

処理したゲノムDNAとハイブリダイゼーションを行った。対象配列を含むDNA断片は環状DNAを形成することから、これらをPCRで増幅し、ライブラリーを作製した。これらを次世代シーケンサーMiseqで解読した。

2. 慶應義塾大学病院皮膚科アトピー教室を受講した中等度以上のAD患者20人に関して、受講前後で、指導内容の理解度・生活への反映度についてのアンケート調査、皮疹の重症度(Severity Scoring of Atopic Dermatitis: SCORAD)を比較検討した。

### C. 研究結果

1. 次世代シーケンサー用のDNAライブラリーは、メーカー推奨の方法を用いBioanalyzer 2100を用いて評価を行った。その結果、予想されたように200~500bpに断片化されたDNAライブラリーを得る事ができた(図1)。この方法を用いてAAを併発しているAD患者6人分ライブラリーを作製した。これらのサンプルを等量混合し、次世代シーケンサーMiseqを用いて解読した。得られた配列を標準配列にマッピングした結果、対象とした遺伝子配列に対し、平均カバレッジ22.0~35.4の配列を解読した(表1、図2)。これらの解読した配列から、アミノ酸変異を伴う変異を抽出し、多型としてdbSNP135データベース中に登録されていない多型を抽出した。その結果、6人から20カ所のミスセンス変異を同定した。そのうち、6変異が予測ソフトによりシビアな変異と予測された(表2)。

2. アトピー教室に関するアンケート結果からは、指導内容の中では皮膚のバリア機能に関する知識が新たに得られた知識であり、生活の中では、スキンケア、住環境、衣服、紫外線対策

が有意に反映されていた。また、受講前後でSCORADは平均36.2から24.0に有意に低下していた。

### D. 考察

1. 今回AD+AAを併発している患者に対して、365遺伝子の解読を行った結果、平均3.33カ所のアミノ酸変異を伴う遺伝子変異を同定した。これまでのexome解析では、150~300ヶ所同定されており、365遺伝子の解析に対応させた場合、2.4~4.7カ所に相当することから、妥当な数値だと考えられる。解析対象とした遺伝子のなかでサイトカインレセプターに多く変異が同定された。今回の6人の解析では共通の遺伝子や変異を同定する事はできなかったが、この方法を用いて解析をする事により、患者共通の遺伝子が見えてくると期待される。

2. アトピー教室は外来プログラムであるために、簡便かつ患者の時間的な負担が少なく、より多くの患者の理解を深める有用な手段となり得ると考えられた。

### E. 結論

ADとAAを併発している患者のAD関連365遺伝子を対象とした遺伝子解読を行い、20カ所の新たなミスセンス変異を同定した。

外来教育プログラムは、疾患に対する理解を深め、皮疹の改善につながる事が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表(平成24年度)

論文発表

なし

学会発表  
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況(予  
定を含む)  
なし

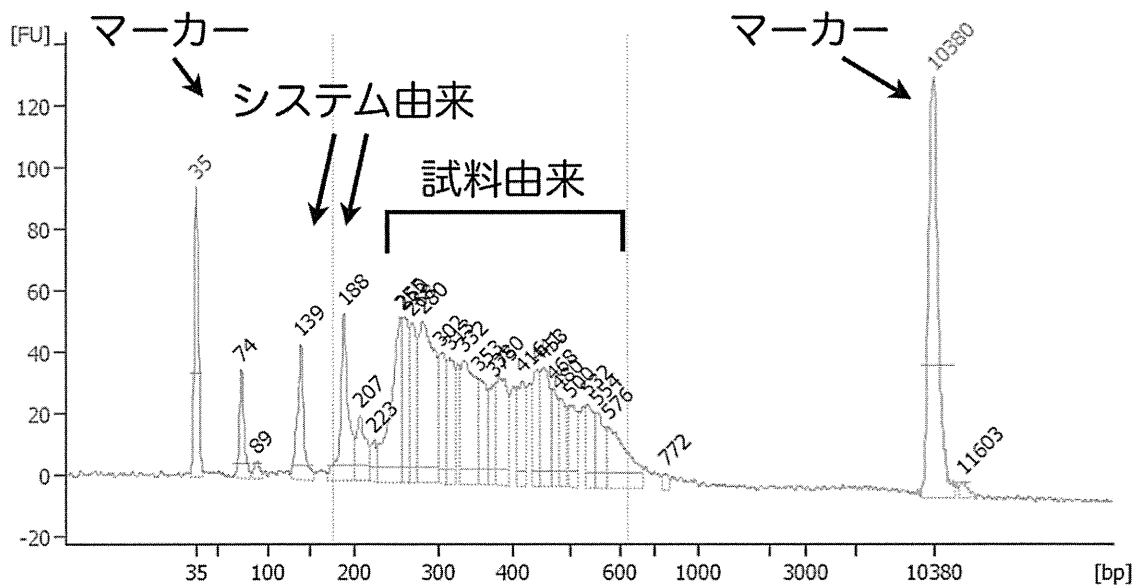


図1 ライブラリーの評価

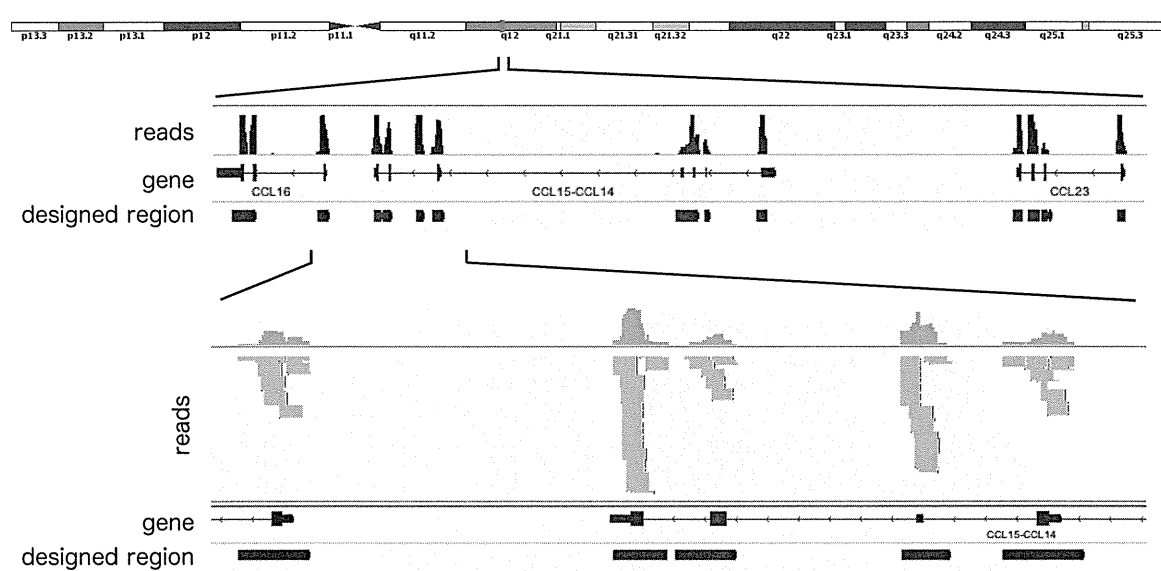


図2 解読配列のマッピング結果

表1 次世代シーケンサー解析結果

	Total reads	on target reads	Av. coverage
AD055	585991	219654	22.0
AD058	886850	343546	34.3
AD062	823784	356788	35.4
AD074	650498	340316	34.5
AD108	623471	309920	30.4
AD155	585991	347088	32.5

表2 変異解析結果

	chr.	Location	gene	mutation	zygosity	chr.	SIFT (mutationのシビアさの予測)
KOAD055	chrX	117874982	IL13RA1	T31A	heterozygote	Xq24	0.50
	chr1	153233748	LOR	G108A	heterozygote	1q21	time out error
KOAD058	chr10	5005681	AKR1C1	F15L	heterozygote	10p15	0.70
	chr11	117869638	IL10RA	P340R	heterozygote	11q23	0.11
	chr1	154401804	IL6R	R73T	heterozygote	1q22	0.36
KOAD062	chr5	38921801	OSMR	Y557C	heterozygote	5p13	0.00
	chr11	65744142	SART1	E588K	heterozygote	11q13	1.00
	chr16	31368604	ITGAX	G117W	heterozygote	16p11	0.01
	chr1	152283700	FLG	R1221H	heterozygote	1q21	time out error
KOAD074	chr3	9974903	IL17RC	V565L	heterozygote	3p25	0.31
	chr11	7985018	NLRP10	P9T	heterozygote	11p15	0.00
	chr19	14157021	IL27RA	R275H	heterozygote	19p13	0.17
	chr2	70188262	ASPRV1	V187I	heterozygote	2p13	0.20
KOAD108	chr11	117870150	IL10RA	A511T	heterozygote	11q23	0.64
	chr11	130067759	ST14	R460G	heterozygote	11q24	0.52
	chr1	153233748	LOR	G108A	homozygote	1q21	time out error
	chr3	9945784	IL17RE	V113L	heterozygote	3p25	0.96
KOAD155	chr3	112357383	CCDC80	A457V	heterozygote	3q13	0.29
	chr4	123854605	SPATA5	M153T	heterozygote	4q28	0.59
	chr17	4637946	CXCL16	D259E	heterozygote	17p13	0.10

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

**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**

研究分担者 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

**研究要旨**

京都府山間部の一小・中学校の全児童・生徒を対象として、皮膚検診、喘息、アレルギー性鼻炎に関する質問票調査、血清総 IgE 値やダニ・スギ特異 IgE 値の検討を行い、乾燥皮膚と血清 IgE 値の関係について解析した。小中学生およびその保護者には 4 年前に皮膚の乾燥を防ぐ入浴法や生活習慣に関する教育介入を行っている。また、皮膚のバリア機能がアレルギー・マーチに関係する表皮角化細胞のサイトカイン産生におよぼす影響をテープストリッピング法で検討した。その結果、小中学生のアトピー性皮膚炎、乾燥皮膚、喘息、アレルギー性鼻炎の有病率は、十数年前からの検診結果と同じ程度であったが、血清総 IgE 値、ダニ特異 IgE 値は、皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣に関する教育介入を行う前と比して低下してきている傾向がみられ、生活習慣と環境中のアレルゲンに対する経皮感作の関連が示唆された。また、アトピー性皮膚炎患者において、角層中の TSLP の発現が皮膚の乾燥に伴って増加したことから、皮膚のバリア機能の低下は Th2 の誘導に重要な TSLP の発現と密接に関連すると考えられるとともに、今後アレルギーマーチを予見する方法として角層中の TSLP 発現を評価する方法が有用な可能性が示唆された。

**研究協力者**

若森健 (京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学研修員)  
益田浩司 (京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学講師)

の発症につながる可能性を示唆している。本研究では、小児の入浴や暖房などの生活習慣に関する実態を調査した後、乳幼児期から皮膚の乾燥を防ぐ適切な生活習慣と保湿スキンケアを、小中学生や乳幼児の保護者に指導して実践を促すことによって、アトピーマーチを予防できる可能性を検討することを目的とする。

また、皮膚のバリア機能とアトピー疾患の発症に関係するサイトカインの角層中での発現との関係を検討し、皮膚の乾燥とアレルギー・マーチの関連を実証することを目的とする。

**A. 研究目的**

乾燥皮膚から侵入した吸入アレルゲンによって成立した感作は、その後喘息やアレルギー性鼻炎を次々に発症するアトピーマーチを引き起こすと考えられる。これまでのわれわれの検討ではアトピー性皮膚炎や喘息、花粉症がみられない軽度の乾燥皮膚のみを呈する小児においても、血清総 IgE 値やダニ・スギ特異 IgE 値が上昇していた。これは、表皮バリア機能が低下している小児では、環境中のアレルゲンへの経皮的感作が成立しやすく、将来喘息やアレルギー性鼻炎など

**B. 研究方法**

京都府山間部の一小・中学校の全児童・生徒を対象として、アトピー性皮膚炎や乾燥皮膚の有無に関する皮膚の検診を行うとともに、喘息やアレル

ギー性鼻炎の有無について質問票による調査を行う。また全児童・生徒から血液を採取し、血清総 IgE 値やダニ・スギ特異 IgE 値を測定し、乾燥皮膚と血清 IgE 値の関係について解析する。小中学生およびその保護者には4年前に皮膚の乾燥を防ぐ入浴法や生活習慣に関する教育介入を行っている。さらに、適切な入浴法・暖房法および保湿スキンケアの方法とその意義に関する教育を、本自治体で行われる乳幼児検診に参加した保護者すべてに行う。

さらに、アトピー性皮膚炎患者の角層の TSLP をテープストリッピング法を用いて測定し、バリア機能に関する計測値との関連を解析するとともに、保湿のスキンケアが角層中 TSLP におよぼす影響を検討する。

### C. 研究結果

小中学生のアトピー性皮膚炎、乾燥皮膚、喘息、アレルギー性鼻炎の有病率は、十数年前からの検診結果と同じ程度であった。一方で、血清総 IgE 値、ダニ特異 IgE 値は、皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣に関する教育介入を行う前と比して低下してきている傾向がみられた。

また、4年前から同自治体で出生した乳児と幼児を対象に皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣に関する個別指導を継続して行った。

さらに、アトピー性皮膚炎患者の角層中 TSLP 発現量は健康皮膚のものより高かった。角層 TSLP は、表皮バリア機能の傷害を表す値と相関して増加し、保湿外用剤によって低下した。

### D. 考察

この数年、小中学生のアトピー性皮膚炎患児における血清 IgE 値やダニ特

異 IgE 値が低下しており、彼らとその保護者に行った適切な入浴法・暖房法および保湿スキンケアの方法に関して行った教育の効果があらわれている可能性が考えられた。われわれは4年前から同町内で出生した乳幼児検診に参加する保護者全員を対象に皮膚の乾燥を防ぐ生活習慣に関する教育を行っており、これらの教育を受けた乳幼児のアトピー性皮膚炎や乾燥皮膚、喘息や花粉症の発症率や血清総 IgE 値やダニ、スギ特異 IgE 値が減少していくかを長期間継続して検討していくことで、乾燥を防ぐ生活習慣のアレルギーマーチに対する予防効果を解析することが重要と考えた。

また、テープストリッピングという非侵襲的な方法で角層中の TSLP を多数の被験者を対象に検討した結果、皮膚の乾燥に伴って TSLP の発現が増加したことから、皮膚のバリア機能の低下は Th2 の誘導に重要な TSLP の発現と密接に関連することが示唆されるとともに、今後アレルギーマーチを予見する方法として角層中の TSLP 発現を評価する方法が有用な可能性が示唆された。

### E. 結論

小児とその保護者に対して適切な入浴法・暖房法および保湿スキンケアの方法に関して行うことは、皮膚の乾燥を防いでアレルギーに対する経皮感作に対して予防的に作用する可能性が示唆された。

また、角層中の TSLP 発現量が皮膚の乾燥と関連して増加することから、皮膚の乾燥は抗原の侵入を容易にするだけでなくアレルギー反応を惹起する微小環境を形成することによってもアレルギーマーチの進展に関与していることが推測された。

今後も乳幼児期から皮膚の乾燥を防ぐ教育介入を数年以上にわたって継続していき、アトピーマーチに対する予防効果に関する検討を遂行していく予定である。

#### 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. Sano Y, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Murakami Y, Matsunaka H, Morita E, Katoh N. Thymic stromal lymphopoietin is increased in the horny layer in patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol (in press)
2. Kotani, H, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Soga, F, Nin M, Asai, J, Kishimoto S, Katoh N. Increased plasma LIGHT levels in patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol 168: 318-24, 2012.

学会発表

1. Sano Y, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Murakami Y, Matsunaka H, Morita E, Katoh N. Thymic stromal lymphopoietin is increased in the horny layer in patients with atopic dermatitis.

The 37rd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.8.

2. 加藤則人. ウェットベンチだけが研究ではない！－疫学研究を生かしたアトピー診療.教育講演「研究を目指す若手皮膚科医のために」. 第 111 回日本皮膚科学会総会. 2012.6.1.
3. 加藤則人. アトピー性皮膚炎の治療：最近の知見と患者の思い. イブニングセミナー. アトピー性皮膚炎の最新治療. 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会.2012.7.14.
4. 加藤則人. 血小板由来の痒みのメディエーターアトピー性皮膚炎における役割－. 第 22 回国際痒みシンポジウム. 2012.10.6.
5. 加藤則人. 治療のゴールを意識したアトピー性皮膚炎の治療.第 64 回日本皮膚科学会西部支部学術大会. イブニングセミナー. 2012.10.25.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 英語論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Kato F, Hisatsune J, <u>Sugai M</u>	Rapid detection of blaIMP-6 by amplification refractory mutation system	<b>J Microbiol Methods</b>	88 (1)	182-184	2012
Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, Shimizu W, Onodera M, Yokozaki M, Hisatsune J, Kato F, Ohge H, <u>Sugai M</u>	Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> carrying blaIMP-6	<b>Diagn Microbiol Infect Dis</b>	72 (1)	109-112	2012
Sandilands A, Brown SJ, Goh CS, Pohler E, Wilson NJ, Campbell LE, Miyamoto K, <u>Kubo A</u> , Irvine AD, Thawer-Esmail F, Munro CS, McLean WH, <u>Kudoh J</u> , <u>Amagai M</u> , <u>Matsui T</u>	Mutations in the SASPase gene (ASPRV1) are not associated with atopic eczema or clinically dry skin	<b>J Invest Dermatol</b>	132 (5)	1507-1510	2012
Kawasaki H, <u>Nagao K</u> , <u>Kubo A</u> , Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, <u>Amagai M</u>	Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	129 (6)	1538-1546	2012
Kotani H, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nomiyama T, Soga F, Nin M, Asai J, Kishimoto S, <u>Kato H</u>	Increased plasma LIGHT levels in patients with atopic dermatitis	<b>Clin Exp Immunol</b>	168 (3)	318-324	2012
<u>Nagao K</u> , Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, <u>Kubo A</u> , Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, <u>Amagai M</u>	Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin	<b>Nat Immunol</b>	13 (8)	744-752	2012
<u>Nagao K</u> , Kobayashi T, Ohyama M, Akiyama H, Horiuchi K, <u>Amagai M</u>	Requirement of TACE/ADAM17 for Hair Follicle Bulge Niche Establishment	<b>Stem Cells</b>	30 (8)	1781-1785	2012
Sasaki T, Niizeki H, Shimizu A, Shiohama A, Hirakiyama A, Okuyama T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Ishiko A, Tanese K, Miyakawa SI, Sakabe JI, Kuwahara M, <u>Amagai M</u> , Okano H, Suematsu M, <u>Kudoh J</u>	Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene SLCO2A1 and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis	<b>J Dermatol Sci</b>	68 (1)	36-44	2012
Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, <u>Ebihara T</u> , <u>Amagai M</u> , Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M	Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population	<b>Nat Genet</b>	44 (11)	1222-1226	2012

<u>Kubo A</u> , <u>Nagao K</u> , <u>Amagai M</u>	3D visualization of epidermal langerhans cells	<b>Methods Mol Biol</b>	961	119-127	2013
Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, Takihara T, Tomomatsu K, Suzuki Y, Oguma T, Sayama K, Arai H, Betsuyaku T, Arita M, <u>Asano K</u>	Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	131 (2)	353-360 e351-352	2013
Sano Y, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Matsunaka H, Murakami Y, Yamashita R, Morita E, <u>Katoh N</u>	Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis	<b>Clin Exp Immunol</b>	171 (3)	330-337	2013
Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, <u>Amagai M</u> , Iwasaki T, <u>Kudoh J</u>	Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin	<b>Vet Dermatol</b>	24 (1)	25-31 e27	2013
Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, Ouhara K, Hisatune J, Kurihara H, <u>Sugai M</u> , Hayes CN, Nakahara T, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Takata T	Dental infection of Porphyromonas gingivalis exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice	<b>J Gastroenterol</b>	Epub ahead of print		2013
Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, <u>Sugai M</u> , Furuse M	Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice	<b>J Dermatol Sci</b>	Epub ahead of print		2013
Yoshida K, Yokouchi M, <u>Nagao K</u> , Ishii K, <u>Amagai M</u> , <u>Kubo A</u>	Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis	<b>J Dermatol Sci</b>	in press		

## 日本語論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>久保亮治</u>	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 (13)	3697-3699	2012
<u>久保亮治</u>	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 (13)	3268-3270	2012
<u>久保亮治</u>	皮膚の物理的バリアと免疫のかかわり	医学のあゆみ	242 (10)	774-779	2012
<u>天谷雅行</u>	皮膚バリアの3次元構造(図説)	臨床のあゆみ	94	13-14	2012
<u>天谷雅行</u>	(病態・治療 Q&A) 皮膚バリアについてお教えてください	臨床のあゆみ	94	7-8	2012
<u>松井毅</u>	表皮顆粒層に特異的に発現するプロテアーゼ SASPase と角質層の保湿機構	臨床免疫・アレルギー科	58 (3)	305-312	2012
川崎洋, <u>久保亮治</u>	皮膚バリア機能と経皮感作	アレルギーの臨床	33 (2)	121-126	2013
川崎洋, <u>天谷雅行</u>	フィラグリン欠損による角層バリア障害とアトピー性皮膚炎	臨床免疫・アレルギー科	59 (2)	153-159	2013

## 英語書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
<u>Matsui T</u>	Endogenous Retroviral-Like Aspartic Protease, SASPase as a Key Modulator of Skin Moisturization	Lodén, M Maibach, HI	<b>Treatment of Dry Skin Syndrome -The Art and Science of Moisturizers-</b>	Springer Berlin Heidelberg	Berlin	179-192	2012

## 日本語書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
<u>加藤則人</u>	思春期アトピー性皮膚炎の特徴は？	宮地良樹	思春期の皮膚トラブル FAQ	診断と治療社	東京	73-78	2012
<u>加藤則人</u>	蕁麻疹の診断と鑑別疾患	秀道広	皮膚科臨床アセット 16 蕁麻疹・血管性浮腫パ フェクトマスター	中山書店	東京	印刷中	

## IV. 平成 24 年度班会議プログラム

平成24年度  
厚生労働省科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

皮膚バリア障害によるアレルギーマーチ発症機序解明に関する研究

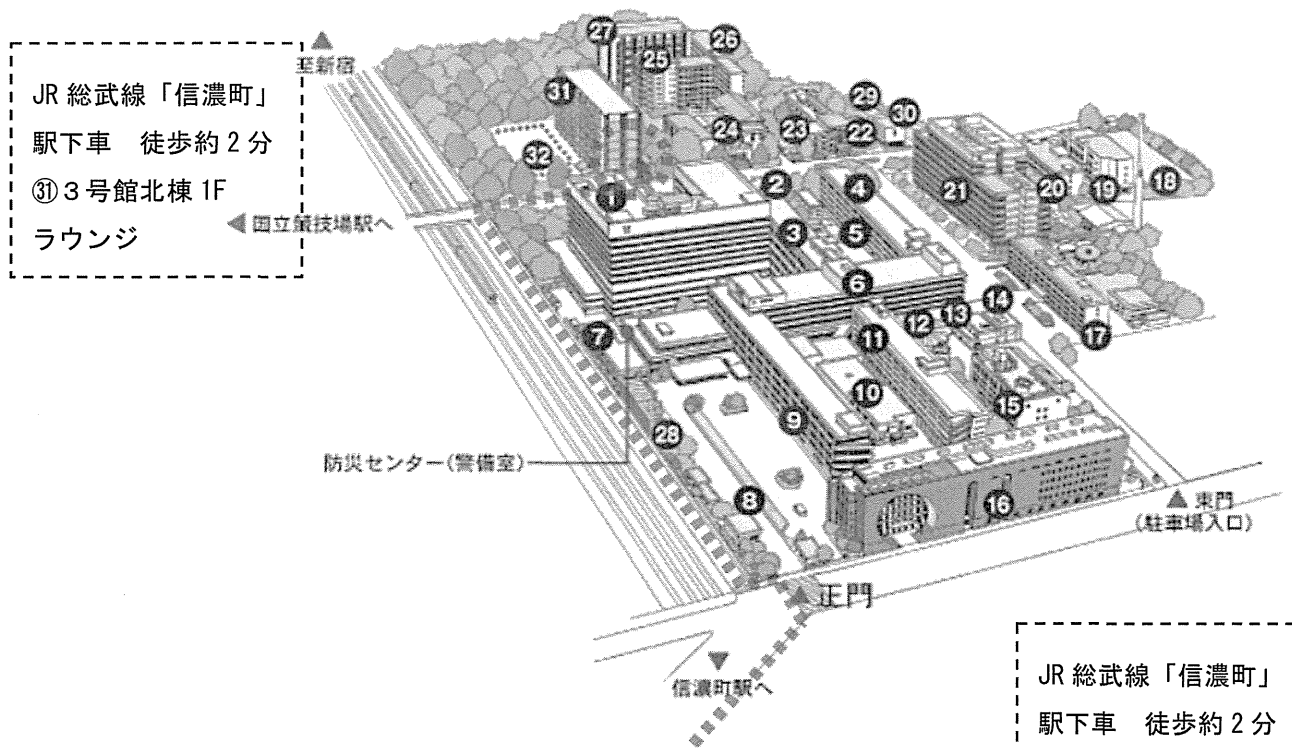
第1回班会議

研究代表者 天谷雅行

日時:平成 24 年 5 月 23 日(水)14:00 より

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



## 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 フィラグリン欠損ヘアレスマウスの確立

川崎 洋<sup>1,2</sup>、久保亮治<sup>1,3</sup>、永尾圭介<sup>1</sup>、天谷雅行<sup>1</sup>  
(1慶大皮膚科、2日本予防医学協会、3慶大総合医科学研究センター)

14:30-14:50 哺乳類皮膚特異的プロテアーゼ SASPase による角質層水分量の調節機構

松井 毅(京都大 物質-細胞統合システム拠点)

14:50-15:10 皮膚タイトジャンクションバリアの解析

久保亮治<sup>1,2</sup>、横内麻里子<sup>1,3</sup>、厚木徹<sup>1,4</sup>、吉田和恵<sup>1</sup>、大山学<sup>1</sup>、天谷雅行<sup>1</sup>  
(1慶大皮膚科、2慶大総合医科学研究センター、3東京電力病院皮膚科、4(株)コーセー)

15:10-15:30 皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割

菅原智子<sup>1</sup>、岩本典子<sup>1</sup>、菅井基行<sup>2</sup>、古瀬幹夫<sup>1</sup>  
(1神戸大細胞生物、2広島大広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

— 休憩 (20 分) —

### 第2部 (座長:菅井基行)

15:50-16:10 TACE/ADAM17 欠損マウスを用いたアトピー性皮膚炎および黄色ブドウ球菌感染の病態解析

小林哲郎<sup>1,2</sup>、永尾圭介<sup>1</sup>  
(1慶大皮膚科、2日本学術振興会)

16:10-16:30 アトピー由来株黄色ブドウ球菌の皮膚定着能の解析  
久恒順三、小島太郎、加藤文紀、菅井基行(広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

16:30-16:50 経皮感作喘息マウスモデルにおける IL-23 の役割  
正木克宜 1、鈴木雄介 2、樹神元博 1,3、加川志津子 2、浅野浩一郎 4  
(1慶應大呼吸器内科、2MSD アレルギー研究寄付講座、  
3川崎市立川崎病院内科、4東海大呼吸器内科)

— 休憩 (20 分) —

### 第 3 部 (座長:加藤則人)

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 2、宮本憲一 1、佐々木貴史 2  
(1 慶大遺伝子医学、2 MSD アレルギー研究寄付講座、3 慶大総合医科学研究センター)

17:30-17:50 日本人 AD 患者における新規 AD 原因遺伝子同定の試み  
海老原全 1、佐々木貴史 1,2、定平知江子 1,3、川崎洋 1、塩濱愛子 4、久保亮治 1,2  
工藤純 5、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、  
4MSD アレルギー研究寄付講座、5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

# 抄録

## 第1部

### フィラグリン欠損ヘアレスマウスの確立

川崎 洋<sup>1,2</sup>、久保亮治<sup>1,3</sup>、永尾圭介<sup>1</sup>、天谷雅行<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>慶大皮膚科、<sup>2</sup>日本予防医学協会、<sup>3</sup>慶大総合医科学研究センター)

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、アトピー性皮膚炎の発症機序を明らかにするため、フィラグリン欠損マウスを作成し研究を進めている。フィラグリンの分解産物は天然保湿因子(NMF)として角層の水分保持に重要な役割を担い、角層のバリア機能維持に寄与すると考えられている。しかし、フィラグリン欠損マウスの皮膚はドライスキン様の外観を呈し、NMF 量が減少していたにもかかわらず、角層内水分量に異常を認めなかった。フィラグリンと角層内水分量、及びドライスキン様の外観の関係を詳細に調べるため、フィラグリン欠損マウスを Hos:HR-1 マウス(星野試験動物飼育所)と交配しヘアレス化した。

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

松井 毅(京都大学 物質-細胞統合システム拠点)

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進化させて角質層を獲得した。さらに、約2万年前の哺乳類出現時においては、柔らかい保湿が可能な角質層を獲得している。

哺乳類特異的であり、皮膚表皮顆粒層 SG1 細胞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、乾燥肌様表皮を呈する。また、Profilaggrin リンカー配列切断異常による角質層への Profilaggrin の蓄積も認められている。しかし、何故角質層水分量が減少するのかは、依然明らかになってはいない。

その原因を明らかにするには、顆粒層～角質層における分子レベルでの解析系の構築が必須である。

そこで、現在確立しようとしている幾つかの新しい解析方法について御紹介する。

### 皮膚タイトジャンクションバリアの解析

久保亮治<sup>1,2</sup>、横内麻里子<sup>1,3</sup>、厚木徹<sup>1,4</sup>、吉田和恵<sup>1</sup>、大山学<sup>1</sup>、天谷雅行<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>慶大皮膚科、<sup>2</sup>慶大総合医科学研究センター、<sup>3</sup>東京電力病院皮膚科、<sup>4</sup>(株)コーセー)

これまで皮膚のタイトジャンクション(TJ)バリアは、主に毛嚢間表皮において解析されてきた。今回われわれは、毛嚢脂腺系における TJ バリアの詳細な解析を行ったので報告する。毛嚢漏斗部、



脂腺導管、脂腺表層には連続した TJ バリアが存在していた。また終止期毛は毛根部まで TJ バリアに囲われた形で存在していた。毛嚢間表皮、外毛根鞘、脂腺にはいずれにも、TJ バリア機能を持ち、細胞膜が apical 膜と basolateral 膜に分割されている細胞層がただ一層のみ存在していた。すなわち、毛嚢間表皮、外毛根鞘、脂腺はいずれも、共通した性質を持つ重層上皮構造であることが示唆された。我々の皮膚は隙間なく TJ によるバリアに覆われていると考えられる。

## 皮膚バリア機能におけるタイトジャンクションの役割

菅原智子 1、岩本典子 1、菅井基行 2、古瀬幹夫 1

(1神戸大細胞生物、2広島大広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

これまで、皮膚からの脱水により生後致死となるクローディン 1 遺伝子欠失マウスにおける角質層の異常について解析を行ってきた。今回、P0 マウスから採取した皮膚を黄色ブドウ球菌毒素 ETA で処理して顆粒層直下で剥離し、さらに顆粒層細胞膜を破壊するために TritonX-100 で処理した「単離角質層」を調製し、水分蒸散に対するバリア機能を測定したところ、ノックアウトマウスの単離角質層では、野生型およびヘテロマウスと比較して過剰な水分蒸散が観察された。したがって、顆粒層のタイトジャンクションが角質層バリアの形成を介して皮膚バリア機能に寄与していることが示された。

一方、クローディン 1 とともに皮膚顆粒層のタイトジャンクションに発現するクローディン 4 の遺伝子欠失マウスでは、皮膚組織の構築、角化マーカーの発現、TEWL についてこれまで異常は確認されていない。

## 第2部

### TACE/ADAM17 欠損マウスを用いたアトピー性皮膚炎および黄色ブドウ球菌感染の病態解析

小林哲郎 1,2、永尾圭介 1

(1慶大皮膚科、2日本学術振興会)

TACE (TNF  $\alpha$ -converting enzyme)/ADAM17 は EGFR リガンドなどの膜型蛋白を切断(シェディング)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。我々は TACE を表皮において欠損させた TACE<sup>flx/flx</sup>/SOX9-Cre マウスを作成し、皮膚における TACE の機能解析を行った。

その結果、TACE/SOX9 マウスは掻痒および血清高 IgE 値を示し、皮膚病理組織学的に肥満細胞の増加、表皮内膿疱が認められた。皮膚からは黄色ブドウ球菌が分離され、各種アトピー性皮膚炎患者から分離される菌と類似した病原遺伝子パターンを示した。またリアルタイム PCR 解析の結果、TACE/SOX9 マウスではケラチノサイトの分化マーカーおよび抗菌ペプチドの発現パターンの異常が認められた。興味深いことに、TACE/SOX9 マウスではリン酸化 EGFR が減少していると

ともに、その下流シグナルの中でも STATファミリー(STAT1,3,5)のリン酸化の減少が認められた。これより、TACE 欠損による皮膚症状は EGFR-STAT シグナルの異常がもたらす結果であることが示唆された。

### アトピー由来株黄色ブドウ球菌の皮膚定着能の解析

久恒順三、小島太郎、加藤文紀、菅井基行(広島大医歯薬学総合研究科細菌学)

これまでに、私どもは、黄色ブドウ球菌の皮膚付着能解析法として、新生児マウスを用いた菌付着実験系及び固着実験系を確立させた。前回の班会議では、アトピー由来黄色ブドウ球菌の FLG-KO マウスに対する付着性及び定着性(固着性)を解析し、途中経過のデータを紹介した。今回の班会議では、他の疾患由来株、マウス数を増やして比較解析した。その結果、アトピー由来株のマウス皮膚付着性は、他の疾患由来株と同様に B6 マウスと FLG-KO マウスで同程度の付着性を示した。しかしながら、マウス皮膚への菌の長時間での定着性(固着性)を比較したところ、アトピー由来株は、B6 マウスよりも FLG-KO マウスの皮膚に強く固着している事がわかった。現在、アトピー株の固着性に関わる因子について、比較ゲノム解析からアプローチしているところである。さらに、アトピーモデルマウスでの黄色ブドウ球菌の皮膚層局在を視覚的に解析する為に、GFP 発現黄色ブドウ球菌を作製している。

### 経皮感作喘息マウスモデルにおける IL-23 の役割

正木克宜 1、鈴木雄介 2、樹神元博 1,3、加川志津子 2、浅野浩一郎 4  
(1慶應大呼吸器内科、2MSD アレルギー研究寄付講座、  
3川崎市立川崎病院内科、4東海大呼吸器内科)

アレルギーマーチのモデルとして我々はマウスの背部に卵白アルブミン(OVA)のパッチを繰り返し貼付して経皮感作した後 OVA 吸入暴露を行っている。この喘息モデルにおいてフィラグリン欠損マウス(FLG KO)は OVA 特異的 IgG1 の産生が早い傾向にある。またダニ抗原を耳介に塗布するモデルでは FLG KO で皮膚局所の IL-23 産生が高い。さらに OVA パッチモデルの気道過敏性は IL-23 依存性に遷延する。以上のこれまでのデータから皮膚バリア障害は IL-23 産生亢進を通じて喘息症状を悪化させていることが示唆されている。そこで OVA パッチモデルの感作相または暴露相に抗 IL-23p19 抗体を腹腔内投与することで IL-23 の役割を検討した。その結果、抗 IL-23p19 抗体を感作相に投与した群は対照群に比較して有意に BAL 中の好酸球の数および比率が減少した。しかし一方、抗 IL-23p19 抗体を暴露相のみに投与した群は有意に気道過敏性が亢進した。以上から経皮感作喘息モデルマウスで皮膚由来の IL-23 は気道の好酸球性炎症には促進的に働く一方、肺局所では気道過敏性に抑制的に働く可能性がある。

## 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 2、宮本憲一 1、佐々木貴史 2  
(1 慶大遺伝子医学、2 MSD アレルギー研究寄付講座、3 慶大総合医科学研究センター)

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 $10^{\sim}12$  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ため、最近では既知 FLG 変異の TaqMan 法によるスクリーニングのみを行ってきた。今回は比較的低コストでの FLG 全解読を目指し、次世代シーケンサー(NGS)を用いた FLG-NGS shotgun 法の開発を検討した。1000 人ゲノム計画で公開された日本人 exome 解析 70 人のデータを用いた FLG 変異の解析結果についても報告する。

一方、イヌの AD 様皮膚炎(cAD)と FLG との関連を解明するために作成した抗イヌ FLG 家兎抗体を用いて、イヌ表皮顆粒層、角質層の FLG を検出した。

## 日本人 AD 患者における新規 AD 原因遺伝子同定の試み

海老原全 1、佐々木貴史 1,2、定平知江子 1,3、川崎洋 1、塩濱愛子 4、久保亮治 1,2  
工藤純 5、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、  
4MSD アレルギー研究寄付講座、5慶大遺伝子医学)

これまでに、慶應大医学部皮膚を受診された 230 人以上の日本人 AD 患者の FLG 変異解析を行ってきたが、既知の FLG 変異を有する AD 患者は 12%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、われわれは新規 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 領域の解読を試みる。

解読対象は、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④IL 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をリストアップし解析対象とする。

技術的には multiplex PCR 法を用いる予定であったが、Agilent 社に開発された Haloplex 法は 300 遺伝子(半年以内に 900 遺伝子)程度を同時に解読する事が可能であることから、Haloplex 法を用いて 300 遺伝子を 8~16 人を対象として解読を行うパイロット研究を予定している。

## 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っている。