

- 解析. 第34回日本分子生物学会
年会 2011.12.14. 横浜市.
17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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. 7.1. 吹
田市.
 21. 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

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))
総合分担研究報告書

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

哺乳類における皮膚表皮は、主に、基底層・有棘層・顆粒層・角質層からなる。皮膚顆粒層特異的に発現する遺伝子であるフィラグリンは、ヒトではフィラグリンが約10~12個タンデムに連なったプロフィラグリンとして発現する。その後、顆粒層から角質層へと分化するに伴いプロテアーゼによってフィラグリン単位へと切断される。そして、角質層上層においてアミノ酸にまで分解され、天然保湿因子を構成する。ヒトフィラグリン欠損は、アトピー性皮膚炎の最大の疾患素因となるが、フィラグリンが正常の症例も多い。

本研究においては、皮膚表皮顆粒層に特異的に発現しているプロテアーゼ Skin Aspartic Protease (SASPase) の欠損マウスの解析により、SASPase が欠損すると、プロフィラグリン分解異常を引き起こし、皮膚表皮角質層の水分量減少を引き起こす事を明らかにした。この結果は、プロフィラグリン分解異常も乾燥肌の原因となり、アトピー性皮膚炎の疾患素因となる可能性を示唆している。また、日本人アトピー性皮膚炎患者コホートに対する変異解析を行った所、日本人では、196人中3人にV187Iの活性抑制変異が認められた。しかし西欧人のアトピー性皮膚炎や乾燥肌コホートにはそのような変異は認められなく、人種により異なる変異が存在することも示唆された。

以上のように、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ことで、角質層バリアーとアトピー性皮膚炎発症の分子機構が明らかになることが予想された。

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

宮本 憲一 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室、特任助教

工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室、教授

Aileen Sandilands

Dermatology & Genetic Medicine, Division of

Molecular Medicine, University of Dundee, Dundee、博士研究員

W.H. Irwin McLean

Dermatology & Genetic Medicine, Division of Molecular Medicine, University of Dundee, Dundee、教授

A. 研究目的

皮膚表皮角質層形成の分子機構を明らかにする為に、哺乳類特異的にゲノムに獲得された皮膚表皮顆粒層特異的レトロトランスポゾン由来プロ

テアーゼ SASPase が欠損したマウスの表現型を解析し SASPase の機能を明らかにする。また、アトピー性皮膚炎患者ゲノムにおける SASPase の変異解析を行い、その発症との関連性を明らかにする。

B. 研究方法

SASase 欠損マウスを Hos:HR-1 マウスと戻し交配を行うことにより、無毛 SASPase 欠損マウスを作成した。このマウスの形態学的・生化学的・生理学的解析を行った。

具体的には、成体ノックアウトマウスの皮膚表皮角質層の表面構造や生化学的・生理学的解析を可能にする為に、既に作成していた SASPase 欠損マウスを無毛マウス Hos:HR-1 へと戻し交配を行い、形態学的解析、生理学的解析、分子生物学的解析を行った。

その過程で、SASPase がプロフィラグリンを基質とする可能性がでてきたため、ヒト SASPase/プロフィラグリンのリコンビナント蛋白質を大腸菌においてそれぞれ発現・精製しプロフィラグリンを基質としたプロテアーゼ活性の解析を行った。

また、SASPase 欠損ヘアレスマウスの天然保湿因子がどのようになっているのかを解析する為に、野生型・欠損マウスの成体無毛マウスから、テープストリッピングを行い、遊離アミノ酸の分析を行った。

更に、SASPase 遺伝子の変異解析を、日本人の健常人群 26 人、アトピー性皮膚炎群 196 人に対して行い、その結果同定された変異もつりコンビナント SASPase 変異体を、大腸菌内に発現・精製した。そして、同じ濃度に合わせた精製蛋白質を用いて、自己分解反応を計測し、活性型の産生量を指標としてプロテアーゼ活性を測定した。

また SASPase 欠損マウスにおいて実

際にどのような細胞生物学的現象が起きているのかを解析する為に、SASPase の Promoter 直下に GFP を挿入したノックインマウスを作成し、このマウスを用いて SASPase 発現細胞を分離する系を至適化した。

C. 研究結果

SASPase 欠損無毛マウスは、生後の外見は明確な表現系は示さなかったが、生後 3~4 週目において、乾燥肌様表皮を呈することが明らかとなった。

また皮膚表層の形状を観察する為に、走査電子顕微鏡観察を行った所、深い溝の皺の増加を伴っていた。

透過電子顕微鏡解析においては、基底層・有棘層・顆粒層は正常であったが、電子密度の濃い角質層が有意に増加していることが明らかとなった。

皮膚表皮の生理学的解析を行った所、水分蒸散量に変化はないが、角質水分量は有意に減少が認められた。またこのことはラマン共焦点解析によっても、確認された。

一方で、表皮分化マーカーであるケラチン-14, -1, インボルクリン、ロリクリンの発現量、発現部位に差異は認められなかったが、SASPase 欠損マウスにおける角質層の下層部分にプロフィラグリンの分解異常産物が蓄積していることが明らかとなった。

そこで、ヒト SASPase とヒトフィラグリンのリコンビナント蛋白質を大腸菌において発現・精製し *in vitro* プロテアーゼアッセイを行い、その切断配列をアミノ酸シーケンスにより決定したところ、SASPase は、プロフィラグリンのリンカー配列を特異的に切断する事が明らかとなった。

フィラグリン分解経路の最終分解産物はアミノ酸の集合体（天然保湿因子）であるが、テープストリッピングによる遊離アミノ酸の組成分析を行った所、野生型と欠損マウスの間に有意な差異は認められなかった。

SASPase の変異解析を、日本人の健康人群 26 人、アトピー性皮膚炎 (AD) 群 196 人に対して行ったところ、5 つのミスセンス変異が同定された。それらの変異を導入したリコンビナント SASPase を大腸菌にて発現・精製し、自己分解による活性測定を行った所、V187I 変異は活性低下を引き起こすことが明らかとなった。ただそのような変異は西欧人コホート (96 人のアイルランド人 AD 症例、96 人の南アフリカコーサ人 AD 症例、99 人のスコットランド乾燥肌症例) には認められなかった。

SASPase Promoter 直下に GFP 遺伝子を挿入したマウスは顆粒層に特異的に GFP を発現し、SASPase 陽性細胞を分離できることを確認した。このマウスを用いて、顆粒層の分離を行い、角質層がどのように形成されるのかを解析する予定である。

D. 考察

SASPase 欠損により、プロフィラグリンの分解異常と角質層水分量の減少が認められたことは、フィラグリン欠損のみならず、フィラグリンの分解異常も角質層の形成に重要な役割を担っていることを示唆している。(図参照)

さらにこれらの事実はレトロトランスポゾン (転位因子) 由来遺伝子が哺乳類特異的にゲノムに挿入され

(Domestication)、実際に組織構築に関わっている初めての例であり、哺乳類皮膚の適応進化において重要な知見である。

また従来角質層上層の天然保湿因子が、角質層における水分調節に関わることが報告されてきた。ところが、乾燥肌を示す SASPase 欠損マウスの角質層上層のアミノ酸組成・量は正常であることから、プロフィラグリンが分解異常を起こしている角質層下層部

分にも水分保持の重要な役割があることを示唆している。

SASPase の変異解析では日本人にわずかながらも活性抑制変異が AD コホートからみつかったものの、西欧人 AD や乾燥肌コホートからはそのような変異は見つからなかった。すなわち SASPase 変異には人種による差異があることと、フィラグリン欠損以外の AD 発症を説明する頻度の変異は認められなかった。しかし、SASPase の活性の増減により、プロフィラグリンの分解異常を伴う乾燥肌が誘導されることも考えられ、AD 発症の危険因子の診断には、従来の遺伝子解析のみならず、皮膚表皮角質層における蛋白質の質的变化による診断も重要であることが考えられる。

また SASPase Promoter を用いた SASPase 陽性顆粒層細胞の分離法により、更に詳細な角質層形成機構を解析する基盤ができつつあり、今後の角質層バリアーの基礎研究・アトピー性皮膚炎発症の診断などに応用されることが期待される。

E. 結論

本研究により、レトロトランスポゾン由来のレトロウイルス型プロテアーゼドメインを持つ SASPase が、プロフィラグリンのリンカー配列を切断することにより、マウス角質層の保湿に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。その活性制御が角質層形成に重要な働きを果たしており、SASPase の細胞生物学的な機能解析が更にアトピー性皮膚炎発症の理解にも繋がっていくと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 22~24 年度)

<論文発表>

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.

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.

3:320-333, 2011.

<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

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

Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I,

Inazawa J, Kudoh J, Amagai M:
Evolutionally integrated retroviral-like
aspartic protease, SASPase regulates
stratum corneum hydration
through profilaggrin-to-filaggrin
processing
第34回 日本分子生物学会年会
December 13-16, 2011, Yokohama,
Japan
一般講演 ・ ポスター発表

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
日本研究皮膚科学会 第36回年次学
術大会
December, 9-11, Kyoto, Japan
Selected in Plenary II

Matsui T: 表皮の顆粒層特異的に発現
するプロテアーゼSASPaseによる、角
質層水分量の制御機構
第61回 日本アレルギー学会秋期学
術大会
シンポジウム14 「Filaggrinとアトピー
性皮膚炎」
November, 10-12, 2011, Tokyo, Japan

Matsui T, Miyamoto K, Kubo A,
Kawasaki H, Ebihara T, Hata K,
Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I,
Inazawa J, Kudoh J, Amagai M:
皮膚表皮顆粒層特異的なレトロウイ
ルス型アスパラギン酸プロテアーゼ
SASPaseは、ProfilaggrinからFilaggrin
への分解を制御し、角質層の水分量を
調節する
第84回 日本生化学会大会
September 21-24, 2011, Kyoto, Japan
一般口頭発表 ・ ポスター

Matsui T: 脊椎動物陸上進出の謎と皮
膚の美容
第29回 日本美容皮膚科学会総会・
学術大会
September 10-11, 2011, Yamaguchi,
Japan
シンポジウム2 「タイトジャンクショ
ンの仕組み」

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
Heidelberg-Kyoto Joint Symposium
“Crossing Boundaries: Stem Cells,
Materials, and Mesoscopic Sciences”
July 21-23, 2011, DFKZ, Heidelberg
University, Germany
Poster Presentation

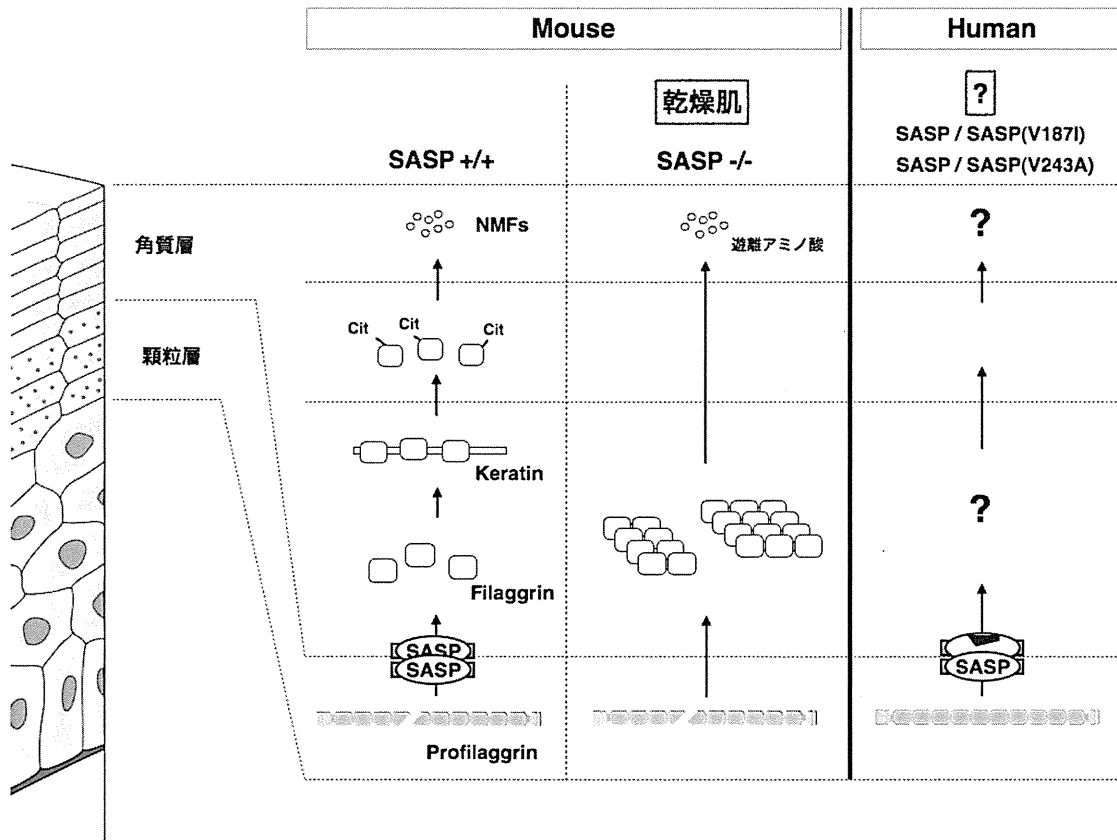
Matsui T, Miyamoto K, Kubo A,
Kawasaki H, Ebihara T, Hata K,
Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I,
Inazawa J, Kudoh J, Amagai M: 陸上脊
椎動物において獲得された皮膚表皮
顆粒層特異的なレトロウイルス型プ
ロテアーゼSASPaseは、角質層の水分
量を調節する
日本進化学会 第13回大会
July 29-31, 2011, Kyoto, Japan
一般講演口頭発表

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
Epithelial Differentiation &
Keratinization Gordon Research
Conference

July 3-8, 2011, Mount Snow Resort, USA
Poster Presentation

H. 知的所有権の出願・登録状況(予
定を含む)
なし

図とその説明



SASPase 欠損により、プロフィラグリンの分解異常と角質層水分量の減少が認められたことは、フィラグリン欠損のみならず、フィラグリンの分解異常も角質層の形成に重要な役割を担っていることを示唆している。

経皮液性免疫と自然発症アトピー性皮膚炎マウスにおける樹状細胞の役割

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

アトピー性皮膚炎ではバリア破綻に基づく経皮的な感作が疾患の基盤にあると考えられている。しかし、その獲得免疫の機構の詳細は不明であるうえに、その中心的な役割を担うと考えられているランゲルハンス細胞の *in vivo* の機能の多くは未だ明らかにされていなかった。我々はランゲルハンス細胞を一過性に消去しうるマウスに蛋白抗原 (細菌由来毒素) を経皮的に免疫し、タイトジャンクションバリア存在下ではランゲルハンス細胞がアレルギーにおいても重要な液性免疫を誘導することを明らかにした。また、TACE/ADAM17 を表皮から欠失させたマウスを作製し、アトピー性皮膚炎様の表現型を有することを明らかにした。このマウスは皮膚炎を自然発症し、アトピー性皮膚炎モデルマウスとして有用である可能性がある。

研究協力者

大内健嗣 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 (現 NIH 留学中)

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

1) 経皮免疫におけるランゲルハンス細胞の機能: アレルゲンや細菌抗原がどのように経皮的に抗原として認識されているのかは不明なところが多い。樹状細胞 (DC) は獲得免疫の起点である重要な細胞である。ランゲルハンス細胞 (LC) は表皮唯一の樹状細胞である。経皮免疫において LC が重要な役割を担っていることが予想されてきたが、その *in vivo* 機能はほとんど不明であった。我々はこれまで LC が遺伝子銃にて免疫された細菌抗原に対して抗原特異的な IgG1 (Th2) 応答を担うこと (Nagao et al., PNAS 2009)、タイトジャンクションバリア (TJ) を保ったまま蛋白抗原を獲得しうることを明らかにした (Kubo et al., JEM 2009)。これら知見をさらに進め

るべく、LC の TJ を介した抗原獲得から液性免疫応答が発動されることを証明し、その生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

2) 自然発症アトピー性皮膚炎モデルマウスの解析: 近年アトピー性皮膚炎の病態の理解が進み、本疾患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、ヒトの病態を反映していると考えたため解析した。

B. 研究方法

1) Ovalbumin (OVA) パッチ免疫の系を確立し、ランゲリン陽性樹状細胞の

有無にて経皮免疫が誘導されるか検討した。また、表皮剥脱毒素 (ET) 産生性黄色ブドウ球菌の感染によって生じる SSSS (staphylococcal scalded skin syndrome) のマウスモデルの系を確立し、ET パッチ免疫を介した LC の生体防御機構を解析した。

2) 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^v マウスとも交配した。

C. 研究結果

1) 蛋白抗原である chicken ovalbumin (OVA) をマウスの耳にパッチ免疫したところ、OVA 特異的 IgG1 が誘導された。LC を一過性に消去する Langerin-DTR (diphtheria toxin [DT] receptor) マウスに DT を腹腔内投与してパッチ免疫すると経皮液性免疫は誘導されなかったことにより、パッチ免疫された蛋白抗原への液性免疫応答にはランゲリン陽性の皮膚樹状細胞が重要であることが分かった。骨髓移植等を組み合わせた実験系で、最近発見された Langerin 陽性真皮樹状細胞はこの免疫応答に関与しておらず、LC が担っていることを確立した。

この経皮的な免疫機構は皮表にある細菌抗原等を獲得しているものと考えた。LC が皮表の細菌由来抗原を獲得し、防御的免疫応答を担うことを証明するため実験的 staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) を利用した。ET をマウス腹腔内に投与すると 3 時間で皮膚にびらんを生じた。ET は TJ を通過することができず、パッチ免疫を行っても皮膚にはびらんを生じ

なかった。しかし、血清には ET 特異的 IgG1 抗体が産生されており、LC を消去した上で免疫したマウスでは抗体産生が見られなかった。LC にて誘導された抗 ET IgG1 は *in vitro* にて ET の中和活性を持っていた。ET をパッチ免疫したマウスに ET を全身投与したところ、PBS パッチ群と異なり、殆どのマウスが SSSS を発症しなかった。重要なことに、ET パッチ免疫前に LC を消去した Langerin-DTR マウスでは重篤な皮膚のびらんを生じた。

2) 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 CD8T 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 IL-17 を産生する CD4 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。

D. 考察

1) これまで機能が不明であった LC は表皮 TJ を介して外界に存在する細菌由来抗原を常時サンプリングし、抗体産生を誘導していることが解った。この免疫応答はあくまでもバリア存在下のことで、抗原は生体外に存在する。皮表に存在する細菌は生体内に侵入することで強い病原性を発揮することがあるが、LC によって誘導された中和活性を持つ抗体で生体が充填されることで、細菌が侵入しても速やかに対応できることになる。我々はこれを preemptive immunity (先制防御的免疫応答) と名付けた。このプロセスは感染防御におけるワクチンではもちろん、経皮的アレルギー成立の範疇でも重要なコンセプトとなる。

2) TACE-Sox9 マウスはいわゆる SPF 下でも全マウスが 3 週から乾燥肌、6 週以降に皮膚の強い炎症を呈し、その症状および経過、血清学的 (IgE 値) もアトピー性皮膚炎に類似していた。免疫学的には Th1 と Th2 反応が増強しているばかりではなく、Th17 の反応や、その他 IL-17 を産生する細胞を皮膚に観察した。これら細胞ないし分子コンポーネントがどのように病態に関わっているのかを解析し、皮膚炎の上流イベントに迫ることができると考える。

E. 結論

経皮免疫の免疫機構と LC の役割を明らかにした。また、新たなアトピー性皮膚炎のマウスモデルを作成し、今後病態機序を解明に貢献できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (平成 22~24 年度) 論文発表

1) Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K : Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med*: 208(13): 2607-13, 2011

2) 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 and Clin Immunol*: 129 (6) 1538-1546, 2012

3) 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):1781-5, 2012

4) Kubo, A., Nagao, K. and Amagai, M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*: 122 (2) 440-7, 2012

学会発表

1) 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. International Congress of Immunology. Aug 22~27, 2010, Kobe, Japan

2) 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 Percutaneous Antigen Exposure in Barrier-disrupted Skin. Sept 7~13, 2010, Helsinki, Finland, 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research

3) Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K. Langerhans cells confer pre-emptive immunity via antigen capture through tight junctions in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. Nov 27~29, 2011. 第40回日本免疫学会総会.幕張メッセ, 千葉.

4) Ouchi T, Kubo A, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BJ, Koyasu S, Amagai M, Nagao K. Langerhans cells play an essential role in inducing protective humoral immune response subsequent to antigen uptake through tight junctions. Barcelona, Spain, Sept 6~11, 2011. 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research.

5) 永尾圭介: 経皮免疫におけるランゲルハンス細胞の役割. 9月15~17日, 第39回日本臨床免疫学会総会. 京王プラザ, 東京. (招待講演)

6) Nagao K: Antigen capture through tight junctions by Langerhans cells induce pre-emptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. 12th International Workshop

on Langerhans Cells. Nov 3~6, 2011, Innsbruck, Australia. (Invited lecture)

7) Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, Nagao K: Antigen capture through tight junctions by Langerhans cells confer pre-emptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. Dec 9~11, 2011, 36th Annual Meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan

8) 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.

9) 永尾圭介: 表皮タイトジャンクション存在下でのランゲルハンス細胞の免疫応答. 6月1~3日, 2012. 第111回日本皮膚科学会総会 (教育講演)

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:W02009/139191
(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:W02009/139191
(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

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。我々は今回、1. ヒト表皮における TJ バリアの形態と位置を精査し、2. アトピー性皮膚炎における TJ バリアと表皮内樹状細胞の形態変化を精査し、3. アトピーモデルマウスにおける TJ バリア変化の解析をおこない、1. ヒト表皮 TJ バリア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こと、2. アトピー性皮膚炎では表皮内ランゲルハンス細胞による TJ バリア外からの抗原取得が促進されていると考えられること、3. フィラグリン欠損のみでは TJ バリアの破綻をおこらないこと、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
横内 麻里子 慶應義塾大学医学部
皮膚科学
吉田 和恵 慶應義塾大学医学部
皮膚科学
川崎 洋 日本予防医学協会
リサーチ・レジデント

抗原が皮膚を通過して慢性的に体内に侵入することが、アトピー性皮膚炎発症の要因となると考えられる。しかし、皮膚のバリアは角質だけが担うのではなく、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。では、角質層バリア・TJ バリアはそれぞれ、外来抗原の経皮的侵入に対してどのようなバリア機能を担っているのか、角質層バリアを突破した抗原の体内への侵入を表皮 TJ バリアは阻止し得るのか、バリア破綻により侵入した抗原はどのように免疫系に捕捉されるのか。バリア障害疾患としてアトピー性皮膚炎の病態を捉えなおすために、本研究ではヒト表皮 TJ バリアの細胞生物学的性質について基礎的な解析を行うことを目的とした。

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。アトピー性皮膚炎発症の主要因として、角層構成蛋白フィラグリンの遺伝子変異が報告されている。すなわち、フィラグリン欠失により皮膚角層のバリア機能が低下し、様々な

B. 研究方法

ヒト皮膚において TJ バリアを可視

化する手法の開発を行った。各種プロテアーゼを用いた表皮・真皮剥離方法を検討し、倫理委員会に認められたインフォームドコンセントに基づいて提供されたヒト皮膚より、1. 通常の切片の免疫染色による解析により、TJ 関連蛋白、アドヘレンスジャンクション (AJ) 関連蛋白、デスモソーム (DS) 関連蛋白の局在解析、を行った。また、ビオチントレーサー実験を組み合わせることで、TJ の位置の同定を行った。2. プロテアーゼ処理により表皮と真皮を分離して得られる表皮シート、および黄色ブドウ球菌が産生する exfoliative toxin (ET) 処理により得られる顆粒層・角層シートを用いて、コンフォーカル顕微鏡により Z 切片を多数撮影したのち三次元再構成することで、ヒト表皮 TJ バリアを立体的に可視化した。さらに、ex vivo において表皮シートを作成し、HLA-DR, langerin を TJ と共に染色し、TJ バリアと LC との立体位置関係について検討した。以上の方法を用いて、正常ヒト皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚において、TJ バリアと LC の観察を行った。また、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

1) 通常の切片の免疫染色による解析

デスモプラキシン (DS 構成蛋白)、オクルディン、クローディン 1 (TJ 構成蛋白) の 3 重染色を行った。角層の下には DS が細胞全周にわたって分布する平板な 3 層の顆粒層細胞が存在した。最外層の細胞はオクルディン、クローディン 1 とともに陰性。第 2 層目の細胞はアピカル細胞接着にオクルディンが濃縮し、apical 細胞膜はクロー

ディン 1 陰性、basolateral 細胞膜はクローディン 1 陽性であった。第 3 層目の細胞は apical 細胞接着にオクルディンの濃縮が見られるものの、クローディン 1 が細胞膜全周に陽性であった。第 2 層目の細胞のみが細胞膜の apico-basolateral 細胞極性を示したことから、第 2 層目の細胞のオクルディン陽性細胞接着が TJ の fence function を示していると考えられた。そこで次に、ビオチントレーサー (560 Da) を ex vivo にてヒト皮膚の真皮に注射し、トレーサーの拡散実験を行った。その結果、apico-basolateral 細胞極性を示す細胞の apical 細胞接着において特異的にトレーサーの拡散が堰き止められていた。すなわち、ヒト表皮顆粒層においても、外側から 2 層目の細胞のみが、apico-basolateral 細胞極性 (TJ の fence function) とビオチントレーサーの拡散制御 (TJ の gate function) の両方を示すことが明らかとなり、ヒト表皮顆粒層が 3 層の異なる性質をもつ細胞層から構成されていることが明らかとなった。さらに TJ 関連蛋白として ZO-1, クローディン 4, AJ 関連蛋白として E カドヘリン、 α カテニンの免疫染色を行った。その結果、ZO-1 はオクルディンとほぼ同じ染色パターンを、クローディン 4 はクローディン 1 とほぼ同じ染色パターンを示した。興味深いことに、AJ 関連蛋白の E カドヘリン、 α カテニンは、第 1 層目の細胞では陰性、第 2 層目の細胞では basolateral 細胞膜に特異的に、第 3 層目の細胞では細胞膜全周に存在していた。この結果は、第 2 層目の細胞が第 3 層目の細胞から分化する時に、細胞膜の apico-basolateral 細胞極性と隣り合う細胞間の TJ 形成の 2 つの特徴を獲得することを示してい

る。今回明らかになった、顆粒層の3層構造と、TJ, AJ, DS 構成蛋白の分布について、図1にまとめた。

2) 表皮シートの三次元可視化による解析

次に我々は、プロテアーゼ処理により表皮と真皮を分離して得られる表皮シート、および ET 処理により得られる顆粒層・角層シートを用いて、ヒト表皮 TJ の三次元可視化法の確立を目指した。ヒト表皮シートは、マウス表皮シートと比べて、遥に多層のケラチノサイトからなっており、マウス表皮シートと同じ染色方法では TJ の三次元可視化が困難であった。そこで我々は ET 処理により得た、角層と顆粒層の細胞からなるシートを用いて TJ の染色を試みた。本方法を用いることで、我々は初めて、ヒト表皮の TJ バリア構造を立体的に観察することに成功した。ヒト表皮では、マウス表皮に比べてランダムに顆粒層の細胞が互いに重なり合って存在していたが、第2層目の細胞極性を持つ細胞の細胞間に TJ バリアが形成され、表皮全体を連続して覆い尽くしていることが明らかになった。

3) アトピー性皮膚炎の表皮内樹状細胞に関する解析

非常に規則正しいマトリックス状配列をしているマウス耳表皮顆粒層細胞と比べると、ヒト表皮顆粒層の細胞はそれぞれの細胞がお互いに重なり合って複雑な構造を作っていた。しかし表皮 TJ は、顆粒層の2層目の細胞同士が接着する面の最もアピカル側の細胞間に存在しており、表皮内にただ1層の TJ バリアを構築していた(図2)。TJ バリアと角質との間には1層の生きた細胞(有核の細胞)の層

が存在しており、角層バリアと TJ バリアの2つからなる表皮バリアの基本構築は、マウスとヒトで共通していると考えられた。次に LC の観察を行った。ヒト表皮はマウス表皮に比べると有棘層が厚く、LC は有棘層に幅広く分布していた。LC の樹状突起の多くは表皮表面に向けて伸びており、マウスと同様に表皮表面の方向を検知する機構を LC が備えていると考えられた(図3)。正常皮膚において、HLA-DR を高発現する活性化した LC を観察すると、樹状突起を TJ とドッキングさせている像が観察された。次に langerin の分布を観察した。マウスに比べるとヒト LC では langerin の染色が、休止期においても樹状突起に明るく観察された。活性化した LC においては TJ とドッキングした樹状突起の先端部分に強く langerin の濃縮が観察された。さらに、アトピー性皮膚炎病変部皮膚において同様の観察をおこなった。病変部皮膚では表皮の肥厚と顆粒層の層数の増加が認められ、ZO-1 にて染色される細胞間接着装置が、正常皮膚よりも多数の層に存在しているのが観察された。しかし、ビオチン化試薬を用いた浸透試験を行ったところ、TJ バリアとして機能しているのは最上層の1層の ZO-1 陽性細胞間接着のみであることが明らかとなり、アトピー病変部においても TJ はただ1層のみ存在していることが明らかとなった。Claudin-1, occludin, ZO-1 の染色では、正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚で明らかな差を認めなかった。

4) フィラグリン欠損マウスの TJ バリアに関する解析

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

これまで細胞極性の研究は、主に単相上皮細胞において行われてきた。今回我々は、顆粒層第2層目の細胞が、単層上皮細胞と同じように、細胞膜の apico-basolateral 細胞極性を示すこと、fence function と gate function を併せて持つ機能的な TJ を形成すること、を明らかにした。今後、重層上皮の細胞生物学を展開していく上で重要な第一歩であると考え。また、ET 処理によるシートは、顆粒層細胞を *en face* に観察する重要な手段であり、今後ケラチノサイトの角化メカニズムを解析していく上で役立つことが期待される。

TJ バリアと LC との相互作用は、マウス皮膚のみでなくヒト皮膚においても保存されていることが明らかとなった。以上より、皮膚バリア構造として、以下のようなモデルを考えている。すなわち、表皮では最外層の角質によるバリアが、身体外部の空気環境と体内の液性環境を分け隔てており、角質バリアの内側では、TJ が表皮を TJ バリア外液性環境と TJ バリア内液性環境の2つのコンパートメントに分割している、というモデルである。

本モデルにおいて、通常 TJ バリア内に存在する LC が、TJ バリア外から抗原取得する意義について、また正常皮膚とアトピー性皮膚炎病変部皮膚でこの相互作用の頻度に何らかの差が存在するのか、今後明らかにしていきたい。

E. 結論

今回我々は、ヒト表皮において、顆粒層の細胞が、それぞれ異なる特徴を持つ3層の細胞からなっていること、その中の外側から数えて2層目の細胞のみが、細胞膜 apico-basolateral 細胞極性を示すと共に、細胞間に機能的な TJ バリアを形成することを明らかにした。また、ヒト表皮の TJ バリアを三次元可視化することに初めて成功し、TJ バリアと LC との相互作用が哺乳類皮膚において保存されていることを明らかにした。これらは、今後ヒト表皮のバリア構造を解析し、角層と TJ という2つのバリア機能をそれぞれ分離して解析していく上で、重要な解析手法となる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表（平成 22～24 年度）

論文発表

英語総説

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.
2. Kubo A, Nagao K, and Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*. 122:440-447,

2012.

3. 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. 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, and Kabashima K. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am. J. Pathol.* 176:2385-2393, 2010.
2. Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, and Nagao K. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *J Exp Med.* 208:2607-2613, 2011.
3. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, and Amagai M. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med.* 3:320-333, 2011.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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. 特別講演：未来皮膚科学：Molecular Barriology of the Skin. 日本皮膚科学会雑誌. 120:408-410, 2010.
2. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア研究の新展開. フレグランスジャーナル. 5:14-18, 2010.
3. 久保亮治, 天谷雅行. ランゲルハンス細胞による外来抗原捕捉機構. 感染・炎症・免疫. 40:267-270, 2010.
4. 久保亮治, 天谷雅行. ランゲルハンス細胞による抗原の補足機序. 臨床免疫・アレルギー科. 54:701-709:2010.
5. 久保亮治. 表皮バリアとタイトジャンクション. 臨床皮膚科増刊号特集 最近のトピックス 2011

Clinical Dermatology 2011.
65:38-43, 2011.

6. 久保亮治. 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態. 日本臨床免疫学会会誌 特集号: 皮膚の臨床免疫. 34:, 2011.
7. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア機構とアトピー性皮膚炎. 実験医学 2011年6月増刊号「疾患発症の影に潜む慢性炎症の分子機構と先進医療」. 29:1634-1640, 2011.
8. 久保亮治, 天谷雅行. 皮膚バリア機構の新しい理解 ~体表面における防御と索敵のメカニズム~. ヒューマンサイエンス. 22:14-18, 2011.
9. 久保亮治. 皮膚が隔てる外と内皮膚バリア機構の細胞生物学. 神奈川医学会雑誌. 38:58-59, 2011.
10. 久保亮治. 皮膚バリア研究の新展開: タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の視点から. 皮膚. 10(supple16):5-10, 2011.
11. 久保亮治. 皮膚バリア構造・機能の可視化への挑戦. 日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号. 121:430, 2011.
12. 久保亮治. 皮膚バリア機構の新しい捉え方. 臨床免疫・アレルギー科. 56:294-302, 2011.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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. Epidermal tight junction barriers and trans-tight junction antigen uptake activity of Langerhans cells. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Psoriasis Research, Ube, Japan 2010年9月
2. Kubo A. Structural and Immunological Barriers of Vertebrate Skin. Seminar in Department of Dermatology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA 2010年10月
3. Kubo A. Molecular Barriology of the Skin: Dynamic Interaction between Surface Physical Barriers and Immune System. The 82th KEIO COEX meeting, Tokyo, Japan 2010年12月
4. Kubo A. Epidermal barrier dysfunction and percutaneous sensitization as an initial trigger of atopic dermatitis. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology, Fukuoka, 2011年10月
5. Kubo A. Physiological and immunological barriers in the epidermis. The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Hiroshima, 2011年10月
6. Kubo A. Surface Barrier and Immunology of the Skin. SBARIS 4th stage 3rd meeting, Osaka, 2012年3月
7. Kubo A. 3D Imaging of the Mammalian Epidermis. 37th Annual Meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology, Naha, Okinawa, 2012年12月

日本語招待講演

1. 久保亮治. 進化からみた皮膚バリア: 私たちは母なる海を身に纏う. 平成 21 年度日本皮膚科学会東京支部主催生涯教育セミナー, 東京 2010 年 2 月 7 日.
2. 久保亮治. 表皮ランゲルハンス細胞とタイトジャンクションバリアの協調による外来抗原取得機構. 第 19 回東京免疫フォーラム, 東京 2010 年 2 月 24 日.
3. 久保亮治. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. 第 109 回日本皮膚科学会総会 皆見省吾記念賞受賞記念講演, 大阪 2010 年 4 月 16 日.
4. 久保亮治. Molecular Barriology of the Skin. 第 109 回日本皮膚科学会総会特別企画「未来皮膚科学」, 大阪 2010 年 4 月 16 日.
5. 久保亮治, 永尾圭介, 横内麻里子, 吉田和恵, 佐々木博之, 天谷雅行. 表皮タイトジャンクションバリアの生物学. 第 17 回分子皮膚フォーラム, 福岡 2010 年 7 月.
6. 久保亮治. 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア機構の細胞生物学. 神奈川県皮膚科医会第 133 回例会・総会, 横浜 2010 年 7 月 4 日.
7. 久保亮治. 皮膚バリア機構の細胞生物学. 皮膚基礎研究クラスターフォーラム: 第 5 回教育セミナー, 東京 2010 年 8 月.
8. 久保亮治. 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア構造と免疫の視点から. 第 22 回高遠シンポジウム, 高遠 2010 年 8 月.
9. 久保亮治. 皮膚が隔てる外と内: 皮膚バリア構造と免疫の視点から. 奈良先端大学 GCOE セミナー, 奈良 2010 年 10 月.
10. 久保亮治. 皮膚バリア機構の新しい捉え方 (ステロイド・カルシニューリン阻害外用薬の使い方). 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京 2010 年 11 月.
11. 久保亮治. 哺乳類皮膚バリア構造の解析～物理的バリアと免疫細胞の相互作用を中心に～. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸 2010 年 12 月.
12. 久保亮治. 皮膚バリア研究の新展開: タイトジャンクションバリアとランゲルハンス細胞の視点から. アトピー性皮膚炎治療研究会第 16 回シンポジウム, 北九州 2011 年 2 月.
13. 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.
14. 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.
15. 久保亮治. 皮膚バリア学 ～身体の内と外を区切るということ～. 大阪大学薬学部大学院講義, 大阪, 2012 年 4 月.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 久保亮治. TOF-SIMS を用いた皮膚角質バリア構造の可視化. JST