

Venerool, 95 (3), 345-346, 2015.

<学会発表>

1. Katoh N: Similarities and differences between American and Japanese guidelines for the management of atopic dermatitis. **73rd Annual Meeting of The American Academy of Dermatology**, San Francisco, USA, 2015. 3. 20- 24.
2. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の最近の話題. 第30回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 横浜, 2014. 4. 26- 27.
3. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の治療の目標とゴール. 第113回日本皮膚科学会総会, 京都市, 2014. 5. 30- 6. 1.
4. 加藤則人: 慢性皮膚疾患の治療のアドヒアランス向上を目指して. 第113回日本皮膚科学会総会, 京都市, 2014. 5. 30- 6. 1.
5. 加藤則人: アトピー性皮膚炎とスキンケア. 第32回日本美容皮膚科学会総会・学術大会, 浦安市, 2014. 7. 12- 13.
6. 加藤則人: 小児アトピー性皮膚炎の治療ー親とこどもの心を動かすには. 第78回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 青森, 2014. 10. 4- 5.
7. 加藤則人: 小児アトピー性皮膚炎のアドヒアランスを高めるコミュニケーション. 第51回日本小児アレルギー学会, 四日市市, 2014. 11. 8- 9.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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 (難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

微量検体による抗原量と抗原特異抗体の高感度定量法の開発、
予防に向けた抗原 affinity maturation の抑制

研究分担者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授

研究要旨

体内へ侵入する抗原による繰返しの感作によって、抗原特異的抗体の一連のクラススイッチと、各抗体種で Low から High Affinity へと成熟変換すると予想される。アレルギー、アトピーの発症には、High Affinity IgE が関与すると推定されるが、病態を正確に把握するためにはどの時期に、どのような経路で抗原が体内に侵入するかについての検証と、体内に侵入した抗原量の定量、どのような Affinity を持つ抗体種が体内に存在しているかを明らかにすることが必要である。現状の測定法では、遊離抗原と抗原-抗体複合体の抗原量を未だ正確に測定することはできない。本プロジェクトでは、Low から High Affinity IgE 変換時期の追跡調査と、母乳と血液中の抗原量測定法の開発を試みた。その結果、臍帯血で発見された Low Affinity IgE が乳幼児期でも見いだされる事、経口減感作療法では Low Affinity IgE は急速に減少して High Affinity に変換するが、IgE 量は減少することが見いだされた。さらに母乳中の抗原量測定では、抗原-抗体複合体から抗原を遊離させ、すでに遊離状態で存在している抗原と共に、ほぼ正確に抗原量を測定する方法として抗体アレイが有用と判定された。

研究協力者

亀村 典夫 徳島大疾患酵素学研究
センター 特任助教
杉本 眞弓 徳島大学病院小児科
特任助教

とから、これらの因子を総合的に解析して病態を理解することが必要である。本研究では、抗原特異的 IgE を含む様々な抗体群と抗原を高感度に定量測定して、その生理的、病態医学的解析を試みることを研究の目標としている。

A. 研究目的

従来のアレルギー、アトピーに対する血液検査は、血液中の抗原特異的 IgE 検査への依存度が高く、アレルギーの病状、進展状況、アレルギーの治療、さらにはアレルギーの予防を考察する上で必ずしも十分とは言えない。従来の IgE 測定法を取ってみても、測定感度が低くそのため高感度化の試みが近年なされている。またアレルギー、アトピーの発症の基盤には、図 1 に示すように、IgE 以外の生体分子として体内の抗原特異的 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA、さらには抗原分子が関与しているこ

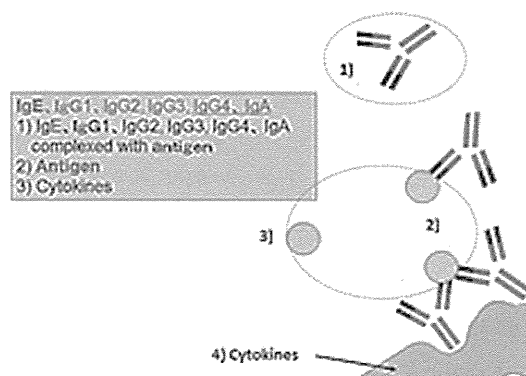


図 1. アレルギー発症に関与する因子群

最近我々は、高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイ (Densely carboxylated protein chip: DCP chip) の作成に成功し、抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, SIgA の高感度定量法を確立した。この方法を使用することで、これまで検出することのできなかつた臍帯血中の抗原特異的 IgE の検出、抗原との Affinity 解析が可能となった。食物アレルギーと IgE の Affinity Maturation との関係解析の結果、最初に低親和性抗体ができ、その後繰り返される抗原刺激で Affinity Maturation が起きて、高親和性 IgE に成熟して発症に至ることが明らかになった。

本年度の研究では、繰り返しの抗原刺激を、母乳中の抗原と経皮膚に想定して、母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する技術開発を実施した。さらに、卵アレルギーの小児を対象とした経口減感作療法時の抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA の変動と、抗原 Affinity の変化を追跡した。

B. 研究方法

ガラス基板 DCP チップを用いて、抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 測定と、抗アレルゲン抗体を固定化した抗体アレイで、血液、母乳中のアレルゲンの高感度定量法の開発を試みた。また、アレルゲン DCP チップを用いて、低親和性 IgE と高親和性 IgE 抗体の定量法を検討した。

C. 研究結果

本年度は、①母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する技術開発として、ガラス基板 DCP チップ上に抗原特異的 IgG 抗体を固定化したマイクロチップの開発と、②アレルギーの予防と治療のための診断法の開発として、アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術開発をめざした。

1) 母乳、血液、皮膚、環境中の抗原量測定の技術開発

微量の生体材料中の抗原でも定量可能な技術として、図 2 に示すようなガラス基板 DCP チップに抗原特異的 IgG 抗体を固定

化したマイクロチップの開発を実施した。抗原には食品に含まれる抗原として最もアレルギー発症の頻度の高い卵、乳、小麦、えび、かに、落花生から、Ovomucoid (OVM), Ovalbumin (OVA)、Casein, β -Lactoglobulin、Gluten, Gliadin、えび、かに Tropomyosin、落花生の Ara h1, Ara h2、そば抗原、の各抗原をウサギに免疫し、得られた血清から各抗原特異的抗体を抗原アフィニティーで精製した。精製抗体を 1mg/mL の濃度まで濃縮して、抗体アレイに共有結合で固相化した。図 3 に示すように、それぞれの抗体は 0.5 ng/mL から 50-80 ng/mL の定量感度を得た。現在、この抗体アレイを用いて、母乳、血液、口周囲の皮膚からのぬぐい液に含まれる各種抗原の定量を試みている。母乳中の OVA 抗原の測定については、遊離型抗原以外に SIgA 結合型抗原の存在が知られているが、SIgA からの抗原の遊離にはほぼ成功しており、定量的測定の方向性が明らかになった。しかし、血液中の IgG 結合型抗原については、部分的な抗原しか回収に成功しておらず今後さらなる検討が必要である。

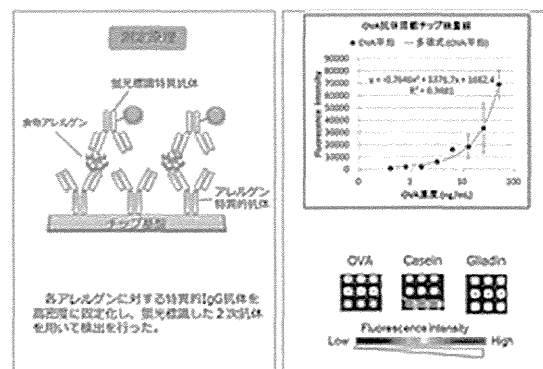


図 2. 抗体固定化 DCP チップでのアレルゲン検出

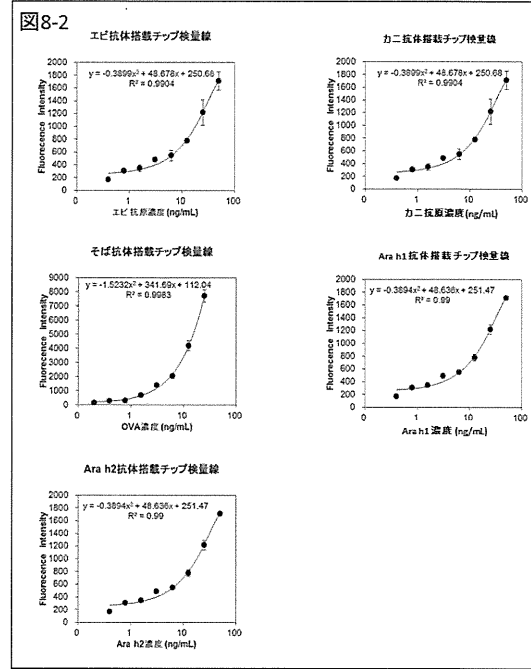
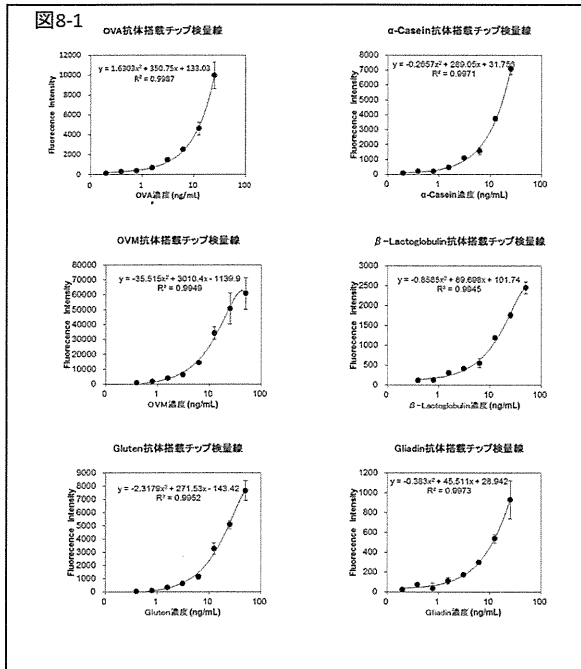


図 3. 各種抗原特異的 IgG を搭載したアレイでの抗原量の定量

2) アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術の開発

図 4 に示すようにアレルゲン感作によって、体内の免疫系は刺激され、IgM から直接 Low affinity IgE が産生される系と、IgM-IgG3-IgG1 から High affinity IgE が産生される系、さらにアレルギーを抑制する IgG1-IgG2-IgG4 の産生系に分けることができる。体内の免疫系が、上記のいずれの状態にあり、いずれの方向に向かっているかを判定することは、アレルギーの予防と治療を考える上で重要である。図 5 には、アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点から調査した結果を示す。アレルギー患者を入院下に、卵の接種量を少量から徐々に増加させることで、減感作前(T0)に比べて約 1 月後には 1 個のゆで卵を食べるように治療してから(T1)、3 ヶ月(T2)、6 ヶ月(T3)、12 ヶ月(T4)の間、卵 1 個を維持量として継続投与した結果である。この間抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA をモニターした。

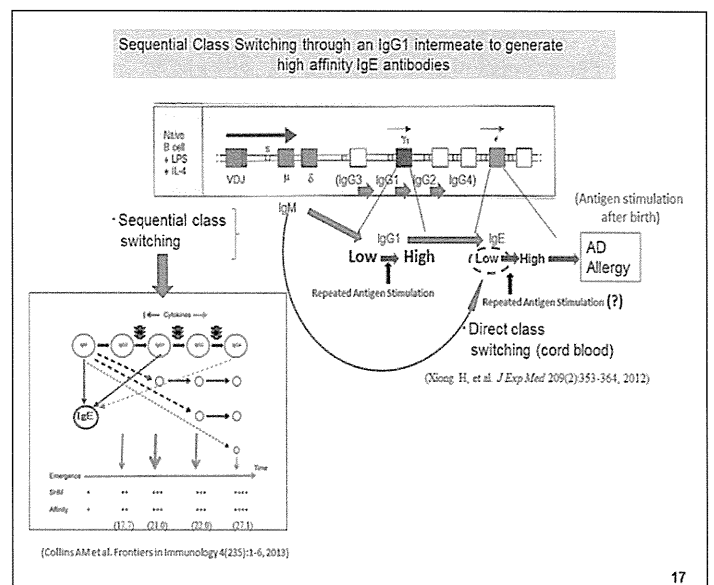


図 4. クラススイッチと Low affinity IgE, High affinity IgE の産生機序

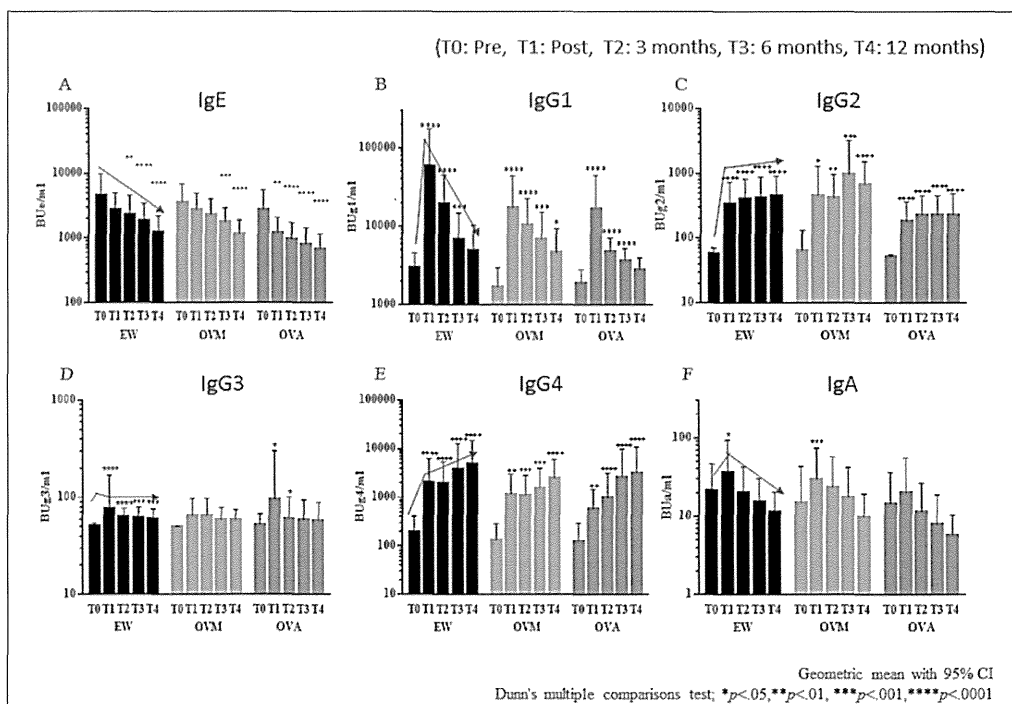


図5. 卵減感作療法の経過に伴う抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA のモニター

その結果、近接する遺伝子座にある起炎性の IgG3-IgG1 抗体は T1 期以降低下傾向を、抗アレルギー性を示す IgG2-IgG4 抗体は T1 期以降増加傾向を示した。IgA は T1 期で軽度の増加後低下傾向を示し、IgE は T0 以後低下傾向を示した。患者群の中でも維持期にゆで卵 1 個を維持できた目標達成患者群（減感作成功群）と、アレルギー症状が増悪したため卵 1 個を維持できずに減量するか完全除去に至った群（減感作不成功群）との比較を図 6 に示す。減感作成功群と不成功群の明確な違いが明らかになった。減感作成功群では、免疫応答性が良く、経口抗原接種によりクラススイッチが IgG3-IgG1-IgG2-IgG4 へと進んだ群で、減感作不成功群では免疫応答性が不十分で、クラススイッチが進んでいないことが判る。特に急速減感作終了後の約 1 月 (T1) 後に、IgG1 の増加が著しいことが、減感作の予後判定に重要であることが示唆された。

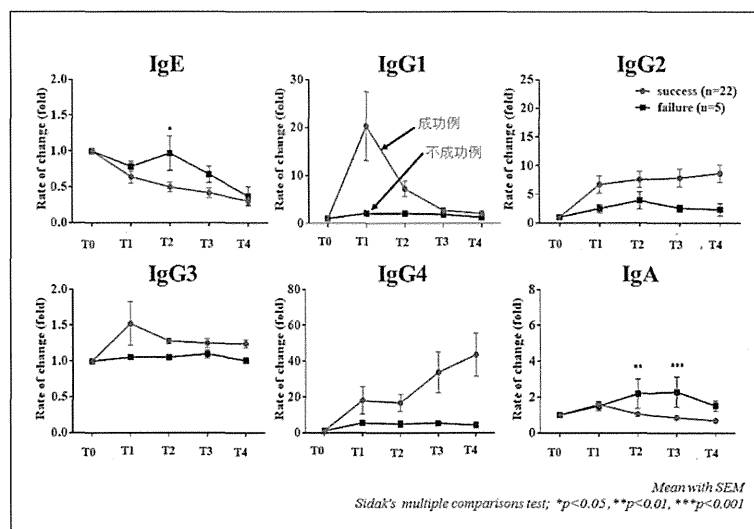


図6. 卵減感作療法の経過に伴う減感作成功群と不成功群の各種抗体価の推移
減感作前(T0)の抗体価を1として表示している。

これらの卵の経口減感作療法を実施した患者の Low affinity IgE の存在比を図 7 に示す。Low affinity IgE は、40 mM の diethylamine (DEA) 存在下に抗原との結合活性を著しく減弱させることから、40 mM DEA のあり無しで Low affinity IgE 量をモニターした。その結果、減感作療法の治療前では DEA 感受性の Low affinity IgE が検出されるが、経口減感作療法開始と共に Low affinity IgE の存在比が少なくなっていることが観察され、これに伴って IgE 量の低下が見られ、減感作は IgE の量と質の変化を誘導することが明らかになった。

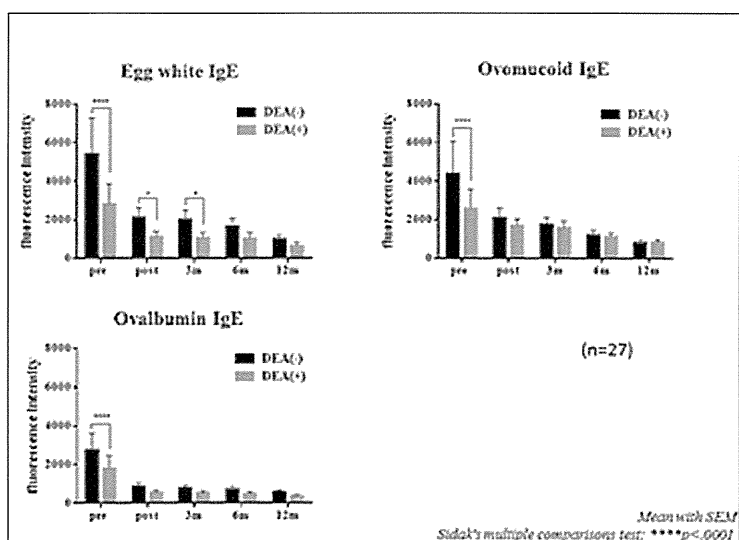


図 7. 卵減感作療法の経過に伴う DEA 感受性 Low affinity IgE 存在率の減少経過

D. 考察

本研究によって、母乳、血液、皮膚、環境中の抗原を高感度に測定する基盤技術として、抗原特異的抗体をマイクロアレイに固相化したチップが開発された。この方法は、微量の生体材料を用いた抗原量の測定に特に有用である。この抗体アレイを用いた抗原量の測定が始まったところであるが、母乳と血液中の抗原量の測定では、大部分の抗原が抗原-抗体複合体として存在していることから、複合体から抗原を解離させる方法の開発が求められている。母乳では抗原親和性の低い SIgA 抗体が多

いため、酸性条件下に抗原の解離が比較的容易で、抗原定量のめどが立ってきた。しかし、抗原との親和性が高い血液の IgG 抗体の場合、酸性条件下でも抗原解離が不十分である。文献上でも効率の高い抗原の解離方法は報告されていない。これについては、今後新たな方法に取り組んで行く。

アレルギー状態をモニターする抗体クラススイッチの観点と、抗原 Affinity の観点から解析する技術では、DCP チップを用いることで、微量の生体材料から抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA をモニターすることが可能となった。これまでのアレルギーの研究では、免疫応答性をクラススイッチの観点からモニターした例はほとんどない。今年度の研究で、経口減感作療法での免疫応答性をクラススイッチの観点からモニターして、予後の判定に有用であることを明らかにした。今後、臍帯血と生後 1 年までの乳児期の血液を用いて、Low affinity から High affinity IgE への変換と、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 のクラススイッチを詳細に追跡することで、アレルギー発症のメカニズムと、アレルギー予防法が明らかになると期待している。

E. 結論

体内に侵入した抗原量を高感度に定量する方法として、DCP チップに抗原特異的抗体を搭載したマイクロチップが開発された。このデバイスは、微量の生体材料を検体とする測定にその威力を発揮する。一方体内侵入抗原による繰返しの感作で、一連のクラススイッチと、Low から High Affinity IgE への質的变化が起きて、その過程でアレルギーが発症すると予想されるが、この過程をモニターする DCP チップ法と、その解析の有用性が初めて示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 26 年度)

<論文発表>

1. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H,

Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830, 2014.

<学会発表>

1. 品原和加子, 亀村典生, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 抗体固定化チップによる食品中および生体成分中のアレルギー性食物抗原の測定検討. 第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9-13.
2. 木戸博, 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸: 臍帯血の抗原特異的低親和性IgE検出と, 生後6, 14ヶ月の高親和性IgEへの変化. 第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9-13.
3. 杉本眞弓, 亀村典生, 鈴木宏一, 窪田賢司, 長尾みづほ, 藤沢隆夫, 木戸博: 高感度定量測定法による, 急速経口免疫療法における抗原特異的免疫グロブリンの検討. 第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会, 京都, 2014. 5. 9-13.
4. 木戸博: 高性能タンパクチップの臨床応用: 減感作療法やアレルギー・アトピーの発症予防への応用. 第19回日本ラテックスアレルギー研究会, 東京, 2014. 7. 27.
5. Ohya Y, Horimukai K, Morita K, Niizeki H, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Saito H: A randomized, controlled intervention trial of early emollient use in prevention of atopic dermatitis and allergic sensitization during infancy. **30th Symposium of the Collegium Internationale allergologicum**, Petersberg, Germany, 2014. 9. 13-18.
6. 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸, 木戸博: 臍帯血中の抗原特異的Low Affinity IgEの検出と生後High Affinity IgE への変化. 第87回日本生化学会大会 京都, 2014. 10. 15-18.
7. 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 下条直樹, 深尾敏幸, 木戸博: 新規蛋白質チップによる臍帯血特異的 IgE の検出と, 離乳完了期までに見られる IgE 抗体の低親和性から高親和性への変化. 第51回日本小児アレルギー学会, 四日市市, 2014. 11. 8-9.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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 (難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

アトピー由来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 教授

研究要旨

私どもは、アトピー性皮膚炎 (AD) 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、これまでに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の比較解析から、AD 由来株は FLG-KO 新生児マウス皮膚に持続的に定着することを明らかにしてきた。CGH 系統解析から抽出した臨床分離株のゲノムドラフトシーケンスを取得し、比較解析を行った結果、AD 株に特徴的な遺伝子を抽出した。その中で特徴的な病原因子候補として、エンテロトキシンと相同性が高い遺伝子に着目し、組換え体をヘアレス FK0 成獣マウスに腹腔内投与したところ、全身の血管拡張および体毛の脱毛が観察された。黄色ブドウ球菌臨床分離株の遺伝子改変はしばしば困難が伴う。当該の AD 由来株の病原因子候補遺伝子の解析や皮膚への菌の固着性を詳細に解析する為に、遺伝子改変実験が必須だが、AD 由来株は従来法の遺伝子改変が不可能であった。今回、私どもは新たなゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを導入し、本菌で利用可能な遺伝子改変用プラスミドの作成を試みた。

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
佐藤 祐介 広島大学大学院
医歯薬保健学研究科 研究員
新津 佳恵 広島大学大学院
医歯薬保健学研究科 大学院生

球菌感染の役割を明らかにすることである。これまでに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の比較解析から、AD 由来株は FLG-KO 新生児マウス皮膚に持続的に定着することを明らかにしてきた。並行して、様々な疾患から由来株の比較ゲノム解析から、AD 株に特徴的な病原因子の候補となりうる遺伝子を解析している。AD 株の病原因子候補遺伝子や、ヘアレス FK0 マウス皮膚への菌定着性に寄与する責任因子を解析する為に、遺伝子欠損株の作製は必要不可欠である。しかしながら、臨床分離された AD 由来株は常法の相同組換えに用いるプラスミドが使用不可であった。そこで私どもは新たなゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを導入し、黄色ブドウ球菌で利用可能なプラスミドを作製した。

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

B. 研究方法

比較ゲノム解析による AD 株のゲノム特徴
日本全国から収集した種々の疾患由来

臨床分離株ライブラリ株のアレイによる CGH 系統解析から、各クラスター選抜株をイルミナシステムによりゲノム配列を取得し、インシリコバイオロジー社の IMC ソフトにて比較解析を行った。

S. aureus 用 CRISPR/Cas9 plasmid の作製

大腸菌-黄色ブドウ球菌シャトルベクター pKAT の MCS に、Addgene 社の pCas9 の Cas9 遺伝子、tracrRNA 及び guideRNA 挿入領域を組み込んで作製した。黄色ブドウ球菌の遺伝子改変するターゲット遺伝子として、バイオフィーム形成に関わる *ica* オペロン内の *icaA* に対して guideRNA 配列を設計し、最終的にシーケンスにより変異を確認した。

C. 研究結果

これまでに様々な疾患由来株の CGH 系統解析から、疾患別ごとのそれぞれのクラスターから選抜 43 株のドラフトゲノム配列と、このうち AD 株を含む 6 株の完全ゲノム配列を取得し、比較ゲノム解析に用いた。解析の結果、AD 株に特徴的な病原因子候補の一つに、エンテロトキシンと相同性が高い遺伝子が見つかった。この遺伝子の機能を調べる為に、大腸菌にて組換え体を作製した。ヘアレス FK0 成獣マウスに腹腔内投与したところ、全身の血管拡張および体毛の脱毛が観察された。今後、この遺伝子産物の AD 病態形成への関わりを検討する必要がある、そのためには遺伝子改変が必要となる。従来、臨床分離株はしばしば遺伝子改変が困難であることが知られ、AD 由来株も従来法による遺伝子改変が不可能であることがわかった。

そこで、新たな遺伝子改変法の確立を目指して、作製した黄色ブドウ球菌用 CRISPR/Cas9 プラスミドを検証した結果、黄色ブドウ球菌では非相同性末端修復系を欠く為に、修復による変異導入効率が極端に低いことが判明した。並行して、mRNA をターゲットに発現を抑制する CRISPRi 用プラスミドを作製し、検証したところ、効率良く目的タンパクの発現をオフにすることがわかった。続いて、AD 由来株でゲノム編集が可能であるのかを確認する実験を行った。バイオフィーム形成は、菌の

消毒剤や抗菌薬への抵抗性増強や、菌の付着・定着性に関わるよく知られた構造体である。本菌のバイオフィームは、成分の一つに多糖類であるポリサッカライド PIA があり、合成に関わる *ica* オペロンが染色体上にコードされている。AD 株のヘアレス FK0 の皮膚定着にバイオフィーム形成の *ica* 遺伝子が機能しているのかを解析する為に、ターゲット遺伝子として遺伝子改変を試みた。そこで、*icaA* 遺伝子内の 3 箇所に guide RNA が結合する候補箇所を選択し、変異導入の確認をシーケンスにて確認したところ、変異導入効率は極めて低いながらも、AD 由来株 TF3378 で *ica* 変異株が作製できた。今後の予定として、ヘアレス FK0 マウスを用いて皮膚感染実験にて、菌の定着性の解析を行う予定である。

D. 考察

ヘアレス FK0 マウスの血管拡張や脱毛反応が観察されたエンテロトキシン様因子について、一般的に黄色ブドウ球菌の多くのエンテロトキシンはスーパー抗原活性により、種々のサイトカイン遊離を惹起する。この新規エンテロトキシン様因子も免疫応答の惹起による生体反応を引き起こしていることが考えられた。

一方、AD 由来株で CRISPR/Cas9 及び CRISPRi による欠損株の作製が可能であることが確認できた。変異導入効率を向上させるために、プラスミドの大きさのコンパクト化、遺伝子導入に用いる機材（エレクトロポレーション）の特性、コンピテントセルの調製方法によって大きく影響することがわかってきた。

E. 結論

AD 由来株の遺伝子改変が可能となり、皮膚定着性解析の菌側因子の詳細な解析が可能となった。また、AD 株の新規エンテロトキシンの生物活性について、今後より詳細な解析が必要である。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 26 年度)

<論文発表>

1. Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T: Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**, 9 (5), e98285, 2014.
2. Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, Yamagishi N, Hu DL: Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. **J Clin Microbiol**, 52 (7), 2637-2640, 2014.
3. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830. e826, 2014.
4. Hagiya H, Hisatsune J, Kojima T, Shiota S, Naito H, Hagioka S, Morimoto N, Otsuka F, Sugai M: Comprehensive analysis of systemically disseminated ST8/non-USA300 type community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Intern Med**, 53 (8), 907-912, 2014.
5. Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai M: Tripoli metallo-beta-lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. with decreased resistance to imipenem in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 58 (4), 2477-2478, 2014.
6. Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, Kuwahara R, Kakuhamata T, Kimura K, Hisatsune J, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M: Imipenem-Susceptible, Meropenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Producing OXA-181 in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 59 (2), 1379-1380, 2015.
7. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, Jove T, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Ueshimo T, Miura T, Sueda T, Onodera M, Yokozaki M, Hattori M, Ohge H, Sugai M: Complete Nucleotide

Sequence of the IncN Plasmid Encoding IMP-6 and CTX-M-2 from Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 59 (2), 1356-1359, 2015.

<学会発表>

1. Hisatsune J, Murakami T, Tatsukawa N, Hayashi I, Sugai M: Skip, a cell wall protein of *S. aureus* for biphasic skin adhesion strategies. **16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI)**, Chicago, USA, 2014. 8. 26- 29.
2. Tatsukawa N, Hisatsune J, Hayashi I, Sugai M: Regulatory mechanism of cell wall protein Skip in *S. aureus*. **16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI)**, Chicago, USA, 2014. 8. 26- 29.
3. 久恒順三, 平川英樹, 伊從慶太, 西藤公司, 大島健志朗, 服部正平, 菅井基行: 犬膿皮症由来*S. pseudintermedius*表皮剥脱毒素 ExpB産生株のゲノム解析. 第59回日本ブドウ球菌研究会, 東京, 2014. 8. 4.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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 (難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

皮膚炎を自然発症する *Tmem79* 欠損マウスの樹立と皮膚炎発症機構の解明

研究分担者 海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科学 准教授
佐々木 貴史 慶應義塾大学医学部コーサースキンケア・アレルギー
予防医学寄附講座 特任講師

研究要旨

皮膚炎を自然発症する突然変異マウス Flaky tail の原因変異は *Tmem79* ナンセンス変異であったことから、我々は *Tmem79* 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。その結果、Flaky tail マウス同様に SPF 環境下でも皮膚炎を発症したことから、単一遺伝子欠損で皮膚炎を発症する皮膚炎モデルマウスを樹立できた。*Tmem79* 欠損マウスの皮疹部解析の結果、アトピー性皮膚炎患者にも見られる黄色ブドウ球菌の異常繁殖が見られることが明らかになった。今後は *Tmem79* 欠損マウスの皮膚炎及び黄色ブドウ球菌繁殖を解明、及び、アトピー性皮膚炎との比較により、アトピー性皮膚炎の皮膚炎発症機構解明の一端となることが期待される。

研究協力者

久保 亮治 慶應大医学部皮膚科学
専任講師
塩濱 愛子 慶應大医学部 MSD アレルギー
研究寄附講座 特任助教
安田 文世 慶應大医学部皮膚科学
大学院生

なること、*Tmem79* が存在する染色体領域には表皮分化に関与する遺伝子がクラスターする Epidermal differentiation complex (EDC) に隣接しており、*Flg* 変異と同様に皮膚症状に関与する変異が連鎖している可能性が排除できないことから、*Tmem79* を完全欠損した *Tmem79* 欠損マウスを作出し、詳細な皮膚炎発症機構の解明を試みた。

A. 研究目的

近年アトピー性皮膚炎 (AD) 患者からフラグリン (*FLG*) 遺伝子の機能喪失変異が疾病素因である事が疫学的に明らかにされ、皮膚バリア機能障害が、アトピー性皮膚炎の発症原因の一つとなる事が明らかになった。Flaky tail マウスは、*Flg* 5303delA (*Flg^{fl}*) 変異と *matted (ma)* 変異を有し血中 IgE 値上昇を伴う皮膚炎を自然発症することから、AD モデルマウスとして注目されている。我々は Flaky tail マウスの自然発症皮膚炎の原因変異は *Tmem79* のナンセンス変異である事を明らかにした。Flaky tail マウスは突然変異マウスであり遺伝背景が通常使われているマウスと異

B. 研究方法

Tmem79 の exon2[~]4 を欠損した C57BL/6N 由来 ES 細胞を受精卵に注入をし、キメラマウスを作成した。キメラマウスと野生型マウスを交配し、*Tmem79* 欠損をヘテロに有するマウスを得た。*Tmem79* ヘテロ欠損マウス同士を交配し、最終的に *Tmem79* 欠損マウスを作出した。

作出した *Tmem79* 欠損マウスは、*matted* マウスとの差を明らかにするために、皮膚炎スコア、搔爬回数などを比較した。皮疹部における黄色ブドウ球菌の繁殖を解析するために、皮疹部 1cm² を滅菌 PBS につけた綿棒を用いて 10 回こすり取るスワブ法

により表皮細菌を回収し、黄色ブドウ球菌の選択培地であるマンニット培地で培養を行った。

C. 研究結果

キメラマウスのスクリーニングと交配の結果、*Tmem79* 欠損マウスを樹立した。mRNA 解析及び抗 *Tmem79* 抗体を用いた発現解析により、*Tmem79* は完全欠損していることを確認した。*Tmem79* 欠損マウスと matted マウスを比較した結果、皮膚炎の発症時期、発症部位など、多くの点で類似した皮膚炎を発症していることから、*Tmem79* 欠損と *Tmem79* Y280*ナンセンス変異はほぼ同様の皮膚炎を生じることが明らかになった。

皮疹部における黄色ブドウ球菌繁殖の解析を行うために、4, 8, 32 週齢 *Tmem79* 欠損マウスからスワブ法により細菌を採取した結果、皮疹が強く見られる 32 週齢の前胸部、頬部から黄色ブドウ球菌が検出された。

D. 考察

Tmem79 欠損マウスと *Tmem79* Y280*ナンセンス変異を有する matted マウスは、ほぼ類似した皮膚炎症状を示した。*Tmem79* は *Flg* を含むマウス 3 番染色体 EDC に隣接するため、EDC 内に別の変異が存在した場合、同様に分離できず、他の遺伝子変異の影響による皮膚症状を区別できない可能性がある。また、Flaky tail は CBA と C57BL/6 との混合遺伝背景を有しており、交配によっては研究室ごとに遺伝背景の異なるマウスになる可能性がある。さらに、matted マウスでは *Tmem79* ナンセンス変異よりも前が部分タンパク質として発現していることが明らかになっていることから、解析ではこの部分タンパク質の影響を考慮に入れなければならなかった。今回、我々が作出した *Tmem79* 欠損マウスは、均一な遺伝背景を有する *Tmem79* 完全欠損マウスであることを確認できたことから、今後はこのマウスを用いて解析を行う予定である。

また、今回の解析で *Tmem79* 欠損マウスは時期及び部位特異的に皮疹部に黄色ブドウ球菌が検出されることが明らかになった。アトピー性皮膚炎の皮疹部では黄色

ブドウ球菌が高頻度に検出されることが明らかになっているが、これが結果なのか原因なのかは明らかになっていない。今後は、*Tmem79* 欠損マウスの解析によって、皮疹部での黄色ブドウ球菌増殖機構が解明されることが期待される。

E. 結論

Tmem79 を欠損する C57BL/6N の遺伝背景を有するマウスを樹立した。*Tmem79* 欠損マウスはアトピー性皮膚炎患者と類似した、時期・部位特異的に皮疹部に黄色ブドウ球菌が検出されることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 26 年度）

<論文発表>

1. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830. e826, 2014.
2. Sasaki T, Furusyo N, Shiohama A, Takeuchi S, Nakahara T, Uchi H, Hirota T, Tamari M, Shimizu N, Ebihara T, Amagai M, Furue M, Hayashi J, Kudoh J: Filaggrin loss-of-function mutations are not a predisposing factor for atopic dermatitis in an Ishigaki Island under subtropical climate. **J Dermatol Sci**, 76 (1), 10-15, 2014.
3. Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 856-864, 2014.
4. Tamari M, Saeki H, Hayashi M, Umezawa Y, Ito T, Fukuchi O, Nobeyama Y, Yanaba K, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Tada Y, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Fujieda S, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Hirota T: An association study of 36 psoriasis susceptibility loci for psoriasis vulgaris and

atopic dermatitis in a Japanese population. **J Dermatol Sci**, 76 (2), 149-160, 2014.

5. 佐々木貴史, 天谷雅行: フィラグリン (filaggrin) . 分子消化器病, 11 (2), 88-93, 2014.
6. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 天谷雅行: 皮膚バリア異常を示す自然発症皮膚炎マウスモデル. 日本臨床免疫学会会誌, 37 (3 (第41回総会ポスター賞受賞記念論文掲載号)), 160-165, 2014.

<学会発表>

1. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Tmem79の同定. 第21回分子皮膚科学フォーラム, 京都, 2014. 4. 11- 12.
2. 佐々木貴史, 古庄憲浩, 塩濱愛子, 竹内聡, 中原剛士, 内博史, 広田朝光, 玉利真由美, 清水信義, 海老原全, 天谷雅行, 古江増隆, 工藤純: 石垣島小児コホート(KIDS)でのFLG機能喪失変異解析及び次世代シーケンサを用いた新規FLG全配列解読法の確立. 第35回日本炎症再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1- 4.
3. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Tmem79ノックアウトマウスの確立. 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1- 4.
4. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 自然発症皮膚炎を起こすTmem79 KO マウスは層板顆粒の分泌異常を示す. 第42回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2014. 9. 25- 27.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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(難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

アトピー性皮膚炎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

皮膚表皮には、角質層バリアと顆粒層のタイトジャンクション (TJ) バリアの2つの物理的バリアが存在する。これら2つのバリアの内側では、表皮内のランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞などが、侵入してきた外来抗原を捕らえるべく待機している。近年、先天的な角質層バリア障害により経皮感作が促進され、アトピー性疾患の原因となることが明らかとなってきた。一方 TJ バリアと皮膚炎との関係については、不明な点が数多く残されている。本研究では、皮膚炎をプライマリに起こした時の皮膚バリア変化、フィラグリン欠損による角層バリア障害をプライマリに起こした時の TJ バリア変化の解析を行った。結果、フィラグリン欠損のみでは TJ バリア障害は誘導されなかったが、ハプテン塗布皮膚炎モデルを作成したところ TJ バリア障害が誘導された。興味深いことに、この TJ バリア障害は分子量依存性で、低分子は TJ バリアを通過するようになったが、分子量 30kD 以上の蛋白分子に対する TJ バリア機能は保たれていた。TJ バリア破綻は角層形成異常・角層バリア異常を招くことが既に分かっていることから、皮膚炎による TJ バリア破綻が角層バリア異常を誘導し、アトピー性皮膚炎における悪循環を招いていることが予想された。

研究協力者

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部
コーサースキンケア・アレルギー
一予防医学寄附講座 特任講師
平野 尚茂 慶應義塾大学医学部
皮膚科学 訪問研究員
厚木 徹 慶應義塾大学医学部
皮膚科 大学院専攻生
吉田 和恵 国立成育医療研究センター
感覚器・形態外科部皮膚科
横内麻里子 練馬総合病院皮膚科 医長

皮膚感作が促進され、アトピー性疾患の原因となることが明らかとなってきた。一方 TJ バリアと皮膚炎との関係については、不明な点が数多く残されている。例えばフィラグリン変異による角層バリア障害により TJ バリア障害は誘発されるのか、皮膚炎症下で TJ バリアの性状はどのように変化するのか、逆に TJ バリア障害をプライマリに起こした時に皮膚にどのような変化が生じるのか、本研究ではこれらの疑問に答えるべく、角質バリア障害と TJ バリア障害、皮膚炎との相互関連性を解析した。

A. 研究目的

皮膚表皮には、角質層バリアと顆粒層のタイトジャンクション (TJ) バリアの2つの物理的バリアが存在する。これら2つのバリアの内側では、表皮内のランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞などが、侵入してきた外来抗原を捕らえるべく待機している。近年、先天的な角質層バリア障害により経

B. 研究方法

角層バリア破綻モデルマウスとしてフィラグリン KO マウスを、皮膚炎モデルマウスとして DNFB の週一回の繰り返し塗布マウスを用いた。表皮 TJ のバリア機能は、マウス耳へのトレーサー皮下注後にトレーサーが表皮細胞間のどのレベルまで浸

透するかによって評価した。トレーサーとして低分子(分子量 556 Da, 1.5 kDa, 5 kD)の蛋白ビオチン化試薬と、分子量約 31 kDa のブドウ球菌毒素 ETA、分子量約 32 kDa の抗デスモグレイン 1 一本鎖抗体 scFv を用いた。

C. 研究結果

フィラグリン欠損のみでは TJ バリア障害は誘導されなかった。一方、ハプテン塗布皮膚炎モデルでは、TJ バリア障害が誘導された。興味深いことに、この TJ バリア障害は分子量依存性で、5 kDa までの低分子トレーサーは TJ バリアを通過するようになったが、分子量 30kD 以上の蛋白分子に対する TJ バリア機能は保たれていた。皮膚炎誘導時の表皮における TJ 関連遺伝子の発現変化を mRNA レベルで解析したところ、TJ を構成する細胞膜貫通型接着分子であるクローディン 1、クローディン 4 などの TJ 関連蛋白の mRNA の発現減少を認めた。また、クローディン 1 のノックアウトマウスにおける表皮 TJ バリア破綻の分子量依存性を検討したところ、皮膚炎モデルマウスと同様の分子量依存性バリア破綻を認めた。

D. 考察

フィラグリン欠損のみでは、TJ バリア破綻は誘導されなかった。この結果は、フィラグリン変異を持つヒトの基本的な表現型が乾燥肌のみで皮膚炎を伴わない尋常性魚鱗癬であることに対応していると考えられた。一方、皮膚炎を人工的に起こすと TJ バリア障害が誘導された。興味深いことにこの TJ バリア障害は、クローディン 1 ノックアウトマウスと同様に、分子量依存性のバリア破綻であった。クローディン 1 ノックアウト表皮では角層の形成異常と角層バリア機能の低下が誘導される。本マウスにおいても角層の形成異常が観察されており、皮膚炎を起点として、TJ バリア破綻とそれに続く角層バリア異常が誘導されることが考えられた。すなわち、一旦皮膚炎が生じると、それが皮膚表皮のバリア異常を引き起こし、より炎症が起こりやすい状態へと遷移することが想像され

る。本メカニズムは、アトピー性皮膚炎における悪循環サイクルの 1 つと考えられた。

E. 結論

皮膚炎とそれに続く TJ バリア破綻・角層形成異常は、アトピー性皮膚炎の悪化を招く悪循環サイクルの 1 つであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (平成 26 年度)

<論文発表>

1. Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, Amagai M: Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 856-864, 2014.
2. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, Amagai M: Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. **J Dermatol Sci**, 77 (1), 28-36, 2015.

<学会発表>

1. Atsugi T, Yokouchi M, Ohyama M, Amagai M, Kubo A: Tight junction barriers are functionally organized in hair follicles and sebaceous glands **73rd Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Albuquerque, New Mexico, USA, 2014. 5. 7-10.
2. Hirano T, Yokouchi M, Atsugi T, Amagai M, Kubo A: Epidermis-specific ablation of claudin-1 in adult mice demonstrates the essential role of a tight junction barrier in skin homeostasis. **The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, 大阪, 2014. 12. 12- 14.
3. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子 Tmem79 の同定. 第 21 回分子皮膚科学フォーラム, 京都, 2014. 4. 11- 12.
4. 久保亮治: 角層の形成機構と先天性角層バリア破綻疾患. 第 113 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2014. 5. 30- 6. 1.

5. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Tmem79ノックアウトマウスの確立. 第35回日本炎症・再生医学会, 沖縄, 2014. 7. 1- 4.
6. 久保亮治: 進化と疾患が教えてくれる皮膚バリア構造の「かたち」と機能. 第41回皮膚かたち研究学会, 東京, 2014. 7. 26- 27.
7. 久保亮治: 経皮感作とアレルギー疾患. 第16回日本褥瘡学会学術集会, 名古屋, 2014. 8. 29- 30.
8. 塩濱愛子, 佐々木貴史, 久保亮治, 川崎洋, 山田健人, 天谷雅行: 自然発症皮膚炎を起こすTmem79 KO マウスは層板顆粒の分泌異常を示す. 第42回日本臨床免疫学会総会, 東京, 2014. 9. 25- 27.
9. 川崎洋, 久保亮治, 平野尚茂, 山田健人, 天谷雅行: フィラグリン欠損マウスの角層バリア機能破綻に対する乾燥環境因子の関与. 第42回日本臨床免疫学会総会 東京, 2014. 9. 25- 27.
10. 久保亮治: 皮膚バリアの構造と機能を可視化する ～バリア破綻疾患の病態解明へのアプローチ～. 第14回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム, 東京, 2014. 12. 20.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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(難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))
分担研究報告書

角層バリア機能の微細構造解析によるアトピー性皮膚炎発症機序の解明

研究分担者 松井 毅 (独)理化学研究所 統合生命医科学研究センター
皮膚恒常性研究チーム 上級研究員

研究要旨

アトピー性皮膚炎をはじめとするアトピー性疾患において、皮膚バリア機能障害による経皮的抗原曝露の亢進が、疾患の発症・増悪をさせていることが明らかになりつつある。皮膚バリアの3大要素として、角質層バリア、顆粒層のタイトジャンクション、ランゲルハンス細胞が存在する。しかし、表皮の顆粒層・角質層において、どのような微細構造レベルでの細胞生物学的現象が、皮膚バリア機能障害初期の兆候として認められるのかは不明な点が多い。本研究では、皮膚バリア機能障害モデルマウスの顆粒層・角質層における電子顕微鏡法による微細構造解析系の構築を行う。本年度は、マウス表皮上層(顆粒層～角質層)のサンプルを用いた加圧凍結・凍結置換法による新しい顆粒層・角質層の電子顕微鏡観察系の構築を行った。

研究協力者

平林 愛 (公財) 難病医学研究財団
リサーチレジデント

(Leica)にて加圧凍結し、凍結置換装置 AFS(Leica)にて、 -90°C から 0°C まで徐々に温度を上昇させることで凍結置換溶液(2%オスミウム/アセトン溶液)への置換を行った。置換終了後、化学固定した試料と同様に樹脂包埋し、超薄切片の作製を行い、電子顕微鏡観察を行った。

A. 研究目的

皮膚の顆粒層・角質層において、どのような微細構造レベルでの細胞生物学的現象が皮膚バリア機能障害初期の兆候として認められるのかを、電子顕微鏡を用いてマウスモデルから明らかにする。本年度は、マウス表皮上層シートを用いた顆粒層・角質層の微細構造観察に特化した電子顕微鏡観察系を構築することを目標とした。

B. 研究方法

マウス表皮上層シートを用いて化学固定法と加圧凍結・凍結置換法により電子顕微鏡用試料作製を行った。化学固定は、Half Kalnovsky 固定液にて固定した後に、オスミウム酸固定液を用いて「後固定」を行った。エタノールでの脱水後、エポキシ系樹脂に包埋し、超薄切片(80nm)を作製した。加圧凍結・凍結置換は、EMPACT

C. 研究結果

低倍率で表皮上層シートの全体像を比較すると、化学固定では細胞膜の湾曲が多く認められた。また、各角層間が大きく開き一方で、顆粒層同士は密着して細胞間隙が狭くなっていた。次に特徴的な領域を高倍率で観察した。核については、加圧凍結・凍結置換の方が核内の電子密度が高く、ヘテロクロマチン領域が明瞭に観察されたことから、生体分子の流出が少ないと考えられた。顆粒層のケラトヒアリン顆粒は、化学固定では高電子密度の塊として観察されたが、加圧凍結・凍結置換では繊維状のアモルファス構造として認められた。また、ケラチンは化学固定では凝集していた

が、加圧凍結・凍結置換では繊維状であった。デスモソームについては、化学固定では顆粒層間の細胞間隙が狭いため観察された数が少なく、明瞭な構造が認められなかったが、加圧凍結・凍結置換では分子構造が明瞭であり、接着分子が重なり電子密度が高い領域も観察された。角質層については、化学固定では角層間の開きが大きいためコルネオデスモソームの数が少なく、輪郭がぼやけていたが、加圧凍結・凍結置換では明瞭なコルネオデスモソームが観察された。また、加圧凍結・凍結置換では角質層内のケラチン繊維も明瞭に観察された。以上の観察結果から、加圧凍結・凍結置換法は、マウス表皮上層シートの顆粒層・角質層における微細構造の保持に適していることが明らかになった。

D. 考察

加圧凍結・凍結置換法は、化学固定法で用いられるアルデヒド固定によるアーティファクトを受ける可能性がなく、生細胞に近い状態で細胞内構造を観察できる手法として注目されてきた。アトピー性皮膚炎発症機序の解明には角層から顆粒層の細胞構造学的現象を微細構造レベルで観察することが重要である。今回用いた表皮上層シートは、角層から顆粒層のみのシートであるが、厚みが約 20 μm であるため、加圧凍結により非晶質凍結することが可能である。実際に、化学固定よりも顆粒層内の核やケラチン、接着構造、角層間のケラチンや接着構造等、微細構造の保持がよいことが明らかになった。

E. 結論

今回の観察より、表皮上層シートを用いた加圧凍結・凍結置換法は、ケラトヒアリン顆粒や接着構造、脂質二重膜、角層内のケラチンなど顆粒層・角質層における微細構造の保持がよく、アトピー性皮膚炎発症機序を解明するためのマウス表皮上層の微細構造観察に適した方法であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 26 年度）

<論文発表>

Matsui T, Amagai M: Dissecting the formation, structure, and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* (epub, doi: 10.1093/intimm/dxv013), 2015.

<学会発表>

松井毅: 哺乳類皮膚表皮角質層の機能的進化. 第14回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム, 東京, 2014. 12. 20.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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
Daito J, Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Tamagawa-Mineoka R, <u>Katoh N</u> , Takamatsu T	Neutrophil Phagocytosis of Platelets in the Early Phase of 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-induced Dermatitis in Mice	Acta Histochem Cytochem	47 (2)	67-74	2014
Masaki K, Suzuki Y, Kagawa S, Kodama M, Kabata H, Miyata J, Tanaka K, Fukunaga K, Sayama K, Oguma T, Kimura T, <u>Amagai M</u> , Betsuyaku T, Asano K	Dual role of interleukin-23 in epicutaneously-sensitized asthma in mice	Allergol Int	63 (Suppl)	13-22	2014
Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, <u>Sugai M</u>	Tripoli metallo-beta-lactamase-1 (TMB-1)-producing Acinetobacter spp. with decreased resistance to imipenem in Japan	Antimicrob Agents Chemother	58 (4)	2477-2478	2014
Hagiya H, Hisatsune J, Kojima T, Shiota S, Naito H, Hagioka S, Morimoto N, Otsuka F, <u>Sugai M</u>	Comprehensive analysis of systemically disseminated ST8/non-USA300 type community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection	Intern Med	53 (8)	907-912	2014
Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, <u>Niizeki H</u> , Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, <u>Kido H</u> , Hisatsune J, <u>Sugai M</u> , Murota H, Katayama I, Sasaki T, <u>Amagai M</u> , Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, <u>Saito H</u> , <u>Ohya Y</u>	Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis	J Allergy Clin Immunol	134 (4)	824-830	2014
Yoshida K, <u>Kubo A</u> , Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, <u>Ebihara T</u> , Nagao K, <u>Amagai M</u>	Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in atopic dermatitis	J Allergy Clin Immunol	134 (4)	856-864	2014
Matsumoto K, <u>Saito H</u>	Eczematous sensitization, a novel pathway for allergic sensitization, can occur in an early stage of eczema	J Allergy Clin Immunol	134 (4)	865-866	2014
Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, <u>Katoh N</u>	Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis	J Am Acad Dermatol	70 (5)	882-888	2014
Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, <u>Sugai M</u> , Yamagishi N, Hu DL	Molecular epidemiology and identification of a Staphylococcus aureus clone causing food poisoning outbreaks in Japan	J Clin Microbiol	52 (7)	2637-2640	2014
Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, <u>Katoh N</u> , Asai J	Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma	J Cutan Pathol	41 (7)	561-567	2014