

SASPase 欠損ヘアレスマウスを用いた角質層水分保持機構の解析

松井 毅(京都大 物質-細胞統合システム拠点)

地球上の脊椎動物は、約 3 億 6 千万年前に、水中から陸上に進出した。その過程で、気相環境に適応する為に、新しい遺伝子群を獲得し、体表面の単層上皮様の組織を、乾燥にも適応した角化重層扁平上皮組織へと進化させた。この上皮進化の謎を解明する為に、進化の過程で獲得された「皮膚特異的遺伝子」の欠損マウスを作成し、太古の皮膚を再現する事を試みている。皮膚表皮顆粒層に特異的なレトロウイルス様プロテアーゼ SASPas の欠損ヘアレスマウスは、角質層肥厚を伴う角質層水分低下が認められた。このマウスは、角質層の下層において Profilaggrin の分解不全による異常蓄積が認められた。しかし、何故 SASPase 欠損が、乾燥肌様表皮を呈するのかは、依然明らかとなっていない。そこで、本年度は、発生段階のどの時期から表現型が現れるのかを解析する。また顆粒層 (SG1) ~角質層の細胞培養観察系を確立し、SASPase 欠損マウスの解析に用いる事も試みる。

第2部

Skip 産生黄色ブドウ球菌の性状解析

久恒順三、小島太郎、村上輝明、加藤文紀、菅井基行(広島大細菌学)

私どもは皮膚に感染する黄色ブドウ球菌が高率に発現する菌体表層タンパク質 Skip を見いだした。Skip は主に SSSS 患者から分離され、菌のバイオフィルム形成に関与する。Skip 保有黄色ブドウ球菌は皮膚表面に固着するのではないかと考え、新生児マウスを用いた固着実験モデルを用いて検討している。最近、Skip 保有株は Skip 破壊株に比べ、抗菌ペプチドに対して抵抗性を有する事がわかった。本実験で確立した新生児マウスを用いた付着実験系、固着実験系を用いて Atopy 由来黄色ブドウ球菌の FLG-KO マウスに対する付着性・固着性を今後評価する予定である。

日本人アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子変異解析の現状

海老原全 1、佐々木貴史 1,2、定平知江子 3、川崎洋 1,2、工藤純 4、久保亮治 1,2、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、
3 都立小児総合医療センター皮膚科、4 慶大遺伝子医学)

これまでに日本人アトピー性皮膚炎 (AD) 患者におけるフィラグリン遺伝子 (FLG) 変異解析法を開発し、慶應義塾大学病院皮膚科に通院する日本人 AD 患者および非 AD の対照群の FLG 解析を行ってきた。日本人 AD 患者における FLG 変異は 8 種の変異が報告されているが、我々は現在、主に、再現性よく簡易的に行うことが可能な Taqman プローブを用いた解析法にて、それらの変異解析を行っている。今回、その現状について報告し、臨床型との相関

についての検討結果も述べたい。

また、以前、AD 患者教育のために開始したアトピー教室について報告したが、そのテキストの改訂版を作成したので、追加報告する。

皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

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

アトピー性皮膚炎(AD)の新規原因遺伝子探索のため行なったフィラグリン(FLG)のプロセッシングに関与する重層上皮特異的タンパク質分解酵素 SASPase (Skin Aspartic Protease) 遺伝子変異解析では、慶應の AD 症例 196 人から4種類 A54S(1 人)、I186T(1 人)、V187I(3 人)、R311C(1 人)、正常対照 28 人から2種類 D232Y(1 人)、V243A(1 人) のミスセンス変異を発見した(Matsui et al, EMBO Mol Med, in press)。さらにAD127 人について解析を進め、新規ミスセンス変異 R96C(1 人)を発見した。また多数の健常対照者についてもミスセンス変異の頻度を検討した。一方、イヌの AD と FLG との関連を解明するために、抗イヌ FLG 家兎抗体を作成した。今後は同抗体を用いて FLG 減少犬の探索を進める。

第3部

Langerhans cells are critical in the pathogenesis of atopic dermatitis via TSLP receptor signaling

椋島健治(京大皮膚科)

皮膚樹状細胞サブセットやTh2誘導に重要な役割を果たすとされるTSLPのアトピー性皮膚炎における役割の詳細は不明である。一方、皮膚に曝露された蛋白抗原は主に角層や表皮上層に留まることが知られる。そこで我々は、表皮に存在するランゲルハンス細胞がアトピー性皮膚炎の発症に重要な役割を果たすと考え、ランゲルハンス細胞のみ欠損するマウスやTSLP受容体をランゲルハンス細胞特異的に欠損させるモデルを作製しその役割を検討した。

経皮液性免疫におけるランゲルハンス細胞の役割

大内健嗣¹、久保亮治^{1,2}、足立剛也¹、小林哲郎¹、ダニエラ・ユミ・キタシマ¹、
藤猪英樹³、小安重夫³、天谷雅行¹、永尾圭介¹
(¹慶大皮膚科、²慶大総合医科学研究センター、³慶大免疫学教室)

ランゲルハンス細胞は表皮唯一の樹状細胞であり、皮膚免疫のセンチネルと考えられてい

るが、その in vivo の機能において強いデータが存在しない。我々はこれまで遺伝子銃を利用した免疫法でランゲルハンス細胞が抗原特異的 Th2 液性免疫 (IgG1) を誘導することを報告した。しかし、この実験では皮膚のバリアを故意に回避し、免疫能のみにフォーカスした人工的なセッティングであった。その後ランゲルハンス細胞が表皮タイトジャンクションを貫いて蛋白抗原を獲得しうることを証明したが、その免疫学的結果は不明であった。今回我々は蛋白抗原を用いてランゲルハンス細胞がタイトジャンクションを通して獲得した抗原に対し IgG1 反応を誘導することを証明し、実験的 Staphylococcal scalded skin syndrome にて防御的な役割を担うことを明らかにした。

アトピー性皮膚炎患者皮膚におけるタイトジャンクションバリアと樹状細胞の解析

吉田和恵¹、久保亮治^{1,2}、永尾圭介¹、横内麻里子^{1,3}、川崎洋^{1,2}、海老原全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、3東京電力病院

皮膚バリアは、角層とタイトジャンクションの2つの物理学的バリアと、樹状細胞による免疫学的バリアにより構成される。我々はこれまでに、マウスおよび健常人において活性化したランゲルハンス細胞の突起がタイトジャンクションバリアを突き抜けて角層に達し、抗原取り込みを行っている可能性がある事を示してきた。アトピー性皮膚炎 (AD) 患者では、角層の機能異常があることが報告されているが、機能異常を伴った角層の下におけるタイトジャンクションと樹状細胞との関係については明らかにされていない。現在、AD 患者皮膚においてタイトジャンクションと、表皮樹状細胞を立体的に可視化する事により、タイトジャンクションバリアと表皮樹状細胞の関係を解析している。

皮膚のバリア機能とアトピー疾患の関係に関する疫学的研究

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 年度から京都府和東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、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やアレルギーマーチの関係を非侵襲的に評価するため、アトピー性皮膚炎患者の角層のテープストリッピング検体を用いて、アトピー型アレルギーに関係するサイトカインである TSLP の解析を行ったところ、興味深い知見を得た。

平成 23 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

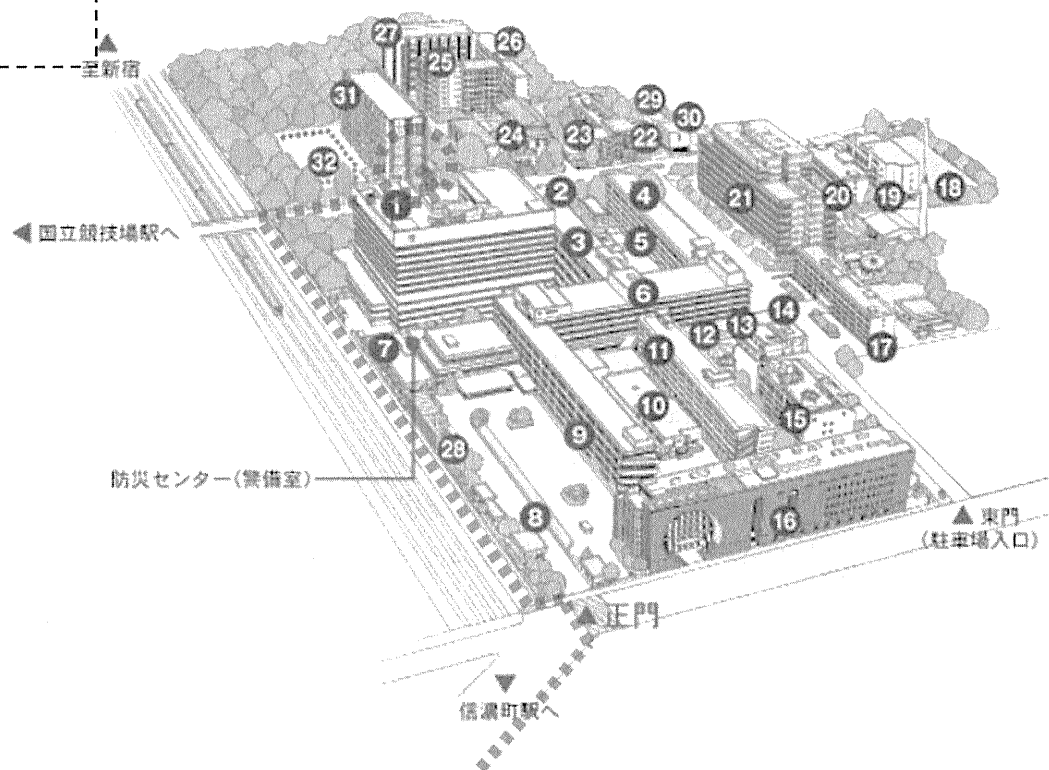
日時:平成 23 年 11 月 16 日(水)14:00-18:30

場所:慶應義塾大学医学部 3号館北棟
(1階ラウンジ)

事務局連絡先: 〒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)内線 62411
FAX:03-3351-6880

E-mail:marikokajima@z3.keio.jp

JR 総武線「信濃町」
駅下車 徒歩約 2 分
① 3号館北棟 1F
ラウンジ



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)

第1部 (座長:海老原全)

14:10-14:30 フィラグリンの関与する皮膚バリア機能の解析

川崎 洋^{1,2}、永尾圭介¹、久保亮治^{1,2}、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)

14:30-14:50 フィラグリン欠損は明らかな皮膚炎を伴わずにダニ抗原による喘息症状を増悪する
鈴木雄介、正木克宜、樹神元博、加川志津子、浅野浩一郎(慶大呼吸器内科)

14:50-15:10 FLG-KO マウスに対する黄色ブドウ球菌の付着・固着性の検討

小島太郎、久恒順三、菅井基行(広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

15:10-15:30 皮膚バリア構造の新しい可視化方法・機能評価方法の開発

久保亮治^{1,2}、石崎逸子³、久保亜紀子⁴、川崎洋¹、大橋善治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アルバックファイ、⁴慶大医化学)

— 休憩 (20 分) —

第2部 (座長:久保亮治)

15:50-16:10 哺乳類皮膚特異的プロテアーゼ SASPase による角質層水分蒸発量の調節機構

松井 毅(京都大学 物質-細胞統合システム拠点)

16:10-16:30 Flaky tail マウスにおける皮膚炎発症の候補遺伝子としての ma 遺伝子の解析

佐々木貴史^{1,2}、塩濱愛子³、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)

16:30-16:50 外来抗原非依存性のアトピー性皮膚炎モデルマウス

永尾圭介1、小林哲郎1、川崎 洋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)

— 休憩 (20分) —

第3部 (座長:佐々木貴史)

17:10-17:30 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

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

17:30-17:50 日本人AD患者におけるFLG変異解析の現状

海老原全1、佐々木貴史1・2、定平知江子1・3、川崎洋1・2、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都立小児センター皮膚科、4慶大遺伝子医学)

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 久保亮治
閉会の辞 天谷雅行

19:00- 懇親会

演題抄録

第1部

フィラグリンの関与する皮膚バリア機能の解析

川崎 洋^{1,2}、永尾圭介¹、久保亮治^{1,2}、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)

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、フィラグリン欠損マウスを作成した。フィラグリン欠損皮膚では角層への物質透過性が亢進しているため経皮免疫応答が亢進すると考えられるが、それは溶媒の種類に影響されることが示唆された。また、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、tape stripping を用いた解析から示唆された。続いて tape stripping 後の TEWL(transepidermal water loss)の推移を観察したところ、フィラグリン欠損皮膚では正常皮膚に比べ、回復が遅延することが確認された。

フィラグリン欠損は明らかな皮膚炎を伴わずにダニ抗原による喘息症状を増悪する

鈴木雄介、正木克宜、樹神元博、加川志津子、浅野浩一郎(慶大呼吸器内科)

ダニ抗原軟膏を耳介に塗布後、同抗原を点鼻投与する喘息モデルでは、フィラグリン欠損マウスで気道炎症の遷延をきたす。このモデルでは肺および脾臓における IL-17A など Th17 系サイトカインの活性化がみられ、特にフィラグリン欠損マウスでその傾向が強いことを前回の班会議で報告した。しかし抗原感作から Th17 サイトカイン活性化に至る免疫学的な機構は不明である。そこで今回はダニ抗原塗布後の耳介局所のサイトカイン mRNA 発現を RT-PCR で検討した。単回塗布後の炎症性サイトカイン反応は総じてフィラグリン欠損マウスの方が鋭敏であるが、中でも IL-6、IL-23、IL-17A といった Th17 関連のサイトカイン発現が強く、かつ遷延する傾向にあった。8 週間ダニ抗原軟膏を繰り返し耳介に塗布しても肉眼的にも組織学的にも明らかな変化をきたさないが、IL-23 mRNA の発現はさらに高まった。以上よりフィラグリン欠損は明らかな皮膚炎を伴わない段階でも皮膚局所での IL-23 などのサイトカイン発現を亢進させ、全身性の Th17 系サイトカイン活性化を通じて気道炎症を増悪・遷延させることが示唆された。

FLG-KO マウスに対する黄色ブドウ球菌の付着・固着性の検討

小島太郎、久恒順三、菅井基行(広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

アトピー性皮膚炎から分離された黄色ブドウ球菌を用いて FLG-KO マウスならびに親株 B6 マウス皮膚に対する付着実験、ならびに付着後の皮膚での増殖実験を行った。比較対照として膿疱疹、SSSS、フルンケル、および敗血症由来株を用いた。付着実験では菌は総じて FLG-KO マウスより、B6 マウスにより多く付着する傾向が見られ、菌株の由来による違いは認められなかった。一方、菌付着後の皮膚での増殖ではアトピー由来株は B6 マウスに比べ FLG-KO マウスで著しく強い増殖を認めた。対照菌群において B6 と FLG-KO について有意差があるかどうか、現在検討中である。

皮膚バリア構造の新しい可視化方法・機能評価方法の開発

久保亮治 1,2、石崎逸子 3、久保亜紀子 4、川崎洋 1、大橋善治 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アルバックファイ、4慶大医化学)

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。

第2部

哺乳類皮膚特異的プロテアーゼ SASPase による角質層水分蒸発量の調節機構

松井 毅(京都大学 物質一細胞統合システム拠点)

地球上の脊椎動物は、約 3 億 6 千万年前に、魚類の体表面の多層上皮様組織を「上皮進化」させて「角質層」を獲得し、現在の哺乳類が持つ乾燥や紫外線にも耐えられる角化重層扁平上皮組織を形成したと考えられる。哺乳類特異的であり、皮膚特異的・顆粒層 SG1 特異的に発現する内在性レトロウイルス型プロテアーゼ SASPase の欠損ヘアレスマウスは、乾燥肌様表皮を呈し、Profilaggrin~Filaggrin へのリンカー配列切断異常による角質層への蓄積が認められた。しかし、角質層水分量が減少するのかが、依然明らかになってはいない。そこで、

発生段階のどの時期から角質層に異常が認められるのかを解析し、その原因を探る事を試みている。このようなアプローチにより哺乳類の適応進化機構のみならず、乾燥肌を伴うアトピー性皮膚炎の発症原因の理解に繋がると考えられる。

Flaky tail マウスにおける皮膚炎発症の候補遺伝子としての ma 遺伝子の解析

佐々木貴史^{1,2}、塩濱愛子³、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 マウスは ft (Flg 遺伝子) 及び ma (matted: ぼさぼさした) の2つの変異を有し、皮膚炎を自然発症する。ft と ma を分離したマウスを作出した結果、皮膚炎を起こす原因は ma 領域にあったため、皮膚炎発症の候補遺伝子として ma 遺伝子の同定を目指した。

前回までに、ma 責任領域を 1972 年に報告された spa[~]ft 間(12.4Mb)から、3.7Mb の領域に絞り込んだ。今回この領域を次世代シーケンサーを用いて解析した結果、CBA マウスと比較して 9 カ所の DNA 変異を同定した。このうち、タンパク質コード領域の変異は ma1 遺伝子のナンセンス変異と、ma2 遺伝子の隣接した 2 塩基の置換によるミスセンス変異の 2 カ所のみであった。ma 変異マウスとして維持されたマウスの解析を行った結果、ma2 の変異は無く、ma1 の変異のみを有していたことから、ma1 を ma 遺伝子と考えている。

外来抗原非依存性のアトピー性皮膚炎モデルマウス

永尾圭介¹、小林哲郎¹、川崎 洋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)

A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family のうち、最も重要と考えられている ADAM17/TACE (TNF α -converting enzyme) を Sox9 発現組織にて欠失させたマウス (TACE/Sox9 マウス) の皮膚症状を解析している。TACE は TNF α などの免疫に重要な役割を果たす分子の機能に関わるのみならず、EGFR (epidermal growth factor receptor) など表皮の分化に重要なレセプターの制御にも関わっており、皮膚の免疫とバリアを結ぶ重要な分子である。TACE/Sox9 マウスは生後 3 週齢頃より掻痒性皮膚病変を呈し、高 IgE 血症を来し、その病態はアトピー性皮膚炎に極めて類似している。

アトピー性皮膚炎患者の皮膚では黄色ブドウ球菌が colonize しており、病態への関与が疑われている。TACE/Sox9 マウスでは皮膚細菌フローラはどのように変化しているのだろうか。今回皮表から細菌培養を行い、プレリナリーな結果を報告する。

第3部

皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

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

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遺伝子でAD患者32名中1名、健常対照者32名中1名から昨年度、新規に発見した7bp欠失によるフレームシフト変異6828del7は、FLG2のFLG様リピートの最後のリピート中に存在するが、AD患者のFLG遺伝子における同種の変異でFLG量の減少とADとの相関が報告されていることから、同様の効果が期待されたため、さらに解析数を増やして、ADとの相関を調べた。その結果、6828del7変異の頻度は、AD患者で0.4%(1/237)、健常対照者で2.4%(2/84)となり、ADと相関する可能性は、ほとんど否定された。

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遺伝子のリピート部をFLG-shotgun法で解読する方法を確立した。

日本人AD患者におけるFLG変異解析の現状

海老原全¹、佐々木貴史^{1・2}、定平知江子^{1・3}、川崎洋^{1・2}、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患者から同定された8種のFLG変異のうち、PCR-DNA sequencing法及びTaqman法による解析方法を確立した。このうち、2種のFLG変異のTaqman法の精度が低いことから、改良を行った。その結果より精度の高い方法が完成し、現在はこの方法を用いてFLG変異解析を運用している。

また、ドイツのグループがGWASによりADとの相関を明らかにした11番染色体q13.5領域の解析を行った。HapMap計画の結果から日本人集団では該当SNPs rs7927894の頻度が非常に少ないと予想されることから、周辺領域のSNPsを含めて検討した。その結果、健常人集団の数が少ないため判断が難しいが、近接SNPs rs3740778でrs7927894のドイツの結果と同様にマイナーアレル頻度が多い傾向があった。

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、2008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い、生活習慣との関係について検討を行っている。

V. 平成 23 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	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
	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	京都大学 物質-細胞統合システム拠点大学 (iCeMS)	特定拠点助教
	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	特任講師
	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	

