

10. 11- 15.
58. Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Dendritic cells penetrate epidermal tight junction barriers to uptake external antigens: a possible involvement in atopic dermatitis. **Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia 2012**, Melida, Mexico, 2012. 10. 30- 11. 7.
59. Amagai M: Skin barrier dysfunction and cutaneous sensitization. **International Meeting of the German Society for Cell Biology, Molecular concepts in epithelial differentiation, pathogenesis and repair**, Leipzig, Germany, 2012. 11. 7- 10.
60. 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**, Kyoto, Japan, 2012. 11. 8- 9.
61. Amagai M: Three musketeers of skin barrier and atopic diseases. **Post-Congress in Tokyo, 10th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology**, Tokyo, Japan, 2012. 11. 19.
62. Amagai M: The three musketeers of the epidermal barrier and cutaneous sensitization. **Final Symposium of Global COE**, Tokyo, 2012. 12. 3- 4.
63. Kubo A: 3D Imaging of the Mammalian Epidermis. **37th Annual Meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology**, Naha, Okinawa, 2012. 12. 7- 8.
64. Amagai M: The three musketeers of the epidermal barrier in atopic diseases. **The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Okinawa, Japan, 2012. 12. 7- 9.
65. 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 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Okinawa, Japan, 2012. 12. 7- 9.
66. 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**, Fukuoka, Japan 2012. 12. 11- 14.
67. Amagai M: Skin barrier dysfunction and cutaneous sensitization. **The Second Immunology Symposium of The University of Tokushima "Immune Development, Deviation, and Regulation"**, Tokushima, Japan, 2013. 1. 24- 25.
68. Masaki K, Suzuki Y, Kagawa S, Kodama M, Kabata H, Tanaka K, Miyata J, Fukunaga K, Oguma T, Betsuyaku T, Asano K: Different roles of interleukin-23 during the epicutaneous sensitization and the antigen exposure to the airways on airway inflammation and responsiveness in mice. **2013 Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI)**, San Antonio, USA, 2013. 2. 22- 26.
69. Suzuki Y, Masaki K, Kagawa S, Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Betsuyaku T, Amagai M, Asano K: Epicutaneous sensitization in filaggrin gene-depleted mouse induces prolonged airway eosinophilia without obvious dermatitis. **2013 Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI)**, San Antonio, USA, 2013. 2. 22- 26.
70. Amagai M: The three musketeers of the epidermal barrier and cutaneous sensitization to external antigens. **The 23rd Annual Meeting of Korean Society for Investigative Dermatology**, Seoul, Korea, 2013. 3. 22- 23.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

《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

I I . 総合分担研究報告書

フィラグリンノックアウトマウスの角層バリア機能と経皮免疫応答の解析

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨 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。フィラグリンノックアウト(KO)マウスを作製し、角層のバリア機能維持及び経皮免疫応答におけるフィラグリンの影響について検討した。テープストリップを用いた実験から、物理刺激によりフィラグリン欠損角層の剥離が亢進することがわかった。電子顕微鏡を用いた観察は、フィラグリン欠損がケラチン線維の凝集と配列の異常をもたらすことを示し、それに伴う角質細胞の骨格異常が物理刺激後のフィラグリン欠損角層の剥離亢進に影響したと考えられた。色素の浸透実験から、外来抗原のフィラグリン欠損角層内への透過性亢進が示唆された。これらフィラグリン欠損角層の機能異常は、ハプテン誘導性接触過敏反応やタンパク抗原経皮塗布後の液性免疫応答の亢進をもたらした。またフィラグリンKOヘアレスマウスでは、体毛等の保護がなくなると角層水分量の低下が進むことから、外的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が示唆された。フィラグリンKOマウスは、フィラグリンの *in vivo* での機能を正しく評価するための重要なツールであり、本マウスを解析することで、皮膚バリア機能異常に関連するアトピー性皮膚炎の発症機序の解明につながることを期待される。

研究協力者

川崎 洋 日本予防医学協会
リサーチ・レジデント

A. 研究目的

皮膚角層に存在するフィラグリンの機能喪失遺伝子変異が、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。フィラグリンは正常な角層形成に必須のタンパク質と考えられているものの、*in vivo*でのフィラグリンの機能はいまだ明らかになっていない。そこで、私たちはフィラグリンノックアウト(KO)マウスを作製した。本研究では、フィラグリンKOマウスを用いて角層のバリア機能維持及び経皮免疫応答におけるフィラグリンの影響について検討した。

B. 研究方法

1. フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察

フィラグリン欠損が皮膚バリアに与える影響を調べるため、フィラグリンKOマウス皮膚の形態学的特徴を観察した。

(a) 走査型電子顕微鏡による観察

日齢5の仔マウスの皮膚組織片を、低真空走査型電子顕微鏡 S-3400N (日立ハイテク) により観察した。

(b) サフラニン染色を用いたフィラグリン欠損角層の観察

厚さ $6\mu\text{m}$ の皮膚凍結切片を1% サフラニン液で1分間染色した後、2% KOH 水溶液を加えて、角層を組織学的に観察した。

2. フィラグリンと角層の物理的脆弱性に関する検討

日齢4の子マウスの背部皮膚をCryofilm(Leica Microsystems)を用いて繰り返しテープストリップし、テープに付着する角質剥離量をImage Pro Plus software(Media Cybernetics)を用いてDIA(the desquamation index for amount)として算出し、定量評価した。また、テープストリップ前後の角層の層数を組織学的に算出した。

3. 電子顕微鏡を用いた、フィラグリン欠損表皮のケラチン配列像の観察

日齢4-5の子マウスの背部皮膚を透過型電子顕微鏡により観察した。

4. フィラグリン欠損皮膚における、物質皮膚透過性の検討

外界から表皮内への物質の皮膚透過に対し、フィラグリン欠損が及ぼす影響を検討した。カルセイン封入りポソーム(蛍光物質)をマウスの皮膚に塗布し、フィラグリンKOマウスと野生型マウス間での皮膚透過性の差を共焦点顕微鏡により観察した。

5. フィラグリンKOマウスの経皮免疫応答に関する解析

フィラグリン欠損に伴う皮膚バリア機能異常が、外来抗原に対する経皮免疫応答の亢進を誘導するのかどうかを検討した。

(a) 刺激性接触皮膚炎反応

マウス耳翼に0.6% croton oilを塗布し、その後の耳翼腫脹を計時的に評価した。

(b) ハプテン誘導性接触過敏反応

剃毛したマウスの腹部に0.3% DNFBを塗布して感作した5日後、マウス耳翼に0.15% DNFBを塗布した。その後の耳翼腫脹を計時的に評価した。

(c) 蛋白抗原に対する液性免疫応答

マウスの耳翼にOVA水溶液とdibutyl phthalateを1:1で混合したものをマウス耳翼に隔日塗布した。8回目の塗布を行った1週間後に、OVA特異的IgG1, OVA特異的IgEをELISA法により測定した。

6. フィラグリンKOヘアレスマウスの角層内水分量とTEWLの測定

フィラグリンは、過去の*in vitro*での報告から、その分解産物が天然保湿因子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た。しかし、フィラグリンKOマウスの皮膚はドライスキン様の外観を呈し、天然保湿因子量が減少していたにもかかわらず、角層内水分量やTEWLに異常を認めなかった。その理由として、ヒトと異なりマウスは体毛で皮膚が保護されているため、フィラグリン欠損の角層水分保持への影響が生じにくくなっている可能性を考えた。そこでフィラグリンKOマウスをHos:HR-1マウス(星野試験動物飼育所)と交配し、フィラグリンKOヘアレスマウスを作成して、その生理学的解析を行った。

野生型ヘアレスマウスとフィラグリンKOヘアレスマウスの角層内水分量とTEWLを、標準湿度環境(湿度40-60%)下で、それぞれVAPOSCAN AS-VT100RS(Asahi Biomed), Corneometer ASA-M2(Asahi Biomed)を用いて測定、評価した。

C. 研究結果

1. フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察

(a) 走査型電子顕微鏡による観察

野生型仔マウスの足では角層構造物に覆われた皮膚を観察したのに対し、フィラグリンKOマウスでは角層

構造物の皮膚表面への付着が認められなかった。(図 1, A 上図)続いて仔マウスの腹部皮膚を観察したところ、同様にフィラグリン KO マウス皮膚では、角層構造物の付着がみられず、皮膚表面は平坦化し、野生型マウスでは見ることのない生細胞の核に相当する構造を観察した。(図 1, A 下図)

(b) サフラニン染色を用いたフィラグリン欠損角層の観察

野生型マウスの皮膚では角層が比較的正常に保たれていたのに対し、フィラグリン KO マウス皮膚では局限して角層欠損を生じる像を多く観察した。(図 1, B)

2. フィラグリンと角層の物理的脆弱性に関する検討

テープストリップ 1 回目の DIA スコアはフィラグリン KO マウスと野生型マウス間に差を認めなかったが、テープストリップの回数が増えるにつれ、フィラグリン KO マウスは野生型マウスよりも有意に高い DIA スコアを示した。(図 2, A, B) また、テープストリップ前の角層の層数はフィラグリン KO マウスと野生型マウス間で差を認めなかったのに対し、10 回テープストリップをした後の角層層数は、フィラグリン KO マウスで有意に低値を認めた。(図 2, C, D)

3. 電子顕微鏡を用いた、フィラグリン欠損表皮のケラチン配列像の観察

フィラグリン KO マウス表皮の顆粒層上層では、ケラトヒアリン顆粒やケラチン線維束のサイズや配列、ネットワークが乱れていることがわかった。(図 3, A) 四酸化ルテニウム固定を用いた角層下層の観察では、野生型マウス角層で観察されるケラチンパターンが、フィラグリン KO マウス角層では

観察されなかった。(図 3, B)

4. フィラグリン欠損皮膚における、物質皮膚透過性の検討

組織標本作製の際、川本法という標本作製法を改良することで、観察時の蛍光物質の染み出しを防ぐことに成功した。カルセイン封入リポソームをマウスの皮膚に塗布してから 3 時間後の皮膚を観察したところ、フィラグリン KO マウスでは角層全層に色素が浸透した像を多く観察したのに対し、野生型マウスでは角層表面にのみ色素の沈着を認めた所見がほとんどだった。(図 4)

5. フィラグリン KO マウスの経皮免疫応答に関する解析

(a) 刺激性接触皮膚炎反応

フィラグリン KO マウスは野生型マウスに比べ、croton oil 塗布後の耳翼腫脹反応の亢進を認めた。(図 5, A)

(b) ハプテン誘導性接触過敏反応

フィラグリン KO マウスは野生型マウスに比べ、DNFB を用いたハプテン誘導性接触過敏反応の有意な亢進を認めた。(図 5, B)

(c) 蛋白抗原に対する液性免疫応答

フィラグリン KO マウスは野生型マウスに比べ、OVA 反復塗布後の血清中 OVA 特異的 IgG1, IgE 値の有意な上昇を認めた。(図 5, C)

6. フィラグリン欠損ヘアレスマウスの角層内水分量と TEWL の測定

日齢 3-4 と 4 週齢のヘアレスマウスの角層内水分量を測定したところ、野生型とフィラグリン欠損ヘアレスマウス間で差異を認めなかった。しかし、6 週齢以降では、野生型に比べフィラグリン欠損ヘアレスマウスで角層内水分量の減少を観察した。(図 6, A) 一方、TEWL に関しては、観察期間全てに渡っ

て野生型ヘアレスマウスとの間に差を認めなかった。(図 6, B)

D. 考察

走査型電子顕微鏡、サフラニン染色を用いた皮膚表面の形態学的観察から、フィラグリン欠損皮膚では未熟な角層の剥離が生じている可能性が想起された。フィラグリン欠損皮膚では角層形成が未熟で、それに起因して角層剥離が生じているならば、テープストリップ等の物理刺激により角層剥離は増強されると考えた。そこで、テープストリップの手法を用いてフィラグリン欠損角層の物理的脆弱性を評価したところ、フィラグリン欠損皮膚は物理刺激により角層が剥がれやすくなっている可能性が示唆された。

ここまでの *in vivo* での観察は、フィラグリンはケラチン線維を凝集し束ねることで、角層の物理的強度の維持や構造の維持に寄与しているという過去の報告に一致した。そこで、フィラグリン欠損角層の脆弱性が本当にケラチン線維の微細な構造異常に起因するのかどうかを透過型電子顕微鏡により観察したところ、フィラグリン欠損によるケラチン配列の構造異常が、フィラグリン欠損角層の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

続いて、フィラグリン欠損に伴う角層機能異常が、物質の外から内への皮膚透過に影響するのかどうかを、カルセイン封入リポソームを用いて検討した。その結果、フィラグリンが外から内への物質透過を防ぐ角層のバリア形成に重要であり、その欠損は外来抗原の表皮内への侵入を許すことが示唆された。

また、フィラグリン KO マウスの経皮免疫応答に関する解析から、フィラ

グリン欠損に伴う角層バリア機能異常が、刺激物質、ハプテンやタンパク抗原の表皮内への侵入に寄与し、刺激性接触皮膚炎や Th1 及び Th2 優位の免疫応答の増強をもたらす可能性が示唆された。

親から離乳し、脱毛が終わる 6 週齢以降より、フィラグリン KOヘアレスマウスで角層内水分量の減少を観察した事実は、フィラグリン欠損は角層水分量の低下を導くが、毛で体表を覆われたり親の保護を受けたりする時期は、フィラグリン欠損があっても何らかの代償機構により、見かけ上角層水分量が維持された可能性を示唆する。また、体毛等の保護がなくなるとフィラグリン KO マウスでは角層水分量の低下が進むことから、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が考えられた。一方、全観察期間でフィラグリン KOヘアレスマウスの TEWL 値に異常を観察しなかったことから、TEWL と角層水分量は必ずしも parallel に推移するパラメーターではないことがわかった。

E. 結論

我々が作成したフィラグリン KO マウス、フィラグリン KOヘアレスマウスは、フィラグリンの *in vivo* での機能を正しく評価するための重要なツールとなる。フィラグリンはアトピー性皮膚炎の主要な発症因子の一つとして報告されており、本マウスを解析することで、皮膚バリア機能異常が関連するアトピー性皮膚炎の発症機序の解明につながることを期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 22～24 年度）

論文発表

英語論文

1. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K: Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. **Am J Pathol.** 176(5): 2385-93, 2010
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):320-33, 2011
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.** 129(6):1538-1546, 2012

英語著書

1. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M: Loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose to atopic dermatitis. **Curr Probl Dermatol.** 41: 35-46, 2011

日本語総説

1. 川崎 洋, 天谷雅行: 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・アレルギー一科**, 59 巻 3 号. 2013 年. p.153-159.

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: フィラグリン欠損マウスにおける角層バリア機能異常と経皮免疫応答の亢進. 第 40 回日本臨床免疫学会総会 **Midwinter seminar workshop**, 東京. 2012 年. 9 月.
2. 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: フィラグリン欠損マウスにおける角層バリア機能異常と経皮免疫応答の亢進. 第 19 回分子皮膚科学フォーラム, 青森. 2012 年. 4 月.
3. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin knockout mice. The 71st Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Phoenix, United States. 2011. May.
4. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin-null mice exhibit altered skin barrier formation and enhanced percutaneous immune responses. **The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Wakayama, Japan. 2010.
5. 川崎 洋, 海老原 全, 永尾圭介, 久保亮治, 佐々木貴史, 定平知江子, 畑 毅, 工藤 純, 天谷雅行: 当科アトピー性皮膚炎患者のフィラグリン遺伝子変異解析とフィラグリン欠損マウスの作製. 第 6 回 **TAP (Tokyo scientific forum for Atopic Dermatitis and Psoriasis)**. (東京). 11 月. 2010 年.
6. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin knockout mice as a tool for understanding percutaneous antigen

exposure in barrier-disrupted skin. **the 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research**, Helsinki, Finland. 2010. Sep.

7. Kawasaki H, Kubo A, Nagao K, Hata T, Yokouchi M, Yoshida K, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin Knockout Mice as a Tool for Understanding the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. **14th International Congress of Immunology**, Kobe, Japan. 2010. Aug.

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

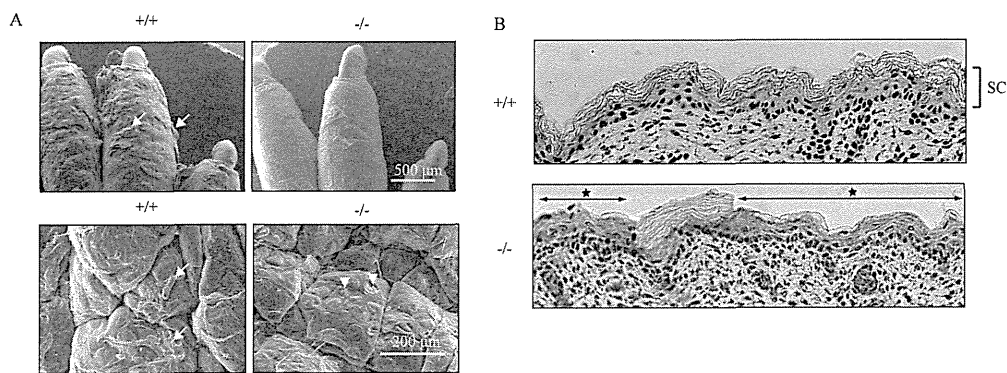


図1 フィラグリン欠損皮膚の形態学的観察

A. 日齢5の子マウスの足(上図)と腹部(下図)の皮膚表面の形態を低真空走査型顕微鏡により観察した。B. 日齢4-5の子マウス腹部角層をサフランインで染色して観察した。★, 角層欠損部。+/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス; 矢印(白), 角層構造物; 矢頭(白), 細胞の核; SC, stratum corneum(角層)

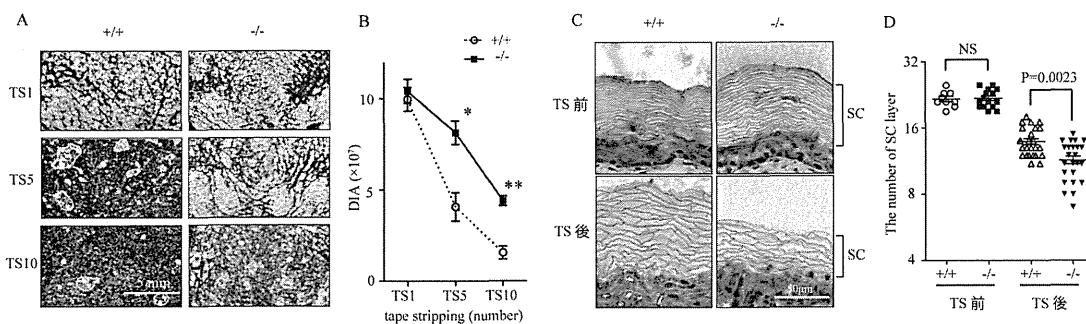


図2 テープストリップを用いた角質脆弱性の評価

テープストリップ後、テープに付着する角質構造物の像(A)と DIA スコア(B)。テープストリップ前(TS 前)とテープストリップ後(TS 後)の角層の組織像(C)と角層層数(D)の推移。+/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス; TS, tape stripping; SC, stratum corneum(角層); NS, not significant. *P < 0.05, **P < 0.01.

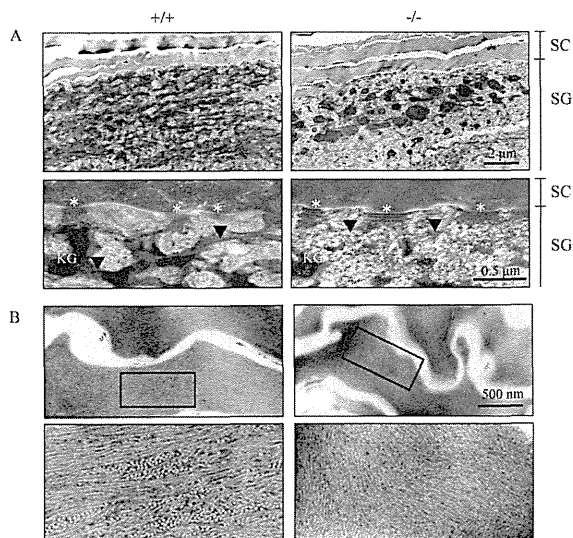


図3 フィラグリン欠損表皮における、異常ケラチン配列像の観察

顆粒層上層(A)と角層下層(B)を電子顕微鏡により観察した。Bの下段の図は上段の図の囲みを拡大したもの。SC, stratum corneum(角層); SG, stratum granulosum(顆粒層); *, デスモソーム; KG, ケラトヒアリン顆粒; 矢頭, 束状のケラチン線維。

+/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス

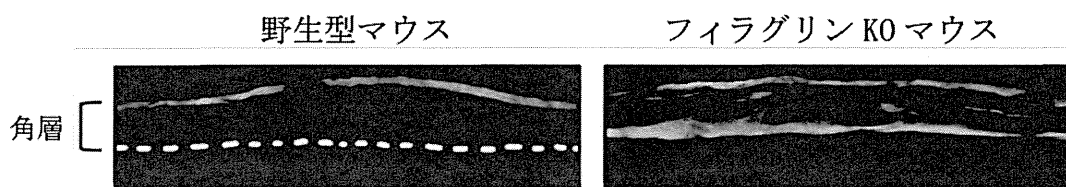


図4 カルセイン封入りポソーム経皮的塗布後の色素透過性の比較 (下段は透過光)

フィラグリンKOマウスでは角層全層に色素が浸透した像を部分的に観察したのに対し、野生型マウスではほぼ全面において角層表面にのみ色素が沈着する像を認めた。

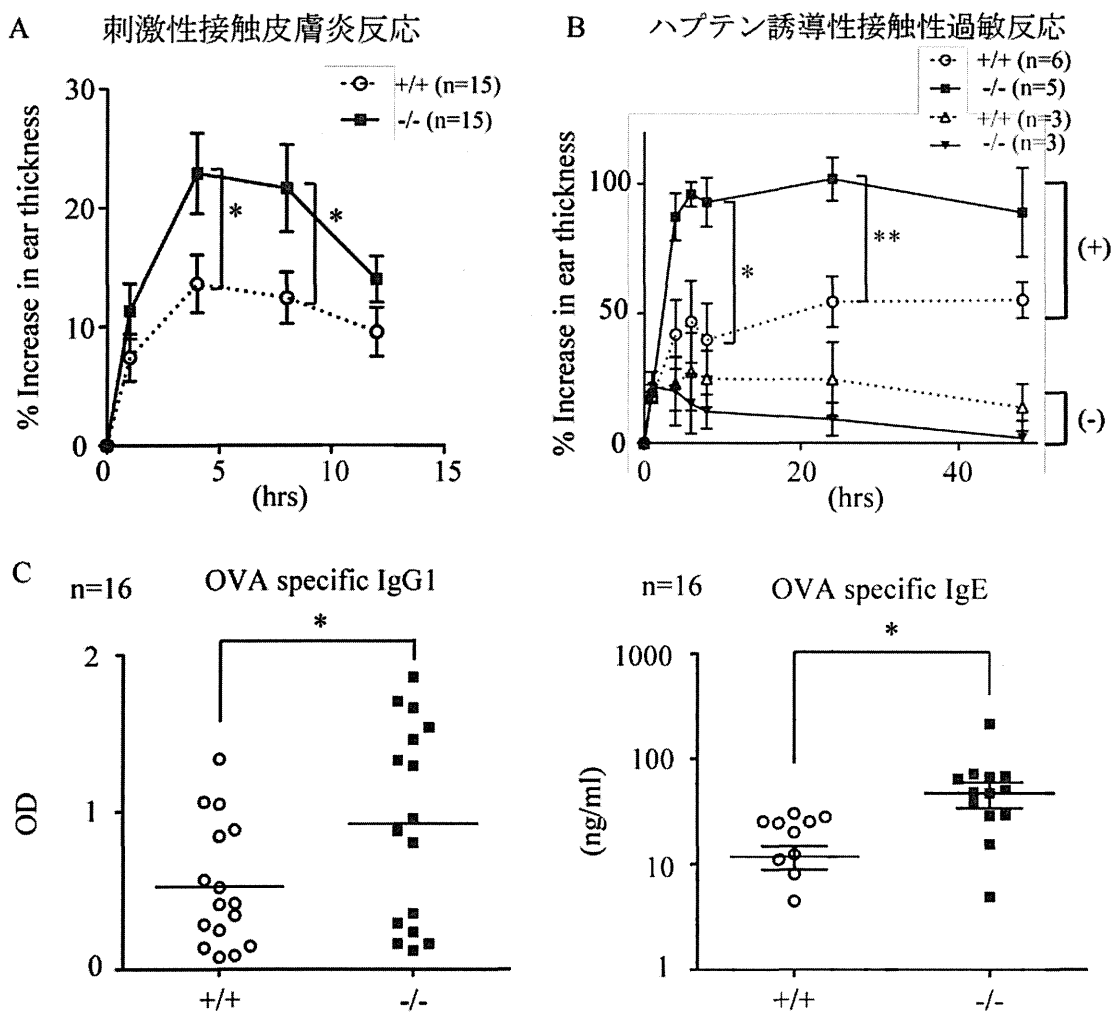


図5 フィラグリン欠損皮膚における経皮免疫応答の亢進

A 耳翼に croton oil を塗布した後の刺激性接触皮膚炎反応の評価。

B DNFB を用いたハプテン誘導性接触過敏反応の評価. (+), 感作あり; (-), 感作なし

C 蛋白抗原 (OVA) 繰り返し塗布後の抗原特異的 IgG1 及び IgE 産生能の比較. +/+, 野生型マウス; -/-, フィラグリン KO マウス. *P < 0.05.

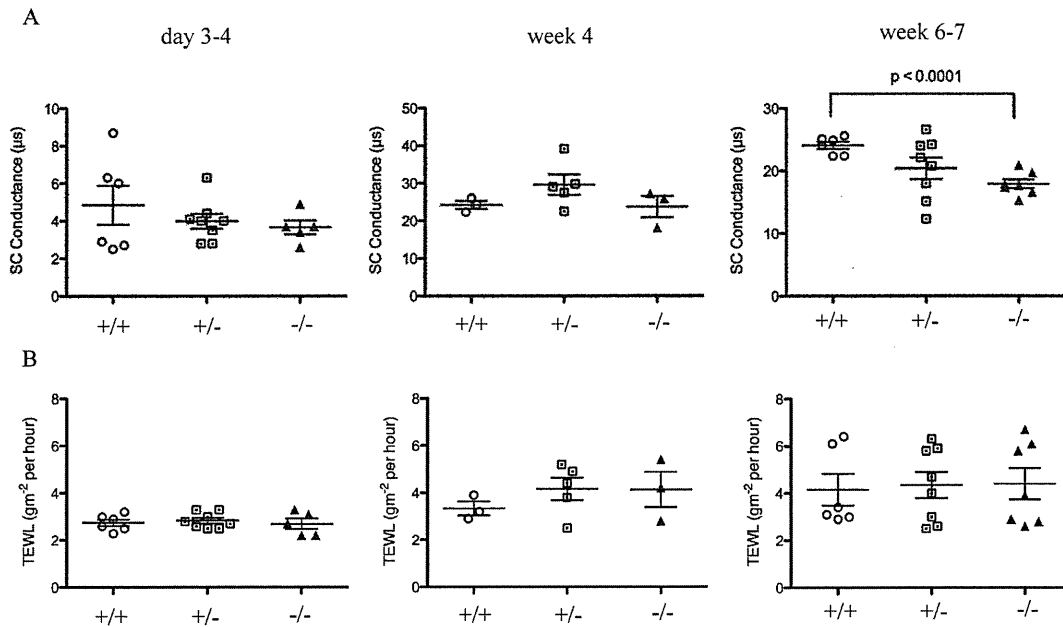


図6 野生型ヘアレスマウスとフィラグリンKOヘアレスマウスの角層内水分量とTEWL値の比較

通常飼育環境下で測定した、日齢3-4、週齢4、週齢6-7それぞれの角層内水分量(A)とTEWL値(B)。+/+、野生型ヘアレスマウス；+/-、ヘテロ型ヘアレスマウス；-/-、フィラグリンKOヘアレスマウス。

表皮バリア機能障害・経皮感作による喘息重症化と IL-23/Th17 応答

研究分担者 浅野浩一郎 東海大学医学部内科学系呼吸器内科学 教授

研究要旨

フィラグリン欠損による表皮バリア機能障害が、経皮抗原感作にともない生じる喘息の病態にどのような影響を与えるかを明らかにするために、フィラグリン欠損マウスなどを用いた検討を行った。喘息モデルでフィラグリン欠損マウスは皮膚における IL-23 発現、全身性 Th17 型炎症の亢進を伴って好酸球性気道炎症が遷延化した。一方、IL-17A あるいは IL-23p19 欠損マウスでは、野生型マウスでみられる遷延性の気道過敏性亢進・気道炎症が消失した。抗 IL-23 抗体を用いて経皮感作期、吸入暴露期で分離して IL-23 を阻害した場合、感作時での IL-23 阻害のみが有効であった。これらの結果から、皮膚における IL-23 シグナルの阻害が経皮感作喘息の重症化回避に有用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
特任講師
樹神 元博
正木 克宜
慶應義塾大学医学部大学院生

れば感作が成立しない。我々は卵白アルブミンの経皮的感作によりアジュバントなしでも好酸球性気道炎症や気道過敏性亢進をきたすこと、このモデルにおいては Th17 経路の免疫応答活性化を介して気道過敏性が遷延することを明らかにした。しかし、卵白アルブミンを抗原としたモデルではフィラグリン欠損マウスにおいても皮膚バリア機能を物理的に傷害しなければ感作が成立しなかった。

そこで今回の研究班において我々は、ダニ抗原の軟膏塗布により物理的な皮膚障害がなくとも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) が気道の喘息様症状を悪化させることを示した。さらにその病態の詳細な機序について、特に Th17 系の免疫応答に注目して検討を行った。

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。さらに、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ことが疫学的研究により明らかとなった。これらの事実は皮膚バリア障害の存在下で生じる抗原への経皮感作が、気道病変の発症および病態に影響する可能性を示唆している。

従来のマウス喘息モデルでは抗原をアジュバントとともに投与しなけ

B. 研究方法

研究代表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

は野生型 C57BL/6 マウスの耳介にダニ抽出抗原軟膏あるいはワセリン軟膏を週 2 回 3 週間塗布して感作した後、同抗原溶液の点鼻吸入を 2 回行った。または卵白アルブミン (OVA) を浸み込ませたパッチを週 1 回 3 日間 3 週間貼付した後、同抗原溶液のネブライザー吸入を 4 日連続で行った。抗 IL-23 抗体投与はパッチ貼付の前後とネブライザー吸入前に行った。いずれの感作モデルも曝露終了後 1 ~ 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 IgE 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 PCR 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ニ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 IgE やダニ抗原特異的 IgE、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ニ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ニン欠損マウスで著明に亢進していた。フローサイトメトリー法で肺での IL-17A 産生細胞を検討したところ CD4 陽性細胞がほとんどであり、Th17 細胞であると考えられた。

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、フィラグリニ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ニ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 α などの遺伝子発現には有意差が認められなかった。以上より皮膚感作部位での IL-23 の発現亢進が Th17 分化を促していると考えられた。

OVA パッチを貼付した野生型マウスの皮膚でも同様に IL-23 の発現が亢進しており、IL-23 あるいは IL-17A 欠損マウスでは気道過敏性亢進や BAL 液の好酸球増多が早期に減弱することが明らかになった。

抗 IL-23 抗体を用いて経皮感作期、吸入曝露期で分離して IL-23 を阻害した場合、感作時のみに抗体投与したときに好酸球性気道炎症は減弱し、曝露時や感作・曝露両時期に投与しても有意な変化がなかった。曝露時のみの投与は気道過敏性を亢進させ、両方の投与は抗原特異的 IgG1 産生を減弱させた。

D. 考察

フィラグリニン欠損に伴う表皮バリア障害があると経皮感作局所で IL-23 の産生が亢進し、全身性に Th17 免疫応答が誘導され、IL-23 や下流の IL-17A をノックアウトすると気道過敏性亢進や BALF 好酸球の増多などの喘息症状が早期に消褪した。

しかし中和抗体を用いた実験の結果から、IL-23 は抗原感作時 (皮膚) と抗原曝露時 (気道) で相反する作用をもっており、IL-23 を全身性に阻害する治療は臨床応用しにくいと思われる。そこで経皮的に IL-23 のシグナルを拮抗し、感作を特異的に阻害しようとするアプローチでの検討が現在進行中である。

明らかな皮膚炎を伴わない経皮感作モデルでも抗原吸入により喘息病態を呈することから、アトピー性皮膚炎の発症前であってもすでに経皮感作が成立していれば喘息を悪化させることが示唆された。いわゆるアレルギーマーチの進行を予防するためには皮膚炎以前の経皮感作を抑えることが重要と思われる。

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、これには皮膚における IL-23 発現誘導と肺を含む全身の Th17 免疫応答亢進を伴う。特に皮膚における IL-23 シグナルの阻害が経皮感作喘息の重症化回避に有用であ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 22～24 年度） 論文発表

1. M. Kodama, K. Asano, T. Oguma, et al.: Strain-specific phenotypes of airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness induced by epicutaneous allergen sensitisation in BALB/c and C57BL/6 mice. *Int Arch Allergy Immunol* 152 Suppl1: 67-74, 2010
2. S. Kagawa, K. Fukunaga, Y. Shiraishi, et al. Role of prostaglandin D2 receptor, CRTH2, in sustained eosinophil accumulation in the airways of mice with chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 155 Suppl1: 6-11, 2011
3. T. Oguma, K. Asano, K. Tomomatsu, et al. Induction of mucin and MUC5AC

expression by the protease activity of *Aspergillus fumigatus* in airway epithelial cells. *J Immunol* 187:999-1005, 2011

4. Y. Suzuki, M. Kodama, K. Asano. Skin barrier-related molecules and pathophysiology of asthma. *Allergol Int* 60: 11-15, 2011
5. J. Miyata, K. Fukunaga, R. Iwamoto, et al. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* (in press)

日本語論文

1. 浅野浩一郎 重症喘息の病型 *IgE practice in asthma* 4: 27-29, 2010
2. 浅野浩一郎 重症喘息の病型と治療法 *臨床免疫・アレルギー科* 53: 174-178, 2010
3. 浅野浩一郎 呼吸器疾患と分子標的治療 -喘息- *呼吸と循環* 58: 987-993, 2010
4. 浅野浩一郎 喘息と COPD をめぐって 類似点と相違点 -遺伝素因- *アレルギー・免疫* 17: 1996-2002, 2010
5. 浅野浩一郎 気管支喘息の遺伝素因 up to date *呼吸* 30: 20-24, 2011
6. 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. 小川里佳, 浅野浩一郎, 加川志津子, 他. 二本鎖 RNA による気道炎症・気道過敏性亢進と IL-17 第 50 回日本呼吸器学会総会, 京都, 2010. 5
2. 浅野浩一郎 シンポジウム「気道構成細胞から喘息の発症メカニズムを

- 探る」 気管支平滑筋細胞 第 60 回
日本アレルギー学会秋期学術大会
東京, 2010. 11
3. 樹神元博, 小熊剛, 加川志津子, 他.
経皮抗原感作マウスにおける気道炎症と気道過敏性亢進の遷延 第 60 回
日本アレルギー学会総会, 東京, 2010.
11
 4. 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, 福岡, 2011.10
 5. 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. Y Suzuki, M Kodama, S Kagawa, 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
 7. K Asano. Plenary lecture.
Anti-inflammatory lipid mediators and severe asthma - what we learn from lipidomics analysis of eosinophils – 2012 Korean Academy of Allergy, Asthma, and Clinical Immunology annual international congress and East Asia Allergy Symposium, Seoul, Korea, 2012. 5
 8. 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
 9. 浅野浩一郎 イブニングシンポジウム 好酸球と脂質メディエーター
リポミクス解析から明らかになったこと 第 51 回日本鼻科学会学術講演会 千葉, 2012. 9
 10. 正木克宜, 鈴木雄介, 加川志津子, 他. 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
 11. 鈴木雄介, 正木克宜, 加川志津子, 他. 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
 12. Y Suzuki, K Masaki, S Kagawa, et al.
Epicutaneous Sensitization In Filaggrin Gene-Depleted Mouse Induces Prolonged Airway Eosinophilia Without Obvious Dermatitis. 2013 AAAAI Annual Meeting, San Antonio, USA, 2013. 2
 13. K Masaki, Y Suzuki, S Kagawa, et al.
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
- 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、独自にマウス皮膚感染実験系を構築し、FLG-K0 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-K0 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-K0 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-K0 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 (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-K0 マウスの生後 4 日後の新生児マウスを用いた。固着実験は、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 cm² 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。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。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

これまでに、日本全国から収集した黄色ブドウ球菌の代表株として 200 株を選別し、CGH 解析によりクラスタリングを行った結果、AD 患者から分離された菌は市中感染菌群に由来し、特有のクラスターを形成していた。また、私どもはマウス皮膚感染を実施する為に、独自のアッセイ系を構築して各疾患由来株を用いて比較解析可能にした。このアッセイ法を使って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。その結果、各疾患株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 FK0 マウスとでは、ほとんどのケースで B6 の方が FK0 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新たに確立した。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。この事から、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定着する事が明

確にわかった。また、各疾患の代表株のドラフトゲノム配列及び既知配列を含めた比較解析から、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 FKG-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 22～24 年度）

論文発表

1. Franke, G.C., Bochenholt, A., Sugai, M., Rhode, H., Aepfelbacher, M.: Epidemiology, variable genetic organization and regulation of the EDIN-B toxin in *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients. *Microbiology* 156(3):860-872, 2010.
2. Matsuo, M., Kato, F., Oogai, Y., Kawai, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H.: Distinct two-component system in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* can change the susceptibility to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1536-1537, 2010.
3. Iyori, K., Hisatsune, J., Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Ide, K., Nagata, M., Fukata, T., Iwasaki, T., Oshima, K., Hattori, M., Sugai, M., Nishifuji, K.: Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canine with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiol. Lett.* 312:169-175, 2010.
4. Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P.: A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 185:7413-7425, 2010.
5. Iyori, K., Futagawa-Saito, K., Hisatsune, J., Yamamoto, M., Sekiguchi, M., Ide, K., Geun, W., Olivry, T., Sugai, M., Fukuyasu, T., Iwasaki, T., Nishifuji, K.: *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes intraepidermal splitting resembling canine impetigo. *Vet. Dermatol.* 22(4):319-326, 2011.
6. Mizumachi, E., Kato, F., Hisatsune, J., Turuda, K., Uehara, Y., Seo, H., Sugai, M.: Clonal distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* on handles of shopping baskets in supermarkets. *J. Appl. Microbiol.* 110(2):562-567, 2011.
7. 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(4):1660-1670, 2011.
8. Yamamoto, M., Fujimoto, H., Shimizu, Kato, F., Hisatsune, J., Ito, Y., Minami, Sugai, M.: Identification and antimicrobial drug susceptibility of clinical *Staphylococcus* spp. Isolates from canine superficial pyoderma at a primary veterinary hospital. *Jpn. J. Vet. Dermatol.* 17(2):99-104, 2011.
9. Matsuo, M., Kato, F., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Growth-phase dependence of cell surface charge in *S. aureus*. *Microbiol. UK.* 157, 1786-1797, 2011.
10. 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.
11. Yoshida, Y., Kato, F., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 33-39, 2011.
12. 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.
13. Kayama, S., Shigemoto, N.,

- Kuwahara, R., Onodera, M., Yokozaki, M., Ohge, H., Kato, F., Hisatsune, J., Sugai, M., Rapid detection of *bla*_{TMP-6} by amplification refractory mutation system. *J. Microbiol. Methods.* 88(1), 182-184, 2012.
14. 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. 菅井基行. MRSA 最近の話題. 第 83 回日本細菌学会シンポジウム S1 多剤耐性菌の現状と将来. 2010.3.27.横浜市.
2. 加藤文紀, 菅井基行. 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素 ETA の新規転写調節因子の探索. 第 83 回日本細菌学会 パシフィコ横浜. 2010.3.27.横浜市.
3. 加藤文紀, 平川英樹, 久原哲, 菅井基行. 黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の新規転写制御因子の探索. 第 4 回日本ゲノム微生物学会年会 2010.3.7.福岡市.
4. 菅井基行. 黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ: 表皮剥脱毒素遺伝子を伝播するファージ. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「バクテリオファージ研究の可能性と課題」(第 3 回ファージ研究会) 2010.9.9.吹田市.
5. 村上輝明, 久恒順三, 加藤文紀, 菅井基行. *Staphylococcus aureus* の新規表層タンパク質 Skip. 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2010.10.16.松山市.
6. 菅井基行. 皮膚バリア機能を凌駕する黄色ブドウ球菌-系統解析からのアプローチ. 第 33 回日本分子生物学会 ワークショップ 上皮バリア機能の分子機構: 上皮組織による生体フロントラインバリア構築. 2010.12.8.神戸市.
7. 菅井基行. 黄色ブドウ球菌の病原性-系統解析からのアプローチ
- チ Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*-comparative genomic approach. 大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series 2010.7.9.吹田市.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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 岡山市.
16. 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