

201126013A

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

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

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成24（2012）年 3月

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

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

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成24（2012）年 3月

## 目 次

I. 平成23年度総括研究報告	1
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 研究代表者 天谷 雅行	
II. 平成23年度分担研究報告	
フィラグリンの関与する皮膚バリア機能の解析	11
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 天谷 雅行	
ダニ抗原経皮感作喘息におけるフィラグリン欠損の影響	15
慶應義塾大学医学部 呼吸器内科学 准教授 浅野 浩一郎	
皮膚バリア機構と細菌感染	19
広島大学大学院医歯薬学総合研究科細菌学 教授 菅井 基行	
プロフィラグリン切断酵素SASPaseによる角質層水分制御機構	23
京都大学 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) 特定拠点助教 松井 毅	
経皮免疫におけるランゲルハンス細胞の役割	26
慶應義塾大学医学部皮膚科学 専任講師 永尾 圭介	
ヒト表皮タイトジャンクションによるバリア機能の解析に関する研究	29
慶應義塾大学医学部 総合医科学研究センター 特任講師 久保 亮治	
皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析	34
慶應義塾大学医学部 遺伝子医学研究室 教授 工藤 純	
日本人AD患者におけるFLG変異解析	38
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 准教授 海老原 全	
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	42
京都府立医科大学大学院医学研究科 皮膚科学 教授 加藤 則人	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 平成23年度班会議プログラム	49
V. 平成23年度構成員名簿	65



# I. 平成 23 年度総括研究報告

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）  
総括研究報告書

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

研究代表者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨

本研究では、皮膚バリア機能障害の観点から、アレルギーマーチを起こすアトピー性疾患の発症に関する病態解明を行い、皮膚バリア機能補正によるアレルギー疾患発症抑制・予防への分子基盤を確立する。フィラグリン欠損に伴う角層バリア機能障害に起因するアレルギーマーチ発症機序を解明するとともに、フィラグリン以外のアトピー性疾患発症新規因子を同定する。

本年度は、フィラグリンノックアウト（KO）マウスの安定供給が確立し、多角的に機能解析することが可能となった。フィラグリンが欠損することのより、角層下層に見られ、角層構造を補強していると考えられているケラチンパターンが消失しており、物理的に角層構造が脆弱になっていることが明らかとなった。経皮的なダニ抗原感作によってTh17サイトカイン発現と遷延性の好酸球性気道炎症、IgE抗体産生、気道粘液産生が、フィラグリンKOマウスは野生型に比べて亢進していた。皮膚におけるフィラグリン欠損の有無が、肺における気道炎症の性質に影響を与えることが初めて示された。さらに、アトピー性皮膚炎患者から分離された黄色ブドウ球菌株は、野生型マウスに比べ、著しく強くフィラグリンKOマウス皮膚に固着していることが示された。プロフィラグリンの分解異常を示すSASPase欠損無毛マウスにおいて、天然保湿因子は正常でありながら、乾燥皮膚を呈することが示された。SASPase欠損無毛マウスは、乾燥皮膚に至る新しい分子機構を解明する上で、有用なツールとなる。ランゲルハンス細胞は、TJの外側から捕捉した細菌毒素に対して中和活性を示すIgG抗体産生を誘導し、皮膚の構造を保ちながら外来抗原に対して免疫応答を成立させることを明らかにした。マウスのみならず、ヒト皮膚においても、TJバリアを3次元的に観察する方法論を確立し、アトピー性皮膚炎皮膚において、LCとIDECは表皮内で異なる位置に存在し、LCはTJを超えて樹状突起を伸ばすが、IDECは主に水平方向に樹状突起を伸ばすことが観察された。

本研究の成果により、アレルギーマーチを起こすアトピー性疾患の発症機序において、皮膚バリア障害による持続的経皮免疫が根本的な要因であることを示す確固たる免疫学的基盤が確立されつつある。

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	松井 毅	京都大学 物質-細胞統合シス テム拠点 特定拠点助教
工藤 純	慶應義塾大学医学部 遺伝子医学 教授	海老原 全	慶應義塾大学医学部 皮膚科 准教授
加藤則人	京都府立医科大学大学院 医学研究科皮膚科 教授	久保亮治	慶應義塾大学医学部総合医科 学研究センター 特任講師
浅野浩一郎	慶應義塾大学医学部 呼吸器内科 准教授	永尾圭介	慶應義塾大学医学部 皮膚科 専任講師

## A. 研究目的

本研究では、皮膚バリア機能障害の観点から、アレルギーマーチを起こすアトピー性疾患の発症に関する病態解明を行い、皮膚バリア機能補正によるアレルギー疾患発症抑制・予防への分子基盤を確立する。フィラグリン欠損に伴う角層バリア機能障害に起因するアレルギーマーチ発症機序を解明するとともに、フィラグリン以外のアトピー性疾患発症新規因子を同定する。

本年度は、フィラグリンノックアウト (KO) マウスを用いて、角層バリア機能解析を進めるとともに、経皮抗原感作による喘息モデルマウスを確立する。特に、皮膚におけるフィラグリン欠損の有無が、気道における免疫反応にどのように影響を及ぼすのか検討する。アトピー性皮膚炎患者皮膚において高率に検出される黄色ブドウ球菌が、皮膚炎発症後付着するのか、皮膚炎発症前にフィラグリンが欠損しているだけで付着しやすくなるのか、フィラグリン欠損の有無と黄色ブドウ球菌の角層への付着性、固着性の関連を検討する。フィラグリン以外のアトピー性疾患発症因子としてフィラグリン分解酵素に注目し、新規に同定した SASPase の機能解析を行うとともに、ヒトにおける遺伝子解析を行う。活性化した表皮ランゲルハンス細胞はタイトジャンクション (TJ) の外側へ樹状突起を伸ばすが、樹状突起先端部から取り込まれた蛋白抗原に対して免疫反応が惹起されるのか検討する。アトピー性皮膚炎患者、および正常人皮膚におけるTJを可視化するとともに、ランゲルハンス細胞とアトピー性皮膚炎患者皮膚において検出される表皮内樹状細胞 (Inflammatory Dendritic Epidermal Cell, IDEC) のTJとの協調関係を明らかにする。昨年度より継続的に行っているフィラグリン以外の皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析を進めるとともに、日本人データの蓄積、バリア機能低下とアレルギー性疾患発症の疫学的解析を継続する。

## B. 研究方法

### 1) フィラグリンKOマウスの角層機能解析

フィラグリンを欠損した角層における物理的脆弱性に関して、テープストリップ法を用いて詳細に検討するとともに、電子顕微鏡を用いて超微形態を観察する。

### 2) フィラグリンKOマウスを用いた喘息モデルマウスの開発

C57BL/6マウスあるいはフィラグリンKO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、3~8週間塗布した後、同種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4-14日目に気管支肺胞洗浄 (BAL)、採血、肺あるいは耳介の病理組織染色を行い評価した。

### 3) フィラグリン欠損角層における黄色ブドウ球菌付着性・固着性の検討

臨床分離株代表株200株から選択した数株を用いて、フィラグリンKO新生児マウスの皮膚に対する付着性・固着性の検討を行った。

### 4) フィラグリン分解酵素SASPaseの機能解析、及び変異遺伝子解析

皮膚顆粒層に特異的に発現するプロテアーゼSASPaseの変異解析を、健常人群26人、アトピー性皮膚炎群196人に対して行い、その結果得られた変異を導入したリコンビナントSASPase変異体を作成し、自己分解反応を計測した。SASPase欠損無毛マウス角層中の天然保湿因子を解析した。

### 5) ランゲルハンス細胞 (LC) による細菌由来抗原に対する経皮免疫能の解析

表皮剥脱毒素 (ETA) 産生性黄色ブドウ球菌の感染によって生じる黄色ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) のマウスモデル系を確立した。ETAはDsg1を切断して水疱を誘導するが、皮膚に過剰量を外用しても、TJを超えることはなく、水疱も誘導されない。従って、パッチ法による経皮免疫を行った場合に、TJの外側のLCの樹状突起先端からのみ抗原捕捉が可能である。ETAを抗原としたパッチ法により経皮感作を行い、経皮免疫による生体防御機構を解析した。

### 6) アトピー性皮膚炎表皮のTJバリアと表皮内樹状細胞の三次元可視化

アトピー性皮膚炎病変部皮膚を用いて、TJバリアと表皮内樹状細胞との立体位置関係、樹状細胞の機能変化について検討した。

### 7) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

フィラグリン2 (*FLG2*) 遺伝子の変異解析をアトピー性皮膚炎患者と健常人に対して行った。

### 8) 皮膚バリア機能を改善させる生活習慣と教育介入によるアトピーマーチ予防に関する疫学的検討

京都府山間部の一小・中学校の全児童・生徒を対象として、皮膚科検診、教育介入を行い、アトピー性皮膚炎、乾燥皮膚、アレルギー性鼻炎、喘息を持つ児童・生徒の頻度の推移を検討する。

## C. 結果

### 1) フィラグリンK0マウスの角層機能解析

テープストリッピングを用い、角質剥離量を定量的に評価する手法により、フィラグリン欠損皮膚の角層は脆弱であり、物理的刺激により角層が剥がれやすくなっていることが示された。テープストリップ後のTEWL値がフィラグリンK0マウスでより高く、フィラグリン欠損に起因する物理的脆弱性が、他の皮膚バリア異常を二次的に誘導する可能性が示唆された。また、フィラグリンK0マウス角層の電子顕微鏡により、顆粒層上層では、ケラトヒアリン顆粒やケラチン線維束のサイズや配列、ネットワークが乱れており、角層下層では、ケラチンパターンが観察されなかった。

### 2) フィラグリンK0マウスを用いた喘息モデルマウスの開発

ダニ抽出抗原暴露では野生型、フィラグリンK0マウスいずれでも気道炎症を誘導したが、フィラグリンK0マウスでは野生型マウスと比較して、暴露7日目の炎症収束相での有意な炎症遷延が認められた。同様に血清総IgE値上昇や気道粘液産生亢進もフィラグリンK0マウスで遷延していた。ダニ抗原で経皮感作したマウスの肺細胞あるいは脾細胞を抗原で再刺激しサイトカイン産生を検討したところ、Th17系サイトカインであるIL-17A産生はフィラグリンK0マウスで有意に亢進していた。さらに皮膚局所においてもTh17系サイトカインmRNA発現が増強していた。いずれのマウスも8週間軟膏を塗布した局所で明らかな皮膚炎を呈さなかった。

### 3) フィラグリン欠損角層における黄色ブドウ球菌付着性・固着性の検討

新生児マウス皮膚を用いた付着実験では、野生型、フィラグリンK0マウスにおいて野生型により高い付着性を認めた。ところが、付着後皮膚上で菌を培養し、バイオフィーム等を産生して強く皮膚上に接着するかどうかを検討する固着実験法においては、アトピー性皮膚炎由来株は野生型に比較しフィラグリンK0マウス皮膚に著しく強い固着性を示した。

### 4) フィラグリン分解酵素SASPaseの機能解析、及び変異遺伝子解析

アトピー性皮膚炎患者5人(196人中)にヘテロジェニックなミスセンス変異(A54S, R311C, I186T, V187I)が認められた。健常人2人(26人中)にもヘテロジェニックなミスセンス変異(D232Y, V243A)が同定された(Matsui et al, EMBO Mol Med, 2011)。

リコンビナントSASPaseを用いた自己分解活性測定の結果、これらの変異により活性が抑制されている事が明らかとなった。SASPase欠損無毛マウスの角質層における遊離アミノ酸は野生型に比し有意な差を認めなかった。

### 5) ランゲルハンス細胞(LC)による細菌由来抗原に対する経皮免疫能の解析

ETAの経皮感作により、抗ETA抗体が誘導され、ETA腹腔内投与による水疱形成は著しく抑制された。感作時、LCを除去すると抗体産生を認めず、重篤な水疱形成を認めた。この結果により、TJの外側でLC樹状突起先端部から捕捉された蛋白抗原に対して免疫反応が惹起されることが示され、皮膚における新たな感作機構を明らかにした(Ouchi et al, JEM 2011)。

### 6) アトピー性皮膚炎表皮におけるTJバリアと表皮内樹状細胞の解析

アトピー性皮膚炎病変部皮膚において、TJのバリア機能について正常皮膚との違いは認められなかった。アトピー性皮膚炎皮膚では、活性化してTJバリアの外側に樹状突起を伸ばすLCが増加していた。また、LCに加えて、IDEC(Inflammatory Dendritic Epidermal Cell)と呼ばれるランゲリン陰性の表皮内樹状細胞の出現が観察された。LCとは異なり、IDECは樹状突起を水平方向に伸ばし、常にTJバリアの内側にとどまることが明らかとなった。すなわち、LCとIDECでは抗原捕捉様式が異なると考えられ、LCとIDECの機能の違いを明らかにした。

### 7) 皮膚バリア機能関連蛋白遺伝子の解析

FLG2変異6828del17を検出するTaqMan probeを作成し、アトピー性皮膚炎患者237人と健常人84人に対して解析を行った結果、患者では1人(1/237(0.4%))、健常人では2人(2/84(2.4%))に検出された。

### 8) 皮膚バリア機能を改善させる生活習慣と教育介入によるアトピーマーチ予防に関する疫学的検討

今年度の小中学生のアトピー性皮膚炎の有病率は4.6%、乾燥皮膚のみを呈する小児は9.6%であり、昨年度のアトピー性皮膚炎の有病率7.5%、乾燥皮膚のみを呈する小児の割合11.7%と比較して低下していた。

## D. 考察

本年度は、フィラグリンK0マウスの安定供給が確立し、多角的に機能解析することが可能となった。フィラグリンが欠損することにより、角層下層に見られ、角層構造を補強していると考えられているケラチン



パターンが消失しており、物理的に角層構造が脆弱になっていることが明らかとなった。経皮的なダニ抗原感作によってTh17サイトカイン発現と遷延性の好酸球性気道炎症、IgE抗体産生、気道粘液産生が、フィラグリンK0マウスは野生型に比べて亢進していた。皮膚におけるフィラグリン欠損の有無が、肺における気道炎症の性質に影響を与えることが初めて示された。さらに、アトピー性皮膚炎患者から分離された黄色ブドウ球菌株は、野生型マウスに比べ、著しく強くフィラグリンK0マウス皮膚に固着していることが示された。この事実は、フィラグリンを欠損した角層は、炎症を起こす以前に、ある特定の黄色ブドウ球菌が固着しやすくなることを示唆しており、アトピー性皮膚炎発症における黄色ブドウ球菌の役割を解明する上で重要な知見となる。フィラグリン欠損角層にどうして固着しやすくなるのか、遺伝子レベル、分子レベルでさらに詳細な解析を進める予定である。

フィラグリンK0マウスは、フィラグリンの最終分解産物である天然保湿因子が低下しており、乾燥皮膚の表現型を呈す。ところが、プロフィラグリンの分解異常を示すSASPase欠損無毛マウスにおいて、天然保湿因子は正常でありながら、乾燥皮膚を呈することが示された。SASPase欠損無毛マウスは、乾燥皮膚に至る新しい分子機構を解明する上で、有用なツールとなる。

SSSSマウスモデルを用いて、ランゲルハンス細胞は、TJの外側から捕捉した細菌毒素に対して中和活性を示すIgG抗体産生を誘導し、皮膚の構造を保ちながら外来抗原に対して免疫応答を成立させることを明らかにした。免疫応答において、ランゲルハンス細胞は制御的な役割をするという知見が蓄積している昨今において、細菌に対する防御免疫を惹起する事実が示された意義は大きい。アトピー性皮膚炎における抗原感作機構を明らかにするのみならず、経皮ワクチンを開発する上においても重要な知見となる。

マウスのみならず、ヒト皮膚においても、TJバリアを3次元的に観察する方法論を確立し、アトピー性皮膚炎皮膚において、LCとIDECは表皮内で異なる位置に存在し、LCはTJを超えて樹状突起を伸ばすが、IDECは主に水平方向に樹状突起を伸ばすことが観察された。LCはTJの外側から、IDECはTJより下で表皮内から抗原を捕捉することが示唆され、アトピー性皮膚炎発症におけるこれらの細胞は異なる役割を持つことが明らか

かとなった。

## E. 結論

本研究の成果により、アレルギーマーチを起こすアトピー性疾患の発症機序において、皮膚バリア障害による持続的経皮免疫が根本的な要因であることを示す確固たる免疫学的基盤が着実に確立されつつある。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

<英語論文>

1. Nishimura Y, Ii M, Qin G, Hamada H, Asai J, Takenaka H, Sekiguchi H, Renault MA, Jujo K, Katoh N, Kishimoto S, Ito A, Kamide C, Kenny J, Millay M, Misener S, Thorne T, Losordo DW: CXCR4 antagonist AMD3100 accelerates impaired wound healing in diabetic mice. **J Invest Dermatol** 132, 711-720, 2011.
2. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C Motif Chemokine 22 (CCL22) Are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. **PLoS One** 6 (11), e26987, 2011.
3. Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H: Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology** 157 (Pt 6), 1786-1797, 2011.
4. 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. **Japan J Vet Dermatol** 17 (2), 99-104, 2011.
5. Kato F, Sugai M: A simple method of markerless gene deletion in *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol Methods** 87 (1), 76-81, 2011.
6. Tamagawa-Mineoka R KT, Mazda O, Katoh N.: IL-21 reduces immediate hypersensitivity reactions in mouse skin by suppressing mast cell activation or IgE production. **J Invest Dermatol** 131 1513-1520, 2011.
7. Oguma T, Asano K, Tomomatsu K, Kodama M, Fukunaga K, Shiomi T, Ohmori N, Ueda S, Takihara T, Shiraishi Y, Sayama K,

- Kagawa S, Natori Y, Lilly CM, Satoh K, Makimura K, Ishizaka A: Induction of mucin and MUC5AC expression by the protease activity of *Aspergillus fumigatus* in airway epithelial cells. **J Immunol** 187 (2), 999-1005, 2011.
8. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K: Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. **J Exp Med** 208 (13), 2607-2613, 2011.
  9. Furue M, Yamazaki S, Jimbow K, Tsuchida T, Amagai M, Tanaka T, Matsunaga K, Muto M, Morita E, Akiyama M, Soma Y, Terui T, Manabe M: Prevalence of dermatological disorders in Japan: A nationwide, cross-sectional, seasonal, multicenter, hospital-based study. **J Dermatol** 38 (4), 310-320, 2011.
  10. 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.
  11. Kagawa S, Fukunaga K, Oguma T, Suzuki Y, Shiomi T, Sayama K, Kimura T, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Asano K: Role of prostaglandin D2 receptor CRTH2 in sustained eosinophil accumulation in the airways of mice with chronic asthma. **Int Arch Allergy Immunol** 155 Suppl 1 6-11, 2011.
  12. 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.
  13. Yoshida Y, Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Nakamura N, Sugai M, Komatsuzawa H: Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett** 320 (1), 33-39, 2011.
  14. 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 Mol Med** 3 (6), 320-333, 2011.
  15. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M: Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis. **Curr Probl Dermatol** 41 35-46, 2011.
  16. Mihara K, Shindo H, Ohtani M, Nagasaki K, Nakashima R, Katoh N, Kishimoto S: Early depth assessment of local burns by videomicroscopy: 24 h after injury is a critical time point. **Burns** 37 (6), 986-993, 2011.
  17. Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H: Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. **Appl Environ Microbiol** 77 (22), 8097-8105, 2011.
  18. Suzuki Y, Kodama M, Asano K: Skin barrier-related molecules and pathophysiology of asthma. **Allergol Int** 60 (1), 11-15, 2011.
  19. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M: Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis In **Pathogenesis and Management of Atopic Dermatitis**. Shiohara T (eds). Tokyo: Karger. 35-46. 2011.05.
  20. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA: Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? **J Invest Dermatol** 132 (3 Pt 2), 949-963, 2012.
  21. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WH, Kudoh J, Amagai M, Matsui T: Mutations in the SASPase Gene (ASPRV1) Are Not Associated with Atopic Eczema or Clinically Dry Skin. **J Invest Dermatol**, 2012.
  22. Kubo A, Nagao K, Amagai M: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **J Clin Invest** 122 (2), 440-447, 2012.
  23. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. **J Allergy Clin Immunol**, in press.
  24. Ozawa A NT, Nakai A, Hartmann G, Takenaka H, Kishimoto S, Katoh N.: Immunohistological analysis of in-transit metastasis in a patient with advanced melanoma treated with combination therapy of CpG oligodeoxynucleotide, dacarbazine, and interferon beta: a case report. **J Dermatol**, in press.
  25. Mihara K SH, Mihara H, Ohtani M, Nagasaki K, Katoh N.: Early depth assessment of local burns by videomicroscopy: novel proposed classification. **Burns**, in press.
- <日本語論文>
1. 加藤則人: 特集: アトピー性皮膚炎: 表皮の時代. ズック靴皮膚炎とアトピー性皮膚炎. **Visual Dermatology** 10 (12), 1262-1263, 2011.
  2. 浅野浩一郎: アレルギー疾患におけるフェーマコジェネティクスの現況. **アレルギー・免疫** 18 (9), 65-70, 2011.

3. 浅野浩一郎: これからの喘息治療 医学のあゆみ 239 (4), 296-299, 2011.
  4. 鈴木雄介, 浅野浩一郎: 妊娠中の気管支喘息の管理. 周産期医学 41 (5), 595-598, 2011.
  5. 加畑宏樹, 浅野浩一郎: 気管支喘息の病態、診断と治療—最近の進歩—長期管理薬による段階的治療—. 救急医学 35 (5), 587-591, 2011.
  6. 浅野浩一郎: 喘息における気道炎症の役割. 日本医師会雑誌 140 (3), 497-500, 2011.
  7. 峠岡理沙、加藤則人: アトピー性皮膚炎における血小板の役割. 日本血栓学会誌 22 77-80 2011.
  8. 浅野浩一郎: 気管支平滑筋気管支平滑筋細胞と喘息—気道リモデリングとの関連を中心に. 臨床免疫・アレルギー科 56 (2), 166-170, 2011.
  9. 加藤則人: アトピー性皮膚炎のプロアクティブ療法. 臨床皮膚 65 (5増), 140-142, 2011.
  10. 久保亮治, 天谷雅行: 皮膚バリア機構の新しい理解—体表面における防御と索敵のメカニズム. HUMAN SCIENCE 22 (1), 14-18, 2011.
  11. 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. 神奈川医学会雑誌 38 (1), 58-59, 2011.
  12. 久保亮治: 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態. 日本臨床免疫学会誌 特集号: 皮膚の臨床免疫 34 (2), in press, 2011.
  13. 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 65 (5), 38-43, 2011.
  14. 佐々木貴史, 天谷雅行: アレルギー性皮膚疾患とバリア機能異常. 小児科 52 (6), 833-841, 2011.
  15. 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」29 (10), 1634-1640, 2011.
  16. 佐々木貴史, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現況. アレルギー・免疫 18 (9), 1322-1329, 2011.
  17. 加藤則人: 金属と接触皮膚炎. 日本皮膚科学会雑誌 121 (10), 2049-2052, 2011.
  18. 久保亮治: 皮膚バリア機構の新しい捉え方. 臨床免疫・アレルギー科 56 (3), 294-302, 2011.
  19. 久保亮治: 皮膚バリア研究の新展開 タイロ下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. 皮膚の科学 10 (Suppl.16), 5-10, 2011.
  20. 加藤則人: 皮膚科軟膏処置 免疫抑制外用薬の使い方. 皮膚病診療 33 (Suppl), 22-27, 2011.
  21. 松井毅: 脊椎動物陸上進出の謎と美容—表皮顆粒層に特異的に発現するレトロウイルス様アスパラギン酸プロテアーゼ SASPaseの研究を通して—. The Journal of Japanese Society of Aesthetic Dermatology 21 (4), 277-287, 2011.
  22. 久保亮治, 天谷雅行: 皮膚バリア機能異常と抗原感作. アレルギー・免疫 19 (1), 32-39, 2011.
  23. 久保亮治: 皮膚バリア構造・機能の可視化への挑戦. 日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号 121 (13), 2920-2922, 2011.
  24. 天谷雅行: 環境と皮膚免疫 フィラグリニンと皮膚バリア機能. 日本化粧品学会誌 35 (4), 318-319, 2011.
  25. 加藤則人: 異汗性湿疹. Monthly Book デルマ, 印刷中.
  26. 峠岡理沙、加藤則人: アトピー性皮膚炎の病態形成における血小板の役割. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌, 印刷中.
2. 学会発表
- <英語発表>
1. Kawasaki H, K. N, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin knockout mice. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
  2. 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. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology** Atlanta, Georgia, USA (May 5-8), 2011. 5. 4-7.
  3. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M: Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
  4. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, Amagai M: High-resolution TOF-SIMS imaging and sequential immunofluorescent analysis of multi-layered barrier structure of the mouse skin stratum corneum. **59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics**, Denver, Colorado, 2011. 6.

- 5- 9.
5. Amagai M: Mechanisms of epidermal barrier and its dysfunction in atopic diseases. **Gordon Research Conferences on Epithelial Defferentiation & Keratinization**, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, 2011. 7. 3- 8.
  6. 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. **Gordon Research Conferences on Epithelial Defferentiation & Keratinization**, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, 2011. 7. 3- 8.
  7. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. **Heidelberg-Kyoto Joint Symposium "Crossing Boundaries: Stem Cells, Materials, and Mesoscopic Sciences"**, Heidelberg, Germany, 2011. 7. 21- 23.
  8. Amagai M: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **Lecture at Medical University of Vienna**, Vienna, Austria, 2011. 9. 6.
  9. Ouchi T, Kubo A, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BJ, Koyasu S, Amagai M, Nagao K: Langerhans cells play an essential role in inducing protective humoral immune response subsequent to antigen uptake through tight junctions. **The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research**, Barcelona, Spain, 2011. 9. 7- 10.
  10. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. **The 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research**, Barcelona, Spain, 2011. 9. 7- 10.
  11. Kato F, Hirakawa H, Tashiro K, Kuhara S, Sugai M: A novel transcriptional regulator, SptB, of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*. **International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress**, Sapporo, Japan, 2011. 9. 7.
  12. Hisatsune J, Murakami T, Kojima T, Hayashi I, Kato F, Sugai M: (Symposium: Staphylo-Streptococcus Diseases) Skip, a versatile cell wall protein of *S. aureus* causing severe skin diseases. **International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress**, Sapporo, Japan, 2011. 9. 9.
  13. Hisatsune J, Murakami T, Hayashi I, Kato F, Sugai M: Skip, a Trojan horse of *Staphylococcus aureus* causing severe impetigo/SSSS. **International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress**, Sapporo, Japan, 2011. 9. 10.
  14. Ishizaki I, Hammond J, Bryan S, Kubo A, Yamamoto A: TOF-SIMS Characterization of In Vivo and Transdermally Treated Mouse Skin. **18th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry**, Riva del Garda, Trentino, Italy, 2011. 9. 18- 23.
  15. Kubo A: Physiological and immunological barriers in the epidermis. **The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research**, Hiroshima, 2011. 10. 8- 9.
  16. Kubo A: Epidermal barrier dysfunction and percutaneous sensitization as an initial trigger of atopic dermatitis. **Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respirology & Immunology 2011**, Fukuoka, 2011. 10. 28- 30.
  17. Ishizaki I, Kubo A, Ohashi Y, Yamamoto A, Hammond J, Fisher G, Bryan S: High Resolution TOF-SIMS Imaging of the Multi-Layered Barrier Structure of Mouse Skin. **American Vacuum Society 58th International Symposium & Exhibition**, Nashville, Tennessee, 2011. 10. 30- 11. 4.
  18. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. **12th International Workshop on Langerhans Cells**, Innsbruck, Tyhrol, Austria, 2011. 11. 3- 6.
  19. Nagao K: Antigen capture through tight junctions by Langerhans cells induce pre-emptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. **12th International Workshop on Langerhans Cells**, Innsbruck, Tyhrol, Austria, 2011. 11. 3- 6.
  20. Amagai M: Dissection of epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. **第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 日韓中合同シンポジウム**, 東京, 2011. 11. 10- 11.
  21. Suzuki Y, Kodama M, Kagawa S, et al: Prolonged airway hyperresponsiveness caused by epicutaneous sensitization is dependent on the IL-23/IL-17A axis. **Japan-Korea-China Joint Symposium. The 61st Annual Congress of Japanese Society of Allergology**, Tokyo, Japan, 2011. 11. 10- 12.
  22. Nagao K, Ouchi T, Kubo A, Fujii H, Koyasu S, Amagai M: Langerhans cells confer

- pre-emptive immunity via antigen capture through tight junctions in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011. 11. 27- 29.
23. Yoshida K, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Amagai M: Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells gain access to the environment outside the tight junction barrier in atopic dermatitis skin. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011. 11. 27- 29.
  24. Amagai M: Epidermal barrier function and its dysfunction in atopic diseases. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
  25. Kubo A, Yokouchi M, Atsugi T, Ohyama M, Amagai M: Investigation of the tight junction barrier in hair follicles and sebaceous glands. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
  26. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
  27. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K: Antigen capture through tight junctions by Langerhans cells confer pre-emptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.
  28. Kato F, Hirakawa H, Tashiro K, Kuhara S, Sugai M: SptB is a novel transcriptional regulator of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*. 4T7pII Functions of Molecules and Complexes/分子・複合体の機能 Transcription/転写. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 16.
  29. Amagai M: Tight junctions and Langerhans cells in cutaneous sensitization. Dermatology and Genetic Medicine Annual Research Retreat 2012, Dundee, Scotland, 2012. 2. 16- 17.
  2. 久恒順三, 桑原隆一, 菅井基行: 伝染性膿痂疹/SSSS由来のETB産生黄色ブドウ球菌のアルベカシン耐性化. 第85回日本感染症学会総会, 東京, 2011. 4. 21.
  3. 加藤則人: アトピー性皮膚炎2011. 第23回日本アレルギー学会春期臨床大会, 千葉市, 2011. 5. 14- 15.
  4. 永尾圭介, 上羽悟史, 梶島健治, 松島綱治, 天谷雅行: 毛嚢による皮膚樹状細胞トラフィックの制御. 第32回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011. 6. 2- 3.
  5. 天谷雅行: フィラグリリンと皮膚バリア機能. 第36回日本化粧品学会, 東京, 2011. 6. 9- 10.
  6. 天谷雅行: 皮膚バリアの窓から見えるアトピー性疾患. 第100回日本皮膚科学会静岡地方会(戸倉新樹教授就任・第100回記念), 浜松, 2011. 6. 19.
  7. 久保亮治, 石崎逸子, 久保亜紀子, 川崎洋, 大橋善治, 天谷雅行: High-resolution time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging and sequential immunofluorescent analysis of multi-layered barrier structure of the mouse skin stratum corneum. 第63回日本細胞生物学会大会, 北海道, 2011. 6. 27- 29.
  8. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性皮膚炎. 第23回北海道皮膚粘膜病セミナー, 札幌, 2011. 7. 13.
  9. 加藤則人: (シンポジウム アトピー性皮膚炎Update) アトピー性皮膚炎の病態と血小板. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 甲府市, 2011. 7. 16- 17.
  10. 加藤則人: (ランチョンセミナー) アトピー性皮膚炎の治療効果を高めるコミュニケーションのコツ. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会, 甲府市, 2011. 7. 16- 17.
  11. 天谷雅行: フィラグリリン欠損と皮膚バリア. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 甲府, 2011. 7. 16- 17.
  12. 松井毅, 宮本憲一, 久保亮治, 川崎洋, 海老原全, 畑和也, 棚橋新也, 市野瀬志津子, 井本逸勢, 稲澤譲治, 工藤純, 天谷雅行: 皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型プロテアーゼSASPaseは、ProfilaggrinからFilaggrinの分解を制御し、角質層の水分量を調節する. 第13回日本進化学会, 京都, 2011. 7. 29- 31.

<日本語発表>

1. 久保亮治: 皮膚科学研究の進歩・最前線 皮膚バリア構造・機能の可視化への挑戦. 第110回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2011. 4. 15- 17.



13. 横内麻里子, 古瀬幹夫, 天谷雅行, 久保亮治: 皮膚(重層上皮)におけるタイトジャンクションバリア恒常性維持機構の解析. 第23回高遠シンポジウム, 高遠, 2011. 8. 25- 26.
14. 萱井基行: 「とびひ」の細菌学-系統解析からのアプローチ-. 第64回日本細菌学会九州支部総会, 門司, 2011. 8. 26.
15. 松井毅: 脊椎動物陸上進出の謎と皮膚の美容. 第29回日本美容皮膚科学会総会・学術大会, 下関, 2011. 9. 10- 11.
16. 石崎逸子, Hammond JS, Bryan SR, 久保亮治, 山本公: TOF-SIMSによるマウス皮膚組織の深さ方向分析. 第59回日本質量分析学会, 大阪, 2011. 9. 13- 15.
17. 久恒順三, 平川英樹, 大島健志郎, 服部正平, 桑原隆一, 加藤文紀, 萱井基行: 膿痂疹をおこす*S. aureus*が保有する pETBの薬剤耐性遺伝子獲得. 第56回日本ブドウ球菌研究会, 高知市, 2011. 9. 23.
18. 加藤文紀, 萱井基行: 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の新規転写調節因子SptA. 第56回日本ブドウ球菌研究会, 高知市, 2011. 9. 23.
19. 堤弘次, 久保亜紀子, 高木博, 赤津裕康, 紺野在, 宮本裕子, 矢尾育子, 江川潔, 佐藤尚武, 久保亮治, 安武かおり, 諸根信弘, 山内大輔, 堀尾哲也, 木村芳滋, 宮川剛, 福田敦夫, 塚田秀夫, 吉田眞理, 橋詰良夫, 峰雪芳宣, 小西慶幸, 池上浩司, 瀬藤光利: 多系統萎縮症患者脳では $\gamma$ -tubulinが減少しており、人工的 $\gamma$ -tubulin 2減少モデル動物は多系統萎縮症様の神経変性と運動失調を発症する. 第54回日本神経化学学会大会, 金沢, 2011. 9. 26- 28.
20. 松井毅, 宮本憲一, 久保亮治, 川崎洋, 海老原全, 畑和也, 棚橋新也, 市野瀬志津子, 井本逸勢, 稲澤譲治, 工藤純, 天谷雅行: 皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型プロテアーゼSASPaseは、ProfilaggrinからFilaggrinの分解を制御し、角質層の水分量を調節する. 第84回日本生化学会, 京都, 2011. 9. 21- 24.
21. 浅野浩一郎: 特別講演「皮膚と喘息」アレルギーマーチの背景にあるものは?. 第21回東京城南喘息・アレルギー研究会, 東京, 2011. 10. 6.
22. 久保亮治: 皮膚バリア機構の精緻な仕組み: バリア機能不全がアトピー疾患をもたらす?. 奈良先端大学GCOEセミナー, 奈良, 2011. 10. 12.
23. 小泉一久, 鹿山鎮男, 萱井基行: 眼科専門病院で分離された臨床分離 *Staphylococcus aureus*の解析. 第64回日本細菌学会中国四国支部総会, 岡山, 2011. 10. 23.
24. 浅野浩一郎: シンポジウム「気道過敏性(獲得と経過)」経皮感作と気道過敏性. 第48回日本小児アレルギー学会・第16回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会 合同学術大会, 福岡, 2011. 10. 28- 30.
25. 天谷雅行: 皮膚バリアと経皮免疫. 新宿区皮膚科医会40周年記念講演会, 東京, 2011. 10. 30.
26. 松井毅: 表皮の顆粒層特異的に発現するプロテアーゼSASPaseによる、角質層水分量の制御機構. 第61回日本アレルギー学会秋期学術大会, 東京, 2011. 11. 10- 12.
27. 久保亮治: 皮膚バリア機能とタイトジャンクション. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会, 品川, 2011. 11. 11- 12.
28. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の治療のゴールと抗ヒスタミン薬の役割. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 四日市市, 2011. 11. 19- 20.
29. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 川崎洋, 清水厚志, 岡野栄之, 天谷雅行, 工藤純: 皮膚炎自然発症モデルマウスflaky tailの皮膚炎原因遺伝子の解明. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13- 16.
30. 松井毅, 宮本憲一, 久保亮治, 川崎洋, 海老原全, 畑和也, 市野瀬志津子, 井本逸勢, 稲澤譲治, 工藤純, 天谷雅行: 陸上脊椎動物において獲得された皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイルス型プロテアーゼSASPaseは、角質層の水分量を調節する. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 13- 16.
31. 久恒順三, 村上輝明, 小島太郎, 達川伸行, 林幾江, 加藤文紀, 萱井基行: *Staphylococcus aureus*の新規表層タンパク質Skipの機能解析. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 14.
32. 天谷雅行: フィラグリン遺伝子異常とアトピー性皮膚炎 up date. アトピー性皮膚炎治療研究会第17回シンポジウム, 東京, 2012. 2. 4.
33. 加畑宏樹, 佐々木貴史, 坂巻文雄, 小山田吉孝, 井上卓, 小熊剛, 黄英文, 天谷雅行, 別役智子, 浅野浩一郎: フィラグリン遺伝子変異を合併した重症喘息症例の検討. 第

52回日本呼吸器学会学術講演会，神戸，  
2012. 4. 20- 22.

34. 足立剛也，平井博之，橋口明彦，天谷雅行，永尾圭介：薬剤アレルギー評価における好塩基球活性化試験の有用性．第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会，軽井沢，2012. 7. 13- 15.
35. 平野眞也，加藤則人：抗ヒスタミン剤使用のポイント．第27回日本臨床皮膚科医会・臨床学術大会，大阪市，2011. 6. 11- 12.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### <特許出願（国際）>

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:2011年4月14日)

特許番号:US2001/0088103

特許出願日:2009年5月15日

国内段階移行日:2010年11月10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

## II. 平成 23 年度分担研究報告

## フィラグリンの関与する皮膚バリア機能の解析

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** 皮膚角層の主要な構成蛋白質であるフィラグリンの遺伝子変異が、アトピー性皮膚炎の主要な発症因子として注目されている。*in vivo*におけるフィラグリンの関与する皮膚バリア機能を詳細に検討し、皮膚バリア機能異常に起因するアトピー性皮膚炎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。フィラグリン KO マウス皮膚の組織学的な観察から、フィラグリン欠損皮膚における未熟な角層の剥離が想起され、それに続くテープストリッピングを用いた解析から、フィラグリン欠損皮膚は物理刺激により角層が剥がれやすい可能性が示唆された。そして電子顕微鏡を用いた観察から、フィラグリン欠損によるケラチン配列の構造異常が、フィラグリン欠損角層の脆弱性に関与していると考えられた。フィラグリン KO マウスは、フィラグリンの *in vivo*での機能を正しく評価するための重要なツールであり、本マウスを解析することで、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明につながることを期待される。

研究協力者

川崎 洋

慶應義塾大学医学部皮膚科学

### A. 研究目的

皮膚角層の主要な構成蛋白質であるフィラグリンの遺伝子変異が、アトピー性皮膚炎の主要な発症因子として注目されている。*in vivo*におけるフィラグリンの関与する皮膚バリア機能を詳細に検討し、皮膚バリア機能異常に起因するアトピー性皮膚炎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。今年度は、フィラグリン KO マウスを用いてフィラグリンの関与する皮膚バリア機能の詳細を解析した。

### B. 研究方法

#### 1. フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察

フィラグリン欠損が皮膚バリアに与える影響を調べるため、フィラグリン KO マウス皮膚の形態学的特徴を観察した。

#### (a) サフラニン染色を用いたフィラグリン欠損角層の観察

厚さ 6 $\mu$ m の皮膚凍結切片を 1% サフラニン液で 1 分間染色した後、2% KOH 水溶液を加えて、角層を組織学的に観察した。

#### (b) 走査型電子顕微鏡による観察

日齢 5 の仔マウスの皮膚組織片を、低真空

走査型電子顕微鏡 S-3400N（日立ハイテク）により観察した。

#### (c) 透過型電子顕微鏡による観察

日齢 4-5 の仔マウスの背部皮膚を透過型電子顕微鏡により観察した。

### 2. フィラグリンと角層の物理的脆弱性に関する検討

日齢 4 の仔マウスの背部皮膚を Cryofilm(Leica Microsystems)を用いて繰り返しテープストリップし、テープに付着する角質剥離量を Image Pro Plus software(Media Cybernetics)を用いて DIA(the desquamation index for amount)として算出し、定量評価した。また、テープストリップ前後の角層の層数を組織学的に算出した。

### C. 研究結果

#### 1. フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察

#### (a) サフラニン染色を用いたフィラグリン欠損角層の観察

野生型マウスの皮膚では、角層が比較的正常に保たれているのに対し、フィラグリン KO マウス皮膚で、限局して角層欠損を生じる像を多く観察した。(図 1,A)

#### (b) 走査型電子顕微鏡による観察

野生型仔マウスの足では角層構造物に覆われた皮膚を観察したのに対し、フィラグリン KO マウスでは角層構造物の皮膚表面へ

の付着が認められなかった。(図 1,B 上図)続いて仔マウスの腹部皮膚を観察したところ、同様にフィラグリン KO マウス皮膚では、角層構造物の付着がみられず、皮膚表面は平坦化し、野生型マウスでは見ることのない生細胞の核に相当する構造を観察した。(図 1,B 下図)

#### (c)透過型電子顕微鏡による観察

フィラグリン KO マウス皮膚の顆粒層上層では、ケラトヒアリン顆粒やケラチン線維束のサイズや配列、ネットワークが乱れていることがわかった。(図 1,C)四酸化ルテニウム固定を用いた角層下層の観察では、野生型マウス角層で観察されるケラチンパターンが、フィラグリン KO マウス皮膚では観察されなかった。(図 1,D)

## 2.フィラグリンと角層の物理的脆弱性に関する検討

テープストリップ 1 回目の DIA スコアはフィラグリン KO マウスと野生型マウス間に差を認めなかったが、テープストリッピングの回数が増えるにつれ、フィラグリン KO マウスは野生型マウスよりも有意に高い DIA スコアを示した。(図 2,A, B)また、テープストリップ前の角層の層数はフィラグリン KO マウスと野生型マウス間で差を認めなかったのに対し、10 回テープストリップをした後の角層層数は、フィラグリン KO マウスで有意に低値を認め、角層剥離量を DIA として算出したデータに合致する所見を得た。(図 2,C, D)

## D. 考察

サフラン染色を用いた角層の組織学的観察、及び走査型電子顕微鏡を用いた観察から、フィラグリン欠損皮膚における未熟な角層の剥離が想起された。

そこで、テープストリッピングを用い、角質の物理的脆弱性に関する検討を行ったところ、フィラグリン欠損皮膚は物理刺激により角層が剥がれやすい可能性が示唆された。

ここまでの *in vivo* での観察は、フィラグリンはケラチン線維を凝集し束ねることで、角層の物理的強度の維持や構造の維持に寄与しているという過去の報告に一致した。そこで、フィラグリン欠損角層の脆弱性が本当にケラチン線維の微細な構造異常に起因するののかどうかを透過型電子顕微鏡により観察したところ、

フィラグリン欠損によるケラチン配列の構造異常が、フィラグリン欠損角層の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

フィラグリン KO マウスは、フィラグリンの *in vivo* での機能を正しく評価するための重要なツールである。フィラグリンはアトピー性皮膚炎の主要な発症因子の一つとして報告されており、本マウスを解析することで、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明につながることを期待される。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表 (平成 23 年度)

### 論文発表

1. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M: Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis. **Curr Probl Dermatol** 41 35-46, 2011.
2. Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C Motif Chemokine 22 (CCL22) Are Associated with Susceptibility to Atopic Dermatitis: Case-Control Studies. **PLoS One** 6 (11), e26987, 2011.
3. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K: Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. **J Exp Med** 208 (13), 2607-2613, 2011.
4. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WH, Kudoh J, Amagai M, Matsui T: Mutations in the SASPase Gene (ASPRV1) Are Not Associated with Atopic Eczema or Clinically Dry Skin. **J Invest Dermatol**, 2012.



5. Kubo A, Nagao K, Amagai M: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **J Clin Invest** 122 (2), 440-447, 2012.
6. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. **J Allergy Clin Immunol**, in press.
4. 天谷雅行: フィラグリン欠損と皮膚バリア. 第41回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 甲府, 2011. 7. 16- 17.
5. 天谷雅行: フィラグリン遺伝子異常とアトピー性皮膚炎 up date. アトピー性皮膚炎治療研究会第17回シンポジウム, 東京, 2012. 2. 4.

学会発表

1. Kawasaki H, K. N, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin knockout mice. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
2. Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, Amagai M: Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. **The 70th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Phoenix, Arizona, USA, 2011. 5. 4-7.
3. 天谷雅行: フィラグリンと皮膚バリア機能. 第36回日本化粧品学会, 東京, 2011. 6. 9- 10.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

<特許出願 (国際)>

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:2011年4月14日)  
 特許番号:US2001/0088103  
 特許出願日:2009年5月15日  
 国内段階移行日:2010年11月10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

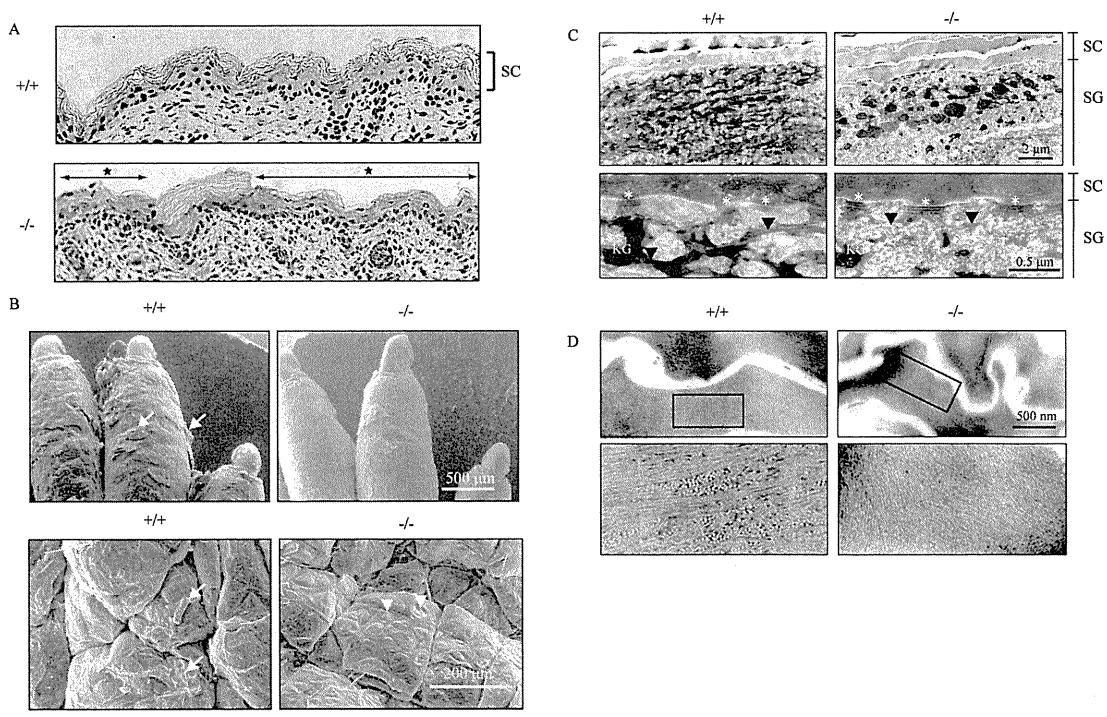


図1 フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察  
 A. 日齢 4-5 の仔マウス腹部角層をサフラニンで染色して観察した。★, 角層欠損部。 B. 日齢 5 の仔マウスの足(上図)と腹部(下図)の皮膚表面の形態を低真空走査型顕微鏡により観察した。顆粒層上層(C)と角層下層(D)を電子顕微鏡により観察した。D の下段の図は上段の図の囲みを拡大したもの。+/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス; 矢印(白), 角層構造物; 矢頭(白), 細胞の核; SC, stratum corneum(角層); SG, stratum granulosum(顆粒層); \*, デスモソーム; KG, ケラトヒアリン顆粒; 矢頭(黒), 束状のケラチン線維。

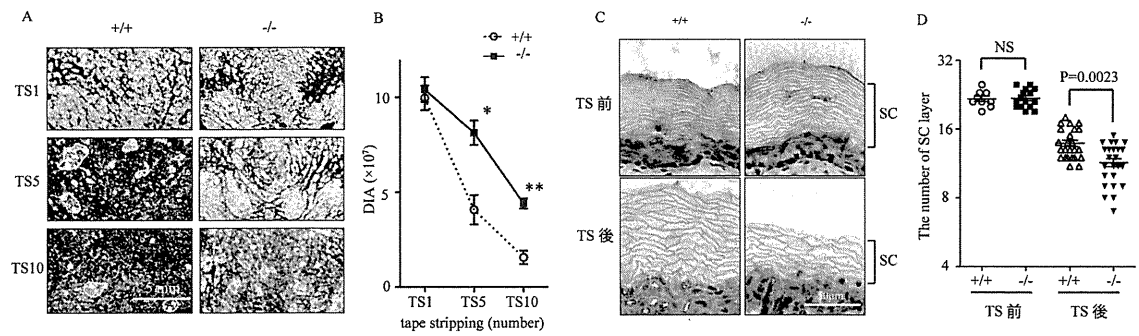


図2 テープストリップを用いた角質脆弱性の評価  
 テープストリップ後、テープに付着する角質構造物の像(A)と DIA スコア(B)。テープストリップ前(TS 前)とテープストリップ後(TS 後)の角層の組織像(C)と角層層数の比較(D)。+/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス; TS, tape stripping; SC, stratum corneum(角層); NS, not significant. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.