

おける IL-17A 産生細胞をフローサイトメトリで確認したところ CD4 陽性の Th17 細胞であった。曝露 7 日後の気管支肺胞洗浄液 (BALF) では好酸球とともにリンパ球も増加していた。

OVA パッチモデルで抗 IL-23 抗体を感作時のみに投与すると BALF の好酸球は有意に減少した。しかし感作時と曝露時の両方に投与した群では好酸球の減少は有意でなかった。反対に曝露時のみに抗体を投与した群では BALF 好酸球数に有意な変化を認めなかったが、気道過敏性が亢進した。OVA 特異的 IgG1 の産生は感作時、曝露時両方で IL-23 抗体を投与した群で有意に減少した。

D. 考察

フィラグリン欠損に伴う表皮バリア障害により Th17 が誘導されることが明らかとなった。さらに経皮感作時には IL-17A や IL-23 の産生が亢進しており、これらをノックアウトすると気道過敏性亢進や BALF 好酸球の増多が早期に消褪する。

我々のこれまでの研究からは皮膚局所での IL-23 が重要であると考えられたため、IL-23 が喘息成立のどの時点で重要かを検討するために抗体投与の実験を行った。その結果 BALF 好酸球増多には感作時の IL-23 が重要であり、曝露時に肺で産生されると想定された IL-23 ではないことが示唆された。さらに曝露時に IL-23 を中和すると気道過敏性が増強するため、感作時と曝露時の IL-23 の役割は反対であることが明らかとなった。一方、抗原特異的 IgG1 は IL-23 依存性に増加しており、この抗体産生は抗原感作の強さを反映するものの必ずしも喘息症状とは比例しないことが示唆される。

経皮感作時にどの細胞が皮膚のど

こで IL-23 を産生するか、誘導された Th17 が IL-17A を産生して効果を発揮するのか等は現在検討中である。

E. 結論

フィラグリン欠損による表皮バリア障害は気道の好酸球性炎症を悪化させ、これには皮膚 IL-23 と肺など全身の Th17 増加を伴う。中でも経皮感作時の IL-23 シグナルを特異的に阻害することが喘息の予防に有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. J. Miyata, K. Fukunaga, R. Iwamoto, Y. Isobe, K. Niimi, R. Takamiya, T. Takihara, K. Tomomatsu, Y. Suzuki, T. Oguma, K. Sayama, H. Arai, T. Betsuyaku, M. Arita, and K. Asano. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* (in press)
2. 浅野浩一郎 経皮感作と気道過敏性 日本小児アレルギー学会誌 26, 46-51, 2012

学会発表

1. K Asano. Plenary lecture. Anti-inflammatory lipid mediators and severe asthma - what we learn from lipidomics analysis of eosinophils – 2012 KAAACI (Korean Academy of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology) annual international congress and East Asia Allergy Symposium, Seoul, Korea, 2012. 5

2. Y Suzuki, K Masaki, S Kagawa, H Kawasaki, K Nagao, A Kubo, T Betsuyaku, M Amagai, K Asano. Epicutaneous Sensitization In Filaggrin Gene-Depleted Mouse Induces Prolonged Airway Eosinophilia Without Obvious Dermatitis. 2013 AAAAI Annual Meeting, San Antonio, USA, 2013. 2
 3. K Masaki, Y Suzuki, S Kagawa, M Kodama, H Kabata, K Tanaka, J Miyata, K Fukunaga, T Oguma, T Betsuyaku, K Asano. Different roles of interleukin-23 during the epicutaneous sensitization and the antigen exposure to the airways on airway inflammation and responsiveness in mice. 2013 AAAAI Annual Meeting, San Antonio, USA, 2013. 2
 4. 浅野浩一郎 シンポジウム「重症喘息の背景と治療戦略」 重症喘息の分子病態 第24回日本アレルギー学会春期臨床大会 大阪, 2012. 5
 5. 浅野浩一郎 イブニングシンポジウム「炎症細胞のトピックス」 好酸球と脂質メディエーター リピドミクス解析から明らかになつたこと 第51回日本鼻科学会学術講演会 千葉, 2012. 9
 6. 正木克宜、鈴木雄介、加川志津子、樹神元博、小熊剛、加畑宏樹、宮田純、田中希宇人、川崎洋、永尾圭介、久保亮治、福永興彦、別役智子、天谷雅行、浅野浩一郎 経皮感作喘息マウスモデルの抗原感作時および暴露時における IL-23 の役割 第62回日本アレルギー学会総会, 大阪, 2012. 11
 7. 鈴木雄介、正木克宜、加川志津子、川崎洋、永尾圭介、久保亮治、別役智子、天谷雅行、浅野浩一郎 経皮感作によるマウス気道の好酸球性炎症はフィラグリン欠損により遷延する 第62回日本アレルギー学会総会, 大阪, 2012. 11
- 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 |

アトピー由来株黄色ブドウ球菌の皮膚定着能に関する研究

研究分担者 菅井基行 広島大学大学院医歯薬保健学研究院細菌学 教授

研究要旨 アトピー性皮膚炎の増悪化に起因する黄色ブドウ球菌感染の意義を明らかにするために、FLG-KO マウス及び野生型マウスを用いて、種々の臨床検体から分離された菌株の皮膚付着性及び固着性、ならびに、AD 由来株のゲノム解析を行った。各疾患由来株の皮膚付着性は、両マウスで顕著な違いは認められなかった。しかしながら、固着実験では、AD 由来株は FLG-KO マウスの皮膚表面に著しく強く固着して、持続的に定着することがわかった。また、AD 由来菌株の比較ゲノム解析から、特有遺伝子の保有や特徴的なゲノム構造等が見つかってきた。これらの結果は、アトピー性皮膚炎患者から分離される黄色ブドウ球菌の病理学的意義を明らかにする糸口になる可能性が考えられた。

研究協力者
久恒順三
広島大学大学院医歯薬保健学研究院
細菌学助教
加藤文紀
広島大学大学院医歯薬保健学研究院
細菌学助教
小島太郎
広島大学大学院医歯薬保健学研究院
細菌学大学院生

として角質構成蛋白質であるフィラグリン (FLG) の遺伝子変異が明らかになってきた。FLG-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 FLG-KO マウスと野生型 B6 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、AD 由来株の性状を明らかにすることを目的とした。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌はヒトと共生する病原細菌の代表であり、極めて多様な病原性を示すことで知られている。皮膚は黄色ブドウ球菌のレザバーとされているが、健常人皮膚からの黄色ブドウ球菌検出率は極めて低い。一方、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, AD) 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、AD の発症・増悪化における本菌感染の位置付けは不確定である。本研究の最終目標は AD 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、AD の重要な素因

B. 研究方法

皮膚付着/固着解析：黄色ブドウ球菌の付着実験、固着実験には野生型 B6 および FLG-KO マウスの生後 4 日後の新生児マウスを用いた。GFP 発現黄色ブドウ球菌の作製：AmCyan 遺伝子を黄色ブドウ球菌発現用ベクター pKAT に組み込み、AD 由来黄色ブドウ球菌 TF3378 株に導入し、蛍光発色の強いクローンを得た。アトピー由来株のゲノム配列解読：各種疾患由来臨床分離 21 株について、Illumina GIIx を用いてドラフト配列を取得した。

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はほぼ同程度であった。また野生型 B6 と FLG-KO マウスとでは、ほとんどのケースで B6 の方が FLG-KO マウスより高い付着性を示した。皮膚に付着した細菌が皮膚上で増殖し、Biofilm 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。その結果、固着実験では AD 由来株 TF3378 は野生型に比較して FLG-KO マウスの皮膚表面に著しく強い固着性を示した。他の AD 株も同様な傾向を示した。このことから、AD 株は皮膚付着してから比較的長時間、FLG 欠失皮膚に持続的に接着する事が明らかとなった。また得られたドラフトゲノム配列の比較解析から、AD 株が持つ特有の serine protease 様遺伝子、exotoxin 遺伝子、II 型制限修飾系遺伝子を同定した。加えて、AD 株は分泌型毒素やエンテロトキシン等のスーパー抗原や外来性遺伝子を持たないことがわかった。さらに FLG-KO マウスでの黄色ブドウ球菌の皮膚層局在を観察する為に AmCyan 発現 AD 株を樹立する事が出来た。

D. 考察

AD 株は野生型の皮膚より著しく強く FLG-KO 皮膚に固着していた。付着の程度は野生型、FLG-KO マウス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が、その理由は不明である。AD 株の比較ゲノム解析アプローチから、特有遺伝子の保有等が見つかってきた。今後、これらの遺伝子の皮膚固

着性への関与を解析する必要がある。今後の検討課題として、AD 株の皮膚上での Biofilm 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 (hBD2 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や皮膚層局在性など、皮膚環境に対する適応性の点から検討する必要がある。

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 FLG-KO 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。今回の結果は Atopy 性皮膚炎患者から分離される黄色ブドウ球菌の病理学的意義を明らかにする糸口になる可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. Shigemoto, N., Kuwahara, R., Kayama, S., Shimizu, W., Onodera, M., Yokozaki, M., Hisatsune, J., Kato, F., Ohge, H., Sugai, M., Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{IMP-6}. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72(1), 109-112, 2012.
2. Kayama, S., Shigemoto, N., Kuwahara, R., Onodera, M., Yokozaki, M., Ohge, H., Kato, F., Hisatsune, J., Sugai, M., Rapid detection of *bla*_{IMP-6} by amplification refractory mutation system. *J. Microbiol. Methods.* 88(1), 182-184, 2012.
3. Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., Furuse, M., Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in

claudin-1-deficient mice. J. Dermatol. Sci. In press. 2012.

学会発表

1. Kato, F., Sugai, M., SptA regulates pathogenicity in *Staphylococcus aureus* 第 85 回日本細菌学会総会 2012.3.29. 長崎市.
2. Kayama, S., Sugai, M., Prevalence of the Imipenem-susceptible meropenem-resistant *K. pneumoniae* (ISMRK) in West Japan. 第 85 回日本細菌学会総会 2012.3.29. 長崎市.
3. Hisatsune, J., Murakami, T., Kojima, T., Tatsukawa, N., Hayashi, I., Yamada, S., Kato, F., Sugai, M., The role in *Staphylococcus aureus* skin-infection, a novel cell wall protein Skip. 第 85 回日本細菌学会総会 2012.3.29. 長崎市.
4. 菅井基行. 黄色ブドウ球菌の病原性発現制御とバイオフィルム形成. 第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 2012. 7.13. 吹田市.
5. 久恒順三, 萩谷英大, 塩田澄子, 菅井基行. 全身播種した市中感染型 MRSA 感染症由来株の解析. 第 32 回広島感染症研究会 2012.11.10. 広島市.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

皮膚表皮特異的遺伝子による角質層制御機構に関する研究

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

研究要旨

哺乳類皮膚表皮顆粒層特異的プロテアーゼである SASPase の欠損マウスは、角質層水分量の減少と共に、Profilaggrin の分解異常を伴っている事をこれまで明らかにしてきた。しかし、角質層水分量が減少する原因は依然不明である。すなわち、SASPase 欠損マウス角質層水分保持不全の分子機構を明らかにしていく事で、角質層バリアーの分子機構も明らかになる事が予想され、アトピー性皮膚炎発症機序の理解にも繋がると考えられる。その為には、顆粒層～角質層に至る分化過程の細胞生物学的解析が重要である。そこで、ゲノム上の SASPase の Promoter の下流に GFP 遺伝子を挿入したノックインマウスを作成した。このマウス皮膚表皮から、SASPase 発現細胞を分離する方法を至適化し、更にこれら SASPase 発現細胞や角質層に特異的に結合する蛍光化合物を探索した。

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

上杉 志成 京都大学 物質-細胞統合システム拠点、教授

を用いて分離し、分離した細胞に対して結合する蛍光化合物をスクリーニングした。

C. 研究結果

SASPase Promoter の下流で GFP 発現マウス皮膚表皮からプロテアーゼを用いて、基底層・有棘層・顆粒層・角質層を分離し、それぞれの細胞における、各種表皮分化マーカーの発現解析を行った。基底層・有棘層においては、keratin-14, keratin-10 等の表皮分化マーカーを保持したままの分離が可能であり、更に顆粒層においても、Filaggrin, Loricrin, SASPase の発現と GFP の発現を確認した。更にこれらのそれぞれ細胞を生きたまま同定するために、蛍光化合物プローブライブラリー (約 400 個) をスクリーニングした。

A. 研究目的

顆粒層から角質層に至る分化過程を細胞生物学的に明らかにする為に、顆粒層・角質層を分離する方法を至適化し、それらに特異的に結合する蛍光化合物を探索する。これら方法により 1 細胞レベルでの細胞生物学的性質を解析する方法を検討する。

B. 研究方法

SASPase Promoter の下流に GFP をノックインしたマウス系統を作製した。このマウスの皮膚表皮の基底層・有棘層・顆粒層・角質層を、プロテアーゼ

D. 考察

皮膚表皮から、表皮細胞の各細胞を

分離し、1細胞レベルでその性質を解析する準備が整った。しかし、高密度の死細胞である角質層の免疫組織科学的解析は困難であり、より分子量の小さな蛍光化合物の探索が必要である。本研究のような蛍光プローブと、GFP陽性細胞とを組み合わせることにより、基底層から角質層に至る細胞生物学的解析を行う事ができ、角質層水分量調節の制御機構を明らかにすることができると予想される。更に臨床サンプルに同様の解析法を応用すれば、未知の病態の理解・診断に有用な系ができるものと予測される。

E. 結論

マウス表皮から各分化段階の細胞を分離し、顆粒層・角質層の細胞生物学的解析を行える準備を整えた。生細胞のままこれら細胞を同定するための新しい蛍光プローブの探索も行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

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.
132:1507-10, 2012.

学会発表

Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease,

SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization and Evolution
The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
Workshop, Mobile elements in development and evolution
December 11-14, 2012, Fukuoka, Japan
Speaker

Matsui T: Endogenous Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization and Evolution
6th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Kyoto Cell-Material Integration
November 8-9, 2012, Kyoto, Japan
Poster presentation

Matsui T: Endogenous Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization
The Montagna Symposium on the Biology of the Skin
October 11-15, 2012, Oregon, USA
Poster presentation

Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization
Fujihara Seminar 2012
A new horizon of retroposon research
July 31-Aug 3, 2012, Kyoto, Japan
Speaker

Matsui T: Mammalian Skin-specific Retroviral-like Aspartic Protease, SASPase is a Key Modulator of Skin Moisturization
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology
Joint Workshop 2
May 28-31, 2012, Kobe, Japan

Kobe International Conference Center,
Kobe, Japan
Selected as a talk

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

Matsui T: Endogenous Retroviral-like
Aspartic Protease, SASPase as a key
modulator of skin moisturization
The 8th Okazaki Biology Conference
Speciation and Adaptation II
- Environment and Epigenetics -
Session7 Evolution of Developmental
systems
March 18-23, 2012, Okazaki, Japan
Selected as a short talk

なし

自然発症アトピー性皮膚炎マウスの解析

研究分担者 永尾圭介 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 専任講師

研究要旨

アトピー性皮膚炎は慢性かつ難治性の皮膚炎を呈し、その病態の本態はバリア破綻に伴う経皮感であると考えられている。一方、経皮的なアレルギーのみでは説明のつかない部分も多く、アトピー性皮膚炎の病態機序の理解を得るためにはヒト同様の表現型を示すモデルが必要である。TACE (TNF α -converting enzyme)/ADAM17 は TNF α や EGFR リガンドなどの膜型蛋白を切断 (シユディング) することで生体内の様々な機能を調節している生物の生存に必須の蛋白分解酵素である。TACE を表皮で欠損させた TACE^{flox/flox}/SOX9-Cre マウスは生後 3~6 週より乾皮症、皮膚炎および著しい搔痒行動をとり、血清 IgE を呈した。皮膚では肥満細胞が増加し、IL-17 を産生する CD4 陽性 T 細胞および γ δ T 細胞の顕著な浸潤が認められた。このマウスモデルは明らかな抗原刺激の非存在下でアトピー性皮膚炎様の症状を呈し、その病態はヒトのアトピー性皮膚炎の一部を反映するものとする。

研究協力者

小林哲郎 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室特別研究員

A. 研究目的

現在アトピー性皮膚炎はバリア破綻が上流にあり、経皮感作から慢性皮膚炎が生じ、喘息や食物アレルギーにつながると考えられている。しかし、乳幼児のアトピー性皮膚炎では必ずしも獲得免疫が成熟した段階で皮膚炎を発症する訳ではなく、何らかの内因性の要素が関係しているとも考えられる。我々は最近 TACE/ADAM17 を Sox9 発現組織 (皮膚では表皮のみ) で欠失させたマウスを作成した。このマウスはアトピー性皮膚炎様の症状を自然発症する興味深い表現型を示した。本研究の目的は TACE^{flox/flox}/SOX9-Cre (TACE-Sox9 マウス) の病態の分子メカニズムを明らかにすることである。

B. 研究方法

TACE^{flox/flox} マウスと Sox9-Cre マウスをそれぞれ C57BL6 背景にバッククロスしたうえで TACE-Sox9 マウスを作成した。TACE-SOX9 マウスの皮膚およびリンパ節をフローサイトメトリーや ELISA を使用し免疫学的に解析した。IgE の関与を検討するために W/W^m マウスとも交配した。

C. 研究結果

TACE-SOX9 マウスはその全てが約 3 週例より乾燥肌を呈した。血清 IgE 値は 4 週齢より高値を示し、14 週齢まで値が上昇する傾向を示した。皮膚には多数の CD4 および CD8 T 細胞の浸潤を認めた。リンパ節では CD69+ の活性型 T 細胞が増加しているのに加え、CD62L-CD44+ の effector memory タイプの CD4+T 細胞が増加していた。サイトカインバランスを解析した結果、リンパ節では IFN γ を産生する Th1 型および IL-4 を産生する Th2 型の CD4T 細胞が増加しているのに加え、IL-17 を

産生する Th17 型の CD4T 細胞が顕著に増加していた。さらに皮膚においても IL17 を産生する T 細胞の数が著明に増加していた。また皮膚では Th17 細胞を誘導するサイトカインである IL-1 β 、IL-6、IL-23、TGF- β の mRNA 発現の増加が認められた。よって、本モデルでは Th1、Th2 に加え Th17 型の免疫応答が関与している可能性が高い。

TACE-Sox9 マウス皮膚での肥満細胞増加および高 IgE 血症はヒトアトピー性皮膚炎と類似していた。病態への IgE-肥満細胞の関与を検討するために TACE-Sox9 マウスを肥満細胞欠損マウスである W/W^v 背景に交配した。興味深いことに、皮膚を含む全身で肥満細胞を欠失した TACE-Sox9; W/W^v マウスは通常の TACE-Sox9 と同程度のアトピー様症状を呈し、本モデルでは肥満細胞の役割は完全に否定された。

補足的な観測ながら、TACE-Sox9 マウスは毛嚢幹細胞の定着を認めないために進行性かつ不可逆性の脱毛を呈した (Nagao et al., Stem Cells, 2012)。

D. 考察

表皮にて TACE を欠失させた TACE-SOX9 マウスはアトピー性皮膚炎様症状を呈し、明らかな抗原の非存在下でそのような症状が出現しうることが分った。TACE-Sox9 マウスでは Th1、Th2 それぞれが増加するパターンを示す一方で、IL-17 を産生する T 細胞の顕著な認められたことから、これらの細胞およびサイトカインが TACE/SOX9 マウスの示す皮膚炎の病態に関わっている可能性が示唆された。

E. 結論

現在経皮感作に伴うアレルギーが病態だと考えているアトピー性皮膚

炎でも明らかな抗原の非存在下でアトピー性皮膚炎様の症状が出る。TACE-SOX9 マウスは掻痒や高 IgE 値などを示す一方で、IL-17 の顕著な増加が認められた。今後はこの免疫異常を誘因している因子を解析し、アトピー性皮膚炎の病態との関連を明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M: Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol*, 13 (8): 744-752, 2012.
2. Nagao K, Kobayashi T, Ohyama M, Akiyama H, Horiuchi K, Amagai M: Brief Report: Requirement of TACE/ADAM17 for Hair Follicle Bulge Niche Establishment. *Stem Cells*, 30 (8): 1781-1785, 2012.

学会発表

Kobayashi T, Horiuchi K, Ohyama M, Akiyama H, Amagai M, Nagao K. Requirement of TACE/ADAM17 for the maintenance of hair follicle stem cell niche. 75TH Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 9~12, 2012. Raleigh, North Carolina, U.S.A.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

Patent No. US 8,350,118 B2.

Date of Patent: Jan 8, 2013

Allergic disease model animals. Inventors: Masayuki Amagai, Akiharu Kubo, Keisuke Nagao.

Assignee: Keio University

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皮膚科・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。角層構成蛋白フィラグリンの変異がアトピー性皮膚炎の主要な発症要因となることから、角層のバリアが先天的に障害されていると、様々な抗原が皮膚を通して体内に侵入しやすくなることで、やがて感作が成立しアレルギー疾患を発症するようになる、という仮説が注目されている。我々はフィラグリンノックアウトマウスを用いて、フィラグリンを欠損した角質の内側で TJ バリアが障害を受けるのかについて検証し、フィラグリン欠損のみでは、表皮の TJ バリア機能異常は来さない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

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。表皮の最外層には角質層が存在し、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。角層構成蛋白フィラグリンの変異がアトピー性皮膚炎の主要な発症要因となることから、角層のバリアが先天的に障害されていると、様々な抗原が皮膚を通して体内に侵入しやすくなることで、やがて感作が成立しアレルギー疾患を発症する

ようになる、という仮説が注目されている。しかし、角質層バリアの内側にはタイトジャンクション (TJ) によるバリアが存在している。アトピー性皮膚炎患者皮膚における TJ バリアの変化については、TJ バリア機能は保たれているという報告と、TJ バリアの破綻が観察されるという報告の双方があり、見解は一定していない。我々はマウスモデルを用いて、フィラグリンを欠損した角質の内側で TJ のバリアは障害を受けるのかについて検証した。

B. 研究方法

これまで我々はマウス皮膚を用いて、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ことを証明してきた。マウス皮膚では、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、表皮を TJ バリアの外側と内側に区画化していると考えられる。フィラグリン欠損マウスを用いて、表皮 TJ バリア

の構造・機能の変化について解析した。

C. 研究結果

まずフィラグリン欠損マウスの表皮 TJ 機能を解析した。皮膚切片の染色像、皮膚表皮シートの3次元観察において、形態学的な異常は認められなかった。次に *in vivo* での浸透性評価を、sulfo-NHS-LC-biotin をプローブに用いて行ったが、新生児期および成体のいずれにおいても、野生型との間に違いは認められなかった。また、表皮より抽出した mRNA を用いて様々な TJ 関連蛋白の発現変化を調べたが、ここでも野生型との間に違いは認められなかった。以上から、フィラグリン欠損のみでは、表皮の TJ バリア機能異常は来さないことが明らかとなった。

D. 考察

フィラグリン欠損のみでは表皮 TJ には検出可能な異常は観察されなかった。フィラグリン欠損に端を発するアトピー性皮膚炎においては、障害された角質バリアの下で感作がまず成立し、その後、抗原の侵入に引き続いて皮膚炎が生じたときに二次的に、表皮 TJ バリアが障害されることが示唆された。表皮 TJ バリアが障害されると二次的に角質の形成異常が起こることがクローディン 1 KO マウスの解析より示されており、炎症、TJ バリア障害、角質形成異常、さらなる抗原侵入にともなう炎症の悪化、という悪循環が生じることが考えられる。

E. 結論

マウス皮膚において、表皮 TJ バリア異常はフィラグリン欠損のみでは引き起こされなかった。アトピー性皮膚炎患者皮膚で観察される表皮 TJ バ

リア異常は、皮膚炎が生じた後に起こる二次的なものであることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表（平成 24 年度）

論文発表

英語総説

1. Kubo A, Nagao K, and Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*. 122:440-447, 2012.
2. De Benedetto A, Kubo A, and Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 132:949-963, 2012.

英語論文

1. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WHI, Kudoh J, Amagai M, and Matsui T. Mutations in the SASPase Gene (ASPRV1) Are Not Associated with Atopic Eczema or Clinically Dry Skin. *J Invest Dermatol*. 132:1507-1510, 2012.
2. Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho Y-H, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, and Amagai M. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol*. 13:744-752, 2012.
3. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A,

Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, and Amagai M. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*. 129:1538-1546.e1536, 2012.

4. Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci*. in press.

日本語総説

1. 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*. 19:32-39, 2012.
2. 久保亮治. 皮膚バリア機能と表皮タイトジャンクション. *マルホ皮膚科セミナー*. 2012.
3. 久保亮治. 三次元イメージングで出会う皮膚銀河の天の川. *日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号*. 122:3697-3699, 2012.
4. 久保亮治. 皮膚タイトジャンクションバリアと疾患. *日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号*. 122:3268-3270, 2012.
5. 久保亮治. 皮膚の物理的バリアと免疫のかかわり. *医学のあゆみ*. 242:774-779, 2012.

学会発表

英語招待講演

1. Kubo A. Surface Barrier and Immunology of the Skin. SBARIS 4th stage 3rd meeting, Osaka, 2012.3.23
2. Kubo A. 3D Imaging of the Mammalian Epidermis. 37th Annual Meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology, Naha, Okinawa, 2012.12.7-8

日本語招待講演

1. 久保亮治. 皮膚バリア構造とバリア破綻疾患. 発生工学・疾患モデル研究会 第92回定例会, 東大医科研, 2012年3月
2. 久保亮治. 皮膚の角化重層上皮によるバリア機構と疾患. 第85回日本細菌学会総会, 長崎, 2012年3月
3. 久保亮治. 皮膚バリア学 ~身体の内と外を区切るとのこと~. 大阪大学薬学部大学院講義, 大阪, 2012年4月
4. 久保亮治. タイトジャンクションバリアと疾患. 第111回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012年6月
5. 久保亮治. 三次元イメージングで出会う皮膚銀河の天の川. 第111回日本皮膚科学会総会, 京都, 2012年6月
6. 久保亮治. アレルギー疾患発症因子としての皮膚バリア障害. 第49回小児アレルギー学会, 大阪, 2012年9月
7. 久保亮治. Pros and Cons:バリア障害か炎症か:バリア障害か炎症か~バリア障害について. 第49回小児アレルギー学会, 大阪, 2012年9月
8. 久保亮治. TOF-SIMSを用いた皮膚角質バリア構造の可視化. JST ERATO (末松ガスバイオロジープロジェクト) JST さきがけ (炎症の慢性化機構の解明と制御) 慶應義塾大学医学部医化学教室 共同講演会:質量分析で何が出来るか?—生命科学研究での有用性—, 東京, 2012年9月
9. 久保亮治. 皮膚から全身へ ~免疫・アレルギー感作に関わる皮膚表面のバリア機構~. 第1回創薬イノベーション懇話会, 東京, 2012年11月

英語学会発表

1. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Ohashi Y, and Amagai M. 2012. The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties, as revealed by TOF-SIMS imaging. In 62nd Montagna Symposium on the Biology of Skin. Portland, Oregon. 2012.10.12
2. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. 2012. Dendritic cells penetrate epidermal tight junction barriers to uptake external antigens: a possible involvement in atopic dermatitis. In Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia. Melida, Mexico. 2012.11.2

日本語学会発表

1. 川崎洋, 永尾圭介, 久保亮治, 畑毅, 清水篤, 水野秀昭, 山田健人, 天谷雅行. フィラグリリン欠損マウスにおける角質バリア機能異常と経皮免疫応答の亢進. 第19回分子皮膚フォーラム, 青森, 2012年4月
2. 吉田和恵, 横内麻里子, 石井健, 永尾圭介, 天谷雅行, 久保亮治. ヒト表皮におけるタイトジャンクションバリアの解析. 皮膚かたち研究学会, 東京, 2012年7月

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

《国際特許》

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)
米国特許出願番号:12/736,800
(登録日:2013年1月8日)
特許番号:US2011/0088103
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:Keio University
発明者: Masayuki Amagai, Akiharu Kubo,
Keisuke Nagao
発明の名称: Allergic Disease Model
Animals

《国内特許》

公開番号:WO2009/139191
(公開日:2009年11月19日)
優先権主張:特願2008-129597
(2008年5月16日)
特願2008-303926
(2008年11月28日)
出願人:学校法人慶應義塾
発明者: 天谷雅行、久保亮治、永尾圭介
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 アトピー性皮膚炎 (AD) の危険因子であるフィラグリン (FLG) 遺伝子は、相同性の高い 10~12 ユニットの FLG リピートを含む長大なコーディング領域 (12~14kb) からなり、解析対象者全員の全解読が困難だった。そこで、以前開発した FLG-shotgun 法に次世代シーケンサー (NGS) を組み合わせた FLG 全解読法の確立を試みた。その結果、NGS 1 回のランで、96 人分の FLG ORF 全領域をカバーする NGS FLG-shotgun 法を開発した。この NGS FLG-shotgun 法を用いて慶應大 AD 患者 120 人の解析を行った所、新たに 7 種の新規ナンセンス及びフレームシフト FLG 変異を検出し、FLG 変異保有率が 10.8% (13/120) から 16.7% (20/120) となった。これらの結果から、日本人集団にはこれまでの解析では見落とされていた頻度の低い FLG 変異が多く存在する事が予測され、正しい FLG 変異保有率を算定するためには、FLG 遺伝子の全解読が必要である事が示唆された。

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 MSD アレルギー研究寄附講座
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 特任助教

大変労力のかかる手法であったため、その後は簡便な TaqMan 法による既知 FLG 変異のスクリーニングのみを行って来た。今年度は我が国における FLG 変異保有率を明らかにするため、FLG-shotgun 法に比べ簡便・安価である次世代シーケンサー (NGS) を用いた FLG 遺伝子の全解読法 (NGS FLG-shotgun 法) の開発と日本人 AD 患者群における新規 FLG 変異の発見を目指した。

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。しかし FLG 遺伝子は、相同性の高い 10~12 ユニットの FLG リピートを含む長大なコーディング領域 (12~14kb) からなり、解析対象者全員の全解読が困難である (図 1 a)。そのため、FLG 遺伝子全解読法として FLG-shotgun 法を開発したが、

B. 研究方法

以前開発した FLG-shotgun 法を改良し、NGS を用いた NGS FLG-shotgun 法の開発をおこなった。FLG リピート領域は FLG-shotgun 法と同じ 4 種の PCR Primer セットで増幅した。FLG リピート以外の領域は、exon 2 全域、exon 3 FLG リピート前領域、FLG リピート後領域の 3 種の PCR Primer セットで増幅した (図 1 b)。これらの PCR 産物を適当なモル比で混合し、FLG 全長を

カバーする PCR 増幅産物を得た。次に、この増幅産物に対し Tn5 transposon を用いて 300~500bp 程度に断片化及びシーケンスタグを導入した次世代シーケンサー用ライブラリーを作製した。シーケンスタグとして 96 種類のタグを用い、96 サンプルを等量混合したサンプルを作製し、次世代シーケンサー（イルミナ、MiSeq）により解読を行った。

得られた配列はシーケンスタグごとに分配し、それぞれを bwa プログラムを用いて FLG 遺伝子標準配列 (A 型) にマッピングした。マッピングした配列から遺伝子変異を同定するために GATK プログラムを用いて DNA 変異を抽出し、snpEFF プログラムを用いて DNA 変異に対応する FLG アミノ酸変異を同定した。同定したアミノ酸変異の中からナンセンス及びフレームシフト変異を抽出し、これらの変異の有無を IGV ビューアーを用いて確認した。

慶應義塾大学医学部皮膚科で収集した日本人 AD 患者 120 人を対象とした。このうち 23 人は以前に FLG-shotgun 法で全解読を行った患者である。また、120 人全員について TaqMan 法による既知変異のスクリーニングもすべて行っている。

C. 研究結果

次世代シーケンサーが解読した塩基配列を FLG 配列へマッピングした結果、FLG コーディング領域全域をカバーする配列を得る事ができ、この配列を標準配列と比較した結果、標準配列と異なる箇所を抽出する事ができた。(図 1 c)。抽出した配列を snpEFF で解析し、ナンセンス及びフレームシフト変異を抽出した。その結果、解析対象の AD 患者が有していると判明していた既知の FLG 変異はすべて検出し

(図 2)、さらにこれまでに日本人集団から報告されていない 7 種の新規 FLG 変異を検出した (図 3、表 1)。

D. 考察

ランニングコストが安価なパーソナル次世代シーケンサーを用いた NGS-FLG shotgun 法を開発した。これまでに検出した FLG 変異をすべて検出できたことから、解読法として信頼できると考えられ、さらに 7 種の新規 FLG 変異も検出する事ができた。このうち 2 種類の新規変異 (S783*、Q3365*) は以前に FLG-shotgun 法で全解読した際には見落としていたものであり、NGS FLG-shotgun 法は、従来法に比べて簡便で低コストであるばかりか検出精度も上がっていることが実証された。この 7 種の新規変異のうち、5 種はサンガー法でも確認ができた。現在、残りの 2 種の確認を行っている。

本方法の問題点としては、

- ① FLG は genotype ごとに FLG repeat 数が異なっているが、その点を考慮したマッピングをしておらず、マッピングを間違えている可能性があり、FLG-shotgun 法と異なり、元のアレルの完全な再構築は行えない。
- ② 多くの PCR キメラ産物が存在し、それらを排除できない。
- ③ bwa プログラムは相同性配列が複数箇所存在する場合、該当するリードを均等に割り振るため、相同性の高い FLG リピートに存在する多型/遺伝子変異は複数箇所に割り振られたため、頻度が低下する。新たに発見した 7 種の変異のうち、2 種は相同性の高い FLG リピートに存在するため、現在の所、変異を含む領域の特定ができていない。
- ④ 本方法では、PCR 増幅時のエラーやキメラ PCR 産物の形成により、人工的

な配列が解読される可能性がある。しかし、PCR 増幅時のエラーの頻度以上で検出される遺伝子多型・変異は、元の配列に存在していることが予想される。

これらの事から、NGS FLG-shotgun 法では、完全な配列の再構築は困難であるが、FLG 遺伝子に存在するナンセンス及びフレームシフト変異は、見逃す事なく、検出が可能であった。

また、NGS FLG-shotgun による 120 人の解析結果から、新たに 7 種の FLG 変異を検出する事ができ、FLG 変異をもつ AD 患者も 10.8%から 16.7%となった。これらの結果から、日本人集団には、頻度の高い数種の FLG 変異と非常に頻度の低い数多くの FLG 変異が存在し、そのため欧州の様に代表的な FLG 変異だけの解析では、FLG 変異保有率に関して、間違えた結論を導く可能性がある事が示唆された。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた安価な FLG 遺伝子全解読法として新たに NGS FLG-shotgun 法を開発した。同法による AD 患者 120 人の解析から、新たに 7 種の FLG 変異を検出する事ができ、FLG 変異をもつ AD 患者も 10.8%から 16.7%となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 24 年度)

論文発表

1. Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Kudoh J. Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. *Vet. Dermatol.*, 24 (1), 25-31.e7, 2013.
2. Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, Kubo A, Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WHI, Kudoh J, Amagai M, Matsui T. Mutations in the SASPase gene (*ASPRVI*) are not associated with atopic eczema or clinically dry skin. *J. Invest. Dermatol.*, 132 (5), 1507-1510, 2012.

学会発表

1. S. Kanda, T. Sasaki, A. Shiohama, K. Nishifuji, M. Amagai, J. Kudoh, T. Iwasaki. Characterization of dog filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. 7th World Congress of Veterinary Dermatology, Vancouver, Canada, July 24-28, 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

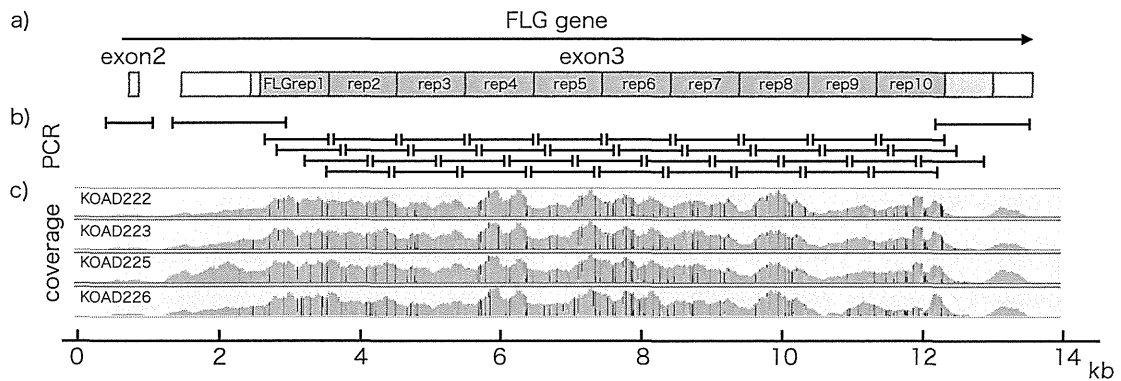


図1 NGS FLG-shotgun 法による解読結果

- a) FLG 遺伝子構造と FLG リピート exon 1 はコーディング領域外のため省略
- b) PCR 領域 FLG リピート領域は、4種のPrimerセットで全域をカバー
- c) NGS FLG-shotgun の結果 濃いグレーの箇所は、標準配列と異なる箇所を示す。

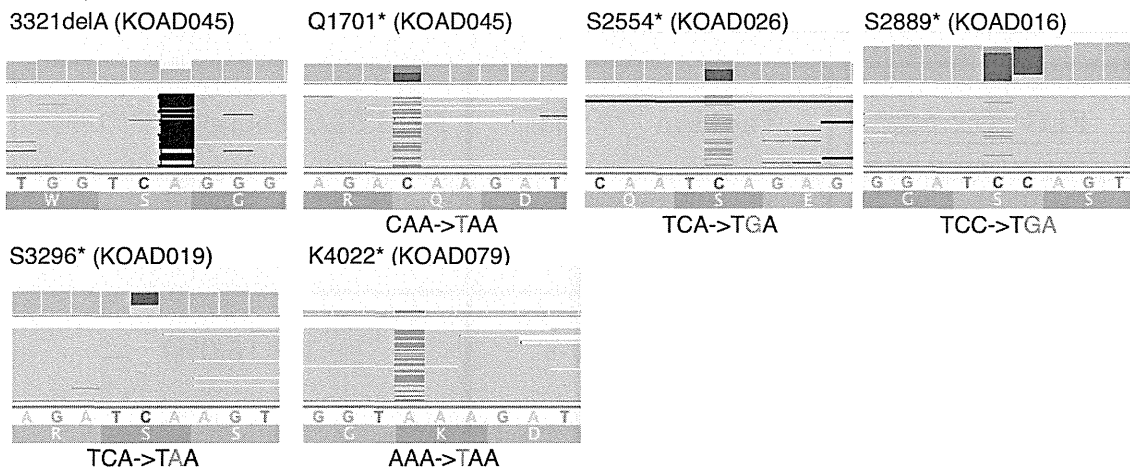


図2 NGS FLG-shotgun 法による既知日本人 FLG 変異の検出

TaqMan 法で検出した既知の6種類の変異をすべて検出する事ができた。

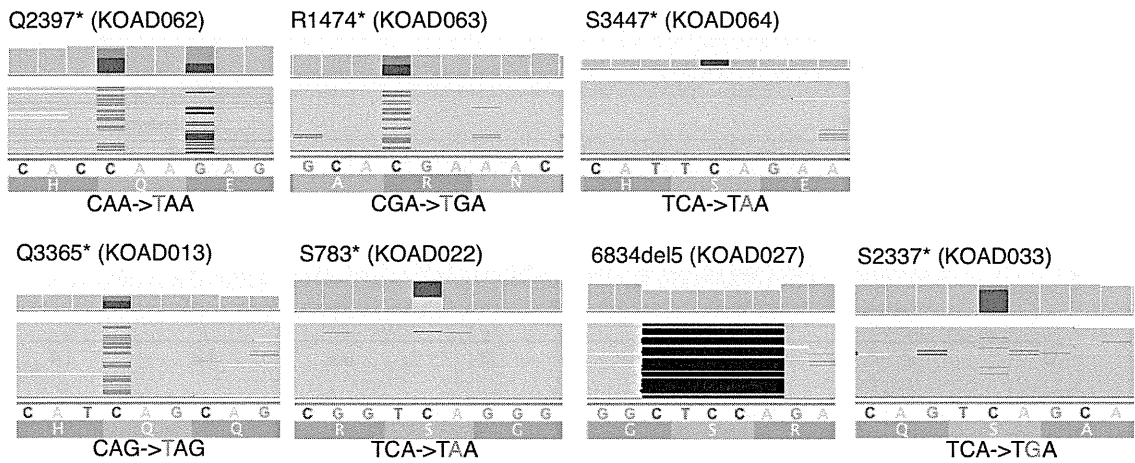


図3 NGS FLG-shotgun 法による新規の日本人 FLG 変異の検出
7 種の新規日本人 FLG 変異を検出した。

表1 日本人 AD 患者に対する FLG 解析結果

FLG 遺伝子型*	TaqMan での解析	NGS FLG-shotgun での解析
AA	107 (89.1%)	100 (83.3%)
Aa	13 (10.8%)	18 (15.0%)
aa	0 (0%)	2 (1.7%)
合計	120	120

*A、a はそれぞれ、正常遺伝子、変異遺伝子を表す。

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治研究事業))
分担研究報告書

日本人 AD 患者における新規 AD 原因遺伝子同定の試み

研究分担者 海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 准教授

研究要旨 これまでに、病態解明のために慶大病院皮膚科を受診した 230 人以上の日本人アトピー性皮膚炎 (AD) 患者のフィラグリン (FLG) 変異解析を行ってきたが、FLG 変異を有する AD 患者は 16%前後と決して高くなく、他の遺伝的もしくは後天的な要因の関与が考えられた。そこで、新規 AD 原因遺伝子の同定を目指し、日本人 AD 患者に対し AD に関連している可能性の高い遺伝子群の全 ORF 領域の解読を試みた。また AD 診療向上のために行っているアトピー教室の治療への有用性について解析・検討した。

研究協力者

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部総合医
科学研究センター
特任講師

塩濱愛子 慶大 MSD アレルギー研究
寄附講座 特任助教

定平知江子 都立小児総合医療センター
皮膚科

川崎洋 日本予防医学協会
リサーチ・レジデント

大山 学 慶應義塾大学医学部
皮膚科学教室 専任講師

工藤 純 慶應義塾大学医学部
遺伝子医学研究室 教授

天谷雅行 慶應義塾大学医学部
皮膚科学教室 教授

A. 研究目的

1. 現在までに多くの集団でアトピー性皮膚炎 (AD) とフィラグリン (FLG) 遺伝子変異との関連が報告されており、FLG 蛋白の減少により皮膚バリア機能が障害されることが AD の発症の根底の 1 つにあることが明らかになった。これまでに、我が国の AD 患者群における FLG 遺伝子変異の寄与度を評価するために FLG 変異の解析法を確立した。この方法で慶應大を受診した AD 患者 230 人に対して解析したが、FLG 変異を有する AD 患者は 16%前後と決して高くなく、他の遺伝的もしくは後天的

な要因の関与が考えられた。そこで、新規 AD 原因遺伝子の同定を目指し、日本人 AD 患者に対し AD に関連している可能性の高い遺伝子群の全 ORF 領域の解読を試みた。

2. 成人の AD 患者を対象にした外来教育プログラム (アトピー教室) の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 特徴的な症状を示す AD 集団として、最初の解析対象は AD に脱毛症 (Alopecia areata: AA) を併発している 6 患者を選択した。

AD 関連遺伝子を効率的解読するために、AD に関連している可能性の高い遺伝子群として①過去に AD と相関があると論文報告された遺伝子②尋常性魚鱗癬の原因遺伝子③脱毛症に関与の可能性が指摘されている遺伝子④ IL 及びそのレセプター⑤ケモカイン及びそのレセプター⑥シグナルパスウェイ⑦抗菌ペプチド⑧皮膚マイクロアレイ解析で高発現量遺伝子、合計 365 遺伝子を選択した。日本人 AD 患者に対しこれらの 300 遺伝子を解読するために、Haloplex (Agilent 社) を用いて解読を行った。

これらの 365 遺伝子に対して、Haloplex プローブを設計し、制限酵素