

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
コーセースキンケア・アレルギー
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 の抗デスマグレイン 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