

## アトピー性皮膚炎モデルマウスの免疫学的解析に関する研究

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

アトピー性皮膚炎の病態形成における樹状細胞サブセットの役割は不明である。そこで、卵白アルブミン（OVA）貼付により誘発するアトピー性皮膚炎モデルを Langerin-ジフテリア毒素受容体（DTR）マウスに適用した。すると、表皮ランゲルハンス細胞が本アトピー性皮膚炎モデルにおける主要な抗原提示細胞であることが明らかになった。さらに、TSLP 受容体をランゲルハンス細胞特異的に欠失させると、皮膚炎症状、IgE 誘導などが著明に減弱することより、ランゲルハンス細胞上の TSLP 受容体を介したシグナルがアトピー性皮膚炎の病態形成に重要な役割を果たしていることが判明した。以上より、アトピー性皮膚炎の病態形成に寄与する皮膚樹状細胞サブセットは、表皮に存在するランゲルハンス細胞であることが明らかとなった。

### 研究協力者

江川形平 京都大学医学研究科皮膚科 助教  
中島沙恵子 京都大学医学研究科皮膚科 大学院生

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎の病態形成における責任抗原提示細胞サブセットと TSLP-TSLP receptor シグナルの果たす役割を検証することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

卵白アルブミン（OVA）貼付により誘導するアトピー性皮膚炎モデルを Langerin-DTR マウス、TSLP Receptor 欠損マウス、B6→TSLP Receptor 欠損マウスへの骨髄キメラマウスなどに適用し、アトピー性皮膚炎発症に関与する樹状細胞の同定と、TSLP-TSLP-receptor シグナルの重要性の検討を行った。

（倫理面への配慮）

特になし

### C. 研究結果

OVA をランゲルハンス細胞欠損マウスに貼付した際、野生型マウスに比し、臨床症状、病理所見、血清中 IgE 値などの所見の程度が減弱していた。OVA 貼付後の所属リンパ節細胞を *in vitro* で OVA により再刺激した際にも細胞増殖や IL-4 サイトカインの産生の低下が認められた。一方、TSLP Receptor 欠損マウスに B6 マウスの骨髄を移植して作成した骨髄キメラマウスは、ランゲルハンス細胞のみにおいて TSLP receptor

が欠損していることが推測されるが、本マウスにおいても OVA 貼付により誘導するアトピー性皮膚炎の所見が野生型マウスに比して減弱していた。さらに、*in vitro* での OVA 再刺激実験においては、OVA 特異的な増殖は野生型に比して有意な差が認められなかったが IL-4 の発現が減弱していた。

### D. 考察

以上より、OVA のようなタンパク抗原曝露により誘導されるアトピー性皮膚炎モデルにおいて、ランゲルハンス細胞が抗原提示や T 細胞活性化において重要な役割を果たすことが示唆された。また、その際にアトピー性皮膚炎の一つの特徴である Th2 優位の指標となる IL-4 の産生や IgE の亢進も認められたことより、ランゲルハンス細胞が Th2 へのシフトに作用していることも窺わせる。一方、TSLP-TSLP receptor シグナルも、ランゲルハンス細胞上に存在する受容体が少なからぬ役割を果たすことが示された。このシグナルは T 細胞の増殖活性には影響を与えないが、IL-4 の産生亢進より Th2 へのシフトに一役買っているようである。

フィラグリニンなどのバリア破壊が起こった際に、タンパク抗原はおそらく表皮内の tight junction でとらえられる事が過去の報告より推測されるが、tight junction 下に存在するランゲルハンス細胞がタンパク抗原の主要な抗原提示細胞となることは、理にかなっていると考えられる。

## E. 結論

外来抗原に対する皮膚の応答の多様性獲得機序は不明な点が多かったが、外来タンパク抗原に対してランゲルハンス細胞が抗原提示細胞として重要な役割を果たしていること、さらに、Th2 優位な状況にシフトさせる際にランゲルハンス細胞とその細胞上に発現する TSLP 受容体が重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 原著論文

1. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y: Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. **J Immunol**, 184 (5): 2729-2735, 2010.
2. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K: Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity. **J Allergy Clin Immunol**, 125 (5): 1154-1156 e1152, 2010.
3. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, Minegaki Y, Nagao K, Waldmann H, Tomura M, Hori S, Miyachi Y, Kabashima K: Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in the sensitization phase. **J Dermatol Sci**, 61 (2): 144-147, 2010.
4. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, 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**, 176 (5): 2385-2393, 2010.
5. Nakajima S, Honda T, Sakata D, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Moniaga CS, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K: Prostaglandin I2-IP signaling promotes Th1 differentiation in a mouse model of contact hypersensitivity. **J Immunol**, 184 (10): 5595-5603, 2010.
6. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y: FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late-phase skin reaction in mice. **Am J Pathol**, 177 (4): 1881-1887, 2010.
7. Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, Honda T, Nakajima S, Moniaga CS, Otsuka A, Ishizaki T, Tomura M, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Okada T, Kabashima K: Rho-mDia1 pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in

- dendritic cells. **Blood**, 116 (26): 5875-5884, 2010.
8. 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 the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. **J Clin Invest**, 120 (3): 883-893, 2010.
9. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y: The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. **J Immunol**, 184 (10): 5670-5677, 2010.

### 2) 総説

1. Honda T, Miyachi Y, Kabashima K: The role of regulatory T cells in contact hypersensitivity. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, 4 (2): 85-89, 2010.
2. Honda T, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K: Prostanoid receptors as possible targets for anti-allergic drugs: recent advances in prostanoids on allergy and immunology. **Curr Drug Targets**, 11 (12): 1605-1613, 2010.

### 2. 学会発表

1. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, 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. **14th International Congress of Immunology**, Kobe, Japan, 2010. 8. 22- 27.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当せず

図 1 : ランゲルハンス細胞除去による皮膚炎症状の軽減

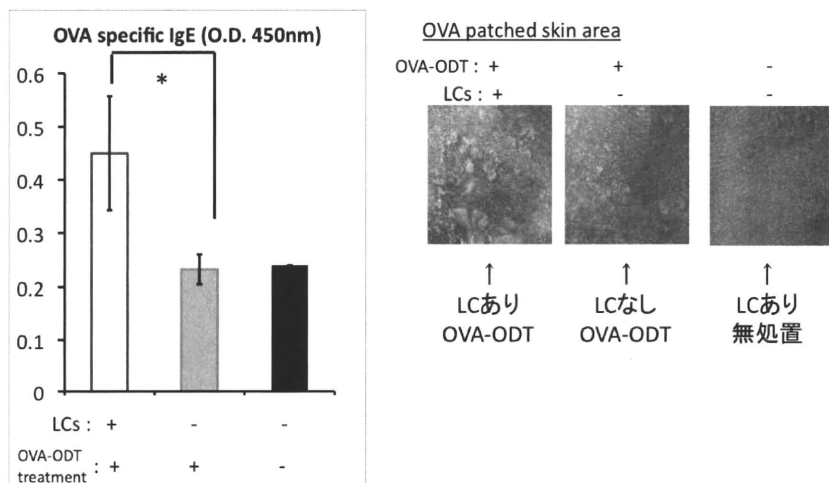
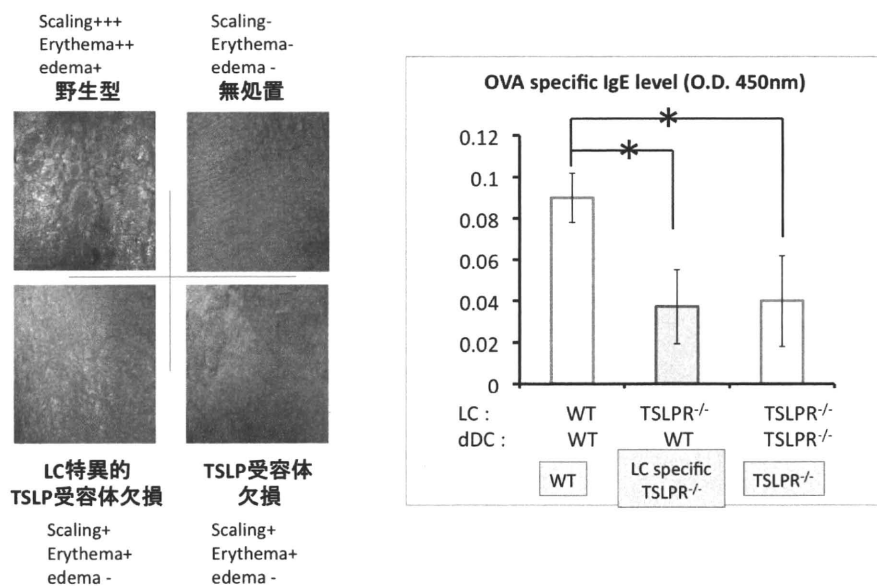


図 2 : ランゲルハンス細胞特異的に TSLP 受容体を除去することによる皮膚炎症状の軽減



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）

## 分担研究報告書

### 皮膚表皮特異的遺伝子と角層バリア制御機構

研究分担者 松井 毅

東京医科歯科大学難治疾患研究所メディカル・トップ・トラック（MTT）プログラム

特任講師

**研究要旨** 哺乳類における皮膚表皮は、主に、基底層・有棘層・顆粒層・角質層からなる。皮膚顆粒層特異的に発現する遺伝子であるフィラグリンは、それが約 10 個タンデムに連なったプロフィラグリンとして発現する。その後、顆粒層から角質層へと分化するに伴いプロテアーゼによってフィラグリン単位へと切断される。そして、角層上層においてアミノ酸にまで分解され、天然保湿因子を構成する。ヒトフィラグリン欠損は、アトピー性皮膚炎の疾患素因となることが知られているが、フィラグリンの欠損だけでは、発症を説明できない症例も多い事も知られている。本年度は、皮膚に発現しているプロテアーゼ G の欠損マウスがプロフィラグリン分解異常を引き起こし、皮膚表皮角質層の水分減少を引き起こす事を明らかにした。この結果は、フィラグリン分解異常も乾燥肌の原因となり、アトピー性皮膚炎の疾患素因となる可能性を示している。

#### 研究協力者

天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科教授  
海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科准教授  
久保亮治 慶應義塾大学医学部皮膚学・総合  
医科学研究センター特別研究講師  
工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研  
究室教授

*in vitro*においてプロフィラグリンの分解活性があるかどうか、またその欠損マウスがプロフィラグリン分解異常を引き起こし、皮膚表皮角質層の性状に影響を及ぼすのかどうかを検討する。最終的には、そのプロテアーゼのアトピー性皮膚炎患者・正常人における遺伝子解析を行う事によって、その機能欠損によるフィラグリン分解異常が、乾燥肌やアトピー性皮膚炎を引き起こす可能性を検討する。

#### A. 研究目的

哺乳類における皮膚表皮は、基底層、有棘層、顆粒層、角質層からなるが、基底層において分裂したケラチノサイトは、有棘層において分化した後、顆粒層から角質層において外界とのバリアーを形成し生体防御を行っている。皮膚特異的遺伝子であるフィラグリンは、顆粒層において、フィラグリンが約 10 個タンデムに連なったプロフィラグリンとして発現する。その後、顆粒層から角質層へと分化するに伴いプロテアーゼによってフィラグリン単位へと切断される。そして最終的には、角層上層においてアミノ酸にまで分解され、天然保湿因子を構成する。一方で、ヒトフィラグリン欠損は、アトピー性皮膚炎の疾患素因となることが知られているが、フィラグリンの欠損だけでは、発症を説明できない事も明らかになりつつある。そこで、本研究においては、プロフィラグリン-フィラグリンに至る「分解経路の異常」がアトピー性皮膚炎の新たな疾患素因となる可能性を検討する。具体的には、皮膚に発現しているプロテアーゼに着目し、そのプロテアーゼが *in*

#### B. 研究方法

皮膚に発現するプロテアーゼ G（仮称）がプロフィラグリンを *in vitro*で基質として分解するかどうかを確認する為、リコンビナント蛋白質を大腸菌において発現・精製し生化学的解析を行った。次に、生体内においても、プロテアーゼ G がプロフィラグリン-フィラグリンへの分解に関与しているのかどうかを、遺伝子欠損マウスを用いて解析した。具体的には、成体ノックアウトマウスの皮膚表皮角質層の表面構造や生化学的・生理学的解析を可能にする為、既に作成していたプロテアーゼ G 欠損マウスを無毛マウス HR-1:Hos へと戻し交配を行い、形態学的解析、生理学的解析、分子生物学的解析を行った。

#### C. 研究結果

リコンビナント蛋白質を大腸菌において発現・精製し *in vitro*プロテアーゼアッセイを行い、生化学的解析を行った結果、プロテアーゼ G は、プロフィラグリンのフィラグリン単位を繋いでいるリンカー

配列を切断する事が明らかとなった。

プロテアーゼ G 欠損無毛マウスは、生後の外見は明確な表現系は示さなかったが、生後 3-4 週目において、乾燥肌様表皮の外観を呈する事が明らかとなった。

また皮膚表層の形状を観察する為に、走査電子顕微鏡観察を行った所、表面角質細胞の形態異常と、深い溝の皺の増加を伴う事も明らかとなった。

透過電子顕微鏡解析においては、基底層・有棘層・顆粒層は正常であったが、電子密度の濃い角質層が有意に増加している事が明らかとなった。

皮膚表皮の生理学的解析を行った所、水分蒸散量に変化はないが、角質水分量は有意に減少が認められた。

表皮分化マーカーであるケラチン-14, -1, インボルクリン、ロリクリンに対する抗体を用いた、イムノブロットング、免疫蛍光染色解析を行った所、発現量・発現部位に差異は認められなかった。しかし、抗フィラグリン抗体によるイムノブロットング解析では、プロテアーゼ G 欠損無毛マウスの表皮角質層において、プロフィラグリンからフィラグリンへの分解不全による異常なプロフィラグリンが蓄積する事が明らかとなった。免疫蛍光染色により、それらの異常プロフィラグリンは角層下層に蓄積する事が明らかとなった。

#### D. 考察

生化学的解析と欠損マウスの解析により、プロテアーゼ G がプロフィラグリン→フィラグリンの分解に関わる事が *in vitro*, *in vivo* において明らかにされた。欠損マウスにおいて、プロフィラグリンの異常な分解産物が角質細胞にどのような影響を与え、また天然保湿因子はどのような組成になっているのかを明らかにする事により、乾燥肌発生の分子基盤が明らかになる事が予測される。また今後、アトピー性皮膚炎患者ゲノムにおけるヒトプロテアーゼ G の遺伝子解析を行う事によって、その機能欠損と乾

燥肌やアトピー性皮膚炎発症との関わりが明らかになる可能性がある。

#### E. 結論

プロテアーゼ G 欠損無毛マウスを用いた解析により、プロテアーゼ G 欠損によるフィラグリンの分解異常が、乾燥肌を形成する原因になる事が示唆された。このような単一遺伝子欠損による無毛マウスを用いた乾燥肌モデルマウスは、他に例がなく、乾燥肌やアトピー性皮膚炎発症の分子機構解析に有用なマウスモデルになると考えられる。

#### 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. [Matsui T](#), Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **EMBO Molecular Medicine: in press**, 2011

<日本語論文>

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

## 皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割の解明

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** 近年、表皮顆粒層細胞に存在するタイトジャンクションが皮膚バリア機能に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。我々は、昨年度までにクローディン1遺伝子欠失 (KO) マウスにおいて水分蒸発に対する皮膚のバリア機能が低下するメカニズムについて検討し、角質層の生化学的異常を明らかにした。そこで今回、クローディン1 KO マウスの角質層のバリア機能の評価を試みた。新生児マウス皮膚から単離した角質層を透過する水分蒸発量を測定したところ、クローディン1遺伝子 KO マウスでは野生型およびヘテロマウスに比べて顕著な蒸発が観察された。すなわち、顆粒層のタイトジャンクションの機能異常が角質層のバリア機能の低下を引き起こすことが示唆された。また、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察から、クローディン1 KO マウスの表皮顆粒層のタイトジャンクションが野生型と比べて構造的に脆弱であることが示唆された。

### 研究協力者

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

近年、表皮顆粒層細胞に存在するタイトジャンクション (TJ) が、皮膚バリア機能に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。TJの主要接着分子クローディンファミリーのうち、表皮にはクローディン1とクローディン4が発現しており、クローディン1 KO マウスは皮膚からの過剰な脱水により生後1日以内に死亡する。さらに、新生児性の硬化性胆管炎と魚鱗癬を併発するNISCH症候群の原因遺伝子としてクローディン1遺伝子が報告されている。皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割を解明し、病態との関与を検討する目的で、我々は昨年度までクローディン1 KO マウスにおける皮膚バリア機能低下のメカニズムを解析してきた。その結果、クローディン1 KO マウスの角質層においてフィラグリンのプロセッシング異常、脂質組成の異常を含む生化学的な変化を見出した。このことは、顆粒層に存在するTJが角質層のバリア機能の形成に関与する可能性を示唆する。そこで今回、クローディン1 KO マウスにおける角質層のバリア機能の評価を試みた。さらに、クローディン1とともに表皮のTJを構成するクローディン4のタイ

トジャンクション形成における役割、およびクローディン1との共存の意義を解明するために、クローディン1 KO マウスの表皮のTJの形態を観察した。

### B. 研究方法

クローディン1 KO マウス、ヘテロマウス、野生型マウスそれぞれの新生児から背部皮膚を単離し、EDTA/PBS処理により真皮を除いた後、0.5%トリプシン/PBS 37°C処理により角質層を剥離した。洗浄後、水を入れたプラスチック製マイクロチューブに角質層をワセリンで貼り付けて室温に静置し、重量変化を経時的に測定して、角質層を介した水分蒸発量を算出した。

上記マウス皮膚を固定し、凍結切断レプリカ法により電子顕微鏡観察を行った。

### C. 研究結果

1) 水分蒸発に対する角質層バリア機能の解析  
トリプシン処理を施すことにより、表皮から確実に角質層だけをきれいなシートのまま単離することができた。野生型、クローディン1ヘテロマウスでは単離角質層の水分蒸発に差が見られなかった。一方、クローディン1 KO マウスの角質層では、野生型、ヘテロに比べて測定初期より蒸発が亢進しており、10時間後、20時間後で5倍以上の差が見られた (図1)。

## 2) 凍結切断レプリカ法による顆粒層 TJ の観察

野生型マウスでは、場所によって TJ のストランド構造の数に差が見られるものの、ストランドのネットワークが連続して細胞周囲をとりまく様子が観察された。特に、各ストランドは直線的で網目を形成する傾向にあった。一方、クローディン 1KO マウスでは、巨視的には TJ が細胞周囲を取り巻いているが、各ストランドは野生型に比べ粗で高い曲率をもち、連続性が失われている部分が観察され、TJ 全体の構造が脆弱であることが示唆された (図 2)。

## D. 考察

クローディン 1 KO マウスから単離した角質層が野生型に比べて多くの水分を蒸発させるという結果は、クローディン 1 KO における角質層の生化学的な異常を反映すると考えられる。そのメカニズムとしては、顆粒層に存在する TJ のバリアが破綻することにより、本来 TJ の内外に形成されるべき正常な液性環境が維持できなくなり、角質層の正常な分化に影響を与えることが予想される。一方、強いタンパク質分解酵素であるトリプシンが角質層に与える影響は無視できず、クローディン 1 KO 角質層が過敏に影響を受ける可能性も否定できないため、より穏やかな条件で角質層を単離する方法が望まれる。

クローディン 1 と 4 を含む正常な TJ とクローディン 1 KO マウスの TJ の形態が異なることがバリア機能の違いの要因となっている可能性がある。すなわち、主にクローディン 4 で形成される TJ では機能的に不十分であり、クローディン 1 が TJ の構造と機能を強化していることが示唆される。ストランド構造の曲率の違いが TJ 機能に与える影響は不明であるが、連続性が失われているのであれば、KO マウスにおける TJ 機能の顕著な低下は十分に説明できる。ただし、顆粒層の TJ は恒常的に生成、分解されており、TJ がそのような過程にある場所が観察されている可能性を完全に否定することができない。確実な証拠とするにはさらに観察数を増やす必要がある。

## E. 結論

クローディン 1KO マウスの角質層は野生型、ヘテロマウスの角質層と比較して、水分蒸発に対するバリア機能が低下していることが示唆

された。今後、さらに穏やかな条件で角質層を単離してアッセイする必要がある。デスマグレイン 1 を切断する黄色ブドウ球菌の毒素である ETA をマウス皮下に注射することにより角質層を単離する予定である。

## 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. Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, Furuse M: Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8011-8016, 2010
2. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M: LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci* 124:548-555, 2011
3. Kirschner N, Haftek M, Niessen CM, Behne MJ, Furuse M, Moll I, Brandner JM: CD44 Regulates Tight-Junction Assembly and Barrier Function. *J Invest Dermatol*. Epub ahead of print, 2010
4. Morita K, Miyachi Y, Furuse M. Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol*. Epub ahead of print, 2011

<日本語論文>

なし

### 2. 学会発表

1. 古瀬幹夫: タイトジャンクションのかたちと機能. 第 109 回日本皮膚科学会総会教育講演. 2010. 4. 18 大阪
2. Sugawara T, Akashi M, Yuki T, Nakagawa N, Sasaki S, Sugiyama Y, Inoue S, Furuse M: Impaired stratum corneum formation in claudin-1-deficient mice with defects in tight junction function. 研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会. 2010. 12. 3 和歌山
3. 古瀬幹夫: 細胞接着装置タイトジャンクションによる上皮透過性の制御機構. 第 55 回日本唾液腺学会 2010. 12. 4. 東京

4. 古瀬幹夫, 増田小百合, 小田裕香子: トリセルラータイトジャンクションの分子構築. BMB2010 ワークショップ 上皮バリアの分子機構: 上皮組織による生体フロントバリア構築. 2010.12.8 神戸

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)  
 1. 特許取得  
 2. 実用新案登録  
 なし  
 3. その他  
 なし

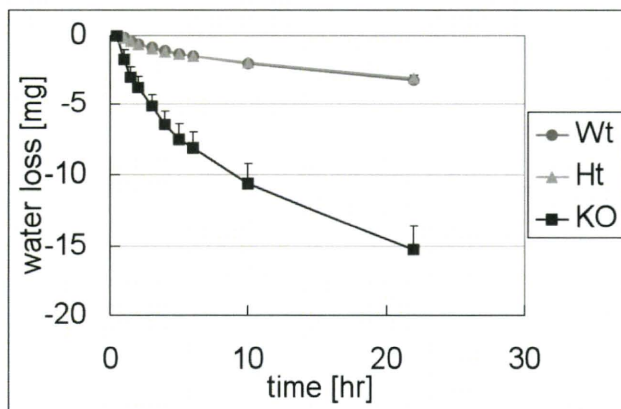


図1 野生型 (WT), クローディン1 遺伝子ヘテロ (Ht), クローディン1 遺伝子ノックアウト (KO) マウス新生児皮膚より単離した角質層を透過した水分蒸発量. 野生型、ヘテロに比べてノックアウトマウスの角質層は水分蒸発に対するバリア機能が顕著に低下している。

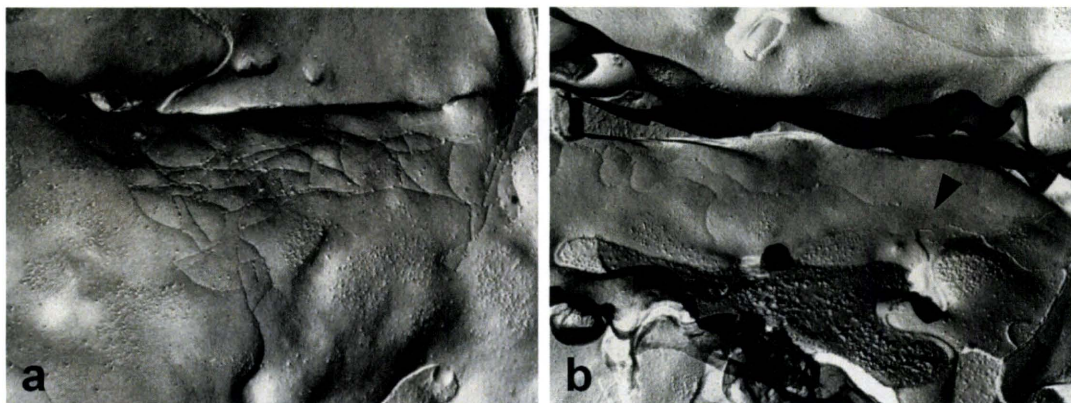


図2 野生型マウス (a)、クローディン1 遺伝子ノックアウトマウス (b) の新生児皮膚の顆粒層に存在する TJ の凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡像. 野生型の TJ ストランドは直線的で網目構造を形成する傾向にある。一方、クローディン1 ノックアウトマウスでは TJ ストランドは曲率が高く粗であり、ストランドが不連続な部分 (矢頭) が観察された。



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）

分担研究報告書

## 皮膚タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の三次元可視化に関する研究

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 講師

**研究要旨** 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。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。角質層の内側にある重層扁平上皮細胞層の外側から数えて2層目の細胞の細胞間をTJがシールし、表皮をTJバリアの外側と内側に区画化している。昨年我々は、マウス耳皮膚を用いた研究により、表皮タイトジャンクション(TJ)バリアとランゲルハンス細胞(LC)の間でダイナミックな協調作業がおこなわれていることを明らかにした。すなわち、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。さらに、樹状突起の先端部分ではエンドサイトーシスが起きていることを示し、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を示唆した。本年度は、ヒト皮膚においても同様の現象が観察されるのかを検討するために、まずヒト皮膚のTJバリアを三次元可視化する方法を確立し、ヒト皮膚においても本現象が観察されることを確認した。現在、健常皮膚とアトピー性皮膚炎皮膚において、本現象に何らかの違いが観察されるのかについて検討中である。

### 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  
吉田和恵 慶應義塾大学医学部大学院  
横内麻里子 慶應義塾大学医学部大学院

### A. 研究目的

昨年我々は、マウス耳皮膚を用いた研究により、表皮タイトジャンクション(TJ)バリアとランゲルハンス細胞(LC)の間でダイナミックな協調作業がおこなわれていることを明らかにした。すなわち、表皮のバリアは角質バリアとTJバリアの2つからなっており、角質バリアを超えて侵入した抗原はTJバリアによりさらなる侵入を阻止される一方、活性化して表皮TJバリアと樹状突起をドッキングさせたLCにより、TJバリアの外側で抗原捕捉されるという「皮膚バリア機構の新しいモデル」を提示している。本年度は、この現象がヒト皮膚でも観察されるのか、また正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部を比較した時に、本現象についてなんら

かの違いが観察されるのか、について検討した。

### B. 研究方法

ヒト皮膚においてTJバリアを可視化する手法の開発を行った。各種プロテアーゼを用いた表皮・真皮剥離方法を検討し、倫理委員会に認められたインフォームドコンセントに基づいて提供されたヒト皮膚より、*ex vivo*において表皮シートを作成し、ヒト表皮TJバリアを三次元的に観察した。本法を用いて、HLA-DR, langerinをTJと共に染色し、TJバリアとLCとの立体位置関係について検討した。以上の方法を用いて、正常ヒト皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚において、TJバリアとLCの観察を行った。

### C. 研究結果

非常に規則正しいマトリックス状配列をしているマウス耳表皮顆粒層細胞と比べると、ヒト表皮顆粒層の細胞はそれぞれの細胞がお互いに重なり合って複雑な構造を作っていた。しかし表皮TJは、顆粒層の2層目の細胞同士が

接着する面の最もアピカル側の細胞間に存在しており、表皮内にただ1層のTJバリアを構築していた(図1)。TJバリアと角質との間には1層の生きた細胞(有核の細胞)の層が存在しており、角層バリアとTJバリアの2つからなる表皮バリアの基本構築は、マウスとヒトで共通していると考えられた。次にLCの観察を行った。ヒト表皮はマウス表皮に比べると有棘層が厚く、LCは有棘層に幅広く分布していた。LCの樹状突起の多くは表皮表面に向けて伸びており、マウスと同様に表皮表面の方向を検知する機構をLCが備えていると考えられた(図2)。正常皮膚において、HLA-DRを高発現する活性化したLCを観察すると、樹状突起をTJとドッキングさせている像が観察された。次にlangerinの分布を観察した。マウスに比べるとヒトLCではlangerinの染色が、休止期においても樹状突起に明るく観察された。活性化したLCにおいてはTJとドッキングした樹状突起の先端部分に強くlangerinの濃縮が観察された。さらに、アトピー性皮膚炎病変部皮膚において同様の観察をおこなった。病変部皮膚では表皮の肥厚と顆粒層の層数の増加が認められ、ZO-1にて染色される細胞間接着装置が、正常皮膚よりも多数の層に存在しているのが観察された。しかし、ビオチン化試薬を用いた浸透試験を行ったところ、TJバリアとして機能しているのは最上層の1層のZO-1陽性細胞間接着のみであることが明らかとなり、アトピー病変部においてもTJはただ一層のみ存在していることが明らかとなった。Claudin-1, occludin, ZO-1の染色では、正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚で明らかな差を認めなかった。現在、TJとLCの相互作用について、正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚の比較をおこなっている。

#### D. 考察

TJバリアとLCとの相互作用は、マウス皮膚のみでなくヒト皮膚においても保存されていることが明らかとなった。以上より、皮膚バリア構造として、以下のようなモデルを考えている。すなわち、表皮では最外層の角質によるバリアが、身体外部の空気環境と体内の液性環境を分け隔てており、角質バリアの内側では、TJが表皮をTJバリア外液性環境とTJバリア内液性環境の2つのコンパートメントに分割している、というモデルである。本モデルにおいて、通常TJバリア内に存在するLCが、TJバリア外

から抗原取得する意義について、また正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚でこの相互作用の頻度に何らかの差が存在するのか、今後明らかにしていきたい。

#### E. 結論

TJバリアとLCとの相互作用が哺乳類皮膚において保存されていることが明らかとなった。

#### 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. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, and Kabashima K. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. **Am. J. Pathol.** 176:2385-2393, 2010.
2. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **EMBO Molecular Medicine**: in press, 2011

<日本語論文>

1. 久保亮治. 特別講演:未来皮膚科学:Molecular Barriology of the Skin. 日本皮膚科学会雑誌. 120:408-410, 2010.
2. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア研究の新展開. フレグランスジャーナル. 5:14-18, 2010.
3. 久保亮治, 天谷雅行. ラングルハンス細胞による外来抗原捕捉機構. 感染・炎症・免疫. 40:267-270, 2010.
4. 久保亮治, 天谷雅行. ラングルハンス細胞による抗原の補足機序. 臨床免疫・アレルギー科. 54:701-709:2010.
5. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア機構の新しい理解 一体表面における防御と索敵のメカニズムー. ヒューマンサイエンス. 22:14-18, 2011.
6. 久保亮治. 表皮バリアとタイトジャンクション. 臨床皮膚科増刊号特集 最近のトピックス 2011 **Clinical Dermatology 2011**. in press:2011.
7. 久保亮治. 皮膚バリアとラングラーハンス細胞の動態. 日本臨床免疫学会誌 特集号:皮膚の臨床免疫. 34:in press, 2011.

8. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア機構とアトピー性皮膚炎. 実験医学2011年6月増刊号「疾患発症の影に潜む慢性炎症の分子機構と先進医療」. in press:2011.

#### 学会発表

1. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Yoshida K, Sasaki H, Amagai M: Langerhans cell dendrites penetrate through epidermal tight junction barrier during foreign antigen uptake. **70th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology**, 2010.5.6.
2. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin-null Mice Exhibit Altered Skin Barrier Formation and Enhanced Percutaneous Immune Responses **The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, 2010.12.3.
3. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Amagai M: Maintenance of intact epidermal tight junction barriers in filaggrin-deficient mouse models. **The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, 2010.12.3.
4. 久保亮治, 永尾圭介, 横内麻里子, 吉田和恵, 川崎洋, 佐々木博之, 天谷雅行: Langerhans cell dendrites penetrate through epidermal tight junction barrier during foreign antigen uptake. 第62回日本細胞生物学会大会, 2010. 5. 20.
5. 久保亮治, 永尾圭介, 横内麻里子, 吉田和恵, 佐々木博之, 天谷雅行: 表皮タイトジャンクションバリアの生物学. 第17回分子皮膚フォーラム, 2010. 7. 9.

#### 招待講演

1. 久保亮治: 進化からみた皮膚バリア: 私たちは母なる海を身に纏う. 平成21年度日本皮膚科学会東京支部主催生涯教育セミナー, 2010.2.7.
2. 久保亮治: 表皮ランゲルハンス細胞とタイトジャンクションバリアの協調による外来抗原取得機構. 第19回東京免疫フォーラム, 2010.2.24.
3. 久保亮治: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. 第109回日本皮膚科学会総会皆見省吾記念賞受賞記念講演, 大阪, 2010.4.16.
4. 久保亮治: Molecular Barriology of the Skin. 第109回日本皮膚科学会総会特別企画「未来皮膚科学」, 大阪, 2010.4.16.
5. 久保亮治: 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア機

構の細胞生物学. 神奈川県皮膚科医会第133回例会・総会, 2010.7.4.

6. 久保亮治: 皮膚バリア機構の細胞生物学. 皮膚基礎研究クラスターフォーラム: 第5回教育セミナー, 2010.8.10.
7. 久保亮治: 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア構造と免疫の視点から. 第22回高遠シンポジウム, 2010.8.20.
8. Kubo A: Epidermal tight junction barriers and trans-tight junction antigen uptake activity of Langerhans cells. **The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Psoriasis Research**, 2010.9.3.
9. Kubo A: Structural and Immunological Barriers of Vertebrate Skin. **Seminar in Department of Dermatology, University of Pennsylvania**, 2010.10.12.
10. 久保亮治: 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア構造と免疫の視点から. 奈良先端大学 GCOE セミナー, 2010.10.20.
11. 久保亮治: 皮膚バリア機構の新しい捉え方 (ステロイド・カルシニューリン阻害外用薬の使い方). 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2010.11.26.
12. 久保亮治: 哺乳類皮膚バリア構造の解析ー物理的バリアと免疫細胞の相互作用を中心にー. **BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)**, 2010.12.8.
13. Kubo A: Molecular Barriology of the Skin: Dynamic Interaction between Surface Physical Barriers and Immune System. **The 82th KEIO COEX meeting**, 2010.12.17.
14. 久保亮治: 皮膚バリア研究の新展開: タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の視点から. アトピー性皮膚炎治療研究会第16回シンポジウム, 2011.2.5.

#### 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

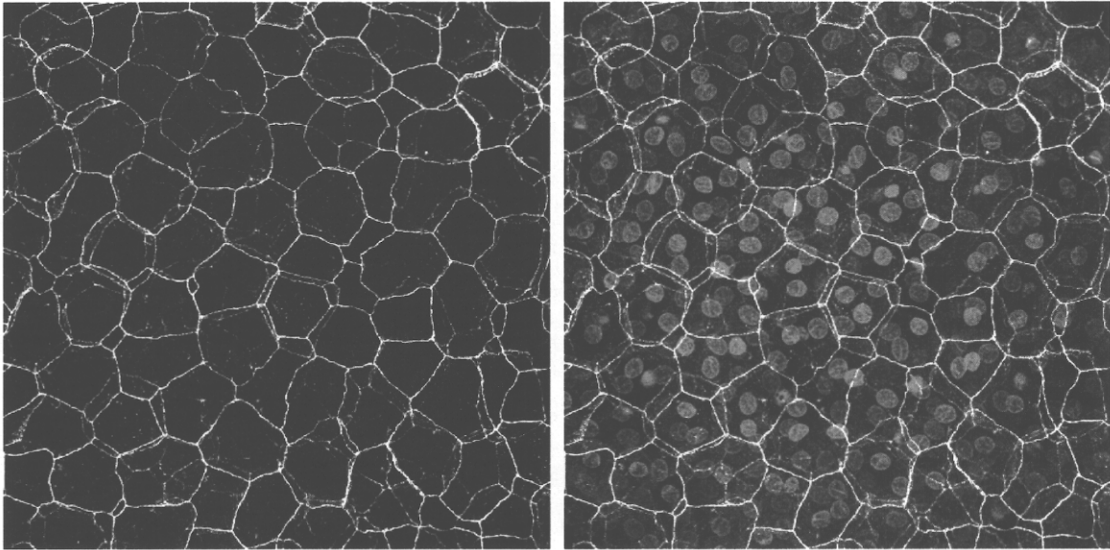


図1 ヒト皮膚のTJバリア。ヒト皮膚のTJバリアを三次元可視化することに成功した。

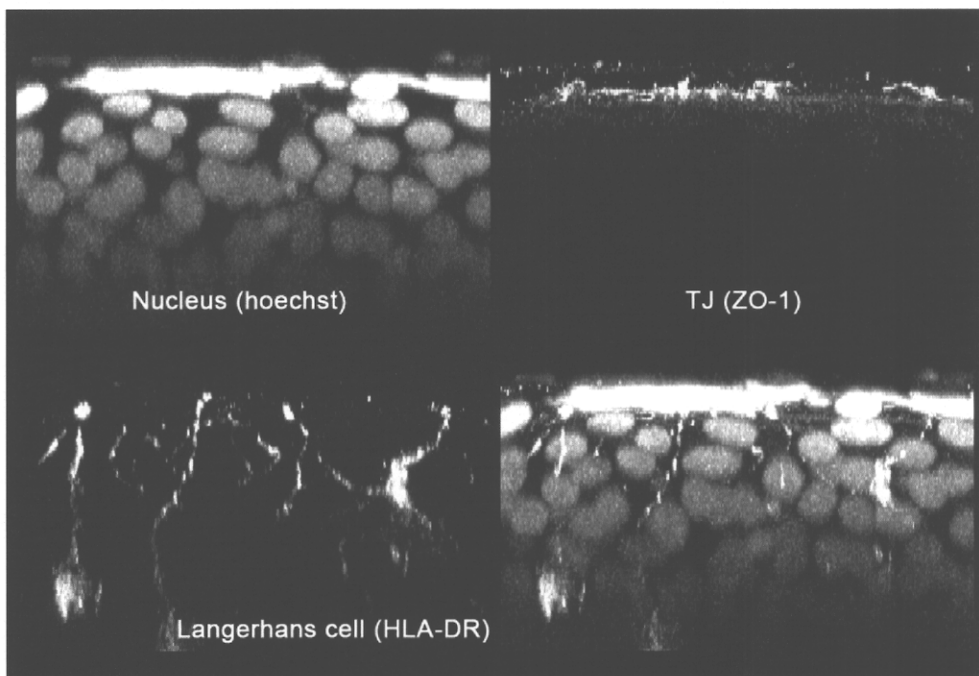


図2 ヒト皮膚におけるTJバリアとランゲルハンス細胞樹状突起のドッキング  
 ヒト皮膚におけるTJバリアとランゲルハンス細胞の同時三次元可視化。定常状態においては、ランゲルハンス細胞は樹状突起を皮膚表面に向けて投射しているが、TJバリアの内側に留まっているのに対し、活性化したランゲルハンス細胞は樹状突起を延長してTJバリアとドッキングする。

## 自然発症皮膚炎モデルマウスの解析

研究分担者 永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師

**研究要旨** アトピー性皮膚炎（AD）は臨床的に乾皮症、特徴的な分布を取る湿疹性病変を認め、緩解、増悪を繰り返しながら慢性に経過する疾患である。血清学的に高 IgE 血症を認め、ダニ抗原などに特異的な IgE 抗体を認めることより、アレルギー性疾患として認識されている。最近遺伝学的なアプローチから AD の重要な素因として角質構成蛋白であるフィラグリンの遺伝子変異が明らかになった。しかし、臨床的に AD を発症する乳児の必ずしも全てに先行するバリア障害（乾皮症）を認めず、フィラグリンの変異に起因するバリアの破綻のみではアトピー性皮膚炎の全てを説明できない。我々は表皮間細胞マーカーを発現する細胞特異的に Adam17/TACE を conditional KO したマウスを作製した。このマウスは生後 3 週目より明らかなアレルゲンの非存在下にて顕著な皮膚炎と高 IgE 血症を生じる。内因的な因子により AD 様の表現型を来している可能性があり、現在その機序を解析している

### A. 研究目的

アトピー性皮膚炎（AD）は臨床的に乾皮症、特徴的な分布を取る湿疹性病変を認め、緩解、増悪を繰り返しながら慢性に経過する疾患である。血清学的に高 IgE 血症を認め、ダニ抗原などに特異的な IgE 抗体を認めることより、アレルギー性疾患として認識されている。最近遺伝学的なアプローチから AD の重要な素因として角質構成蛋白であるフィラグリンの遺伝子変異が明らかになった。しかし、臨床的に AD を発症する乳児の必ずしも全てに先行するバリア障害（乾皮症）を認めず、フィラグリンの変異に起因するバリアの破綻のみではアトピー性皮膚炎の全てを説明できない。我々は外的因子の非存在下でアトピー性皮膚炎様の症状を自然発症するモデルマウスを作製し、かゆみ・皮膚炎の発症機序を解明したい。

### B. 研究方法

注目した分子は shedding convertase の代表的分子である TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme, ADAM17) である。TACE は免疫系の重要な上流分子である TNF $\alpha$  を膜上から cleave し、活性型に変換する分子であり、同時に epidermal growth factor (EGF) receptor のシグナリングにも重要な役割を果たしていることから免疫系とバ

リア形成に重要な分子であると考えられることができる。この分子の欠損マウスは胎生致死であるため、conditional KO (cKO) マウスを作製した。毛嚢幹細胞で発現されるマーカーの Cre マウスを ROSA26-LacZ マウスに交配してで Sox9 の fate mapping を行ったところ、表皮細胞は毛嚢間表皮も含めて陽性となり、その真皮内および皮下には明らかな陽性所見は得られなかった。これらの所見から、この Cre マウスを用いて TACE<sup>loxP/loxP</sup> の交配を行い、皮膚では表皮特異的に TACE を欠損させた cKO マウスを作製した。生まれてきたマウスの表現型を皮膚・掻爬行動の観察・血中サイトカイン・病理組織にて評価した。同じく表皮細胞に発現するケラチン 5-Cre マウスでも TACE cKO マウスを作製した。

### C. 研究結果

興味深いことに、TACE cKO マウスは生後 3 週目より明らかなアレルゲンの非存在下にて顕著な皮膚炎を生じた。皮膚炎は強い掻痒を伴い、マウスには掻破行動を認め、週齢を重ねるに連れて重症化した。また、血清学的には高 IgE 血症を呈し、外来抗原で免疫された Flaky tail mouse (フィラグリンの遺伝子変異を持つ) と比較しても同等以上の血清レベルを呈した。また、血中サイトカイン解析にて IL-17 および

G-CSF の高値を認め、免疫系の異常が推測された。病理組織では肥満細胞が真皮で増えており、アレルギー皮膚症としても合致する所見であった。ケラチン5で作製した TACE cKO マウスは同様の表現型を示したが、食事摂取不良に基づく発育不良を認めたため今後も毛嚢幹細胞マーカーCre-TACE cKOを中心に解析すべきと考えられた。

#### D. 考察

TACE cKO マウスは内因的な因子により AD 様の表現型を来している可能性があり、バリアおよび免疫学的観点から掻痒性皮膚炎の発症の機序を解析する必要がある。また、本マウスで異常を示すサイトカインや血球細胞を TACE cKO 背景で作製することにより発症する重要な因子が見つかるのではないかと期待している。

#### E. 結論

TACE cKO マウスは内因的な因子により AD 様の表現型を来している可能性があり、バリアおよび免疫学的観点から掻痒性皮膚炎の発症の機序を解析する必要がある。また、本マウスで異常を示すサイトカインや血球細胞を TACE cKO

背景で作製することにより発症する重要な因子が見つかるのではないかと期待している。

#### 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

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

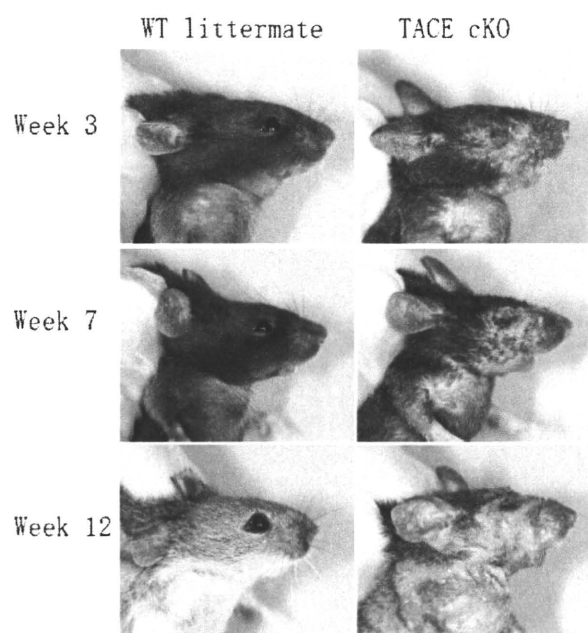


図1 野生型コントロール（左）と比較して TACE cKO（右）は生後3週間後頃より落屑と紅斑を伴う皮膚の表現型を呈し、激しい搔痒を伴う。

## 皮膚バリア機能とダニ抗原誘発喘息

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** アトピー性皮膚炎から喘息、鼻炎へと進展するアレルギーマーチの病態を明らかにするため、卵白アルブミンを抗原として経皮感作するモデルを作成し、その病態の解明を行ってきた。しかし、卵白アルブミンを抗原としたモデルでは遺伝的にフィラグリンを欠損しているマウスでもあらかじめ皮膚バリア機能を物理的に傷害することが感作成立に必要であり、ヒトでみられるアレルギーマーチを正確に反映していない可能性がある。そこで今回はそれ自体にプロテアーゼ活性があるダニ抗原を用いて、野生型マウスと遺伝的に皮膚バリア機能が低下しているフィラグリン欠損マウスで経皮感作、気道曝露を行い、気道炎症の評価を行った。このモデルでは耳介にダニ抗原の軟膏を反復塗布した後に同抗原を気道に投与するだけで喘息様の気道好酸球性炎症を誘発できた。更にこのモデルで観察された喘息様の気道炎症はフィラグリン欠損マウスで野生型マウスより強い傾向にあった。このことから、遺伝的な皮膚バリア機能低下がアレルギーマーチの成立に寄与している可能性が示唆された。

### 研究協力者

鈴木雄介 予防医学協会リサーチレジデント  
樹神元博 慶應義塾大学医学部大学院生

### 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、皮膚バリア機能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。

我々は卵白アルブミンの経皮的感作によりハプテンなしでも好酸球性気道炎症や気道過敏性亢進をきたすこと、このモデルにおいては一般的な喘息モデルと比較して気道過敏性が遷延することを前年までの研究で明らかにしたが、さらにこの遷延性気道過敏性亢進にはTh17系の免疫応答活性化が関わっていることも見出している。

しかし、卵白アルブミンを抗原としたモデルではフィラグリン欠損マウスにおいても皮膚バリア機能を物理的に傷害しなければ感作が

成立しなかった。そこで今回はそれ自体にプロテアーゼ活性があるダニ抗原の軟膏塗布により、物理的な皮膚障害なしに気道炎症をきたすモデルを作成し、それを用いて遺伝的な皮膚バリア機能低下（フィラグリン欠損）との相乗作用があるかを検討した。

### B. 研究方法

C57BL/6 マウスあるいは主任研究者の天谷らが開発したフィラグリン遺伝子欠損マウスの両耳介にダニ抽出抗原軟膏あるいはワセリン軟膏を週2回3週間塗布した後、同抗原溶液あるいは溶媒（PBS）の点鼻吸入を3日間隔で2回行った。曝露終了後4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を評価した。

### C. 研究結果

BAL液中の総細胞数と好酸球数はワセリン軟膏-PBS点鼻群、ワセリン軟膏-ダニ点鼻群、ダニ軟膏-ダニ点鼻群の順に増加していた（図1）。フィラグリン欠損マウスでは野生型マウスに比してダニ軟膏-ダニ点鼻群での好酸球数が多い傾向にあった（図1）。いずれのマウスにも軟膏を塗布した局所に肉眼的な皮膚炎は認められなかった。



## D. 考察

我々の今までの検討から、経皮感作による喘息モデルは Th2/Th17 を介した遷延性の気道過敏性亢進をきたし、従来の喘息動物モデルに比べてより臨床病態に即した表現型を呈することが明らかになっている。しかし、卵白アルブミンを抗原とし、皮膚の機械的損傷を加えて作成するモデルではフィラグリン欠損による皮膚バリア障害の影響を正確に評価できなかった。今回のモデルは皮膚の機械的損傷を伴わないため、フィラグリン欠損の影響をより正確に反映したと考えられる。

ただし、野生型マウスでも明らかな皮膚炎を伴わずに抗原感作が成立したことから、高濃度抗原暴露条件下ではアレルギー中のプロテアーゼ活性を介したバリア損傷等の機序により感作が成立しうると思われる。以上より、皮膚バリア機能と抗原曝露量の2つの因子によって感作が成立するかどうかの規定されていると考えられる。

## E. 結論

経皮的なダニ抗原感作によって気道曝露後の好酸球性気道炎症が増悪することが明らかとなった。特にアレルギー曝露量が少ない場合の抗原感作が皮膚バリア機能の障害度に依存することが示唆された。アレルギー回避と皮膚バリア機能維持の両者を組み合わせることで喘息の発症・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

### 1. 論文発表

<英語論文>

1. 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 hyperresponsiveness induced by epicutaneous

allergen sensitisation in BALB/c and C57BL/6 mice. *Int Arch Allergy Immunol* 152 Suppl: 67-74, 2010.

2. Y. Suzuki, M. Kodama, and K. Asano. Skin barrier-related molecules and pathophysiology of asthma. *Allergol Int* (Epub ahead of print), 2011.

<日本語論文>

1. 浅野浩一郎 重症喘息の病型 *IgE practice in asthma* 4: 27-29, 2010
2. 浅野浩一郎 重症喘息の病型と治療法 *臨床免疫・アレルギー科* 53: 174-178, 2010
3. 浅野浩一郎 呼吸器疾患と分子標的治療 -喘息- *呼吸と循環* 58: 987-993, 2010
4. 浅野浩一郎 喘息と COPD をめぐって 類似点と相違点 -遺伝素因- *アレルギー・免疫* 17: 1996-2002, 2010
5. 浅野浩一郎 気管支喘息の遺伝素因 up to date *呼吸* 30: 20-24, 2011

### 2. 学会発表

1. 小川里佳, 浅野浩一郎, 加川志津子, 松崎達, 寺島毅, 藤島清太郎, 石坂彰敏: 二本鎖 RNA による気道炎症・気道過敏性亢進と IL-17. **第50回日本呼吸器学会総会**, 京都, 2010. 4. 23-25.
2. 浅野浩一郎: シンポジウム「気道構成細胞から喘息の発症メカニズムを探る」 *気管支平滑筋細胞*. **第60回日本アレルギー学会秋期学術大会**, 東京, 2010. 11. 25-27.
3. 樹神元博, 小熊剛, 加川志津子, 加畑宏樹, 上石修史, 田中希宇人, 宮田純, 小倉裕美, 友松克允, 若木美佐, 塩見哲也, 福永興壺, 佐山宏一, 浅野浩一郎: 経皮抗原感作マウスにおける気道炎症と気道過敏性亢進の遷延. **第60回日本アレルギー学会秋期学術大会**, 東京, 2010. 11. 25-27.

### 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

## BALF 総細胞数

## BALF 好酸球数

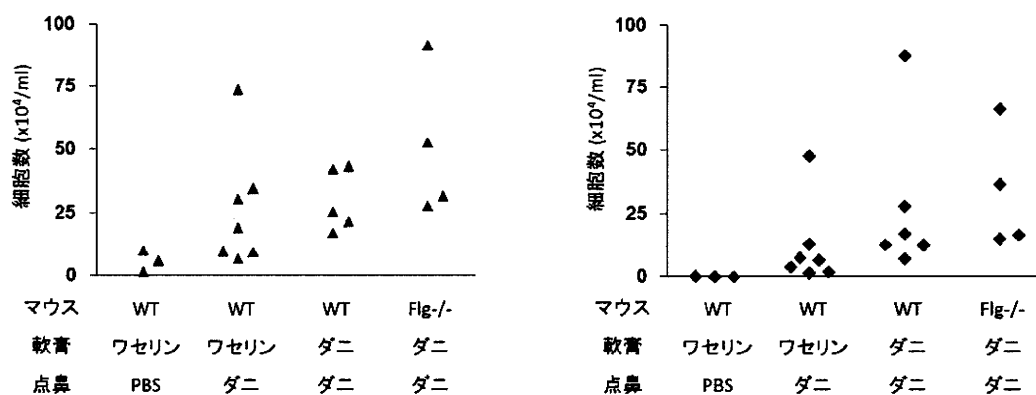


図1 野生型マウス(WT)とフィラグリン欠損マウス(Flg<sup>-/-</sup>)の気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数(左)と好酸球数(右)

ダニ抽出抗原軟膏あるいはワセリン軟膏をマウスの耳介に週2回3週間塗布した後、同抗原溶液あるいは溶媒(PBS)の点鼻投与を3日間隔で2回行った。曝露終了後4日目に気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、総細胞数と好酸球数を測定した。

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）

分担研究報告書

## 皮膚バリア機構と細菌感染

研究分担者 菅井基行 広島大学大学院医歯薬学総合研究科細菌学 教授

**研究要旨** 皮膚感染を起こした黄色ブドウ球菌に共通して認められる約 200 kDa のタンパク質に着目し、Skin Infection Related Protein (Skip)と名付けた。Skip は LPXTG motif、YSIRK motif を保有し菌体表層ペプチドグリカンに共有結合するタンパク質であることが明らかとなった。Skip 保有株は強いバイオフィーム産生性を示し、Skip を欠損させるとそのバイオフィーム産生能は低下した。一方で Skip 欠損株は細胞間マトリクスに対する結合能が著しく上昇した。このことから Skip は皮膚感染する黄色ブドウ球菌の皮膚への固着ならびに皮内侵襲に関わる重要な付着因子であることが示唆された。

### 研究協力者

久恒順三 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
細菌学助教  
加藤文紀 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
細菌学助教  
村上輝明 広島大学大学院医歯薬学総合研究科  
細菌学大学院生

ム SmaI 断片のパルスフィールド電気泳動像をクラスタリング解析し、全菌株を分類した。得られた約 40 のグループから数株をサンプリングし、合計 200 株について黄色ブドウ球菌の約 2,500 遺伝子の *orf* をスポットしたマイクロアレイを用いて comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行った。病原因子の解析には 96 well plate を用いた Biofilm 形成実験、細胞外基質をコーティングしたプレートを用いた付着実験、新生児マウスを用いた付着実験を行った。

### A. 研究目的

黄色ブドウ球菌はヒトと共生する病原細菌の代表であり、極めて多様な病原性を示すことで知られている。皮膚は黄色ブドウ球菌のレザバーとされているが、健常人皮膚からの黄色ブドウ球菌検出率は極めて低い。一方、アトピー性皮膚炎患者患部皮膚の大多数から黄色ブドウ球菌が検出される。しかしながらアトピー性皮膚炎の発症・増悪化における黄色ブドウ球菌感染の位置づけは不明確である。このため本研究の最終目標はアトピー性皮膚炎の病態形成における黄色ブドウ球菌感染の役割を明らかにすることである。

その前段階として臨床検体から分離された黄色ブドウ球菌を用いて、そのゲノタイプと病原性との関連性を検討し、皮膚感染する黄色ブドウ球菌のゲノムタイプを明らかにすること、皮膚感染する黄色ブドウ球菌の病原因子について検討することを目的とした。

### B. 研究方法

ゲノムタイピングには様々な病態から分離された黄色ブドウ球菌約 3,000 株を用いた。最初にゲノ

### C. 研究結果

日本全国から収集した黄色ブドウ球菌の代表株として 200 株を選別し、CGH 解析によりクラスタリングを行った。その結果、アトピー性皮膚炎患者から分離された菌は市中感染菌群に由来し、クラスターを形成することが明らかとなった。

皮膚感染を起こした黄色ブドウ球菌に共通して認められる約 200 kDa のタンパク質に着目し、Skin Infection Related Protein (Skip)と名付けた。Skip は LPXTG motif、YSIRK motif を保有し菌体表層ペプチドグリカンに共有結合するタンパク質であることが明らかとなった。相同組み替えにより Skip 破壊株を作製し、Skip の性状について検討した結果、Skip 保有株は菌同士の自己凝集を起こし試験管底に沈降することを見いだした。Skip 破壊株では自己凝集は消失していた。Skip 保有株は極めて強いバイオフィーム形成能を示した。Skip 破壊株はバイオフィーム形成能を消失した。Skip 保有株、Skip 破壊株はともに新生児マウス背部皮膚に付着能を示したが、細胞外

基質であるコラーゲンやフィブリノゲンをコーティングしたプレートには Skip 破壊株が優位に多く結合した。

#### D. 考察

臨床分離株のゲノタイピングからアトピー性皮膚炎患者皮膚に定着する黄色ブドウ球菌は特定のゲノタイプをもつことが明らかにされた。現在、代表的な株についてゲノム配列決定が進行中である。ゲノムシーケンスからアトピー性皮膚炎患者皮膚に定着する黄色ブドウ球菌に特徴的な遺伝子セットが明らかにされることを期待している

皮膚感染を起こした黄色ブドウ球菌に共通して認められる菌体表層タンパク質 Skip を同定した。Skip は菌のバイオフィーム形成に関与することが明らかとなった。黄色ブドウ球菌が皮膚に感染する過程でバイオフィームを産生して皮膚に固着する機能を発揮していると考えられる。また Skip 破壊株では皮下に存在する細胞外基質に強い親和性を示したことから、細菌が Skip の発現を調節することで皮膚バリアーをくぐり抜ける過程で巧妙に菌体表層の性状を変化させる可能性が示唆された皮膚感染を起こした黄色ブドウ球菌に共通して認められる菌体表層タンパク質 Skip を同定した。Skip は菌のバイオフィーム形成に関与することが明らかとなった。黄色ブドウ球菌が皮膚に感染する過程でバイオフィームを産生して皮膚に固着する機能を発揮していると考えられる。また Skip 破壊株では皮下に存在する細胞外基質に強い親和性を示したことから、細菌が Skip の発現を調節することで皮膚バリアーをくぐり抜ける過程で巧妙に菌体表層の性状を変化させる可能性が示唆された

#### E. 結論

アトピー性皮膚炎患者皮膚に定着する黄色ブドウ球菌が特定のゲノタイプをもつことを明らかにした。また皮膚感染を起こす黄色ブドウ球菌が特異的に発現する表層タンパク Skip を見だし、Skip が菌のバイオフィーム形成に関与することを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

<英語論文>

1. Iyori K, Hisatsune J, Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Ide K, Nagata M, Fukata T, Iwasaki T, Oshima K, Hattori M, Sugai M, Nishifuji K: Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. **FEMS Microbiol Lett**, 312 (2): 169-175, 2010.
2. Matsuo M, Kato F, Oogai Y, Kawai T, Sugai M, Komatsuzawa H: Distinct two-component systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* can change the susceptibility to antimicrobial agents. **J Antimicrob Chemother**, 65 (7): 1536-1537, 2010.
3. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P: A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol**, 185 (12): 7413-7425, 2010.
4. Franke GC, Bockenholt A, Sugai M, Rohde H, Aepfelbacher M: Epidemiology, variable genetic organization and regulation of the EDIN-B toxin in *Staphylococcus aureus* from bacteraemic patients. **Microbiology**, 156 (Pt 3): 860-872, 2010.
5. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M: Regulatory Mechanism for Exfoliative Toxin Production in *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun**, 79 (4): 1660-1670, 2011.
6. Mizumachi E, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, Uehara Y, Seo H, Sugai M: Clonal distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* on handles of handheld shopping baskets in supermarkets. **J Appl Microbiol**, 110 (2): 562-567, 2011.
7. Yamamoto M, Fujimoto H, Shimizu W, Kato F, Hisatsune J, Ito Y, Minami T, Sugai M: Identification and antimicrobial drug susceptibility of clinical *Staphylococcus* spp. isolates from canine superficial pyoderma at a primary veterinary hospital. **Jpn J Vet Dermatol**, in press: 2011.
8. Iyori K, Futagawa-Saito K, Hisatsune J, Yamamoto M, Sekiguchi M, Ide K, Son WG, Olivry T, Sugai M, Fukuyasu T, Iwasaki T, Nishifuji K: *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. **Vet Dermatol**: 2011.