバリアを越えて抗原を取り込む. 第39回日本免疫学会総会・学術大会, 大阪, 2009. 12. 2- 4.
 12. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. 第73回日本皮膚科学会東京支部学術大会, 東京, 2010. 2. 20-21.
 13. 天谷雅行: 皮膚バリアと経皮免疫. 第6回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2010. 2. 26- 28.
- G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 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

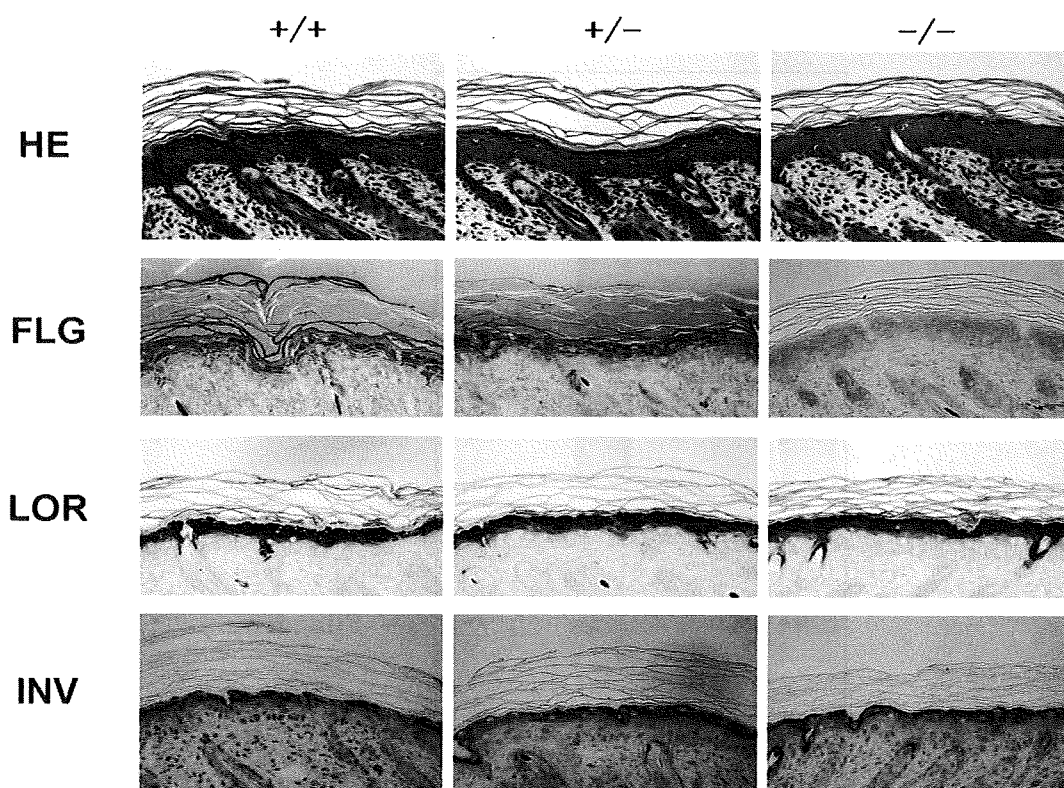


図1 フィラグリン欠損マウス (-/-) では、表皮顆粒層でのフィラグリン発現が消失していた。ヘテロマウス (+/-)、フィラグリン欠損マウス (-/-) いずれも、ロリクリン、インボルクリンの発現に変化はなく、HE 染色にても野生型と比べて明らかな変化は見られなかった。

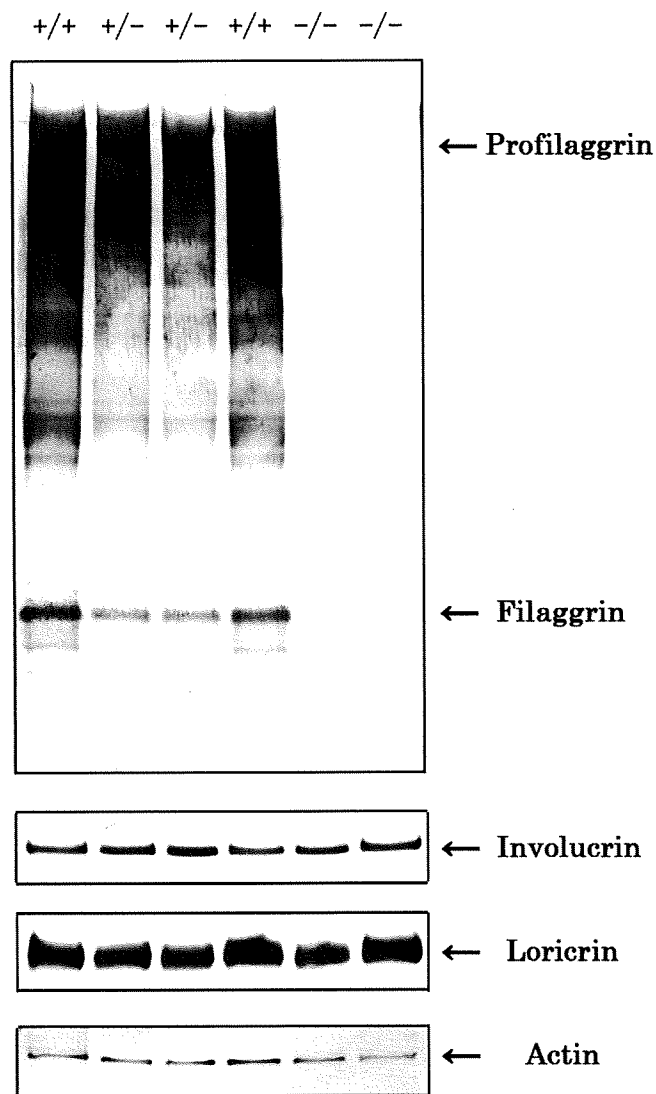


図2 フィラグリン欠損マウス (-/-) では、フィラグリンの前駆体のプロフィラグリンと成熟型フィラグリンのいずれも、発現が完全に消失していた。一方、ロリクリン、インボルクリンの発現に変化は見られなかった。

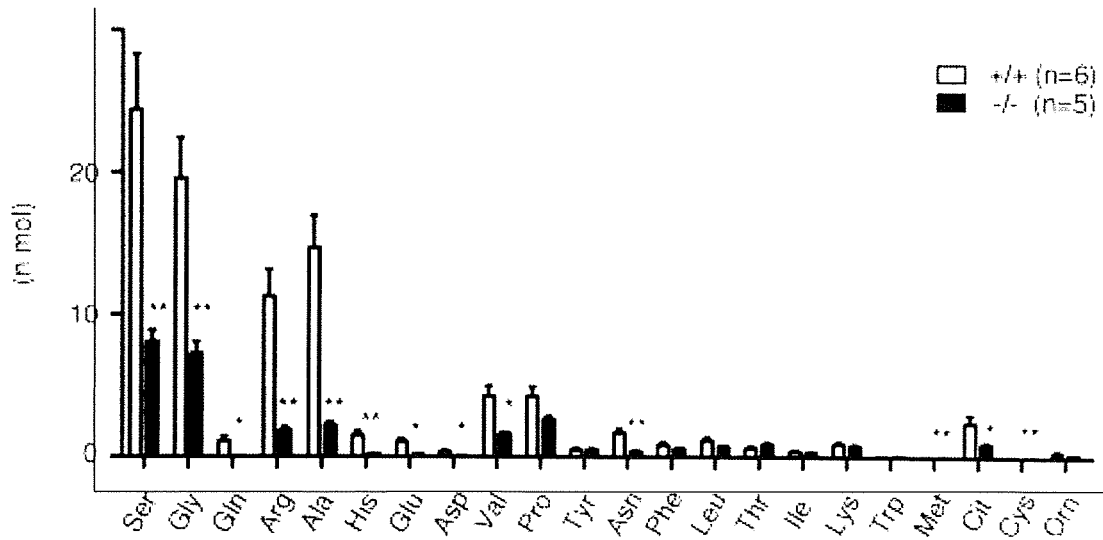


図3 野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との角層内アミノ酸量の比較。

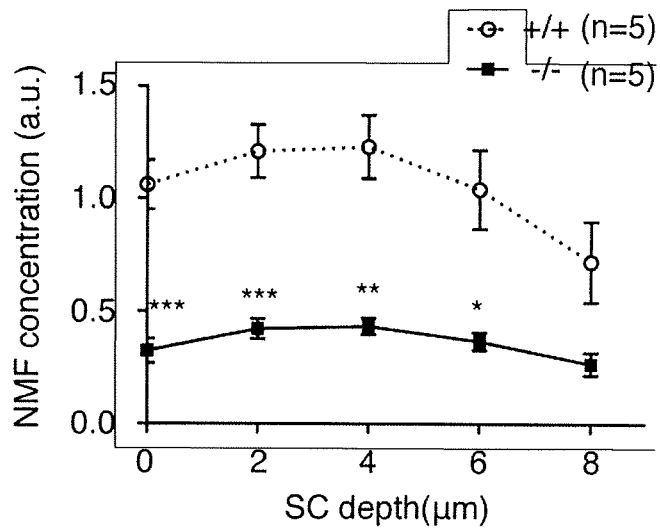


図4 野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との角層 NMF 量の比較。

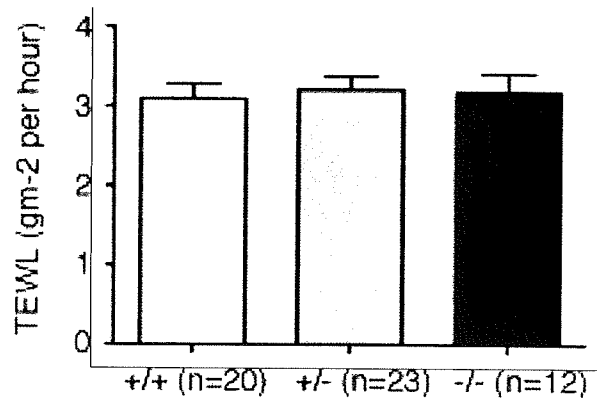


図5 TEWLを測定したところ、野生型マウス(+/+)とフィラグリン欠損マウス(-/-)との間に有意差を認めなかった。(+/-: ヘテロマウス)

角質とタイトジャンクションからなる皮膚の物理的バリアと免疫系の相互作用の研究

研究分担者 久保 亮治 慶應義塾大学医学部皮膚科学／総合医科学研究センター・特別研究講師

研究要旨 皮膚表皮には角質層バリアとタイトジャンクション (TJ) バリアが存在している。我々は、表皮の TJ バリアを初めて 3 次元的に観察することに成功した。本法を用いて表皮 TJ と表皮ランゲルハンス細胞を同時に可視化したところ、休止期のランゲルハンス細胞が TJ バリアの内側に留まるのに対し、活性化したランゲルハンス細胞は表皮 TJ バリアの外側に樹状突起を伸ばすことを発見した。樹状突起の先端部分ではエンドサイトーシスが起こっており、角質層バリアを突破して侵入した抗原を TJ バリアの外側で捕捉している可能性が示唆された。また、TJ バリアを突き抜けた樹状突起とその両側の表皮細胞との間には、新たな TJ が形成されており、表皮 TJ バリアの恒常性を保ち、角質層バリアを突破した抗原の侵入を防いでいると考えられた。

研究協力者

天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科教授
永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科講師
川崎 洋 慶應義学医学部大学院生

ア機能の細胞生物学的・免疫学的性質について基礎的な解析を行うことを目的とした。

A. 研究目的

皮膚の表面は、表皮と呼ばれる重層扁平上皮シートにより覆われている。表皮の最外層に角質層が存在し、細胞を乾燥によるダメージから守るとともに、外来抗原が生体内に侵入するのを防いでいる。アトピー性皮膚炎発症の主要因として、角質構成蛋白フィラグリンの遺伝子変異が報告されている。すなわち、フィラグリン欠失により皮膚角層のバリア機能が低下し、様々な抗原が皮膚を通過して慢性的に体内に侵入することが、アトピー性皮膚炎発症の要因となると考えられる。しかし、皮膚のバリアは角質だけが担うのではなく、角質層バリアの内側にタイトジャンクション (TJ) によるバリアが存在している。では、角質層バリア・TJ バリアはそれぞれ、外来抗原の経皮的侵入に対してどのようなバリア機能を担っているのか、フィラグリン欠失により生じるバリア障害とはどのような性質のものか、バリア破綻により侵入した抗原はどのように免疫系に捕捉されるのか。バリア障害疾患としてアトピー性皮膚炎の病態を捉えなおすために、本研究では皮膚バ

B. 研究方法

1) 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。

2) TJ バリアとランゲルハンス細胞

マウス耳表皮シートを用いて、表皮 TJ バリアを立体的に可視化する方法を初めて確立した。本方法を用いて表皮 TJ バリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化し、その相互作用を検討した。また蛋白ビオチン化試薬およびビオチンラベルした抗原を表皮に塗布し、抗原の取り込み過程を精査した。

C. 研究結果

1) OVA patch 貼付試験

OVA patch 1 サイクル後より、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。この結果から、OVA はパッチ処理により皮膚バ

リアを通過すると考えられた。しかし、OVAの分子量から考えて、OVAがTJバリアを通過するとは考え難いため、TJバリアの外側で抗原取得が行われている可能性を考え、TJバリアとランゲルハンス細胞の関係を精査する実験を行った。

2) TJバリアとランゲルハンス細胞の観察

表皮TJバリアを立体的に可視化する方法により、哺乳類表皮TJバリアを世界で初めて*en face*に可視化することに成功した(図1)。表皮は表面から順に角層・顆粒層・有棘層・基底層の4層からなる。TJバリアは顆粒層の外から2層目の細胞間をシールしていた。次に、TJバリアとランゲルハンス細胞を同時に可視化した。休止期のランゲルハンス細胞は、基底層と有棘層の間に細胞体があり、樹状突起を表皮上層に向かって伸ばしているが、樹状突起の先端はTJバリアより内側にとどまっていた。角質層をスコッチテープにて3回ストリッ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(平成19-21年度)

1. 論文発表

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 murine filaggrin gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*, 41: 602-8, 2009
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*, 206 (13): 2937-2946, 2009.
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.

2. 学会発表

1. 川崎洋, 久保亮治, 海老原全, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎に関する最近のトピックス. 第4回TAP(Tokyo scientific forum for Atopic Dermatitis and Psoriasis), 東京, 2008. 12. 13.
2. 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**, Funchal/ Madeira/ Portugal, 2009.9.3-6.
3. 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**, Budapest, Hungary, 2009.9.9-12.
4. 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**, 大阪, 2009. 12. 2-4.
5. 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. 12. 2-4.
6. A. Kubo, K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki, M. Amagai: External antigen uptake by Langerhans cells through epidermal tight junction barriers. **The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Fukuoka, Japan, 2009. 12. 4- 6.
7. 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

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。

野生型マウス (n=4) を 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。OVA 暴露群では OVA 特異的 IgE が検出された。

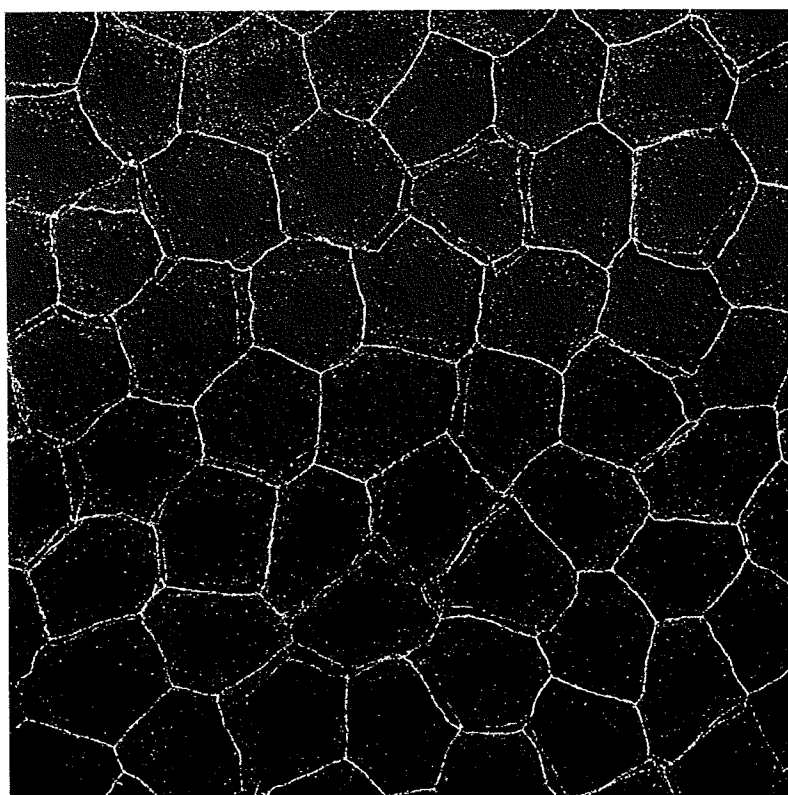


図1 マウス耳より単離した表皮を whole mount にて染色することにより、初めて表皮 TJ バリアを立体的に可視化することが可能となった

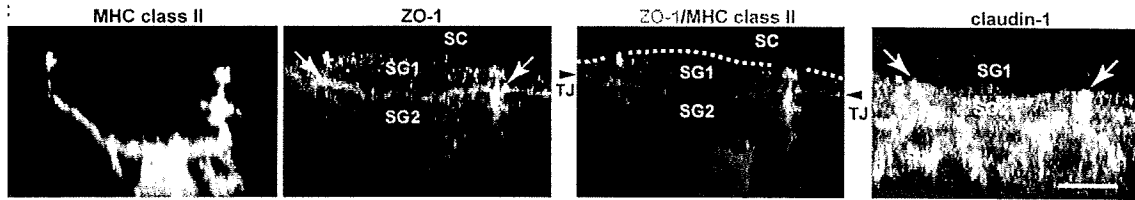


図2 活性化したランゲルハンス細胞 (MHC class II 陽性) の樹状突起は、顆粒層の1層目の細胞 (SG1) と2層目の細胞 (SG2) の間に存在する皮膚タイトジャンクションバリア (ZO-1 陽性) を超えて、角層 (SC) の下にまで至る。

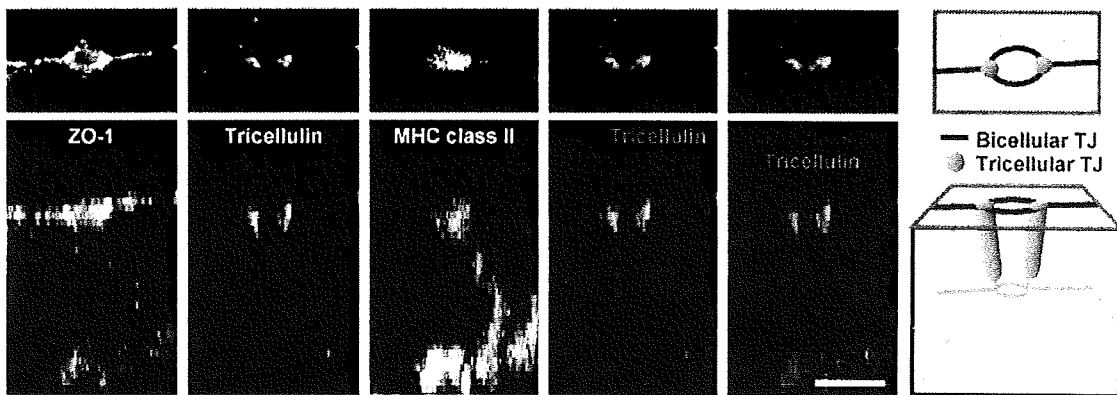


図3 活性化したランゲルハンス細胞 (MHC class II) の樹状突起と、皮膚タイトジャンクションバリアがドッキングした箇所では、皮膚ケラチノサイトとランゲルハンス細胞樹状突起の間に2細胞間タイトジャンクションバリア (ZO-1) と3細胞間タイトジャンクションバリア (tricellulin) が新たに形成される。

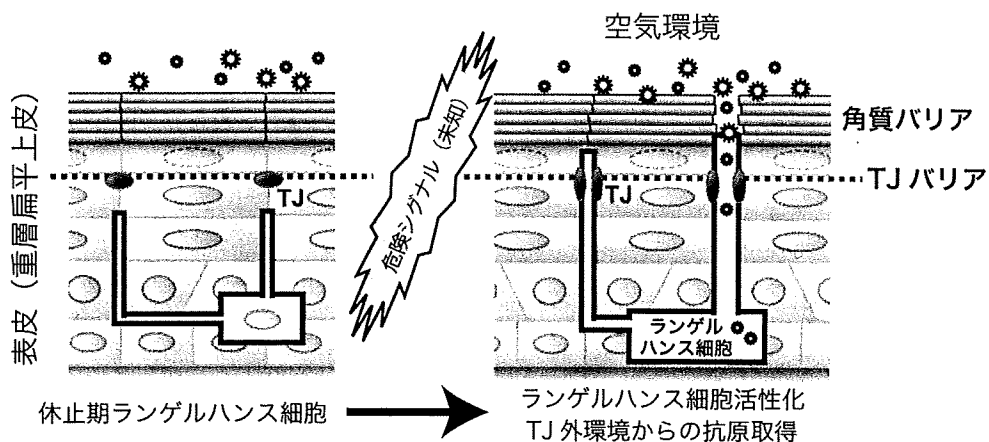


図4 休止期のランゲルハンス細胞 (左) が表皮 TJ バリアの内側に留まるのに対し、刺激に伴い活性化したランゲルハンス細胞 (右) は、表皮 TJ バリアを超えて外側に樹状突起を伸ばし、TJ バリア外の抗原を取得する機能を持つと考えられる。

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、outside→inside バリア機能を定量的に評価する方法を蛍光ハプテンを用いることにより確立した。さらに、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、吉木竜太郎

産業医科大学医学部皮膚科 大学院生、助教

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(atopic dermatiti; 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。

バリア機能評価には inside→outside バリア評価法としての経皮水分蒸散量(TEWL)の測定法が確立されているが、外来抗原の生体内への侵入における評価基準となる outside→inside バリアの定量的機能評価

法は確立しておらず、今後バリア破壊の免疫への影響を考えていく上で、同測定法の確立は重要課題である。そこで outside→inside バリアの定量的測定法を確立することを目的とする。

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。

外来抗原の生体内への侵入における評価基準となる outside→inside バリアの定量的機能評価法は確立するために、蛍光ハプテンである FITC をマウス腹部に塗布し、その後テープストリッピングにより残存した FITC を除去し、表皮に存在する FITC 量を定量し、outside→inside バリア機能を評価する。

また、Langerin-ジフテリア毒素受容体 (DTR) マウス、Langerin-DTR の骨髄を 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)。

FITC 塗布後の表皮に存在する FITC 量を定量することに成功した。また、FITC 量は flaky tail マウスで著明に亢進していた (図 2)。

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 3)。

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 (平成 19-21 年度)

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**: Epub ahead of print, 2010.
 4. 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**, 129 (3): 705-713, 2009.
 5. 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 (12): 2833-2841, 2008.
 6. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. **J Invest Dermatol** 128 (11): 2625-2630, 2008.
 7. 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 (7): 1719-1727, 2008.

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 mDial 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.
3. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明の名称: 皮膚バリア機能の測定方法
出願番号: 特願 2009-195002
出願日: 2009.08.26
出願人: 国立大学法人京都大学
発明者: 梶島健治、竹馬真理子、Catharina Moniaga

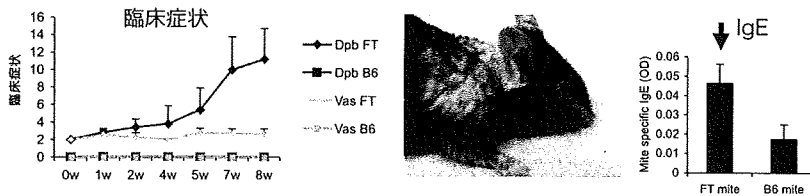
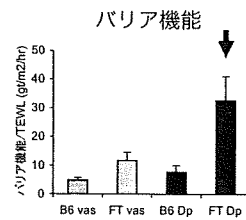
Flaky tailマウスを用いた新規アトピー性皮膚炎モデルの確立

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。

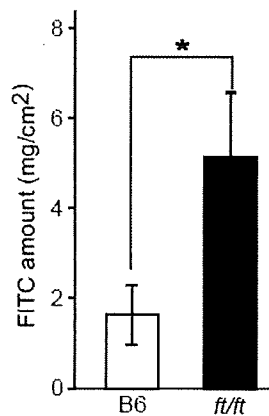


図2：蛍光ハプテンである FITC を皮膚に塗布後、表皮を分離し、表皮に存在する FITC 量を定量した。

DNFBによる接触過敏反応

0.3% sensitization, 0.15% elicitation with DNFB

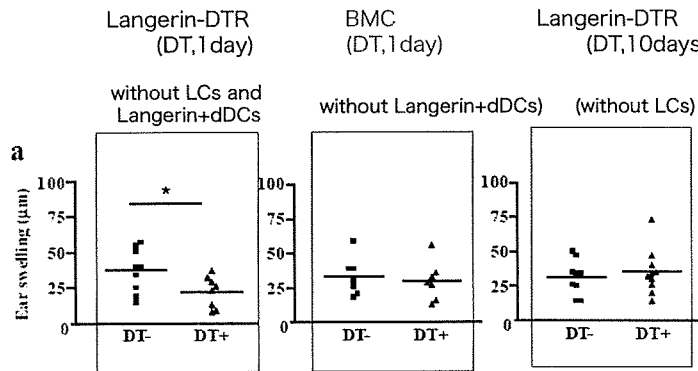


図3 : 接触過敏反応を Langerin-DTR マウス、Langerin DTR BM→B6 BM キメラマウス、Langerin-DTR マウスに DT 投与 10 日後のマウスに適用し、耳介腫脹を測定した。

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 本研究では、皮膚バリア機能障害と TJ の異常との関係を明らかにするため、表皮 TJ の機能と形成機構に関する研究を行った。まず、表皮 TJ の主要構成分子であるクローディン 1 遺伝子ノックアウトマウスが示す皮膚バリア機能破綻のメカニズムをさらに解明するために、このマウスの角質層の異常の有無を検討した。その結果、このマウスにおいて皮膚表面からのトレーサー浸透に対する角質層のバリア機能が低下し、角質層におけるフィラグリンのプロセッシングが異常であることを見出し、クローディン 1 が顆粒層の TJ のバリア機能のみならず角質層の正常な分化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、細胞培養系において細胞外のトリプシン様プロテアーゼ活性によってケラチノサイトが容易に TJ を形成する性質を持つことを見出し、乾癬が呈する異所的な TJ 形成にプロテアーゼが関与する可能性を示した。

A. 研究目的

細胞間隙の拡散バリアとして機能する細胞間接着構造タイトジャンクション(TJ)の機能解析から、これまで皮膚には存在しないと言われていた機能的な TJ が表皮顆粒層細胞に存在すること、さらに表皮 TJ を構成する接着分子クローディン 1 遺伝子ノックアウトマウスが、表皮 TJ のバリア機能の破綻による脱水により致死であることが示された。これらの研究成果により、従来皮膚科学で全く注目されていなかった TJ が皮膚バリア機能の一端を担うことが認知されつつある。そこで、バリア障害からアトピー性皮膚炎を考える上で、表皮 TJ のバリア機能の関与について検討することを目的として、皮膚バリア機能障害と TJ の異常について解析を行った。まず、クローディン 1 ノックアウトマウスにおける水分蒸発に対する皮膚バリアの破綻のメカニズムを角質層に着目して検討した。さらに、皮膚の乾燥を伴う乾癬において異所的な TJ 形成とプロテアーゼ発現亢進が見られることから、ケラチノサイトの TJ 形成における細胞外プロテアーゼ活性の役割を解析した。

B. 研究方法

1) クローディン 1 ヘテロマウス同士の交配によって得られた同腹の仔マウスを安楽死後、ホルマリン固定と同時に X-gal 溶液 (PBS,

pH4.5) に浸して、表皮の内在性 b-ガラクトシダーゼによって発色させ、X-gal の表皮への浸透を可視化した、さらに皮膚の凍結切片を作製し、X-gal の浸透部位を解析した。また、クローディン 1 ノックアウトマウスを含む同腹のマウスの皮膚を採取し、角質層を単離して SDS 溶液に可溶化させ、ウェスタンブロットにて角化マーカーの発現を解析した。2) クローディン 1 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 細胞を選び出し、細胞外よりトリプシン等のプロテアーゼを作用させ、TJ 形成を蛍光抗体法、凍結割断レプリカ法で観察した。

C. 研究結果

1) クローディン 1 ノックアウトマウスの表皮は体表からの X-gal トレーサーの浸透が著しく亢進していることが明らかになった。X-gal の発色は角質層で見られ、コントロールのマウスでは観察されなかった。したがって、クローディン 1 ノックアウトマウスでは、角質層のバリア機能が低下していることが示唆された。さらに、この角質層のバリア機能低下の原因となりうる角質層細胞の生化学的変化の一つとして、角化タンパク質の一つであるフィラグリンのプロセッシングに異常が見られた。クローディン 1 ノックアウトマウスでは、フィラグリンのモノマーがウェスタンブロットで検出されな

かった。2) ヒト扁平上皮由来 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、電子顕微鏡観察により TJ 形成が確認された。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、クローディン自身はトリプシンによる消化を受けなかった。

D. 考察

1) 表皮の TJ は顆粒層に存在し、クローディン 1 ノックアウトマウスでは顆粒層の TJ のバリア機能が破綻していることが組織の内側から外側へのトレーサの漏出によって報告されていた。しかし、このマウスが皮膚からの著しい脱水を示すことは、角質層バリア機能の低下をも意味する。今回の研究によって、実際にクローディン 1 ノックアウトマウスにおいて角質層にも異常が見られることが明らかになった。顆粒層の TJ をつくるクローディン 1 の欠失が角質層の正常な分化にまで影響するメカニズムとして、顆粒層が形成する TJ のバリア機能が破綻することにより、TJ より内側の細胞外液が角質層へ漏れ出し、角質層の分化を妨げたことが考えられる。すなわち、顆粒層の TJ が存在することにより、TJ より外側に角質層の正常な分化を支える適度な環境が形成されていると推測される。今後、この仮説を証明するためには、クローディン 1 ノックアウトマウスの角質層のバリア機能が実際に低下していることを確認すること、顆粒層の TJ と角化層の間の液性環境を解明し、クローディン 1 ノックアウトマウスにおいてその環境が破壊されていることを示す必要がある。TJ が表皮において顆粒層の細胞間隙のバリア機能のみならず、角質層の正常なバリア機能の形成にも関与するという今回の結果は、TJ が皮膚バリア機能において 2 重の重要性を持つことを示している。

2) 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にパッチの 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、少なくとも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えられる。今後、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、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も TJ 形成を誘導できるかについて検証する必要がある。

E. 結論

表皮顆粒層に存在する TJ は、顆粒層の細胞間隙のバリアだけでなく、角質層の正常な分化とバリア機能にも必要であること、すなわち皮膚バリア機能形成にとって 2 重の重要な役割を果たしていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (平成 19-21 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 (2): 509-522, 2007.
2. Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 134 (2): 523-534, 2008.
3. Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, 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 (5): 939-949, 2008.
4. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19 (11): 4687-4693, 2008.
5. Furuse M: Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (4): 813-819, 2009.
6. Furuse M, Moriwaki K: The role of claudin-based tight junctions in morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1165: 58-61, 2009.
7. Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M: The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J Cell Sci*, 122 (Pt 7): 985-994, 2009.
8. Adachi M, Hamazaki Y, Kobayashi Y, Itoh M,