

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

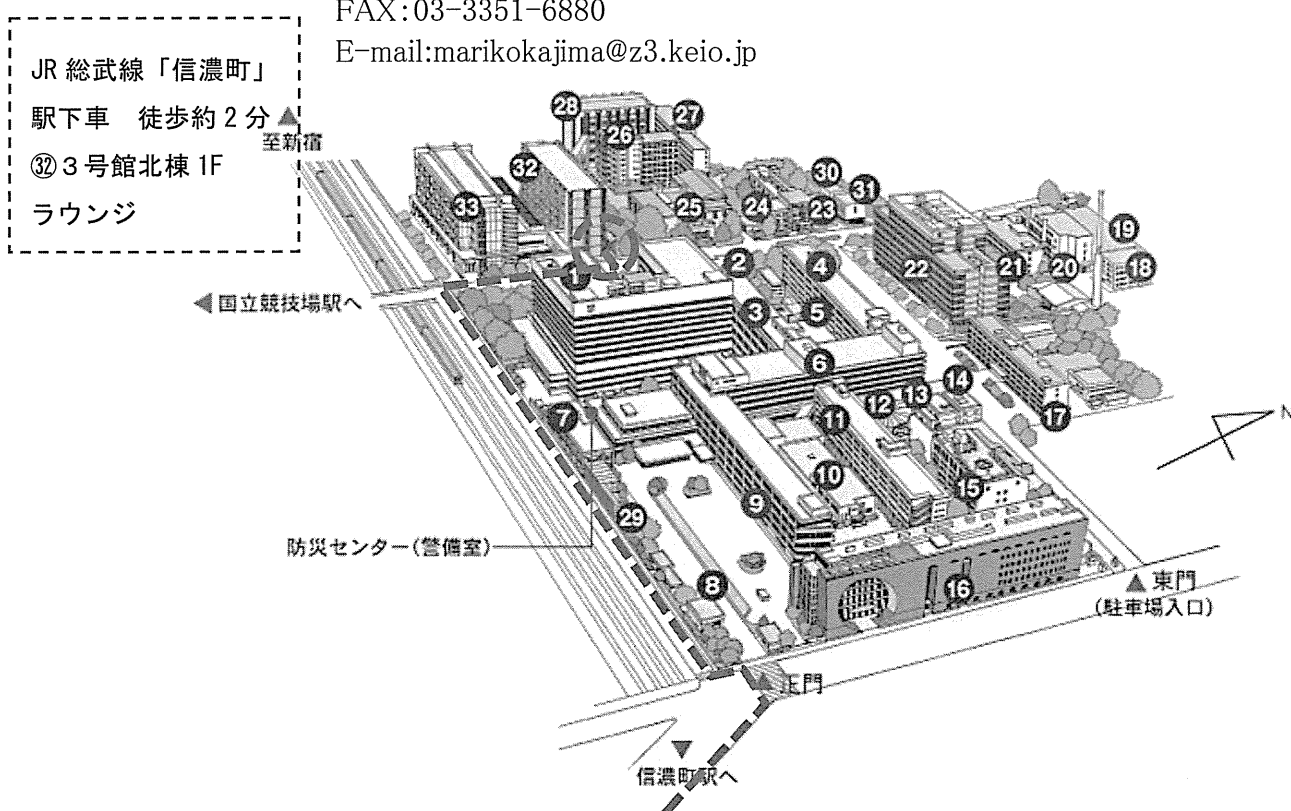
第2回班会議

研究代表者 天谷雅行

日時:平成24年11月14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

### 第1部 (座長:海老原全)

14:10-14:30 フィラグリンと角層水分保持

川崎 洋<sup>1,2</sup>、久保亮治<sup>1,3</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)

14:30-14:50 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

松井 毅  
(京都大 物質-細胞統合システム拠点)

14:50-15:10 フィラグリン欠損マウスにおける表皮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>、川崎 洋<sup>1,4</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>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>予防医学協会)

15:10-15:30 新規自然発症性皮膚炎の原因遺伝子 Matrin の同定

佐々木貴史<sup>1,2</sup>、塩濱愛子<sup>3</sup>、久保亮治<sup>1,2</sup>、川崎洋<sup>1,4</sup>、工藤純<sup>5</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>慶大 MSD アレルギー研究寄附講座、  
<sup>4</sup>予防医学協会、<sup>5</sup>慶大遺伝子医学)

— 休憩 (20 分) —

### 第2部 (座長:菅井基行)

15:50-16:10 経皮感作喘息に対する治療介入の試み

鈴木雄介<sup>1</sup>、正木克宜<sup>2</sup>、加川志津子<sup>1</sup>、浅野浩一郎<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>MSD アレルギー研究寄附講座、<sup>2</sup>慶應大呼吸器内科、<sup>3</sup>東海大呼吸器内科)

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 黄色ブドウ球菌の colonization を示すアトピー性皮膚炎モデルマウスの解析  
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)

－ 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、塩濱愛子 2、神田聡子 1、宮本憲一 1、佐々木貴史 3  
(1 慶大遺伝子医学、2 慶大 MSD アレルギー研究寄附講座、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、塩濱愛子1・3、定平知江子1・4、  
川崎洋1・2、大山学 1、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慶大 MSD アレルギー研究寄附講座、  
4都立小児センター皮膚科 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 本研究班の今後  
天谷雅行(慶大皮膚科)

18:30-18:40 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

### フィラグリンと角層水分保持

川崎 洋<sup>1,2</sup>、久保亮治<sup>1,3</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。過去の *in vitro* の研究は、フィラグリンの分解産物は天然保湿因子(NMF)として働き、角層の水分保持に重要な役割を担うと報告している。興味深いことに、標準湿度環境(湿度 40-60%)で飼育したフィラグリン欠損マウスは、角層のNMF量が著しく減少しているにもかかわらず、角層内水分量の減少がみられなかった。一方、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て標準湿度環境で飼育したところ、日齢 3-4 のマウスや 4 週齢のマウスでは角層内水分量の減少を認めなかったのに対し、6-7 週齢のマウスでは角層内水分量の減少を観察した。本結果は、乾燥等の環境要因がフィラグリン欠損皮膚の角層水分保持に影響する可能性を示唆する。

### 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

松井 毅  
(京都大 物質-細胞統合システム拠点)

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、何故、角質層水分量が減少しているのかの、原因は不明である。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、マウス皮膚表皮の細胞を分離し、細胞生物学的性質を解析する方法を検討した。

### フィラグリン欠損マウスにおける表皮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>、川崎 洋<sup>1,4</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>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>予防医学協会)

皮膚表皮の物理的バリアは、角質バリアとタイトジャンクションバリアの2つの要素からなる。

アトピー性皮膚炎においては、フィラグリン変異による角質バリア機能の障害だけでなく、タイトジャンクションバリアの機能にも障害があることが示唆されている。そこでフィラグリン欠損マウスにおいてタイトジャンクションバリア機能評価をおこなったが、異常は認められなかった。一方、皮膚炎症モデルにおいて表皮タイトジャンクションバリア機能を評価したところ、低分子に対するバリア機能に障害が認められた。炎症に引き続いて起こる二次的なタイトジャンクションバリア障害が、アトピー性皮膚炎の病態において果たす役割について考察する。

### 新規自然発症性皮膚炎の原因遺伝子 *Mattrin* の同定

佐々木貴史<sup>1,2</sup>、塩濱愛子<sup>3</sup>、久保亮治<sup>1,2</sup>、川崎洋<sup>1,4</sup>、工藤純<sup>5</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>慶大 MSD アレルギー研究寄附講座、  
<sup>4</sup>予防医学協会、<sup>5</sup>慶大遺伝子医学)

SPF 環境下でも自然発症皮膚炎を生じる Flaky tail マウスは、*ft* (*Flg* 遺伝子) 及び *ma* (matted: ぼさぼさした) の2つの変異を有している。FLG KO マウスが皮膚炎を自然発症しないことから、*ft* と *ma* を分離した所、*ma* が自然発症性皮膚炎の原因変異であった。そこで、自然発症性皮膚炎発症のメカニズムの解析を目的とし、*ma* の原因となる変異を同定・機能解析を行った。

*ma* 責任領域を 3.7Mb の領域に絞り込み、この領域を対象とし次世代シーケンサーを用いて解析した結果、タンパク質コード領域の変異として *Mattrin* (Matted transmembrane protein) 遺伝子のナンセンス変異と、*Kiaa0907* 遺伝子の隣接した 2 塩基の置換によるミスセンス変異を同定した。野生型 *Mattrin* 遺伝子 Tg マウスを用いたレスキュー実験の結果、ぼさぼさの毛に併せて自然発症性皮膚炎の表現型もレスキューされたことから、*Mattrin* 遺伝子のナンセンス変異が *ma* の原因変異であることを明らかにした。

## 第2部

### 経皮感作喘息に対する治療介入の試み

鈴木雄介<sup>1</sup>、正木克宜<sup>2</sup>、加川志津子<sup>1</sup>、浅野浩一郎<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>MSD アレルギー研究寄附講座、<sup>2</sup>慶應大呼吸器内科、<sup>3</sup>東海大呼吸器内科)

フィラグリン欠損マウスは、ダニ抗原軟膏塗布感作モデルにおいて①皮膚での IL-23 mRNA 発現、②肺および脾細胞からの IL-17A 産生亢進、③肺 Th17 細胞増加、④抗原気道暴露後の気道炎症の増強、をきたすことが今までの検討より明らかになった。さらに、卵白アルブミンパッチ貼付モデルで IL-23 欠損マウスを用いた検討からも、経皮感作喘

息における IL-17A/IL-23 の関与を示唆する結果が得られた。

そこで、抗 IL-23 中和抗体を腹腔内投与することで経皮感作喘息の抑制が可能かを検討した。中和抗体を経皮感作相のみに投与した場合には抗原特異的抗体産生・気道炎症の抑制がみられるものの、抗原気道暴露相での中和抗体投与はかえって気道炎症・過敏性を増悪させる結果となった。次に、皮膚における IL-23-STAT3 シグナルを選択的に抑制するために、STAT3 阻害作用をもつ STA-21 をダニ抗原とともに軟膏製剤として皮膚に塗布したが、明瞭な気道炎症抑制効果は認められなかった。IL-23 発現を皮膚特異的に阻害する薬剤およびその送達方法について、さらに検討が必要と考えられる。

## 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)

私どもは、様々な疾患由来の黄色ブドウ球菌株を用いて、B6 または FLG-KO の皮膚付着定着解析を行ってきた。これ迄の結論として、AD 由来株 TF3378 株は比較的短時間における皮膚表面への付着は B6 及び FLG-KO マウス共に同程度であるが、長時間での菌の定着性では FLG-KO マウスで顕著に強く皮膚に居続ける事が判明した。AD 株の皮膚層局在解析のために、光る黄色ブドウ球菌が必要となったが、改良のすえ AmCyan 発現 AD 株を構築できた。AD 由来株の FLG-KO マウスへの強い固着性に関わる分子メカニズムを明らかにするためには新たな解析アプローチを検討しなければならない。

## 黄色ブドウ球菌の colonization を示すアトピー性皮膚炎モデルマウスの解析

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 を表皮で欠損させた TACE<sup>flox/flox</sup>/SOX9-Cre マウスはアトピー様症状を示す一方で、興味深いことに皮膚には黄色ブドウ球菌の colonization が認められ、皮膚炎と細菌叢の関係を明らかにする上で重要なツールとなり得る可能性がある。今回は TACE/SOX9 マウスの免疫学的な解析について報告する。

TACE/SOX9 マウスでは血清 IgE および CCL17/TARC 値が 4 週齢より高値を示し 14 週まで値が上昇する傾向を示した。皮膚では多数の CD4 および CD8T 細胞の浸潤を認めた。リンパ節では CD69+ の活性型および 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、TACE/SOX9 マウスのリンパ節では IFN  $\gamma$  + および IL4+ の CD4T 細胞が増加しているのに加え、IL17+ 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 CD4 および  $\gamma$   $\delta$  T 細胞の数が著明に増加していた。以上の結果より TACE/SOX9 マウスでは Th1、Th2、

Th17 細胞がそれぞれ増加するパターンを示し、中でも感染に伴って出現する Th17 細胞の増加が著明なことから、TACE/SOX9 マウスの皮膚症状の病態に細菌感染が大きく関わっていることが示唆された。

## 第 3 部

### 皮膚バリア機能関連蛋白の遺伝子解析

工藤 純<sup>1</sup>、神田聡子<sup>1</sup>、塩濱愛子<sup>2</sup>、宮本憲一<sup>1</sup>、佐々木貴史<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>慶大遺伝子医学、<sup>2</sup>MSD アレルギー研究寄附講座、<sup>3</sup>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 10~12 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。新たに開発した次世代シーケンサー (NGS) を用いた FLG-NGS shotgun 法を用いて慶應大 AD 患者 36 人 (ID の順に選んだ方 34 人と既知変異を持つ 2 人の患者) の解析を行った所、新たに 4 種の新規 FLG 変異 (3 種のナンセンス変異と 1 種フレームシフト変異) を同定し、FLG 変異保有率が 14.7% (5/34) から 23.5% (8/34) 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<sup>1</sup>、佐々木貴史<sup>1・2</sup>、塩濱愛子<sup>1・3</sup>、定平知江子<sup>1・4</sup>、  
川崎洋<sup>1・2</sup>、大山学<sup>1</sup>、工藤純<sup>5</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>慶大 MSD アレルギー研究寄附講座、  
<sup>4</sup>都立小児センター皮膚科 <sup>5</sup>慶大遺伝子医学)

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 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、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。

方法は Agilent 社に開発された Haloplex 法でライブラリー調整を行い、小型次世代シーケンサー MiSeq で解析を行った。

最初の条件検討として、①過去に AD/円形脱毛症 (AA) 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の 300 遺伝子を AD と AA

を発症している6人に対して解析した結果、6人から20種の未知のミスセンス変異を同定した。現在、さらにAD/AA併発患者8人を解析予定である。  
またAD診療向上のために行っているアトピー教室について以前紹介したが、治療におけるその効果について解析したので、その結果を合わせて報告する。

## 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係する生活習慣、居住環境などに関する質問票調査を継続している。これらの結果について報告する。  
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についても報告する。



## V. 平成 24 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保健学研究院 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	東海大学医学部 呼吸器内科学	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	



