

IV. 平成 22 年度班会議プログラム

平成 22 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

皮膚バリア障害によるアレルギーマーチ発症機序解明に関する研究

第 1 回班会議

研究代表者 天谷雅行

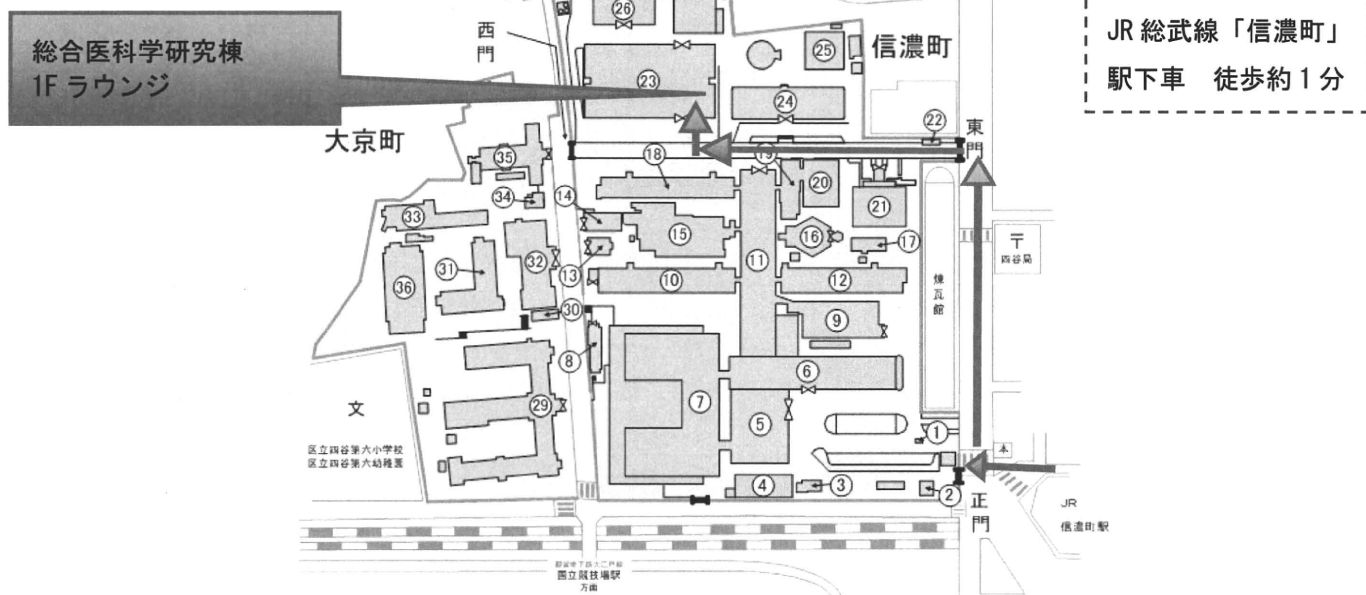
日時：平成 22 年 5 月 26 日（水）14:00-18:30

場所：慶應義塾大学医学部 総合医科学研究棟
（1 階ラウンジ）

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：03-3353-1211（代表）（ラウンジ:内線 63530）
FAX：03-3351-6880
E-mail：nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp

信濃町キャンパス
キャンパスマップ

☒ は主な校舎・病棟の出入口



- | | | | | | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|------------------|-----------|
| 1. 駐車料金所 | 8. 生協売店 | 15. 放射線治療部棟 | 22. 駐車管理所 | 29. 別館 | 36. 臨床研究棟 |
| 2. 花屋 | 9. リハビリテーション棟 | 16. 本館臨床講堂 | 23. 総合医科学研究棟 | 30. 三四会館 | |
| 3. スターバックスコーヒー | 10. 6号棟 | 17. 内分泌検査棟 | 24. 東校舎 | 31. 紅梅寮 | |
| 4. 食堂 | 11. 中央棟 | 18. 7号棟 | 25. ミュージウム | 32. 北里記念医学図書館棟 | |
| 5. 1号棟(A棟) | 12. 2号棟(臨床研究棟) | 19. CTスキャナー棟 | 26. 第2校舎 | 33. 白梅寮 | |
| 6. 1号棟(B棟) | 13. 霊安室 | 20. 第1、第2MR棟 | 27. 新教育研究棟 | 34. (財)ワックスマン財団 | |
| 7. 新棟 | 14. 包括先進医療センター棟 | 21. 孝養舎 | 28. グラウンド | 35. 第3校舎(予防医学校舎) | |

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

（座長：久保亮治）

14:10-14:30 フィラグリンノックアウトマウスを用いたフィラグリンの機能解析

川崎 洋¹、永尾圭介¹、久保亮治^{1 2}、畑 毅³、天谷雅行¹
（¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター、³コーセー化粧品）

14:30-14:50 経皮感作喘息モデルマウスにおける皮膚バリア機能の影響に関する検討

樹神元博、加川志津子、友松克允、小熊剛、浅野浩一郎（慶大呼吸器内科）

14:50-15:10 アトピー性皮膚炎モデルの免疫学的解析：皮膚樹状細胞の役割

椛島健治¹、江川形平¹、坂部純一²（¹京大皮膚科、²産業医大皮膚科）

15:10-15:30 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

工藤 純¹、佐々木貴史²、宮本憲一¹、塩濱愛子¹、神田聡子¹
¹慶大遺伝子医学、²慶大総合医科学研究センター

15:30-15:50 自然発症皮膚炎モデルマウスの解析

永尾圭介¹、堀内圭輔²、天谷雅行¹
（¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター）

- 休憩（20分） -

タイトジャンクションの機能解析

(座長：椛島健治)

- 16:10-16:30 ヒト表皮タイトジャンクションバリアの解析
久保亮治 1 2、永尾圭介 1、横内麻里子 1、吉田和恵 1、天谷雅行 1
(1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター)
- 16:30-16:50 皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割
古瀬幹夫 (神戸大細胞生物)

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

(座長：海老原全)

- 16:50-17:10 重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPaseの機能解析
松井 毅 (東京医歯大メディカル・トップ・トラック (MTT) プログラム)
- 17:10-17:30 日本人 AD 患者における FLG 変異解析の現状
佐々木貴史 1、河野通良 2、川崎洋 2、久保亮治 12、
定平知江子 3、海老原全 2、工藤純 4、天谷雅行 2
(1 慶大総合医科学研究センター、2 慶大皮膚科、
3 都立小児総合医療センター皮膚科、4 慶大遺伝子医学)
- 17:30-17:50 アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌感染の役割
菅井基行 (広島大細菌学)
- 17:50-18:10 皮膚のバリア機能を守る生活習慣とアトピー疾患の関係について
加藤則人、若森健、益田浩司 (京都府立医大皮膚科)

18:10-18:20 総合討論 (座長：天谷雅行)

18:20-18:30 事務連絡 海老原 全
閉会の辞 天谷雅行

19:00- 懇親会

演題抄録

フィラグリンノックアウトマウスを用いたフィラグリンの機能解析

川崎 洋¹、永尾圭介¹、久保亮治^{1 2}、畑 毅³、天谷雅行¹
(¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター、³コーセー化粧品)

皮膚バリア機能異常に起因するアトピー疾患マウスモデルを確立するため、フィラグリンノックアウト(KO)マウスを作製した。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 KO マウスと野生型マウス間で有意差を認めなかった。次にマウスの皮膚にカルセイン含有リポソームを塗布し、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 KO マウスでは野生型マウスに比べ、物質の角層透過性が亢進している所見が得られた。フィラグリン KO 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る。今後はフィラグリン欠損に伴う皮膚バリア機能異常を有する皮膚への経皮的抗原曝露に対する免疫応答の詳細を明らかにすることを目指す。

経皮感作喘息モデルマウスにおける皮膚バリア機能の影響に関する検討

樹神元博、加川志津子、友松克允、小熊剛、浅野浩一郎（慶大呼吸器内科）

【目的】経皮感作喘息モデルにおいて、フィラグリン(FNG)欠損に伴う皮膚バリア機能障害が及ぼす影響を検討する。【方法】C57BL/6（野生型）および FNG-KO マウスを用い、卵白アルブミン（OVA）を浸透させたパッチを背部皮膚へ2週間（各3日間/週）貼付（経皮感作）した後、4週目に2%OVAエアロゾル吸入暴露を行った。感作の過程で4回採血を行い、OVA 特異的 IgG1 濃度の経時変化を評価した。また吸入暴露後に気管支肺胞洗浄を施行し、気道炎症を評価した。【結果】野生型マウスに対し FNG-KO マウスではより早い時期から血清中 OVA 特異的 IgG1 濃度が上昇する傾向がみられたが、最終的には同程度の感作が成立した。2回感作後の OVA 吸入暴露により生じた好酸球性気道炎症についても両群間で差を認めなかった。【考察】FNG-KO マウスでは野生型マウスよりも早い時期から感作が成立する可能性が示されたが、今回検討した抗原量・感作期間では最終的な抗原特異的 IgG1 濃度、気道の好酸球性炎症に差が認められなかった。今後、感作のプロトコールを検討予定である。

アトピー性皮膚炎モデルの免疫学的解析：皮膚樹状細胞の役割

椛島健治¹、江川形平¹、坂部純一²（¹京大皮膚科、²産業医大皮膚科）

アトピー性皮膚炎発症にバリア機能の破綻が重要である事が近年明らかにされた。しかしながら、発症機序における免疫学的側面は不明の点が多く、アトピー性皮膚炎発症に関与する皮膚樹状細胞サブセットの同定とその役割の解明はなされていない。そこで、マウス

アトピー性皮膚炎モデルにおいて、皮膚樹状細胞サブセットを除去し、その臨床経過を観察することにより、アトピー性皮膚炎発症に関与する責任皮膚樹状細胞サブセットの同定を試みることを本研究の目的とする。さらに、サブセットを同定後、その役割の詳細の解明を試みたい。

皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

工藤 純¹、佐々木貴史²、宮本憲一¹、塩濱愛子¹、神田聡子¹
(¹慶大遺伝子医学、²慶大総合医科学研究センター)

これまでに皮膚バリア機能蛋白の遺伝子異常とアトピー性皮膚炎との関連を解明するために、日本人フィラグリン遺伝子の構造と多型、アトピー性皮膚炎患者における突然変異、フィラグリンの極端な減少が報告されていた *flaky tail (ft)* マウスのフィラグリン遺伝子の変異を解析し、報告した。今年度は候補遺伝子としてフィラグリン-2 遺伝子等の変異解析をアトピー性皮膚炎患者を対象として進める。一方、モデル生物として、遺伝的要因からアトピー性皮膚炎を頻発するイヌの品種に注目し、皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子変異の有無を検討する。変異の見つかった新規遺伝子については、ヒトのアトピー性皮膚炎患者における遺伝子変異の有無を検証する。

自然発症皮膚炎モデルマウスの解析

永尾圭介¹、堀内圭輔²、天谷雅行¹ (¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター)

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 *Sox9-cre* マウスと *Adam17/TACE* (TNF α converting enzyme)-floxed マウスを交配し、conditional KO マウスを作製した。この遺伝子改変マウスは生後 3 週目より顕著な皮膚炎と高 IgE 血症を生じ、現在その機序を解析している。

ヒト表皮タイトジャンクションバリアの解析

久保亮治^{1 2}、永尾圭介¹、横内麻里子¹、吉田和恵¹、天谷雅行¹
(¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター)

哺乳類表皮には2つのバリアが存在する。角質層によるバリアと顆粒細胞層の細胞間をシールするタイトジャンクション (TJ) によるバリアである。角質層によるバリアに比べて、表皮における TJ によるバリアは、未だ詳細に解析されていないのが現状である。我々は昨年、マウス表皮の TJ バリアの三次元可視化に初めて成功し、表皮ランゲルハンス細胞が活性化に伴いその樹状突起を伸ばして TJ バリアを超え、TJ バリア外の抗原を取得する機能を持つことを報告した。現在、表皮における TJ バリアの機能についての解析を進めると共に、ヒト皮膚における TJ バリアの可視化とランゲルハンス細胞との関わりについて解析を進めている。現在の進捗状況について報告する。

皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割

古瀬幹夫 (神戸大細胞生物)

1) 表皮顆粒層のタイトジャンクションが皮膚バリア機能に果たす役割を角質層分化への影響も含めて明らかにする。今年度中にクローディン1 ノックアウトマウスの角質層バリア機能を直接解析する。さらに、イオンと水チャネル様活性をもつ claudin-2 を皮膚特異的に発現誘導できるトランスジェニックマウスを作製する。成体マウスで表皮タイトジャンクションの小分子に対するバリアを人為的に破綻させ、上記課題を安定的に解析する。
2) トリセルラージャクションの基礎的な機能解析を進め、久保氏が発見したランゲルハンス細胞の突起によるトリセルラージャクションの開閉の機構の解明に有用な情報を提供していきたい。

重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPaseの機能解析

松井 毅 (東京医歯大メディカル・トップ・トラック (MTT) プログラム)

重層扁平上皮組織の形成機構を理解する為に、2002年から2003年にかけて、マウス皮膚表皮均一化cDNAライブラリーをプローブとして、高速 *in situ* hybridization法を用いて、表皮分化段階特異的発現を示す遺伝子群をスクリーニングした。約1万遺伝子の中から、重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPaseのマウスホモログを同定した。(Matsui *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:27512-25, 2006) その欠損マウスは、生後5週目から体側に小皺が発生する事を報告していたが、その形成原因は明らかではなかった。そこで、更に詳細に成体の皮膚表面の解析を行う為、ヘアレスマウス (HR-1:Hos) へと戻し交配を行い、無毛SASPaseノックアウトマウスを作成した。本発表ではその表現系解析について御報告する。

日本人 AD 患者における FLG 変異解析の現状

佐々木貴史 1、河野通良 2、川崎洋 2、久保亮治 12、
定平知江子 3、海老原全 2、工藤純 4、天谷雅行 2

1 慶大総合医科学研究センター、2 慶大皮膚科、
3 都立小児総合医療センター皮膚科、4 慶大遺伝子医学

これまでに本研究では、日本人 AD 患者における FLG 変異解析法を開発し、慶應義塾大学病院に通院する日本人 AD 患者および非 AD の対照群の FLG 変異解析を行ってきた。日本人 AD 患者における FLG 変異は、我々も報告した 2 種を含む 4 種の変異 (S2554X, S2889X, S3296X, 3321delA) に加え、最近、新たに 3 種の変異 (S1695X, Q1701X, K4022X) が報告された。今回は、新たに報告された 3 種の変異解析法の開発状況と変異解析の進行状況について報告する。

アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌感染の役割

菅井基行 (広島大細菌学)

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患から、敗血症・肺炎・毒素性ショック症候群まで、多様な病原性を示す事が知られている。アトピー性皮膚炎患者の大多数は、患部皮膚より黄色ブドウ球菌が検出される。しかしこの黄色ブドウ球菌の皮膚炎修飾における意味についてはいまだ十分な科学的説明がなされていない。私どもはこれまで臨床から分離された多検体の黄色ブドウ球菌を用いて、比較ゲノム解析を行い、黄色ブドウ球菌のゲノタイプとその菌の由来の間に関連性があることを見いだしている。本研究では我々の黄色ブドウ球菌ライブラリーの中でアトピー性皮膚炎に高い親和性を有する株のゲノム性状を解析し、モデル実験系を駆使して、アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌感染の持つ意味について明らかにしていく。

皮膚のバリア機能を守る生活習慣とアトピー疾患の関係について

加藤則人、若森健、益田浩司 (京都府立医大皮膚科)

2007 年度から、京都府和束町で出生した乳幼児全員を対象に、皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣のアレルギー予防における意義とその具体的な方法についての個別指導による教育介入を行っている。また、同町立小中学校生を対象に皮膚検診と末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、スギ・ダニ特異 IgE 抗体価、血清コレステロール値などの測定、アレルギー性鼻炎の有無や皮膚バリアに関係する生活習慣、居住環境などに関する質問票調査を継続している。

また、入浴や空調など日常生活での要因と皮膚の易刺激性の関連を非侵襲的に検討するため、テープストリッピングによる角質中のサイトカインの解析を行っている。

平成 22 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

皮膚バリア障害によるアレルギーマーチ発症機序解明に関する研究

第 2 回班会議

研究代表者 天谷雅行

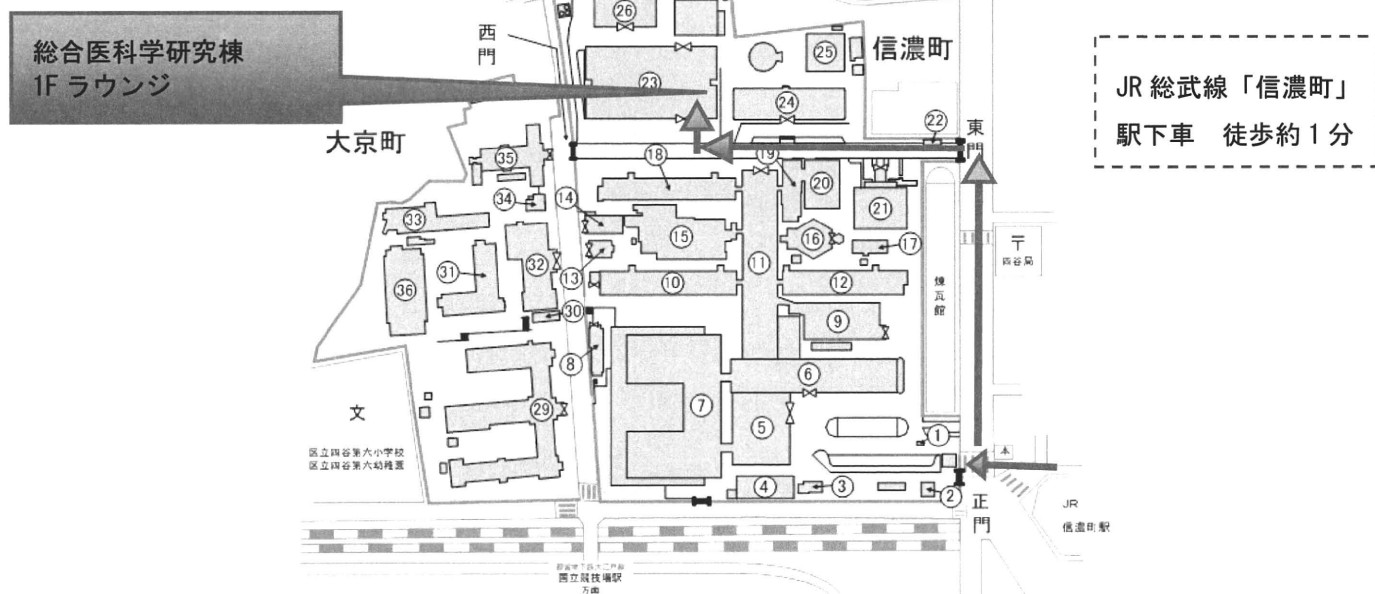
日時：平成 22 年 11 月 12 日（金）14:00-18:30

場所：慶應義塾大学医学部 総合医科学研究棟
（1 階ラウンジ）

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：03-3353-1211（代表）（ラウンジ:内線 63530）
FAX：03-3351-6880
E-mail：nagatomi@sc.itc.keio.ac.jp

信濃町キャンパス
キャンパスマップ

☒ は主な校舎・病棟の出入口



- | | | | | | |
|----------------|-----------------|--------------|--------------|------------------|-----------|
| 1. 駐車料金所 | 8. 生協売店 | 15. 放射線治療部棟 | 22. 駐車管理所 | 29. 別館 | 36. 臨床研究棟 |
| 2. 花屋 | 9. リハビリテーション棟 | 16. 本館臨床講堂 | 23. 総合医科学研究棟 | 30. 三四会館 | |
| 3. スターバックスコーヒー | 10. 6号棟 | 17. 内分泌検査棟 | 24. 東校舎 | 31. 紅梅寮 | |
| 4. 食堂 | 11. 中央棟 | 18. 7号棟 | 25. ミュージアム | 32. 北里記念医学図書館棟 | |
| 5. 1号棟(A棟) | 12. 2号棟(臨床研究棟) | 19. CTスキャナー棟 | 26. 第2校舎 | 33. 白梅寮 | |
| 6. 1号棟(B棟) | 13. 霊安室 | 20. 第1、第2MR棟 | 27. 新教育研究棟 | 34. (財)ワックスマン財団 | |
| 7. 新棟 | 14. 包括先進医療センター棟 | 21. 孝養舎 | 28. グラウンド | 35. 第3校舎(予防医学校舎) | |

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

（座長：久保亮治）

14:10-14:30 フィラグリンノックアウトマウスの経皮免疫応答の解析

川崎 洋¹、永尾圭介¹、久保亮治^{1 2}、畑 毅³、天谷雅行¹
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター、3 コーセー化粧品

14:30-14:50 アトピー性皮膚炎モデルの免疫学的解析：皮膚樹状細胞の役割

椛島健治、江川形平、中島沙恵子
京大皮膚科

14:50-15:10 自然発症皮膚炎モデルマウスの解析

永尾圭介¹、足立剛也¹、キタシマ ユミ ダニエラ¹、堀内圭輔²、天谷雅行¹
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター

15:10-15:30 ダニ抗原によるdanger signal（細胞外ATP）の遊離とIL-23/IL-17A経路の活性化

鈴木雄介、樹神元博、加川志津子、浅野浩一郎
慶大呼吸器内科

－ 休憩（10分）－

皮膚バリア機構と細菌感染

（座長：永尾圭介）

15:40-16:00 皮膚感染黄色ブドウ球菌が保有する細胞壁結合タンパク質 Skip

久恒順三、村上輝明、小島太郎、加藤文紀、菅井基行
広島大細菌学

16:00-16:20 重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPaseの機能解析

松井 毅
東京医歯大メディカル・トップ・トラック（MTT）プログラム

16:20-16:40 皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割

岩本典子、古瀬幹夫
神戸大細胞生物

16:40-17:00 皮膚バリア構造の可視化とバリア機能評価

久保亮治 1 2、永尾圭介 1、横内麻里子 1、吉田和恵 1、川崎洋 1、天谷雅行 1
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター

- 休憩 (10分) -

アトピー性皮膚炎における
皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子解析と疫学解析

(座長：海老原全)

17:10-17:25 Flaky tail マウスにおける *ma* 原因遺伝子の解析

佐々木貴史 1 2、塩濱愛子 3、川崎洋 1、久保亮治 1 2、工藤純 3、天谷雅行 1
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター、3 慶大遺伝子医学

17:25-17:40 日本人 AD 患者における FLG 変異解析の現状

佐々木貴史 1 2、海老原全 1、川崎洋 1、久保亮治 1 2
定平知江子 3、工藤純 4、天谷雅行 1
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター
3 都立小児総合医療センター皮膚科、4 慶大遺伝子医学

17:40-18:00 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

工藤 純 1、塩濱愛子 1、神田聡子 1、宮本憲一 1、佐々木貴史 2 3
1 慶大遺伝子医学、2 慶大総合医科学研究センター、3 慶大皮膚科

18:00-18:20 皮膚のバリア機能を守る生活習慣とアトピー疾患の関係について

加藤則人、若森健、益田浩司 (京都府立医大皮膚科)

18:20-18:30 総合討論 (座長：天谷雅行)

事務連絡 海老原 全

閉会の辞 天谷雅行

19:00- 懇親会

演題抄録

14:10-14:30

フィラグリノックアウトマウスの経皮免疫応答の解析

川崎 洋¹、永尾圭介¹、久保亮治^{1,2}、畑 毅³、天谷雅行¹
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター、3 コーセー化粧品

皮膚バリア機能異常に起因するアトピー疾患マウスモデルを確立するため、フィラグリノックアウト(KO)マウスを作製した。我々はこれまでにフィラグリノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、物質の角層透過性が亢進していることを明らかにした。今回、フィラグリノックアウト皮膚への経皮的抗原曝露後の免疫応答の詳細を明らかにするため、刺激性接触皮膚炎反応、ハプテン誘導性接触過敏反応、蛋白抗原塗布後の液性免疫応答に関する反応評価を行った。その結果、いずれの系でもフィラグリノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ経皮免疫応答が亢進していることが観察された。我々の作製したフィラグリノックアウトマウスは皮膚バリア機能異常が関連するアトピー性皮膚炎の発症機序の解析に有用なモデルとなる。

14:30-14:50

アトピー性皮膚炎モデルの免疫学的解析：皮膚樹状細胞の役割

椋島健治、江川形平、中島沙恵子
京大皮膚科

アトピー性皮膚炎発症に関与する皮膚樹状細胞サブセットや責任分子の同定とその役割の解明はなされていない。そこで、OVA 貼付によるマウスアトピー性皮膚炎モデルにおいて、皮膚樹状細胞サブセットを除去し、その臨床経過を観察することにより、ランゲルハンス細胞が T 細胞の活性化や Th2 への分化に重要な役割を果たしている事を明らかにした。また、ランゲルハンス細胞上に存在する TSLP-TSLP 受容体シグナルが Th2 への分化に関与していることを示唆する所見を得たので報告する。

14:50-15:10

自然発症皮膚炎モデルマウスの解析

永尾圭介¹、足立剛也¹、キタシマ ユミ ダニエラ¹、堀内圭輔²、天谷雅行¹
1 慶大皮膚科、2 慶大総合医科学研究センター

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 Sox9-cre マウスと Adam17/TACE (TNFa converting enzyme)-floxed マウスを交配し、conditional KO マウスを作製した。この遺伝子改変マウスは生後 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。

15:10-15:30

ダニ抗原による danger signal（細胞外 ATP）の遊離と IL-23/IL-17A 経路の活性化

鈴木雄介、樹神元博、加川志津子、浅野浩一郎
慶大呼吸器内科

我々は今まで卵白アルブミン経皮感作喘息モデルを用いて検討を行ってきたが、フィラグリンノックアウトマウスで血清中の抗原特異的 IgG1 が若干早く増加するものの、抗原曝露後に生じる気道炎症は野生型マウスと同等である。この理由として剃毛後パッチを長期間貼付することによる皮膚損傷が、フィラグリン欠損によるバリア機能障害を凌駕していることが考えられる。しかし、卵白アルブミンを塗布するだけではフィラグリンノックアウトマウスであっても表皮を透過して抗原提示細胞に到達しうるか疑問である。一方、ダニ抗原を気道上皮細胞に作用させると danger signal である細胞外 ATP の遊離をきたすことを見出し、表皮においても同様の現象が起きる可能性がある。細胞外 ATP は樹状細胞を介した IL-23/IL-17A 経路の活性化をきたし、さらに IL-23/IL-17A 経路は経皮感作モデルにおける気道炎症と気道過敏性の遷延に必要であった。以上の所見より、皮膚バリア機能障害の存在下であれば細胞外 ATP がより容易に表皮下の抗原提示細胞に到達することで、IL-23/IL-17A 経路活性化による遷延性の気道炎症と気道過敏性をきたす可能性がある。

15:40-16:00

皮膚感染黄色ブドウ球菌が保有する細胞壁結合タンパク質 Skip

久恒順三、村上輝明、小島太郎、加藤文紀、菅井基行
広島大細菌学

ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群から分離された黄色ブドウ球菌に発現している高分子量細胞壁結合タンパク質を見だし、Skin Infection related Protein (Skip) と名付けた。Skip を保有する黄色ブドウ球菌は強いバイオフィーム産生性を示し、Skip 遺伝子破壊株はバイオフィーム産生能を失う。このことから、Skip は皮膚表面での固着に関わる因子と考えられる。Skip 産生株の皮膚感染における Skip の役割について研究の進捗状況を報告する。

16:00-16:20

重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPaseの機能解析

松井 毅

東京医歯大メディカル・トップ・トラック (MTT) プログラム

重層扁平上皮組織の形成機構を理解する為に、重層上皮特異的蛋白質分解酵素SASPase(Skin Aspartic Protease)の機能解析を行っている。SASPaseは顆粒層特異的に発現する酸性プロテアーゼである。その欠損マウスは、生後5週目から体側に小皺が発生する事を報告していたが、その形成原因は明らかではなかった。そこで、詳細に成体皮膚の角層解析を行う為、ヘアレスマウス(HR-1:Hos)へと戻し交配を行い、無毛SASPaseノックアウトマウスを作成した。無毛SASPaseノックアウトマウスは、生後5週目ぐらいから皮膚表面が乾燥肌様を示し、角層の肥厚が認められた。また、フィラグリンの分解異常も認められ、乾燥肌・皺の関連性が示唆され始めている。現在は、SASPase欠損による角層内の水分量減少がどのようにして引き起こされるのかを解析しようとしている。

16:20-16:40

皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割

岩本典子、古瀬幹夫

神戸大細胞生物

皮膚からの脱水により生後致死となるクローディン1遺伝子ノックアウトマウスについて、これまで角質層の形態的、生化学的な異常を明らかにしてきた。今回、このマウスの角質層のバリア機能を直接解析した。P0マウスより採取した皮膚から角質層だけを単離し、角質層を介する水分蒸散を測定したところ、ノックアウトマウスの角質層では、野生型およびヘテロマウスと比較して過剰な水分蒸散が観察された。したがって、クローディン1によって形成される顆粒層のタイトジャンクションのバリア機能が、角質層の正常な分化に必要な液性環境の維持を介して皮膚バリア機能の形成に寄与していることが示唆された。

また、クローディン1とともに顆粒層のタイトジャンクションを構成するクローディン4の欠失マウスを作製するために、現在ヘテロマウス同士を交配させている。

16:40-17:00

皮膚バリア構造の可視化とバリア機能評価

久保亮治^{1,2}、永尾圭介¹、横内麻里子¹、吉田和恵¹、川崎洋¹、天谷雅行¹

¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター

アトピー性皮膚炎の発症要因として、フィラグリン変異による皮膚バリア機能異常が注目されている。皮膚のバリア機能を測定する方法としては、経皮的水分蒸散量の測定、色素・蛍光色素の皮膚への浸透度評価などがある。一方これまでに我々は、皮膚バリアが角質層バリアとタイトジャンクションバリアの2つのバリアから構成されていることを示し

てきた。すなわち、皮膚バリア機能異常を評価するためには、これら2つのバリア機能を別々に評価することが必要となる。現在、これら2つのバリアの適切な可視化方法と、バリア機能評価方法の開発を行っている。

17:10-17:25

Flaky tail マウスにおける *ma* 原因遺伝子の解析

佐々木貴史^{1 2}、塩濱愛子³、川崎洋¹、久保亮治^{1 2}、工藤純³、天谷雅行¹
¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター、³慶大遺伝子医学

Flaky tail マウス(ft)は、CBA マウスコロニーから生じたバサバサした毛を特徴する matted(*ma*)マウスから、さらに、小さな耳とカサカサな皮膚を特徴とする ft の変異が生じたマウスであり、アトピー性皮膚炎(AD)様皮膚炎を自然発症するマウスとして注目されている。これら ft と *ma* の遺伝形式は常染色体劣性であり、この2つの遺伝子は染色体3番の近接領域に存在している事が明らかになっている。このうち ft は Flg 遺伝子の1塩基欠失(5303delA)である事を報告している。

最近、ft マウスと C57BL/6 マウスと交配の結果、ft/ft でバサバサな毛をもたないマウスを得た。このマウスは典型的な AD 様皮膚炎を発症しなかったことから、ft マウスでの皮膚炎発症には Flg だけでなく *ma* の関与が示唆された。この事から、新たな AD 様皮膚炎関連遺伝子を同定するために、*ma* 原因遺伝子同定を試みた。

17:25-17:40

日本人 AD 患者における FLG 変異解析の現状

佐々木貴史^{1 2}、海老原全¹、川崎洋¹、久保亮治^{1 2}
定平知江子³、工藤純⁴、天谷雅行¹
¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター
³都立小児総合医療センター皮膚科、⁴慶大遺伝子医学

これまでに、日本人 AD 患者における FLG 変異解析法を開発し、慶應義塾大学病院に通院する日本人 AD 患者および非 AD の対照群の FLG 変異解析を行ってきた。日本人 AD 患者における FLG 変異は、これまでに8種の変異の変異が報告されている。今回は、新たに報告された FLG 変異を含む全8種の変異解析の結果について報告する。

また、さらなる AD 発症機序の解明には FLG 解析の普及が必要である。これまでの FLG 変異解析法は、変異を含む FLG リピートを特異的に PCR 法で増幅し、制限酵素処理もしくは DNA 塩基配列決定により行ってきた。この条件では、再現性は必ずしも良くなく、これらが解析の普及の妨げとなってきた。そこで、これらを再現性よく簡易的に行える Taqman プローブを用いた変異解析法の確立をおこなった。

17:40-18:00

皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

工藤 純¹、塩濱愛子¹、神田聡子¹、宮本憲一¹、佐々木貴史^{2,3}
1 慶大遺伝子医学、2 慶大総合医科学研究センター、3 慶大皮膚科

アトピー性皮膚炎 (AD) の原因遺伝子の探索のため、フィラグリン (FLG) ファミリー遺伝子の中で FLG に次いで皮膚での発現が高い FLG2 遺伝子を候補とし、その変異解析法を確立した。FLG2 のリピート配列間の塩基配列の違いを利用して、4 本の PCR 断片によって全翻訳領域を特異的に増幅し、直接シーケンシングを行う条件を設定し、AD 患者、健常対照者各 16 人の全解読を行った結果、FLG2 は 3 種の遺伝子型に分類され、また AD 患者 1 人に 7bp の欠失を同定した。同変異は、最終的に AD、健常対照者共に 32 人中 1 人ずつに見つかっており、AD との関連の解明には、さらなる検討を要する。一方、イヌの AD と FLG との関連を解明するために、①FLG タンパクの検出法を検討し、②FLG 遺伝子の非リピート部の配列から 3 種の遺伝子型に分類した。当初予定したロング PCR 法での増幅が見られなかったため、新たな解析方法を検討中である。

18:00-18:20

皮膚のバリア機能を守る生活習慣とアトピー疾患の関係について

加藤則人、若森健、益田浩司 (京都府立医大皮膚科)

乳児期からの皮膚のバリア機能を守る生活習慣の継続が、成長に伴うアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、喘息などのアトピー疾患の発症率や血清総 IgE 値、スギ・ダニ特異 IgE 値の上昇に影響をおよぼすかを検討するために、2007 年度から京都府和束町で出生した乳幼児全員を対象に皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣のアレルギー予防における意義とその具体的な方法についての個別指導を継続して行っている。また、同町立小中学校生を対象に皮膚検診と末梢血好酸球数、血清総 IgE 値、スギ・ダニ特異 IgE 抗体価、血清コレステロール値などの測定、アトピー疾患の有無や皮膚バリアに関係する生活習慣、居住環境などに関する質問票調査を継続している。

さらに、皮膚のバリア機能異常と表皮角化細胞のサイトカイン産生の関係を非侵襲的に評価するため、角層のテープストリッピング検体によるサイトカインの解析を行っている。

V. 平成 22 年度構成員名簿

班員構成

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	天谷雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科学	教授
研究分担者	古瀬幹夫	神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学 講座 細胞生物学分野	教授
	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
	工藤 純	慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室	教授
	加藤則人	京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学	教授
	椛島健治	京都大学大学院医学研究科皮膚科学	准教授
	浅野浩一郎	慶應義塾大学医学部呼吸器内科学	准教授
	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)	特任講師
	海老原 全	慶應義塾大学医学部皮膚科学	専任講師
	久保亮治	慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター	特別研究講師
	永尾圭介	慶應義塾大学医学部皮膚科学	専任講師
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: 03-3351-6880 E-mail: marikokajima@z3.keio.jp	教授秘書
経理事務連絡 担当責任者	光永明弘	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: 03-5363-3507 E-mail: ras-shinanomachi-kourou@adst.keio.ac.jp	

