

## 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

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における皮膚バリア機能関連分子フィラグリンの影響を明らかにするため、フィラグリン欠損マウスにダニ抗原の経皮感作、気道曝露を行い、気道炎症の評価を行った。このモデルで観察されたダニ特異的 I g E 抗体産生および好酸球性気道炎症、気道粘液産生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、経皮感作にともなって生ずる気道病変の病態にも影響し、アレルギーマーチの成立に重要である可能性が示唆された。

### 研究協力者

鈴木 雄介  
慶應義塾大学医学部呼吸器内科  
特任助教  
正木 克宜  
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、皮膚バリア機構を司るフィラグリンの遺伝子異常がある場合、喘息とアトピー性皮膚炎を伴うことが多いとの疫学的データがある。

我々は卵白アルブミンの経皮的感作により一般的な喘息モデルと比較して長く遷延する気道過敏性が Th17 系の免疫応答活性化を通じて起こることを前年までの研究で明らかにした。さらに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ている。我々の研究結果から、フィラグリン欠損マウスでは気道の喘息様症状が悪化することが示唆されており、これを確認するとともにその機序について検討を行った。

### B. 研究方法

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あるいは野生型 C57BL/6 マウスの両耳介にダニ抽出抗原軟膏また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 から 14 日目にマウスの血清、気管支肺胞洗浄（BAL）液、脾臓・肺組織を採取し、抗原特異的 I g E 値、炎症細胞数、サイトカイン濃度、気道粘液産生細胞数を評価した。またダニ軟膏を単回塗布した後の皮膚組織におけるサイトカイン遺伝子発現を P C R で検討した。

### C. 研究結果

曝露 7 日後の BAL 液中の好酸球数はフィラグリン欠損マウスの方が野生型マウスに比して有意に多かった。この傾向は血清総 I g E やダニ抗原特異的 I g E、気道粘液産生細胞数でも認められた。脾臓あるいは肺細胞からのサイトカイン産生を検討したところ、IL-5 や IL-13 などの Th2 サイトカイン産生にはフィラグリン欠損マウスと野生型マウスで差を認めない一方で、IL-17A や IL-22 などの Th17 サイトカインの産生がフィラグリン欠損マウスで著明に亢進していた。

8 週間軟膏を塗布しても局所に肉眼的な皮膚炎は認められなかったが、フィラグリン欠損マウスでは耳介での IL-23 発現が亢進していた。さらにダニ軟膏の単

回塗布後 6 時間後には IL-6 が、6-24 時間後には IL-23p19 の遺伝子発現がフィラグリン欠損マウスの耳介局所で亢進していた。対照的に IL-12p40 や TNF $\alpha$  などの遺伝子発現には有意差が認められなかった。

#### D. 考察

従来の経皮感作喘息モデルは、機械的に皮膚バリア機能を障害した後に経皮感作を行っている。そのため、フィラグリン欠損による影響を評価できない。われわれが用いたモデルは抗原含有軟膏を正常皮膚に塗布するのみであり、機械的損傷を全く伴わないため、フィラグリン欠損の影響をより正確に評価できると考えられる。

我々の今までの検討から、経皮感作喘息モデルでは 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。今回の検討によって、フィラグリン欠損マウスでも Th17 サイトカイン産生誘導の亢進とともに気道の喘息性炎症が悪化することが確認されたことから、フィラグリン遺伝子異常をとまなう患者でも経皮感作によって誘導される Th17 サイトカインが好酸球性炎症などを悪化させていることが示唆される。

一方、皮膚バリア機能異常をとまなわない野生型マウスでも明らかな皮膚炎を伴わずに抗原特異的な IgE と Th2 型免疫応答は成立した。これは、アレルゲンへの暴露と宿主の皮膚バリア機能との両方の因子によって、喘息の発症と難治化が規定されていることを示している。

#### E. 結論

皮膚バリア関連蛋白のフィラグリンは経皮的ダニ感作による Th17 サイトカイン誘導を抑制し、引き続く気道症状に対して保護的に働くことが示された。アレルゲン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（平成 23 年度）

##### 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Suzuki Y, Kodama M, Asano K: Skin barrier-related molecules and pathophysiology of asthma. **Allergol Int** 60 (1), 11-15, 2011.

##### 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

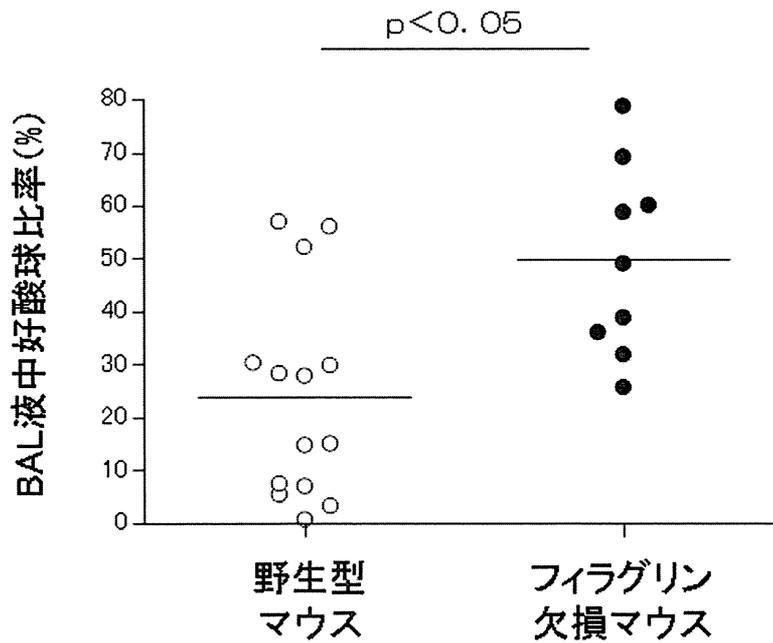


図1. ダニ抗原経皮感作喘息モデルにおける好酸球性気道炎症  
 フィラグリン欠損マウス (n=9) と野生型マウス (n=13) の耳介にダニ抗原を塗布した後、抗原を点鼻投与した。7日後に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、好酸球数比率を比較した。

## 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** アトピー性皮膚炎の病態形成における黄色ブドウ球菌の役割を明らかにする目的で様々な疾患から分離された黄色ブドウ球菌を用い、フィラグリン KO (FKO) マウスを用いた細菌感染実験を行った。新生児マウスを用いた菌付着および付着した菌が皮膚表層で増殖するかどうかを調べる菌固着を評価した。その結果、菌付着性には野生株 B6、FKO 株で差は認められなかったが、菌固着性ではアトピー性皮膚炎由来株が野生株 B6 に比して FKO マウスに著しく高い固着性を示した。

### 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

小島太郎

広島大学大学院医歯薬学総合研究科細菌学  
大学院生

### 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、健康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付けは不明確である。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。

近年、遺伝学的なアプローチからアトピー性皮膚炎の重要な素因として角質構成蛋白質であるフィラグリンの遺伝子変異が明らかになってきた。フィラグリン KO マウスでは野生型マウスに比べ、角質のバリア機能が低下していることが示されている。そこでフィラグリン KO マウスと野生型マウスを用いて、種々の臨床検体から分離された黄色ブドウ球菌の付着性ならびに固着性について検討し、アトピー性皮膚炎由来株の性状を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

黄色ブドウ球菌の付着実験、固着実験には新生児マウスを用い、野生型 B6 および FKO マウスを用いた。黄色ブドウ球菌には様々な病態から分離された黄色ブドウ球菌約 3,000 株から抽出した我が国の臨床分離株代表株 200 株より選択した株を用いた。

### C. 研究結果

新生児マウス皮膚を用いた付着実験では impetigo、SSSS、Atopy、Furuncle、Sepsis 由来株を用いて検討したが、疾患による菌の付着性に大きな差は認められなかった。また野生型 B6 と FKO マウスとでは、ほとんどのケースで B6 の方が FKO マウスより高い付着性を認めた。皮膚に付着した細菌が皮膚上で増殖し、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、時間的な因子を考慮した菌の性状を明らかにする目的で新生児皮膚を用いた固着実験法を確立した。具体的には新生児マウスを菌液に浸漬した後、2日間飼育し、生理食塩水で洗浄し、背部皮膚 1 cm<sup>2</sup> 片を切り出した。その後、この皮膚片を界面活性剤 Triton-X100 含有緩衝液で処理し、皮膚に固着した菌を遊離させ、生菌数を cfu としてカウントし、評価した。その結果、固着実験では Atopy 由来株は野生型 B6 に比較して FKO マウスの皮膚表面に著しく強い固着性を示した。また、Skip 産生株 (Impetigo 由来) も Atopy 株と同様に野生型 B6 に比較して FKO マウスの皮膚表面に著しく強い固着性を示した。それに対し、他の株は FKO マウスよりも B6 皮膚に強い固着性を示した。

#### D. 考察

Atopy 株は野生型 B6 皮膚より著しく強く FKO 皮膚に固着していた。付着の程度は黄色ブドウ球菌の皮膚付着性においては B6、FKO で顕著な違いが認められないため、付着した後の皮膚での増殖に違いが生じたと考えられる。なぜ Atopy 株が FKO に強い固着性を示すかは不明である。Atopy 株は強い病原性を示す株と異なり、多くの株は分泌毒素やエンテロトキシン等のスーパー抗原をほとんど保有しない。今回の結果は Atopy 性皮膚炎患者から分離される菌の持つ性状を明らかにする糸口になる可能性があると考えられる。今後の検討課題として、Atopy 株の皮膚上でのバイオフィルム産生性やケラチノサイトや上皮細胞から分泌する抗菌ペプチド (bディフェンシンや CAP18 等) に対する耐性を含めた自然免疫に対する菌の抵抗性、皮膚 pH 変化に対する対応性など、皮膚環境に対する適応性の点から、検討する必要がある。その為にもアトピー由来株のゲノム配列比較解析を行い、他の疾患由来株のゲノム配列比較解析によりアトピー由来株に特有の遺伝子を探索する必要もあると考えられる。

#### E. 結論

アトピー性皮膚炎患者皮膚から分離された黄色ブドウ球菌が FKO マウス皮膚に対し、強い固着能を示すことを明らかにした。Skip 陽性株が同様の性状を示したため、FKO への固着に菌体表層のタンパク成分が関わる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成 23 年度)

##### 1. 論文発表

1. Kato F, Kadomoto N, Iwamoto Y, Bunai K, Komatsuzawa H, Sugai M: The regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** 79, 1660-1670, 2011.
2. Kato F, Sugai M: A simple method of markerless gene deletion in *Staphylococcus aureus*. **J. Microbiol. Methods.** 87, 76-81, 2011.

3. Matsuo M, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H: Growth-phase dependence of cell surface charge in *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. UK.** 157, 1786-1797, 2011.
4. Mizumachi E, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, Uehara Y, Seo H, Sugai M: Clonal distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* on handles of shopping baskets in supermarkets. **J. Applied Microbiol.** 110, 562-567, 2011.
5. Oogai Y, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H: Expressions of virulence factors in *Staphylococcus aureus* grown in serum. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 8097-8105, 2011.
6. 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, 99-104, 2011.
7. Yoshida Y, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H: Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 320, 33-39, 2011.

##### 2. 学会発表

1. 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 2011.4.21 東京.
2. 菅井基行. 「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 特別講演-I 2011.8.26 8/26 門司.
3. Kato F, Hirakawa H, Tashiro K, Kuhara S, Sugai M. A novel transcriptional regulator, SptB, of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*. IUMS 2011.9.7. Sapporo.
4. Hisatsune J, Murakami T, Hayashi I, Kato F, Sugai M. Skip, a Trojan horse of *Staphylococcus aureus* causing severe impetigo/SSSS. IUMS 2011.9.10. Sapporo.
5. Hisatsune J, Murakami T, Kojima T, Hayashi

I, Kato F, Sugai M. Skip, a versatile cell wall protein of *S. aureus* causing severe skin diseases. Symposium: Staphylo-Streptococcus Diseases. IUMS 2011.9.9. Sapporo.

6. 加藤文紀 菅井基行. 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. 2011.9.23. 高知市.

7. 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、菅井基行. 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. 2011.9.23. 高知市.

8. 小泉一久、鹿山鎮男、菅井基行. 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. 2011.10.23 岡山.

9. 久恒順三、村上輝明、小島太郎、達川伸行、林幾江、加藤文紀、菅井基行. *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 2011.12.14. 横浜.

10. Kato F, Hirakawa H, Tashiro K, Kuhara S, Sugai M. SptB is a novel transcriptional regulator of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*. 47pII 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 2011.12.16. 横浜.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし



## 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

研究分担者 松井 毅 京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点大学 終研究室  
特定拠点助教

### 研究要旨

哺乳類皮膚特異的・顆粒層特異的に発現するレトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼ SASPase は、Profilaggrin リンカー配列を正しく切断し、角質層の水分量を調節していると考えられる。その欠損無毛マウスは乾燥肌を呈する事を本研究課題では明らかにしてきたが、どの時期から起きているのかは明らかではなかった。本年度は、新生児の SASPase 欠損無毛マウスの解析を行うと同時に、日本人で見つかった活性抑制・喪失変異の、西欧人コホートにおける解析も行った。

### 研究協力者

久保 亮治  
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・  
総合医科学研究センター、特任講師  
天谷 雅行  
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室、教授  
宮本 憲一  
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室、  
特任助教

工藤 純  
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室、  
教授

Aileen Sandilands  
Dermatology & Genetic Medicine, Division  
of Molecular Medicine, University of  
Dundee, Dundee、博士研究員

W.H. Irwin McLean  
Dermatology & Genetic Medicine, Division  
of Molecular Medicine, University of  
Dundee, Dundee、教授

### A. 研究目的

これまでの成体の SASPase 欠損無毛マウスを用いた研究において、レトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼ SASPase が、Profilaggrin のリンカー配列を正しく切断し、角質層の水分量を制御する事を明らかにしてきた。

本年度は、SASPase 欠損無毛マウスに認められる乾燥肌の表現系がどのように形成されるのかを明らかにする為に新生児表皮における表現系解析を行った。

またこれまでの本研究課題において、日本人アトピー性皮膚炎コホート中に、SASPase の活性抑制変異 V187I を初めとするミスセンス変異が存在する事も明らかにしてきた。そこで、これら変異や、新規ミスセンス変異が、西欧人コホート中にも認められるかを明らかにする為に、SASPase の遺伝子解析を行った。

### B. 研究方法

乾燥肌様皮膚表皮を呈し、Profilaggrin の分解異常が認められる SASPase 欠損無毛マウスの天然保湿因子がどのようになっているのかを解析する為に、野生型、及びホモ欠損マウスの新生児無毛マウスのテープストリッピングを行い、遊離アミノ酸の分析・TEWL（表皮水分蒸散量）の測定・角質水分量・Profilaggrin 分解パターンの解析の解析を行った。

SASPase 全長シーケンスにおける変異解析を、アイルランド人のアトピー性皮膚炎（AD）患者ゲノム（96人）、コーサ人の AD 患者ゲノム（96人）、スコットランド人の乾燥肌群のゲノム（99人）に対して行った。（Dundee 大学との共同研究）V74I, G87R, S333F の変異解析は、Taqman 法によって 259 人のアイルランド人 AD 患者ゲノム、167 人のスコットランド人の乾燥肌群のゲノムに対して行った。また T49A, V187I, V243A 変異についても Taqman 法による変異解析を行った。

### C. 研究結果

SASPase 欠損無毛マウスの新生児における (Day3) 角質層における遊離アミノ酸の分析を行ったが、成体マウスと同様に、各アミノ酸の単位面積当たりの全アミノ酸量/組成比は、野生型と比べて有意な差は認められなかった。TEWL も野生型と欠損マウスとの間に有意な差は認められなかった。それに対して、角質層水分量が、野生型と欠損型との間で有意差が認められた。更にホモ欠損マウスにおける Profilaggrin の分解異常も認められた。

各コホートにおける SASPase 変異を全長シーケンスにより解析した結果、新たな4種類(R52Q, V74I, G87R, S333F)のミスセンス変異が同定された。ただし、日本人と同様のミスセンス変異は同定されなかった。そこで、新たに259人のアイルランド人AD患者ゲノムや167人のスコットランド人の乾燥肌群のゲノムに対して、V74I, G87R, S333F の変異解析を Taqman 法を用いて解析を行ったが、これら変異を持つゲノムは G87R 一例を除いては、新たには見いだされなかった。また、以前より報告されていた SNP である T49A の変異頻度の解析も、442人のアイルランド人AD患者ゲノム、458人のアイルランド人健常人群ゲノムに対して行ったが、アトピー性皮膚炎との相関性は見いだされなかった。167人のスコットランド人乾燥肌群ゲノムと100人のスコットランド人健常人群ゲノムに対しても同様の解析を行ったが、乾燥肌症状との相関性は見いだされなかった。これらの結果は Filaggrin の変異が存在するサンプルを除いても、統計学的には変わらない結果であった。更に、V187I, V243A を Taqman 法を用いて、上記コホートに対して変異の頻度を解析もしたが、いずれのコホートにもこれらの変異は見いだされなかった。

### D. 考察

本研究により、成体のSASPase欠損無毛マウスと同様に、新生児においても、TEWLは影響を受けずに、角質層水分量低

下とProfilaggrin分解異常が認められた事は、生後、既に乾燥肌が形成されている事を示しており、成体になり無毛化していく際の環境の要因によるものではないと考えられる。すなわち、SASPase欠損による角質層水分量減少・Profilaggrinの分解異常は、角質層形成の発生的現象そのものが異常になっていると考えられた。今後は、顆粒層から角層形成の段階における細胞生物学的解析から角質層保湿の分子機構の解析を行う予定である。

本年度のDundee大との共同研究により、主に西欧人のコホート解析から、新規SASPaseミスセンス変異としてR52Q, V74I, G87R, S333F が同定されたが、変異部位は、Proteaseドメインの外側にある事から、これらは活性にも影響を与えていないとも考えられる。実際にADや乾燥肌とは相関は認められなかった。日本人コホートに認められたV187IやV243Aは活性に影響を与えるが、これらは西欧人のコホートには見いだされなかった。すなわち、V187I, V243Aは日本人に特有のミスセンス変異である事が示唆された。このように、SASPase変異は、ADや乾燥肌との病態と相関する頻度では存在していないと考えられる。低いながらも日本人に認められるV187I, V243Aが、病態に関与するかは今後の課題である。一方で、欠損マウスの結果からは、角質層の保湿に重要な働きをしている事が明らかである事から、SASPaseの活性低下や阻害剤の存在が、乾燥肌・AD発症において、何らかの働きをしている可能性も考えられる。またSASPaseの変異の有無に関わらず、Profilaggrinの分解異常と乾燥肌・AD発症の関連性も今後検討すべき課題であると考えられる。

### E. 結論

SASPase 欠損マウスにおける Profilaggrin 分解異常・角質水分量低下は、新生児においても確認され、成体における環境要因ではない事が明らかとなった。

西欧人コホート解析により、乾燥肌やAD発症との相関性に関わるSASPase変

異は認められなかった。今後は SASPase の活性抑制などとの関連性の解析が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報  
特になし。

## G. 研究発表（平成 23 年度）

### 1. 論文発表

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.

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.

### 2. 学会発表

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 Differentiation & Keratinization**, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, 2011. 7. 3- 8.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし

## 経皮免疫におけるランゲルハンス細胞の役割

研究分担者 永尾 圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 専任講師

**研究要旨** アトピー性皮膚炎ではバリア破綻に基づく経皮的な感作が疾患の基盤にあると考えられている。しかし、その獲得免疫の機構の詳細は不明であるうえに、その中心的な役割を担うと考えられているランゲルハンス細胞の *in vivo* の機能の多くは未だ明らかにされていない。本研究では我々はブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素により生じるブドウ球菌性皮膚剥脱症候群のマウスモデルを確立した。これを用い、ランゲルハンス細胞が機能的なタイトジャンクションを介して外界の表皮剥脱毒素を獲得し、Th2 型の液性免疫を誘導することにより防御的役割を果たすことを確立した。この研究により、ランゲルハンス細胞の *in vivo* における免疫学的機能の一端が解明された。

### 研究協力者

大内健嗣 慶應義塾大学医学部助教  
小林哲郎 慶應義塾大学医学部訪問研究員

足立剛也 慶應義塾大学医学部医学研究科・大学院生

ダニエラ・ユミ・キタシマ 慶應義塾大学医学部医学研究科・大学院生

藤猪英樹 慶應義塾大学医学部免疫微生物学教室・助教

小安重夫 慶應義塾大学医学部免疫微生物学教室・教授

ることを証明し、その生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

Ovalbumin (OVA)パッチ免疫の系を確立し、ランゲリン陽性樹状細胞の有無にて経皮免疫が誘導されるか検討した。また、表皮剥脱毒素 (ET) 産生性黄色ブドウ球菌の感染によって生じる SSSS (staphylococcal scalded skin syndrome) のマウスモデルの系を確立し、ET パッチ免疫を介した LC の生体防御機構を解析した。

### A. 研究目的

アレルゲンや細菌抗原がどのように経皮感作されているのかは不明なところが多い。樹状細胞 (DC) は獲得免疫の起点となる重要な免疫細胞である。ランゲルハンス細胞 (LC) は表皮唯一の樹状細胞だが、近年遺伝子改変マウスにウィルスおよびハプテンを用いた *in vivo* の実験系で LC の免疫機能を否定する論文が多く報告された。そのさなか、我々はランゲルハンス細胞が遺伝子銃にて免疫された細菌抗原に対し抗原徳的な IgG1 (Th2 型) 応答を担うことを報告し (Nagao et al., PNAS 2009)、タイトジャンクションバリア (TJ) を保ったまま蛋白抗原を獲得しうることを明らかにした (Kubo et al., JEM 2009)。今回の研究では LC の TJ を介した抗原獲得から液性免疫応答が発動され

### C. 研究結果

OVA をマウスの耳にパッチ免疫したところ、遺伝子銃による免疫と同様に抗原特異的 IgG1 が誘導された。興味深いことに、Langerin-DTR (diphtheria toxin [DT] receptor) マウスに DT を腹腔内投与すると、経皮液性免疫は誘導されなかったことにより、パッチ免疫された蛋白抗原への液性免疫応答にはランゲリン陽性の皮膚樹状細胞が重要であることが分かった。骨髓移植等を組み合わせた実験系で、最近発見された Langerin 陽性真皮樹状細胞はこの免疫応答に関与しておらず、LC が担っていることを確立した。この免疫機構は皮表にある細菌抗原等を獲得しているものと考えた。LC が皮表の細菌由来抗原を獲得し、防御的免疫応答を担うことを証明するため実験的 SSSS

を利用した。ET をマウス腹腔内に投与すると3時間で皮膚にびらんを生じた。ET はタイトジャンクションを通過することができず、パッチ免疫を行っても皮膚にはびらんを生じなかった。しかし、血清にはET 特異的 IgG1 抗体が賛成されており、免疫時 LC を消去したマウスでは抗体産生が見られなかった。LC にて誘導され抗 ET IgG は in vitro にて ET の中和活性を持っていた。ET をパッチ免疫したマウスに ET を全身投与したところ、PBS パッチ群と異なり、殆どのマウスが SSSS を発症しなかった。重要なことに、ET パッチ免疫前に LC を消去した Langerin-DTR マウスでは重篤な皮膚のびらんを生じた。

#### D. 考察

LC は TJ の外界に存在する細菌由来抗原を常にサンプリングし、抗体産生を誘導していることが分った。外界に存在する抗原に対して何故反応する必要があるのか？それはブドウ球菌に代表されるように、いわゆる正常細菌叢でも病原性を発揮しうるからではないか。LC により抗体産生が誘導され、全身を循環することで、細菌の侵入に対応できる。この際、細胞性免疫が誘導されてしまうと、皮膚に炎症が生じ、むしろバリア破綻を招く可能性があるため、液性免疫応答である必然性があるのだ。

#### E. 結論

本研究は初めて in vivo で LC と細菌抗原の関わりを免疫学的に証明した。この一連の機構を ACT (Antigen Capture through Tight junctions) と命名したが、ACT を利用することにより最低限の侵襲で免疫をつけることができる。経皮的なアレルゲンの感作のメカニズムにも示唆に富む現象である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (平成 23 年度)

##### 論文発表

1. 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.
2. Kubo A, Nagao K, Amagai M: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **J Clin Invest** 122 (2), 440-447, 2012.
3. 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**, 2012.

##### 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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 scaled skin syndrome. **The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

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

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

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 特任講師

**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。マウスでは、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がシールしている。しかし、ヒト表皮においては、TJバリアの存在は示されているものの、その構造、角質バリアとTJバリアの機能分担については、不明なことが多く残されている。今回我々は、ヒト表皮のTJバリア構造を初めて3次的に観察することに成功した。マウス表皮の顆粒層では垂直方向に整然とケラチノサイトが配列しているのに対し、ヒト表皮の顆粒層ではランダムに重なり合ってケラチノサイトが配列していた。TJ、アドヘレンスジャンクション、デスモソームの各構成蛋白の染色により、ヒト表皮顆粒層は3層の異なる性質を持った細胞層から構成されていること、第2層の細胞が細胞膜のapico-basal polarityを持ち、その細胞間をTJがシールしていること、を明らかにした。

研究協力者

天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学・教授  
横内 麻里子 慶應義塾大学医学部皮膚科学・共同研究員  
吉田 和恵 慶應義塾大学医学部皮膚科学・大学院  
川崎 洋 慶應義塾大学医学部皮膚科学・共同研究員

バリア機能を担っているのか、角質バリアを突破した抗原の体内への侵入を表皮TJバリアは阻止し得るのか、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、本研究ではヒト表皮TJバリアの細胞生物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、角層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

B. 研究方法

慶應義塾大学の倫理審査委員会に承認された手続きに基づき、手術検体より皮膚の一部を採取して皮膚サンプルを得た。正常皮膚サンプルを用いて、1. 通常の切片の免疫染色による解析により、TJ関連蛋白、アドヘレンスジャンクション (AJ) 関連蛋白、デスモソーム (DS) 関連蛋白の局在解析を行った。また、ビオチントレーサー実験を組み合わせることで、TJの位置の同定を行った。2. プロテアーゼ処理により表皮と真皮を分離して得られる表皮シート、および黄色ブドウ球菌が産生するexfoliative toxin (ET) 処理により得られる顆粒層・角層シートを用いて、コンフォーカル顕微鏡によりZ切片を多数撮影したのち三次元再構成することで、ヒト表皮TJバリアを立体的に可視化した。

## C. 研究結果

### 1) 通常の切片の免疫染色による解析

デスマプラキン (DS 構成蛋白)、オクルディン、クローディン1 (TJ 構成蛋白) の3重染色を行った。角層の下にはDSが細胞全周にわたって分布する平板な3層の顆粒層細胞が存在した。最外層の細胞はオクルディン、クローディン1ともに陰性。第2層目の細胞はアピカル細胞接着にオクルディンが濃縮し、apical 細胞膜はクローディン1陰性、basolateral 細胞膜はクローディン1陽性であった。第3層目の細胞はapical 細胞接着にオクルディンの濃縮が見られるものの、クローディン1が細胞膜全周に陽性であった。第2層目の細胞のみが細胞膜のapico-basolateral細胞極性を示したことから、第2層目の細胞のオクルディン陽性細胞接着がTJのfence functionを示していると考えられた。そこで次に、ビオチントレーサー (560 Da) を *ex vivo* にてヒト皮膚の真皮に注射し、トレーサーの拡散実験を行った。その結果、apico-basolateral細胞極性を示す細胞のapical細胞接着において特異的にトレーサーの拡散が堰き止められていた。すなわち、ヒト表皮顆粒層においても、外側から2層目の細胞のみが、apico-basolateral細胞極性 (TJのfence function) とビオチントレーサーの拡散制御 (TJのgate function) の両方を示すことが明らかとなり、ヒト表皮顆粒層が3層の異なる性質をもつ細胞層から構成されていることが明らかとなった。さらにTJ関連蛋白としてZO-1、クローディン4、AJ関連蛋白としてEカドヘリン、 $\alpha$ カテニンの免疫染色を行った。その結果、ZO-1はオクルディンとほぼ同じ染色パターンを、クローディン4はクローディン1とほぼ同じ染色パターンを示した。興味深いことに、AJ関連蛋白のEカドヘリン、 $\alpha$ カテニンは、第1層目の細胞では陰性、第2層目の細胞ではbasolateral細胞膜に特異的に、第3層目の細胞では細胞膜全周に存在していた。この結果は、第2層目の細胞が第3層目の細胞から分化する時に、細胞膜のapico-basolateral細胞極性と隣り合う細胞間のTJ形成の2つの特徴を獲得することを示している。今回明らかになった、顆粒層の3層構造と、TJ, AJ, DS構成蛋白の分布について、図1にまとめた。

### 2) 表皮シートの三次元可視化による解析

次に我々は、プロテアーゼ処理により表皮と真皮を分離して得られる表皮シート、およびET処理により得られる顆粒層・角層シートを用いて、ヒト表皮TJの三次元可視化法の確立を目指した。ヒト表皮シートは、マウス表皮シートと比べて、遥に多層のケラチノサイトからなっており、マウス表皮シートと同じ染色方法ではTJの三次元可視化が困難であった。そこで我々はET処理により得た、角層と顆粒層の細胞からなるシートを用いてTJの染色を試みた。本方法を用いることで、我々は初めて、ヒト表皮のTJバリア構造を立体的に観察することに成功した。ヒト表皮では、マウス表皮に比べてランダムに顆粒層の細胞が互いに重なり合っている存在していたが、第2層目の細胞極性を持つ細胞の細胞間にTJバリアが形成され、表皮全体を連続して覆い尽くしていることが明らかになった。

## D. 考察

これまで細胞極性の研究は、主に単相上皮細胞において行われてきた。今回我々は、顆粒層第2層目の細胞が、単相上皮細胞と同じように、細胞膜のapico-basolateral細胞極性を示すこと、fence functionとgate functionを併せて持つ機能的なTJを形成すること、を明らかにした。今後、重層上皮の細胞生物学を展開していく上で重要な第一歩であると考えられる。また、ET処理によるシートは、顆粒層細胞をen faceに観察する重要な手段であり、今後ケラチノサイトの角化メカニズムを解析していく上で役立つことが期待される。一方、ヒト表皮において、今後TJとランゲルハンス細胞の相互作用を解析していくためには、表皮シートにおいてTJをより良く染色する方法を開発していく必要があり、今後の目標としたい。

## E. 結論

今回我々は、ヒト表皮において、顆粒層の細胞が、それぞれ異なる特徴を持つ3層の細胞からなっていること、その中の外側から数えて2層目の細胞のみが、細胞膜apico-basolateral細胞極性を示すと共に、細胞間に機能的なTJバリアを形成することを明らかにした。また、ヒト表皮のTJバリアを三次元可視化することに初めて成功し

た。これらは、今後ヒト表皮のバリア構造を解析し、角層と TJ という 2 つのバリア機能をそれぞれ分離して解析していく上で、重要な解析手法となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表 (平成 23 年度)

論文発表

<英語論文>

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. 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.
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. 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**, 2012.

<英語総説>

1. Kubo A, Nagao K, Amagai M: Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **J Clin Invest** 122 (2), 440-447, 2012.

2. 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.

<日本語総説>

1. 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.
2. 久保亮治, 天谷雅行: 皮膚バリア機構の新しい理解—体表表面における防御と索敵のメカニズム. **HUMAN SCIENCE** 22 (1), 14-18, 2011.
3. 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 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.
4. 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.
5. 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. 皮膚の科学 10 (Suppl. 16), 5-10, 2011.
6. 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.
7. 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.

学会発表

<英語招待講演>

1. Kubo A: Physiological and immunological barriers in the epidermis. **The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research**, Hiroshima, 2011. 10. 8- 9.
2. Kubo A: Epidermal barrier dysfunction and percutaneous sensitization as an initial trigger of atopic dermatitis. **Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology 2011**, Fukuoka, 2011. 10. 28- 30.

<英語学会発表>

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. 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. 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 Differentiation & Keratinization**, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, 2011. 7. 3- 8.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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, Tyrol, Austria, 2011. 11. 3- 6.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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 scaled skin syndrome. **The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Kyoto, Japan, 2011. 12. 9- 11.

<日本語招待講演>

1. 久保亮治: 皮膚科研究の進歩・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.
2. 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.
3. 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.

<日本語学会発表>

1. 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.

2. 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.
3. 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/Molecular Depth Profiling of the Multi-Layered Structure of Mouse Skin by TOF-SIMS. 第59回日本質量分析学会, 大阪, 2011. 9. 13- 15.
4. 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.

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

## 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授

**研究要旨** 皮膚バリア機能関連遺伝子が集中している 1q21.3 の Epidermal differentiation complex (EDC)領域に存在する遺伝子の中から FLG2 遺伝子についてアトピー性皮膚炎との関連を解明するために、昨年度発見したフレームシフト変異 6828del7 の TaqMan 法による迅速解析法を開発し、日本人 AD 患者 237 人と健常対照者 84 人に対して解析を行った結果、AD 患者では 1 人(1/237(0.4%))、健常対照者では 2 人(2/84(2.4%))しか保因者がおらず、有意差は認められなかった。

イヌ FLG のアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドを免疫原として、抗イヌ FLG ウサギ抗体を作成し、ウェスタンブロット法と免疫組織化学染色で十分な特異性を有している事を明らかにした。また、イヌ FLG 遺伝子変異の解析のため、FLG-shotgun 法によるイヌ FLG 遺伝子の塩基配列解読法を確立した。

### 研究協力者

佐々木貴史 慶應大医学部総合医科学研究  
センター 特任講師  
塩濱 愛子 慶應大医学部遺伝子医学研究室  
特任助教  
神田 聡子 慶應大医学部遺伝子医学研究室  
共同研究員  
宮本 憲一 慶應大医学部遺伝子医学研究室  
助教

### A. 研究目的

近年アトピー性皮膚炎患者からフィラグリン (FLG) 遺伝子の変異が発見され、皮膚バリア機能の障害が、アトピー性皮膚炎の発症原因の一つとして注目されている。今年度は皮膚に高発現しており、FLG 様リピート配列を有する FLG2 遺伝子についてアトピー性皮膚炎との関連を解明することを目的とした。また、モデル生物としてアトピー性皮膚炎を頻発するイヌに注目し、FLG 遺伝子変異の有無を検討する。

### B. 研究方法

昨年度、FLG2 遺伝子のシーケンシングで AD 患者 32 人中 1 人、健常対照者 32 人中 1 人から新規に発見した 7bp 欠失によるフレームシフト変異 6828del7 の TaqMan 法による迅速解析法を開発し、AD 患者での頻度解析を行った。

イヌ FLG のアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドを免疫原として、抗イヌ FLG ウサギ抗体を作成し、ウェスタンブロット法と免疫組織化学染色で得られた抗体の特異性を評価した。また、イヌ FLG 遺伝子変異の解析のため、FLG-shotgun 法によるイヌ FLG 遺伝子の塩基配列解析法を確立した。

### C. 研究結果

FLG2 変異 6828del7 を検出する TaqMan probe を作成し、慶應義塾大学医学部皮膚科で収集した日本人 AD 患者 237 人と健常対照者 84 人に対して解析を行った結果、AD 患者では 1 人(1/237(0.4%))、健常対照者では 2 人(2/84(2.4%))の変異が同定された (図 1、表 1)。

イヌ FLG 遺伝子の配列をヒトやマウス FLG 遺伝子と比較した結果、イヌ FLG のモノマー数は 4 つとヒト (10~12) やマウス (15~16) に比べて少なく、また FLG モノマーのサイズは 59、54kDa とヒト (37kDa) やマウス (26kDa) に比べて大きいことが予想された。作成した抗イヌ FLG 抗体を用い、ウェスタンブロット法でイヌ表皮抽出タンパクを解析した結果、予想された 59、54kDa 付近にバンドを確認した。免疫組織化学染色でも表皮顆粒層の細胞質内顆粒を染色し、イヌ FLG を特異的に認識していると判定した (図 2)。

次にイヌ FLG 遺伝子塩基配列の解明のた