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・治療研究事業））
分担研究報告書

皮膚バリア破綻モデルマウスの作成と解析

研究分担者　久保 亮治　慶應義塾大学医学部皮膚科学　専任講師

研究要旨

皮膚は、最表層を覆う頑丈な角質バリアによって空気環境から人体を守っている。角質バリアの内側には細胞と細胞の隙間をシールするタイトジャンクション（TJ）バリアが存在する。近年、角質バリアの先天的障害が、アトピー性皮膚炎の発症要因となることが明らかとなった。角質バリア不全が外来抗原の経皮侵入の増加を招き、経皮感作が次々と成立することでアトピー性皮膚炎を引き起こすというモデルが考えられている。我々はこれまでに、角質バリア障害そのものはTJバリア機能に影響を及ぼさないが、炎症はTJバリアを障害することを明らかにしている。一方、TJバリアの破綻は角質形成異常を引き起こす。すなわち、一旦皮膚炎が起こると、炎症がTJバリアを障害することで角質形成異常が引き起こされ、結果ますます経皮抗原侵入が加速するという悪循環が起こることが予想される。本研究では、表皮TJバリア破綻がプライマリに生じた時の病態生理を解析することにより、本仮説を検証する。炎症時に障害されたTJバリアをリストアし、バリア破綻・経皮感作・炎症という悪循環を止めることは、アトピー性皮膚炎の増悪を押さえる新たな治療のターゲットとなることが期待される。

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

平野尚茂　慶應義塾大学医学部 皮膚科 共同研究員

A．研究目的

皮膚の表面は重層上皮細胞のシートで覆われており、その最表層は頑丈な角質バリアによって覆われ、空気環境から我々の身体は守られている。角質バリアの内側には細胞と細胞の隙間をシールするタイトジャンクション（TJ）バリアが存在する。近年、角質バリアの先天的障害が、アトピー疾患の発症要因となることが明らかとなった。角質バリアの不全が外来抗原の経皮侵入の増加を招き、経皮感作が亢進することでアトピー疾患が引き起こされる、というモデルが考えられている。一方、TJバリアとアトピー性疾患の関わりについてはまだ不明な点が多く残されている。TJの主要構成蛋白クローディン１の先天性欠損症であるNISCH症候群では、魚鱗癬様の皮膚症状を呈することが報告されている。しかし、NISCH症候群は世界で2家系のみの非常に珍しい疾患であり、その詳細な病態は不明である。また、クローディン１のKOマウスは生後１日で死亡するため、これまでTJバリアの先天的破綻の病態は十分に解析されてこなかった。また、アトピー性皮膚炎患者の皮膚において、角質バリア破綻だけでなくTJバリアの破綻も起こっていることが示唆されている。しかし、TJバリア破綻がアトピー性皮膚炎の病態形成にどのような影響を与えているのか？炎症による二次的な変化なのか、TJバリア破綻が病状の悪化を招くのか？それはどのようなメカニズムに基づくのか？未解明である。我々は、TJバリア破綻の病態を解明するために、クローディン１のコンディショナルKOマウスを樹立し、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローディン１をKOする系を構築した。本マウスを解析することにより、純粋にTJバリア破綻を出発点とした時に皮膚に何が起こる

かを解析し、アトピー性皮膚炎の病態形成におけるTJバリア破綻の生理的意義を明らかにすることを目的とする。

B．研究方法

マウスクローディン１遺伝子の転写開始点を含むexon1をloxPにより挟む形でコンディショナルKOベクターを構築し、ES細胞でターゲッティングを行うことで、クローディン１ floxマウスを得る。

K5-creマウス、またはK14-creERTマウスと交配することにより、表皮特異的にクローディン１をKOしたマウス（K5-cre, claudin-1 flox/flox）、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローディン１をKOできるマウス（K14-creERT, claudin-1 flox/flox）を得る。

C．研究結果

表皮特異的にクローディン１をKOしたマウスは、全身でKOしたマウスと同様に、生後急速に体重減少を来たし、生後１日以内に死亡した。クローディン１は表皮と胆管に発現しており、NISCH症候群では魚鱗癬と硬化性胆管炎を来す。この結果は、クローディン1KOマウスの死因が肝臓でのクローディン１欠損によるものではなく、皮膚でのクローディン１欠損によるものであることを示している。現在、成体マウスにおいてタモキシフェン誘導性にクローディン１欠損を誘導し、その表現型の解析を進めている。

D．考察

皮膚表皮のTJバリアが、マウス個体の生存に必須であることが示された。なぜ同じクローディン１の欠損症のヒトは生き残りマウスは死ぬのかは不明であるが、成体マウスでクローディン１欠損を誘導してもマウスが死なないことから、新生児マウスは体重が少ないために皮膚表面からの水分蒸散の亢進に耐えられない可能性が考えられた。

E．結論

今回作成した、タモキシフェン誘導性に表皮特異的にクローディン１をKOできるマウスは、表皮TJバリア破綻を出発点とする皮膚病態の解析において有用なモデルと考えられ、今後更なる解析を進める。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表（平成25年度）

＜論文発表＞ (*corresponding author)

1. 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**. 71 (2), 89-99, 2013.
2. *Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosak iR, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M: Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause nagashima-type palmoplantar keratosis. **Am J Hum Genet** 93 (5), 945-956, 2013.
3. Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in matted mice. **J Allergy Clin Immunol**. 132 (5), 1111-1120, 2013.
4. *Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M. The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties. **Sci Rep** 3:1731, 2013.

＜学会発表＞

1. Kubo A, Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki

H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M: The stratum corneum comprises three layers with distinct barrier properties to metal ions. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.

2. Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M: A homozygous nonsense mutation of gene for *Mattrin*, a component of lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in mice. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
3. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: Filaggrin-null mice exhibit impaired stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses. **ASPCR-ASDR 2013**, Sydney, Australia, 2013. 5. 17- 19.
4. Kubo A: Molecular Barriology of the Stratum Corneum and Epidermal Tight Junctions. **Molecular Mechanisms Regulating Skin Homeostasis 2013**, Koln, Germany, 2013. 9. 23- 25.
5. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS imaging unveiled the stratum corneum of the skin consisting of three layers with distinct properties. **19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry**, Jeju, Korea, 2013. 9. 29- 10. 4.
6. Ishizaki I, Hammond J, Kubo A, Kawasaki H, Nagao K, Ohashi Y, Amagai M, Kubo A: TOF-SIMS analysis of the barrier properties of the three layers of the stratum corneum to metal ions. **15th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis**, Italy, 2013. 10. 13- 18.
7. Kubo A: The three musketeers of the epidermal barrier. **4th Pan Asian Pacific Skin Barrier Research Annual Symposium**, Seoul, Korea, 2013. 10. 15.
8. Kawasaki H, Kubo A, Hirano T, Amagai M: Exacerbation of the skin barrier function of filaggrin-null mice in dry environment. **42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Chiba, Japan, 2013. 12. 11- 13.
9. Sasaki T, Shionama A, Kawasaki H, Kubo A, Yamada T, Okano H, Amagai M: A homozygous nonsense mutation in Matted, a novel skin barrier gene associated with lamellar granule secretory system, causes spontaneous dermatitis in mice. **42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Chiba, Japan, 2013. 12. 11- 13.
10. 横内麻里子, 川崎洋, 久保亮治, 天谷雅行. バリア障害モデルマウスにおけるタイトジャンクションバリア機能についての検討. **第19回分子皮膚フォーラム**, 東京, 2013.4.12.
11. 久保亮治. 皮膚タイトジャンクションバリアから見た皮膚疾患の病態と病理. **第102回日本病理学会総会**, 札幌, 2013.6.7.
12. 久保亮治. バリア異常からみたアトピー性皮膚炎の病態と治療. **第112回日本皮膚科学会総会**, 横浜, 2013.6.15.
13. 久保亮治. 角質層バリアと皮膚免疫. **第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会**, 甲府, 2013.8.9.
14. 久保亮治. アトピー性皮膚炎と皮膚バリア. **第77回日本皮膚科学会東京支部**, 東京, 2014.2.15.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

＜特許取得＞
《国内特許》
出願番号:特許出願 2012-4752
出願日:2012 年 3 月 5 日
公開番号:特許公開 2013-179920
公開日:2013 年 9 月 12 日
出願人:学校法人慶應義塾

発明者:天谷雅行、佐々木貴史、塩濱愛子、
工藤純、久保亮治
発明の名称:自然発症皮膚炎の新規原因
因子及び皮膚疾患モデル動物

《国際特許》
国際出願番号:PCT/JP2009/002161
国際出願日:2009 年 5 月 15 日
国際公開番号:WO2009/139191
国際公開日:2009 年 11 月 19 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