

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  
免疫アレルギー研究分野)

# アトピー性皮膚炎発症機序の解明と皮膚バリア ケアによる予防法の開発に関する研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成26(2014)年 5月

## 目 次

### I . 平成25年度総括研究報告

アトピー性皮膚炎発症機序の解明と皮膚バリアケアによる予防法の開発に関する研究..... 1	
	慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 研究代表者 天谷 雅行

### II . 平成25年度分担研究報告

新規マウス自然発症性皮膚炎原因遺伝子Tmem79の同定とヒトアトピー性皮膚炎患者でのTmem79の解析..... 9	
	慶應義塾大学医学部 皮膚科学 准教授 海老原 全
	慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター 特任講師 佐々木貴史

皮膚バリア破綻モデルマウスの作成と解析.....13	
	慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師 久保 亮治

スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究.....17	
	(独)国立成育医療研究センター 副研究所長 斎藤 博久
	(独)国立成育医療研究センター生体防御系内科部アレルギー科 医長 大矢 幸弘
	(独)国立成育医療研究センター感覚器・形態外科部皮膚科 医長 新関 寛徳
	徳島大学疾患酵素学研究センター・酵素分子化学部門 特任教授 木戸 博
	広島大学大学院医歯薬保健学研究院 細菌学 教授 菅井 基行

臍帯血の抗原特異的低親和性IgEの検出と、生後のAffinity Maturationが関与するアトピー性皮膚炎の発症と、その予防.....22	
	徳島大学疾患酵素学研究センター・酵素分子化学部門 特任教授 木戸 博

III . 研究成果の刊行に関する一覧表.....29	
-----------------------------	--

IV . 平成25年度班会議プログラム.....31	
----------------------------	--

V . 平成25年度構成員名簿.....39	
------------------------	--

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))  
総括研究報告書

**アトピー性皮膚炎発症機序の解明と皮膚バリアケアによる予防法の  
開発に関する研究**

研究代表者 天谷 雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学 教授

**研究要旨**

本研究では、皮膚バリア機能障害による経皮的抗原曝露の亢進がアトピー性皮膚炎をはじめとするアトピー性疾患を発症、増悪させるという観点から、アトピー性皮膚炎発症機序を解明する基礎研究と、バリアケアによるアトピー性皮膚炎発症、増悪の予防法を確立するための疫学的臨床研究を行う。H25年度において、基礎研究では、角層バリア機能障害を有するアトピー性疾患発症関連新規遺伝子として、SPF環境下において皮膚炎を自然発症する matted マウスの責任遺伝子 Tmem79 を同定した。Tmem79 は表皮顆粒層最外層(SG1細胞)において強く発現しており、Tmem79 変異により層板顆粒の分泌が障害されることが明らかになった。ヒトアトピー性皮膚炎においては、日本人患者では、ヒト TMEM79 に有意な変異を同定する事はできなかったが、Dundee 大学の Saunders のグループより、3000人以上を用いたコホート解析により p.V147M がイギリス AD 患者集団と弱い連鎖を示す事が報告された。疫学的臨床研究においては、スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関するランダム化介入試験により、スキンケアがアトピー性皮膚炎の発症予防に有効であることを示唆する結果が得られた。最終的な結論は、次年度の結果を待たなければいけないが、発症前の Proactive は保湿剤の使用がアトピー性皮膚炎の発症を予防し得ることを示唆している。新新生児期から6ヶ月以上に渡りこれらの測定をした報告はほとんどなく、有意義である。本年度の成果は、基礎的なアプローチと疫学的なアプローチが共に皮膚バリアケアの重要性を示しており、次年度以降の研究展開がさらに期待される。

**研究分担者**

齋藤 博久 (独)国立成育医療研究センター研究所 小児アレルギー学 副所長

木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 酵素分子化学部門 特任教授

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

大矢 幸弘 (独)国立成育医療研究センター研究所 アレルギー科 医長

新関 寛徳 (独)国立成育医療研究センター研究所 皮膚科学 医長

海老原 全 慶應義塾大学医学部 皮膚科学 准教授

永尾 圭介 慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師

久保 亮治 慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師

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

**A . 研究目的**

本研究では、皮膚バリア機能障害による経皮的抗原曝露の亢進がアトピー性皮膚炎をはじめとするアトピー性疾患を発症、増悪させるという観点から、アトピー性皮膚炎発症機序を解明する基礎研究と、バリアケアによるアトピー性皮膚炎

発症、増悪の予防法を確立するための疫学的臨床研究を行う。基礎研究では、フィラグリン以外の新規アトピー性皮膚炎発症関連新規候補遺伝子の探索、同定を行うとともに、アトピー性疾患モデルマウスの作成、解析を行い、発症機序の解明をめざす。臨床研究では、H22年度から開始された「適切なスキンケア、薬物治療方法の確立とアトピー性皮膚炎の発症・増悪予防、自己管理に関する研究」を継続、発展させることにより、スキンケア、バリアケアによりアトピー性皮膚炎の発症、増悪を予防することが可能か、疫学的研究を行う。

## B . 研究方法

### 1) 角層バリア機能障害を有するアトピー性疾患発症関連新規候補遺伝子の同定

Flaky tail マウスは、皮膚炎を自然発症するモデルマウスとして広く使用されている。このマウスは尾部の角層形成異常に関わる flaky tail と毛髪異常に関わる matted の2種類の常染色体劣性変異を有している事が明らかになっている。本研究において、flaky tail 変異は Flg 遺伝子の1塩基欠損であること、Flg K0 マウスは皮膚炎を自然発症しないことを明らかにし、flaky tail マウスの皮膚炎の原因遺伝子は matted 遺伝子である可能性を示した。そこで、flaky tail マウスの matted 変異を同定し、そのヒト相同遺伝子のAD患者及びコントロールでの解析を行った。

### 2) スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関するランダム化介入試験

研究デザインは無作為化オープン並行群間試験で、生後1週未満の健康な新生児を対象とし、スキンケアを予防的(proactive)に実施する群と必要時(reactive)に実施する群に分け、32週間指定されたスキンケアを継続し、アトピー性皮膚炎の発症率を比較した。途中、4週、12週、24週、32週と外来でフォローし、皮膚バリア機能の指標である TEWL

(transepidermal water loss)、角質水分量の測定と、皮膚黄色ブドウ球菌の有無を調べるための皮膚ぬぐい液の採取を行った。

また、出生時、12週、32週では血液検査も行い、TARC(thymus and activation-regulated chemokine)、特異的IgEの測定を行った。本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施された。

### 3) 臍帯血抗原特異的低親和性IgE検出法の開発

低親和性抗原特異的IgE抗体の検出は、ガラス基板表面を化学修飾することによって、抗原を高密度に固定化する方法を開発したことから、微量の抗原特異的IgEを高感度に検出することに成功した

(Anal Chim Acta 2011; 706: 321-327)。使用検体は、2004年から2005年にかけて岐阜大学で行われた岐阜アレルギー免疫コホート研究の検体を使用した。

## C . 研究結果

### 1) 角層バリア機能障害を有するアトピー性疾患発症関連新規候補遺伝子の同定

マウス Matted 変異最小責任領域を次世代シーケンサーで解読した結果、Tmem79 p.Y280\*変異と KIAA0907 p.A43V を同定した。Tmem79 は、皮膚に強く発現している事、及び Tmem79 遺伝子の導入した matted マウスが皮膚炎症状を起こさなかった事から、matted 変異は Tmem79 p.Y280\*変異であると同定した。この Tmem79 はマウス内に相同遺伝子はなく、ヒトでも同一の遺伝子構造を有する TMEM79 遺伝子が存在していた。そこで、AD患者250人及び健康人コントロール100人に対し、ヒト TMEM79 遺伝子のコーディング領域の全解読を行った。その結果、ヒト多型データベースにすでに登録されている3種の多型 (p.P42L(rs79735386)、p.V147M(rs6684514)、c.1458G>C(rs3795728))を頻度の高い多型として、また他にヒト多型データベースに登録のない5種のマイナーな変異を同定したが、

ナンセンス変異やAD患者とコントロールの間で有為な差がある変異は同定されなかった。

## 2) スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関するランダム化介入試験

2013年11月18日現在、118例より参加同意を得ている。そのうち、出産後の母体、児の体調不良などでリクルート基準に達しなかった児を除く116例がランダム化登録を完了した。(Proactive群61例、Reactive群57例)研究参加開始後、研究を開始できなかった2例と同意撤回の7例を除く109例(Proactive群57例、Reactive群:52例)が解析の対象となった。解析は2013年11月18日現在のデータで実施した。32週までのアトピー性皮膚炎の発症をアウトカムとした二乗検定によるp値は0.07と有意差はでなかったが、アトピー性皮膚炎に乳児湿疹A(掻痒を伴うが、出現から4週間以内の皮疹)を加えアウトカムとするとp値は0.018となった。このことから、乳児湿疹Aがその後アトピー性皮膚炎に進展するかを再検討する必要があると考え、フォロー期間を36週(32週+4週)としてアウトカムを再計算したところ、36週時点でのアトピー性皮膚炎の発症はReactive群で有意に高くなることが分かった(p=0.049)。そのため、保湿塗布によってアトピー性皮膚炎が予防できる可能性が高いと判断し、本研究への新規のエントリーは2013年11月8日をもって終了とした。副次的評価項目である皮膚バリア機能(TEWL、角質水分量)や特異的IgEは現在結果の集計中である。

## 3) 臍帯血抗原特異的低親和性IgE検出法の開発

本研究において、臍帯血の抗原特異的IgEの性状を解析した。なお、今回は抗原として(Ovomucoid: OVM)を使用した。その結果、OVMを搭載した蛋白チップへの抗-OVM特異的IgEの結合反応を競合阻害するOVMの阻害パターンから、臍帯血のIgEは6ヶ月14ヶ月血のIgEに比べて競合阻害感度が低く、低親和性であることが示

された。さらに人のIgEレセプターとルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞系に、臍帯血、6ヶ月、14ヶ月血のOVM特異的IgEを添加しOVMでチャレンジしたところ、低親和性IgEを示す臍帯血IgEではルシフェラーゼレポーターは発動せず、6ヶ月、14ヶ月血のOVM特異的IgEではルシフェラーゼレポーターが発動された。以上の結果から、臍帯血は低親和性抗原特異的IgEのためアレ르기反応は抑制されているが、生後6ヶ月までの間に繰り返される抗原感作とHyper Mutationによって、IgE抗体はAffinity Maturationを起こしていることが判明した。

## D. 考察

本年度のアトピー性疾患発症関連新規候補遺伝子の同定において、アトピー性皮膚炎マウスモデルで新規に同定されたTmem79の解析を行ったが、日本人AD患者のヒトTMEM79に有意な変異を同定する事はできなかったが、我々と同時にTmem79を同定したDundee大学のSaundersのグループは、3000人以上を用いたコホート解析によりp.V147MがイギリスAD患者集団と弱い連鎖を示す事を報告した。これらのことから日本人でもTMEM79がAD患者と連鎖している可能性はあり、そのために大規模な集団の解析が今後必要となると考えられた。

スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関するランダム化介入試験においては、スキンケアがアトピー性皮膚炎の発症予防に有効であることを示唆する結果が得られている。2013年11月18日に実施した解析ではアトピー性皮膚炎の発症がReactive群で有意に高い結果が得られた。これは、発症前のProactiveは保湿剤の使用がアトピー性皮膚炎の発症を予防し得ることを示唆している。また、TEWL( transepidermal water loss)、角質水分量、皮膚pH、特異的IgE検査も実施しており、今後これらがAD発症や経皮感作の予測因子となりうる可能性もある。新生児期のこのような検査の

報告自体極めて少ないうえ、新生児期から6ヶ月以上に渡りこれらの測定をした報告はほとんどなく、これらの結果はアトピー性疾患発症予防の観点だけでなく基礎的な研究結果として重要なものとなると考えられる。

## E . 結論

本研究の成果により、アトピー性疾患の発症に関与する皮膚バリア機能関連遺伝子の同定がなされ、アトピー性皮膚炎発症における病態が確実に解明されてきている。さらに、スキンケア、バリアケアによりアトピー性皮膚炎の発症、増悪を予防すること可能であることが、ランダム化介入試験により示されつつある。皮膚バリア機能を補正することによりアトピー性疾患の発症、アレルギーマーチを予防、抑制することができれば、厚生行政に多大なる貢献が期待される。

## F . 健康危険情報

特になし

## G . 研究発表（平成25年度）

< 論文発表 >

《英語論文》

1. Hata T, Nishimoto S, Nagao K, Takahashi H, Yoshida K, Ohyama M, Yamada T, Asano K, Amagai M: Ectopic expression of epidermal antigens renders the lung a target organ in paraneoplastic pemphigus. **J Immunol** 191 (1), 83-90, 2013.
2. Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, Kato F, Kayama S, Sugai M: Emergence of *Staphylococcus aureus* carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. **Antimicrob Agents Chemother** 57 (12), 6131-6140, 2013.
3. Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Kudoh J: Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. **Vet Dermatol** 24 (1), 25-31, 2013.
4. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Ishino T, Imon K, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M: The first case of septicemia caused by imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Ann Lab Med** 33 (5), 383-385, 2013.
5. Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S, Hirakawa H, Itaha H, Ohge H, Gotoh N, Usui T, Matsubara A, Sugai M: Identification and characterization of a novel aac(6)-Iag associated with the blaIMP-1-integron in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One** 8 (8), e70557, 2013.
6. Kubo A, Ishizaki I, 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.
7. 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, Kosaki R, 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.
8. Matsumoto K, Saito H: Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases -per-"eczema"tous sensitization drives the allergy march. **Allergol Int** 62 (2), 291-296, 2013.
9. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. **J Allergy Clin Immunol** 131 (2), 590-592, 2013.
10. 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 the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic

- dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 132 (5), 1111-1120, 2013.
11. 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.
  12. Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H: Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. **J Allergy Clin Immunol** 133 (3), 904-905, 2014.
- 《日本語論文》
1. 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. **日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号** 123 (13), 2702-2706, 2013.
  2. 久保亮治: 皮膚バリア機能障害からみたアトピー性疾患の病態解明. **日本小児科医会会報第45号 アレルギー特集号** (45), 31-37, 2013.
  3. 久保亮治, 天谷雅行: 経皮感作はなぜ重要か? ~皮膚バリア障害からみたアトピー疾患~. **皮膚アレルギーフロンティア** 11 (3), 131-135, 2013.
  4. 久恒順三, 達川伸行, 佐藤祐介, 加藤文紀, 鹿山鎮男, 菅井基行: 黄色ブドウ球菌. **感染症内科** 1 (3), 275-285, 2013.
  5. 佐々木貴史, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎の皮膚バリアからみた病態. **臨床免疫・アレルギー科** 60 (3), 276-281, 2013.
  6. 大矢幸弘: 経皮感作とアレルギー スキンケアによるアトピー性皮膚炎の発症予防. **臨床免疫・アレルギー科** 59 (5), 581-586, 2013.
  7. 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・アレルギー科** 59 (2), 153-159, 2013.
- < 学会発表 >  
《英語発表》
1. Adachi T, Kobayashi T, Amagai M, Nagao K: Epidermotropic resident memory T cells require hair follicle-derived cytokines to reside in epidermis. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
  2. Kobayashi T, Horiuchi K, Adachi T, Kawasaki H, Amagai M, Nagao K: TACE/ADAM17 deficiency in epidermis leads to IL-17A-associated inflammation with atopic dermatitis-like phenotype. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
  3. 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.
  4. 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.
  5. Amagai M: The three musketeers of the epidermal barrier and atopic dermatitis. **ASPCR-ASDR 2013**, Sydney, Australia, 2013. 5. 17- 19.
  6. 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.
  7. Amagai M: The epithelium as a barrier. **EAACI-WAO Congress 2013 (joint congress organised by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the World Allergy Organization)**, Milan, Italy, 2013. 6. 22- 26.
  8. Amagai M: Three musketeers of skin barrier and atopic dermatitis. **9th Asian Dermatological Congress**, Hong Kong, 2013. 7. 10- 13.
  9. Kubo A: Molecular barrierology of the stratum corneum and epidermal tight junctions. **Molecular Mechanisms Regulating Skin Homeostasis 2013**, Koln, Germany, 2013. 9. 23- 25.
  10. 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.
11. 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.
  12. Kubo A: The three musketeers of the epidermal barrier. **4th Pan Asian Pacific Skin Barrier Research Annual Symposium**, Seoul, Korea, 2013. 10. 15.
  13. Amagai M: Skin barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic disease. **The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology**, Yokohama, Japan, 2013. 10. 19- 20.
  14. Amagai M: Stratum corneum barrier dysfunction and atopic diseases. **42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology**, Chiba, Japan, 2013. 12. 11- 13.
  15. 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.
  16. 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.
- 《日本語発表》
1. 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20回分子皮膚科学フォーラム**, 東京, 2013. 4. 12- 13.
  2. 正木克宜, 鈴木雄介, 加川志津子, 樹神元博, 小熊剛, 持丸貴生, 松坂雅子, 加畑宏樹, 宮田純, 田中希宇人, 福永興吉, 天谷雅行, 別役智子, 浅野浩一郎: 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53回日本呼吸器学会学術講演会**, 東京, 2013. 4. 19- 21.
  3. 鈴木雄介, 正木克宜, 加川志津子, 川崎洋, 永尾圭介, 久保亮治, 別役智子, 天谷雅行, 浅野浩一郎: 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53回日本呼吸器学会学術講演会**, 東京, 2013. 4. 19- 21.
  4. 大矢幸弘: アトピー性皮膚炎の発症因子と発症予防-皮膚科と小児科はこう考える(教育セミナー). **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11-12.
  5. 亀村典生, 川本典生, 深尾敏幸, 近藤直実, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 出生から生後14ヶ月までの食物抗原特異的抗体価の変動についての検討. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
  6. 品原和加子, 澤淵貴子, 亀村典生, 窪田賢司, 鈴木宏一, 木戸博: カルボキシル化DLC抗体チップを用いたアレルギー性食物抗原の高感度定量測定. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
  7. 木戸博, 亀村典生, 多田仁美, 品原和加子, 鈴木宏一, 窪田賢司: アレルギーの診断、発症、寛解の病態評価に必要な血液と粘膜の抗原量の新規高感度定量測定. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
  8. 窪田賢司, 亀村典生, 多田仁美, 鈴木宏一, 大矢幸弘, 森田英明, 市岡隆男, 木戸博: 患者の採血負担を最小限にした低侵襲性高感度DLCマルチアレルギーチップの有用性. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
  9. 海老原全: 皮膚バリア機能から考えるアトピー性皮膚炎の治療. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
  10. 天谷雅行: 皮膚バリア機構の解明と経皮感作. **第22回千葉基礎・臨床免疫セミナー**, 千葉, 2013. 5. 24.
  11. 天谷雅行: 皮膚バリア障害とアトピー性疾患. **第8回しもつけ病診連携懇話会**, 宇都宮, 2013. 6. 6.
  12. 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.



13. 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.
14. 正木克宜, 鈴木雄介, 加川志津子, 樹神元博, 小熊剛, 持丸貴生, 加畑宏樹, 宮田純, 田中希宇人, 福永興壱, 天谷雅行, 別役智子, 浅野浩一郎: 経皮感作喘息モデルマウスにおけるIL-23の役割. **第23回国際喘息学会日本・北アジア部会**, 東京, 2013. 6. 28 - 29.
15. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 山田健人, 蜂矢隆久, 清水厚志, 岡野栄之, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子Mattedの同定. **第34回日本炎症・再生医学会**, 京都, 2013. 7. 2- 3.
16. 岩本優子, 久恒順三, 加藤文紀, 香西克之, 菅井基行: 黄色ブドウ球菌の表皮剥脱毒素ETA遺伝子プロモーター領域の解析. **第7回細菌学若手コロッセウム**, 広島県三原市, 2013. 8. 7-9.
17. 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.
18. 天谷雅行: 皮膚バリアが壊れているアトピー性皮膚炎. **免疫ふしぎ未来**, お台場, 2013. 8. 11.
19. 佐伯秀久, 広田朝光, 中川秀己, 常深祐一郎, 佐藤伸一, 天谷雅行, 古江増隆, 玉利真由美: IL22遺伝子多型は日本人の尋常性乾癬と相関する. **第28回乾癬学会学術大会**, 東京, 2013. 9. 6-7.
20. 天谷雅行: 皮膚バリアを可視化する. **旭川皮膚科講演会**, 旭川, 2013. 9. 12.
21. 天谷雅行: 皮膚バリア機能異常とアトピー性疾患. **第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会**, 大宮, 2013. 9. 21-22.
22. 天谷雅行: 皮膚バリアを可視化する—3次元、4次元の世界から見えてくる皮膚疾患—. **第17回川崎市皮膚科医学会学術講演会**, 川崎, 2013. 10. 2.
23. 正木克宜, 加畑宏樹, 福永興壱, 加川志津子, 持丸貴生, 松坂雅子, 鈴木雄介, 川崎洋, 佐々木貴史, 天谷雅行, 浅野浩一郎, 別役智子: 重症喘息患者におけるFilaggrin遺伝子変異の検討. **第21回臨床喘息研究会**, 伊勢, 2013. 10. 5.
24. 久恒順三, 萩谷英大, 塩田澄子, 菅井基行: 全身播種したCA-MRSA感染症由来株の解析. **第66回日本細菌学会中国四国支部総会**, 広島県呉市, 2013. 10. 12.
25. 天谷雅行: 皮膚バリア三銃士とアトピー性皮膚炎. **第50回日本小児アレルギー学会**, 横浜, 2013. 10. 19-20.
26. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 山田健人, 蜂矢隆久, 清水厚志, 岡野栄之, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子mattedの同定. **第41回日本免疫臨床学会総会**, 下関, 2013. 11. 27-29.
27. 品原和加子, 亀村典生, 多田仁美, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: アレルギー診断・発症・寛解の病態評価に必要な血中アレルギー量の新規高感度定量測定法. **第63回日本アレルギー学会秋季学術大会**, 東京, 2013. 11. 28-30.
28. 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.
29. 天谷雅行: 皮膚バリア機能とアレルギー疾患発症機構. **独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センターシンポジウム**, 東京, 2014. 2. 28.

## 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》
1. 出願番号: 特許出願 2010-145212  
出願日: 2010年6月25日  
公開番号: 特許公開 2010-204130  
公開日: 2010年9月16日  
出願人: 国立大学法人徳島大学  
発明者: 木戸博、多田仁美、澤淵貴子、山川由美子、水口寛、木下盛敏  
発明の名称: ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法
  2. 出願番号: 特許出願 2010-129694  
出願日: 2010年6月7日  
公開番号: 特許公開 2010-266448  
公開日: 2010年11月25日  
出願人: 国立大学法人徳島大学  
発明者: 木戸博、多田仁美、澤淵貴子  
発明の名称: アレルギー疾患の判定方法

及びアレルギー疾患の判定キット

< 実用新案登録 >

なし

3. 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》

1. 国際出願番号:PCT/JP2008/000242  
国際出願日:2008年2月15日  
国際公開番号:W02008/111281  
国際公開日:2008年9月18日  
出願人:国立大学法人徳島大学、オリエンタル酵母工業株式会社  
発明者:木戸博、鈴木宏一  
発明の名称:アレルギー疾患の判定方法
2. 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:W02009/139191  
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

## 新規マウス自然発症性皮膚炎原因遺伝子 *Tmem79* の同定と ヒトアトピー性皮膚炎患者での *Tmem79* の解析

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  
研究分担者 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

### 研究要旨

*Flg<sup>fl</sup>* 変異と *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モデルマウス Flaky tail の皮膚炎原因変異は *ma* 変異であり、*ma* 変異は皮膚バリア遺伝子 *Tmem79* のナンセンス変異である事を明らかにした。ヒト AD 患者 250 人の解析結果、*TMEM79* に AD に関連する変異を同定する事はできなかったが、*ma* マウスでの皮膚炎発症メカニズム解明により、AD における皮膚炎の発症メカニズムの一部が解明されると期待される。

### 研究協力者

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

### A . 研究目的

近年アトピー性皮膚炎(AD)患者からフィラグリン(*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<sup>fl</sup>*)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。しかし我々が樹立した *Flg* KO マウスは皮膚炎を自然発症しなかった。この事から、Flaky tail マウスの自然発症皮膚炎の原因遺伝子を同定し、Flaky tail マウスの皮膚炎発症のメカニズムを解明する事を試みた。

### B . 研究方法

Flaky tail マウスの皮膚炎発症の原因変異を同定するために、野生型マウスと交配を行い *Flg<sup>fl</sup>* 変異と *ma* 変異の分離を行った。最小責任ゲノム領域を次世代シーケンサーにより網羅的に解読し、遺伝

子変異を同定した。同定した原因遺伝子候補を *ma* マウスに導入したトランスジェニックマウスを作出し、皮膚炎症状がレスキューされるか解析を行った。同定した原因遺伝子 *Tmem79* の mRNA 及びタンパク質の発現解析を行った。慶應義塾大学病院皮膚科を受診した AD 患者 250 人に対し *TMEM79* 遺伝子の解読し、ヒト AD 患者での関連解析を行った。

### C . 研究結果

野生型マウスと Flaky tail マウスの戻し交配に *Flg<sup>fl</sup>* 変異と *ma* 変異を分離した結果、皮膚炎は *Flg<sup>fl</sup>* 変異ではなく、*ma* 変異が原因であった(図 1)。最小責任ゲノム領域の解読の結果、*Tmem79* 遺伝子ナンセンス変異を同定した。*Tmem79* ゲノム領域をクローニングし *ma* マウスに導入した結果、皮膚炎症状がレスキューされた(図 1)。発現解析の結果、*Tmem79* mRNA は表皮に特異的に発現し、抗 *Tmem79* 抗体を用いた皮膚染色の結果、*Tmem79* は顆粒層の最上層に特異的に発現していた。テープストリッピング法を用いて *ma* マウス角質層を解析した結果、*ma* マウスの角質層は野生型より脆弱性を示した(図 2)。AD 患者 250 人に対し *TMEM79* 遺伝子の解読を行ったが、AD と関連する変異を同定す

る事はできなかった。

## D . 考察

Flaky tail マウスは、血中 IgE 上昇を伴う皮膚炎を自然発症し *Flg<sup>fl</sup>* 変異を有している事から、AD モデルマウスとして用いられてきた。今回の研究で、Flaky tail マウスの皮膚炎の原因遺伝子は *Flg<sup>fl</sup>* 変異ではなく、新たな皮膚バリア遺伝子 *Tmem79* のナンセンス変異である事を明らかにした。*Tmem79* 遺伝子は顆粒層に特異的に発現し、その欠損により角質層が脆弱性を示す事から、*Tmem79* は皮膚バリア関連因子であった。これらの事から、皮膚バリア遺伝子欠損が皮膚炎発症の原因となる事が明らかになった。ヒト AD 患者では関連する *TMEM79* 変異を同定できなかったが、共通する皮膚炎自然発症メカニズムが存在する可能性が高いことから、*ma* マウスでの皮膚炎発症メカニズム解明により、AD における皮膚炎の発症メカニズムの一部が解明されると期待される。

## E . 結論

マウスにて欠損により血中 IgE 上昇を伴う自然発症皮膚炎の原因となる新規皮膚バリア遺伝子 *Tmem79* を同定した。ヒト AD 患者 250 人から関連する *TMEM79* 変異は同定できなかったが、*ma* マウスでの皮膚炎発症メカニズム解明により、AD における皮膚炎の発症メカニズムの一部が解明されると期待される。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表 (平成 25 年度)

< 論文発表 >

1. Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Kudoh J: Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. **Vet Dermatol** 24 (1), 25-31, 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, Kosaki R, 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 the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 132 (5), 1111-1120, 2013.
4. 佐々木貴史, 天谷雅行: アトピー性皮膚炎の皮膚バリアからみた病態. **臨床免疫・アレルギー科** 60 (3), 276-281, 2013.

< 学会発表 >

1. 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 *Matrin*, a component of lamellar granule secretory system, produces spontaneous dermatitis in mice. **The International Investigative Dermatology 2013**, Edinburgh, Scotland, 2013. 5. 8- 11.
2. 海老原全: 皮膚バリア機能から考えるアトピー性皮膚炎の治療. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
3. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 山田健人, 蜂矢隆久, 清水厚志, 岡野栄之, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子 *Matted* の同定. **第34回日本炎症・再生医学会**, 京都, 2013. 7. 2- 3.

4. 正木克宜, 加畑宏樹, 福永興幸, 加川志津子, 持丸貴生, 松坂雅子, 鈴木雄介, 川崎洋, 佐々木貴史, 天谷雅行, 浅野浩一郎, 別役智子: 重症喘息患者におけるFilaggrin遺伝子変異の検討. **第21回臨床喘息研究会**, 伊勢, 2013. 10. 5.
5. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 久保亮治, 川崎洋, 山本明美, 山田健人, 蜂矢隆久, 清水厚志, 岡野栄之, 工藤純, 天谷雅行: 新規自然発症皮膚炎原因遺伝子mattedの同定. **第41回日本免疫臨床学会総会**, 下関, 2013. 11. 27-29.
6. 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.

## H . 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

### < 特許取得 >

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

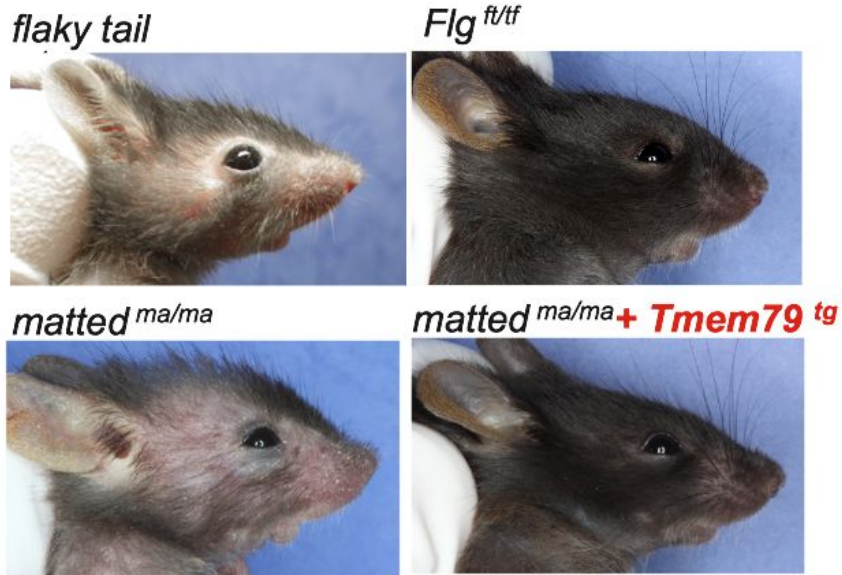
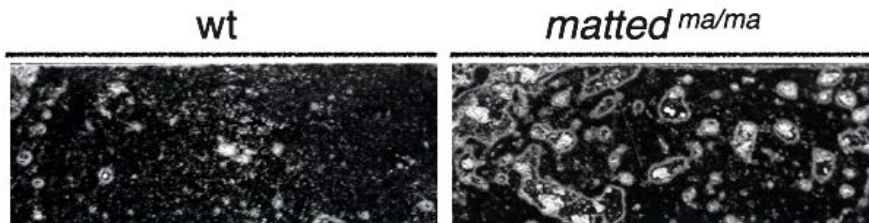


図1 Flaky tailマウスの *Flg*<sup>ft/ft</sup> と *ma* の分離と *Tmem79*レスキューマウス

テープ剥離角層の正面像



残存角層の垂直切片像

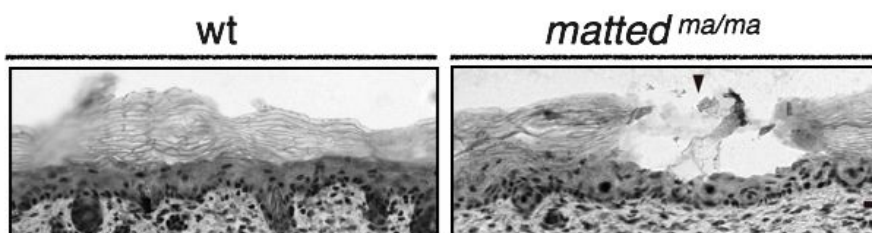


図2 *ma*マウス角層脆弱性

## 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間隙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、角質バリアの先天性障害が、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、一旦皮膚炎が起ると、炎症がTJバリアを障害することで角質形成異常を引き起こされ、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

イン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バリアの先天性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

### 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間隙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、角質バリアの先天性障害が、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

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

マウスクローニン 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 細胞でターゲティングを行うことで、クローニン 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ニン 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ニン 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ニン 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し、生後 1 日以内に死亡した。クローニン 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、クローニン 1KO マウスの死因が肝臓でのクローニン 1 欠損によるものではなく、皮膚でのクローニン 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ニン 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。なぜ同じクローニン 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ニン 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ニン 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, Kosaki 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 *Matrin*, 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:W02009/139191

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

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

**スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究**

研究分担者 斎藤博久 (独)国立成育医療研究センター 副研究所長  
研究分担者 大矢幸弘 (独)国立成育医療研究センター生体防御系内科部アレルギー科 医長  
研究分担者 新関寛徳 (独)国立成育医療研究センター感覚器・形態外科部皮膚科 医長  
研究分担者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター・酵素分子化学部門 特任教授  
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(AD)は慢性・反復性経過を特徴とする掻痒のある湿疹(Eczema)で、生活の質(quality of life; QOL)の低下をもたらす。また近年は、経皮感作による食物アレルギーの獲得の可能性も示唆されており、離乳食が開始される乳児期のアトピー性皮膚炎の発症予防の可能性が期待されている。そこで、今回我々は皮疹がまだ出現していない生後1週未満のAD発症のハイリスク児を、新生児期から全身のスキンケアを予防的に行う群(Proactive群)と必要時に局所のみに行う群(Reactive-control群)に分け、8か月時点でのEczemaの発症率を比較し、予防的なスキンケアがAD発症予防に有効かを検討した。2010年11月から2013年11月まで当院で出産予定の家族を対象にチラシやポスターで研究参加者を募った。参加希望者のうち、エントリー基準を満たし文書での同意が得られた児をエントリーした。途中2012年11月に53例の時点で中間解析を実施し、当初の予定参加者(70例)では検出力が不足すると判断し、さらに1年間エントリーを継続した。2013年11月にエントリー数が118例になったところで再度中間解析を行ったところ、研究を終了していた99例(Proactive 51例、Reactive-control 48例)を対象とした解析で、Proactive群では51例中19例がinfantile eczema(IE)を発症していたのに対し、Reactive-control群では48例中28例が発症しており、Proactive群で有意に発症が少ないことが分かった。(p = 0.018) そのため、両群の有効性に差があると判断し、2013年11月30日をもって新規のエントリーを中止した。

**研究協力者:**

森田久美子	(独)国立成育医療研究センター生体防御系内科部アレルギー科 医師	松本健治	(独)国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部 部長
北沢 博	同上	徳永秀美	(独)国立成育医療研究センター 薬剤部
堀向健太	同上	青木智子	(独)国立成育医療研究センター 6西病棟 看護師
成田雅美	同上	西海真理	(独)国立成育医療研究センター 医療連携室 看護師
野崎誠	(独)国立成育医療研究センター感覚器・形態外科部皮膚科 医員	早瀬和子	(独)国立成育医療研究センター 生体防御系内科部アレルギー科
吉田和恵	同上	丸田明子	(独)国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 皮膚科
左合治彦	(独)国立成育医療研究センター周産期センター センター長		
本村健一郎	(独)国立成育医療研究センター周産期センター レジデント		

## A . 研究目的

20世紀後半の経済成長や生活環境の激変に伴い、我が国を含め先進国のアトピー性皮膚炎患者数は増加してきた。「日本アレルギー学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン2012」や「日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン」に、「(アトピー性皮膚炎の)炎症に対してはステロイド外用薬やタクロリム軟膏による外用療法を主とし、生理学的機能異常に対しては保湿・保護剤外用などを含むスキンケアを行い、痒痒に対しては抗ヒスタミン薬、抗アレルギー薬の内服を補助療法として併用し、悪化因子を可能な限り除去することを治療の基本とするコンセンサスが確立されている」と記載されている。しかし、アトピー性皮膚炎の発症を予防する方法はまだ実証されたものはないのが現状である。特に近年、食物アレルギーの発症に経皮感作が関与しているとする報告もあり(Lack G. et al, J Allergy Clin Immunol. 2008;121:1331)、乳児期のアトピー性皮膚炎の発症予防が、食物アレルギーも含むアレルギー性疾患の予防にも重要である可能性が考えられている。

アトピー性皮膚炎患者は皮膚バリア機能障害を有する疾患であり、皮膚バリアを補填する治療(保湿剤塗布)が寛解維持に有効であることが報告されているが(Wiren K. et.al, Eur AcaDermatol Venereol. 2009 ;23:1267-72)、発症前から皮膚バリア機能を補填するスキンケア(全身への Proactive な保湿剤塗布)を行うことでアトピー性皮膚炎の発症を予防できるかはわかっていない。そこで今回我々はアトピー性皮膚炎発症のハイリスク児(両親どちらか、または同胞にアトピー性皮膚炎の既往がある)を対象に、予防的なスキンケア(全身への Proactive な保湿剤塗布)を新生児期から行うことでアトピー性皮膚炎の発症を抑制できるか否かを、生後8か月時点でのアトピー性皮膚炎の発症率をアウトカムとして検討した。

## B . 方法

研究デザインは無作為化オープン並行群間試験を用いた。研究参加者の募集は当院産婦人科外来でのチラシ配布やポスター掲示

で行った。参加希望者に試験担当者より研究の説明を行い、文書での同意を取得した。出生後1週以内にエントリー基準を満たすことを再度確認できた新生児をエントリーし、スキンケアを全身に予防的に実施する群(Proactive群)と必要時に局所的に実施する群(Reactive-control群)にランダムに割り付け、各群の乳児に対して、生後4週、12週、24週、32週の外来受診時に皮膚診察と皮膚バリア機能検査(TEWL、角質水分量、表皮pHの測定)、皮膚黄色ブドウ球菌検査を行った。生後12週、32週にはさらに血液検査(TARC、各種特異的IgE抗体の測定)を実施した。32週の時点までの乳児アトピー性皮膚炎(eczema、以下、乳児AD)の両群の累積罹患率を主要評価項目とし、皮膚バリア機能の測定指標や血液検査項目は副次的評価項目として比較した。乳児ADの診断は割付をブラインドされている皮膚科専門医が行った。

皮膚黄色ブドウ球菌の培養は菅井基行らが、血液中の特異的IgE/IgG1/IgG4、唾液中のIgAは木戸博らが測定を担当した。

主要評価項目および副次的評価項目を含む内容はUMIN臨床試験登録システムに前登録(UMIN-CTR: R000005429 スキンケアによる乳児湿疹・アトピー性皮膚炎予防に関する研究)した。

### (倫理面への配慮)

本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施され、乳児はアトピー性皮膚炎の発症時、診断時には速やかに加療を受けられるようにした。また、試験試料によると思われる有害事象が出現した場合は、即座に試験試料の使用を中止し、治療を行うこととした。

## C . 結果

2010年11月より症例登録を開始し、2012年11月末の時点で当初の計画に従って中間解析を行った。この時点では、32週までの観察期間を終えた47例と、32週に達する前にすでにアトピー性皮膚炎発症などでプロトコルオフとなった6例の、計53例が解析対象となった。同意撤回があったProactive群1例、Reactive

群 3 例を解析から除き、最終的に 49 例を解析対象とした。その結果、アトピー性皮膚炎の発症をアウトカムとした  $\chi^2$  乗検定による  $p$  値は 0.19 であり、当初の目標症例数 (両群合わせて 70 例) では、検出力が不足する見込みとなった。そこで、70 例到達後も症例登録を継続し、1 年後の 2013 年 11 月に再度 2 回目の中間解析を行った。2013 年 11 月の時点でのエントリー状況を Table1 に示す。

総エントリー数は 118 例、うち同意撤回が 7 例、乳児 AD 以外の先天性の皮膚疾患による研究参加中止が 2 例あった。解析対象は、2013 年 11 月時点で研究が終了している 99 例 (Proactive 群 51 例、Reactive-Control 群 48 例) とした。

Table1 各群のエントリー状況 単位:人

	Proactive 群	Reactive-Control 群
エントリー数	61	57
同意撤回	3	4
研究参加中止	1	1
研究参加中	6	4
研究終了 (解析対象)	51	48

解析対象 99 例の 32 週までの転帰を Table2 に示す。途中、プロトコール違反で 5 例 (Proactive 群 2 例、Reactive-Control 群 3 例)、乳児 AD 以外の皮膚疾患の発症で 3 例 (Proactive 群 3 例のみ) で計 8 例が研究から脱落した。

乳児 AD の定義は、Simpson らがパイロット研究で使用した基準 (典型的な部位に Eczema が認められる、掻痒がある、2 週間以上継続、～すべてを満たす) を採用した。(Simpson EL et al, J Am Acad Dermatol, 2010; 63: 587-593)

乳児皮疹は上記以外の皮疹 (掻痒を伴わず、スキンケアのみで軽快) と定義した。乳児 AD 発症者の平均発症週数は、Proactive 群で 16 週、Reactive-Control 群で 15 週だった。乳児 AD 発症の累積罹患率をアウトカムとした両群の 2 乗検定による  $p$  値は 0.018 であり、Proactive 群で有意に低かった。

Table2 解析対象の 32 週までの転帰 単位:人

	Proactive 群 (n=51)	Reactive-Control 群 (n=48)
乳児 AD*	19	28
乳児皮疹	6	7
脱落	5	3
発症なし**	21	10

両群乳児の出生時における経表皮水分蒸散量 (TEWL)、角質水分量、皮膚 pH、には有意差はなく、両群の AD 発症者における発症時のそれらの指標にも有意差はなかった。(Table3)

Table3 皮膚検査結果 (平均)

	Proactive	Reactive-Control	$p$ -value
TEWL 出生時	8.3	8.5	0.800
TEWL 発症時	16.0	17.1	0.593
水分量 出生時	13.9	13.8	0.953
水分量 発症時	50.0	44.2	0.185
pH 出生時	5.7	5.6	0.677
pH 発症時	5.5	5.5	0.647

単位 TEWL (g/m<sup>2</sup>h)

黄色ブドウ球菌の検出に関しては、定期検査毎に頬部よりスワブ擦過にて検体を確保し、菌の検出及び、黄色ブドウ球菌の菌株の違いに関して検索中である。

血液検査 (IgE, IgG1, IgG4)、唾液検査 (IgA) については、現在測定・解析中である。

## D. 考察

我々は以前に新生児を対象とした前向きコホート研究から、生後1カ月時に乳児湿疹がアレルギーマーチに先行することを見いだしている (Matsumoto K, et al, Int Arch Allergy Immunol 2005;37:S69)。また、AD の治療によって血清 IgE が低下すること (Fukuie T,

et al. Br J Dermatol, 2010 Jun 10 Epub)、アトピー性皮膚炎患者皮膚において経皮感作がおこる可能性があることも報告されており、湿疹の悪化がアレルギー疾患の引き金になりうることが示唆されている。一方、皮膚バリア機能に関連するフィラグリン遺伝子変異によりADを高率に発症する (Fleckman P. et al, Exp Dermatol. 2002 ;11: 327-36)ことも報告されており、皮膚のバリア機能を良好に保つことがアトピー性皮膚炎予防や将来の他のアレルギー疾患予防に資する可能性がある。また、ADでは、皮疹部のみならず無疹部においても、角質細胞間脂質のひとつであるセラミド量が少なくバリア機能が低下していると報告されており (Imokawa G, et al. J Invest Dermatol. 1991 ; 96:523-6)、保湿剤の使用によって皮膚のバリア機能が改善することを示した報告もある (Buraczewska I, et al. Br J Dermatol. 2007 ; 156:492-8)。上記のような先行研究より「スキンケアによりアトピー性皮膚炎の発症を予防できるのではないか」、また同時に「スキンケアにより皮膚バリア機能が良好に保たれ、アレルゲン感作も防ぐことができるのではないか」との仮説を立て、これらを検証すべく本研究を行った。

本研究は2012年11月に49例を対象に1回目の中間解析を行いその時点ではProactive群とReactive-control群の乳児ADの発症率に明らかな差は認められなかった。その後、エントリーの強化を行い、脱落者を減らすようフォロー体制を整え、1年後の2013年11月に行った2回目の解析では、解析対象99例においてProactive群の発症率は37%、Reactive-control群の発症率は58%となり、Proactive群で有意に低いことが分かった。(p=0.018)この累積発症率は、アトピー性皮膚炎のリスクのない集団における発症率よりも高いが、先行研究におけるハイリスク群での発症率が50%程度で (Hoare CLW et al, HTA. 2000;4:1-191) Simpsonらのパイロット研究での発症率が15-23%という報告に近い。

本研究で新規のエントリーを中止した時点で研究継続中だった参加者には解析結果を伝え割り付けを解除したのち、希望者にはProactive群で使用した保湿剤の提供を行った。また、乳児ADと診断された研究参加者の

うち希望者は当院皮膚科またはアレルギー科での診療を継続している。

乳児のアトピー性皮膚炎の発症と抗原感作状況の関係については、抗原特異的 IgE 値を始めとする各種抗体値を測定中である。現時点では、抗原感作がどの時期から発生するかは、胎内感作、経母乳感作、経皮感作など、様々な報告が交錯しており、いまだ明らかになっていない。未発症者でも特異的 IgE が陽性になっているケースもあり、経皮感作ばかりではない可能性はあるが、さらに精査検討する必要がある。

## E . 結論

本研究により、保湿剤による皮膚バリア機能補正による新生児期からの介入がアトピー性皮膚炎の発症を予防することができる可能性が示された。

## F. 健康危険情報

今回の研究において特記すべき健康器具情報は無い。

## G . 研究発表 (平成 25 年度)

< 論文発表 >

1. 大矢幸弘: 経皮感作とアレルギー スキンケアによるアトピー性皮膚炎の発症予防. **臨床免疫・アレルギー科** 59 (5), 581-586, 2013.
2. Matsumoto K, Saito H: Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases -per-"eczema"ous sensitization drives the allergy march. **Allergol Int** 62 (2), 291-296, 2013.
3. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. **J Allergy Clin Immunol** 131 (2), 590-592, 2013.

<学会発表>

1. 大矢幸弘:アトピー性皮膚炎の発症因子と発症予防-皮膚科と小児科はこう考える(教育セミナー)。第25回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2013. 5. 11- 12.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 実用新案登録
2. その他
3. 特許取得

特許登録 特許第 4660756 号 木戸博:  
ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチド  
の固定化方法 2011

特許第 4568841 号 木戸博(1 番/3 名)  
アレルギー疾患の判定方法及びアレルギー  
疾患の判定キット 2010

## 臍帯血の抗原特異的低親和性 IgE の検出と、生後の Affinity Maturation が関与する アトピー性皮膚炎の発症と、その予防

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

最近我々が開発した高密度に抗原を固定化したアレルゲンマイクロアレイを用いて、今年度は臍帯血と出生後の抗原特異的 IgE の定量とその性状解析を実施した。研究には、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液中に測定可能な量の抗Ovomucoid IgE抗体を持つ検体を材料として用いた。その結果、臍帯血の抗原特異的 IgE抗体は全て低親和性抗原特異的 IgE抗体の性状を示し、ヒトFcγR1を介する肥満細胞からのヒスタミン遊離を引き起こさなかった。一方生後6-14ヶ月では、高親和性抗原特異的 IgE抗体の性状を示し、ヒスタミン遊離シグナルが検出された。このことから、出生時の低親和性抗原特異的 IgE抗体は、生後6-14ヶ月までに抗原刺激を受けて高親和性抗原特異的 IgE抗体に変化することが明らかになった。このことは、生後6-14ヶ月までの抗原刺激を避けることで、アレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆された。

### 研究協力者

亀村 典夫 徳島大学  
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

研究の目標としている。

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。本年度は、IgE の高感度定量法を用いることで、これまで検出することのできなかった臍帯血中の抗原特異的 IgE の検出が可能となり、抗原との Affinity 解析を実施し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症と IgE の Affinity Maturation との関係を考察した。解析の結果、抗体産生課程で最初に低親和性抗体ができてその後繰り返される抗原刺激によって Affinity Maturation が起きて、アレルギーの発症に結びつく高親和性 IgE に成熟すると推定されていたが、臍帯血中に低親和性抗原特異的 IgE 抗体が存在していることを初めて証明することに成功した。さらに、この低親和性 IgE 抗体は生後6-14ヶ月で Affinity Maturation することが判明し、乳幼児のアトピー性皮膚炎、食物アレルギーの発症との関係を考察した。

### 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、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とから、これらの因子を総合して病像の理解を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



## B . 研究方法

我々は、シリコンあるいはガラス基板、Diamond-like carbon ( DLC ) 処理基板の表面を高密度にジカルボン酸、またはポリカルボン酸で化学修飾することによって、アミノ基を持つアレルゲンを高密度に共有結合で固定化する方法を開発したことから、微量の抗原特異的 IgE を高感度に検出することに成功した ( Anal Chim Acta 2011; 706: 321-327 )。本研究ではこれを用いて、臍帯血中の抗原特異的低親和性 IgE 抗体の検出を行った。使用した検体は、2004 年から 2005 年にかけて岐阜大学で行われた岐阜アレルギー免疫コホート研究の検体を使用した。同一乳児で臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢の検体がそろっている検体の中から、卵白特異的 IgE 抗体が全ての時期で検出される検体 ( 37 検体 ) の中から、さらに全ての時期で抗 Ovomucoïd ( OVM ) IgE 抗体価が、上記検査方法で有意に検出可能な  $\geq 20$  Binding Unit IgE ( BUe ) / mL を示す 9 名の乳児検体を用いて検証した。

## C . 研究結果

アレルギー、アトピーの病歴を持つ母親から生まれる子供の大半は、胎児期から抗原特異的 IgE が検出されることをこれまでに報告してきた ( J Allergy Clin Immunol 2012; 130: 113-121 )。一方、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在する事が報告されているが、胎児のアトピー、食物アレルギーの報告はない。これらの事から、臍帯血の抗原特異的 IgE がなぜアレルギーの発症に結びついていないのかを調べるため、その性状を解析した。なお今回は図 1 に示す如く、抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

### 1. 臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体における抗 OVM IgE 抗体の OVM との結合親和性の測定

図 2 に示すように、OVM を搭載したアレ

ルゲンチップへの抗-OVM 特異的 IgE の結合反応を競合阻害する OVM の阻害濃度のパターンから、臍帯血の OVM 特異的 IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて競合阻害感度が低いことが判明した。50% 結合阻害を示す OVM の濃度は、臍帯血の  $3.1 \pm 0.8$  nM に比べて 6 ヶ月、14 ヶ月血ではそれぞれ  $0.9 \pm 0.2$  nM、 $0.9 \pm 0.3$  nM と有意 ( $P < 0.01$ ) に低値を示した。このことは、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて低親和性で生後高親和性に変化していることが示された。さらに、これまで低親和性 IgG の証明に使用されてきた蛋白質変性剤の diethylamine ( DEA ) ( 10-40 mM ) の添加実験でも、図 3 に示すように臍帯血の IgE は 6 ヶ月、14 ヶ月血の IgE に比べて DEA 処理による OVM への結合力の低下が著しく、この実験でも臍帯血 IgE は DEA に対して脆弱であると共に、OVM への低親和性が確認された。具体的には、検体の希釈系列で得られる最大結合値の 50% を示す検体希釈倍率において、臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、10, 20, 40 mM の DEA 存在下における最大結合値の 50% を示す希釈倍率は、6 ヶ月、14 ヶ月血に比べて有意 ( $P < 0.01$ ) に増大しており、DEA によって結合親和性が影響の受けやすい脆弱な検体であることが判明した。

### 2. OVM と抗 OVM IgE 抗体存在下におけるヒスタミン遊離シグナルの検証

Fc R1 を介する肥満細胞のヒスタミン遊離シグナルは、Rat Basophilic Leukemia ( RBL ) 細胞で再現されている。この RBL 細胞にヒトの Fc R1 を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系にルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似した測定系 ( RS-ATL8 ) を使用して、臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢乳児の抗-OVM 特異的 IgE 抗体のシグナル伝達系を検証した。OVM との低結合親和性を示した臍帯血の抗-OVM 特異的 IgE 抗体は、1 pM、10 pM、100 pM、1 nM、10 nM の OVM 抗原をチャレンジしてもルシフェラーゼレポーターは活性化しなかった。一方、6 ヶ月、14 ヶ月血

の OVM 特異的 IgE 抗体の場合は、1 pM、10 pM、100 pM の OVM 抗原のチャレンジで、抗原濃度に依存したルシフェラーゼの増加が観察された。100 pM、1nM、10 nM の OVM 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

以上の結果から、臍帯血は低親和性抗原特異的 IgE のために肥満細胞でのアレルギー反応は抑制されているが、生後 6 ヶ月から 14 ヶ月までの間に繰り返される抗原感作によって、OVM 特異的 IgE 抗体は Affinity Maturation を起こしてアレルギー、アトピーを引き起こす可能性が推定された。

#### D . 考察

本研究によって、これまで理論的には低親和性抗原特異的 IgE の存在が提唱されていたが、ヒトの臍帯血 IgE で初めてその存在が証明された。この IgE は抗原との親和性が低く、肥満細胞の Fc R1 に結合してもヒスタミン遊離シグナル伝達を引き起こさないことが判明した。このことは、胎児血や臍帯血にはアレルギー反応を起こすレベルのアレルゲンが存在するにもかかわらず、胎児にアトピー、食物アレルギーがないのは、胎児血や臍帯血の抗原特異的 IgE が低親和性のためと推定された。

一方 6 ヶ月、14 ヶ月齢乳児血の高親和性 OVM 特異的 IgE 抗体は、Hyper Mutation による Affinity Maturation の結果と考えられ、これらの抗体を持つ乳児のアトピー、食物アレルギーの発症に関与していると推測された。低親和性抗体から高親和性抗体への変化は、繰り返される抗原刺激による Hyper Mutation の結果であることから、生後 6 ヶ月までの間の抗原刺激を避けることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性が示唆される。抗原刺激では、消化酵素による消化を受けない抗原が最も強い抗原刺激性のあることから、抗原の経皮感作が Hyper Mutation の有力なきっかけになる

と推定された。

#### E . 結論

臍帯血の抗原特異的 IgE 抗体は、低親和性抗原特異的 IgE 抗体で、肥満細胞からのスタミン遊離を引き起こさない。しかし、生後 6 - 14 ヶ月までの間に、低親和性 IgE 抗体は高親和性 IgE に成熟することが推定された。このことから、生後 6 - 14 ヶ月までの抗原刺激を低下させることでアレルギー、アトピーの発症を抑制できる可能性を示唆した。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表 (平成 25 年度)

< 論文発表 >

1. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. **J Allergy Clin Immunol** 131 (2), 590-592, 2013.
2. Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H: Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. **J Allergy Clin Immunol** 133 (3), 904-905, 2014.

< 学会発表 >

1. 亀村典生, 川本典生, 深尾敏幸, 近藤直実, 鈴木宏一, 窪田賢司, 木戸博: 出生から生後14ヶ月までの食物抗原特異的抗体価の変動についての検討. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 横浜, 2013. 5. 11- 12.
2. 品原和加子, 澤淵貴子, 亀村典生, 窪田賢司, 鈴木宏一, 木戸博: カルボキシル化DLC抗体チップを用いたアレルギー性食物抗原の高感度定量測定. **第25**

**回日本アレルギー学会春季臨床大会**、  
横浜、2013. 5. 11- 12.

3. 木戸博、亀村典生、多田仁美、品原和加子、鈴木宏一、窪田賢司: アレルギーの診断、発症、寛解の病態評価に必要な血液と粘膜の抗原量の新規高感度定量測定. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
4. 窪田賢司、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、大矢幸弘、森田英明、市岡隆男、木戸博: 患者の採血負担を最小限にした低侵襲性高感度DLCマルチアレルゲンチップの有用性. **第25回日本アレルギー学会春季臨床大会**、横浜、2013. 5. 11- 12.
5. 品原和加子、亀村典生、多田仁美、鈴木宏一、窪田賢司、木戸博: アレルギー診断・発症・寛解の病態評価に必要な血中アレルゲン量の新規高感度定量測定法. **第63回日本アレルギー学会秋季学術大会**、東京、2013. 11. 28- 30.

## H . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

< 特許取得 >

1. 特許第 5322240 号、アレルギー疾患の判定方法及びアレルギー疾患の判定キット、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
2. 特許第 5322242 号、ダイヤモンドチップへの蛋白質/ペプチドの固定化方法、特許権者、国立大学法人徳島大学、発明者、木戸博、多田仁美、澤淵貴子
3. 特許第 5342997 号、アレルギー疾患の判定方法、特許権者、国立大学法人徳島大学、オリエンタル酵母工業株式会社、木戸博、鈴木宏一

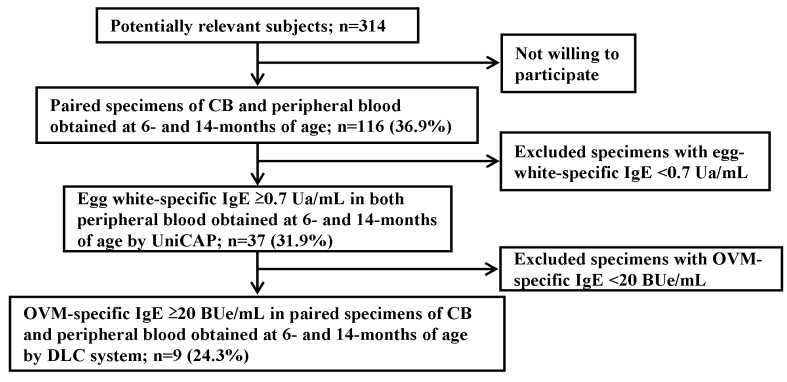


図1、検体測定に用いた患者群。抗 OVM IgE 抗体を保有する 9 名の乳児の臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体を用いた。

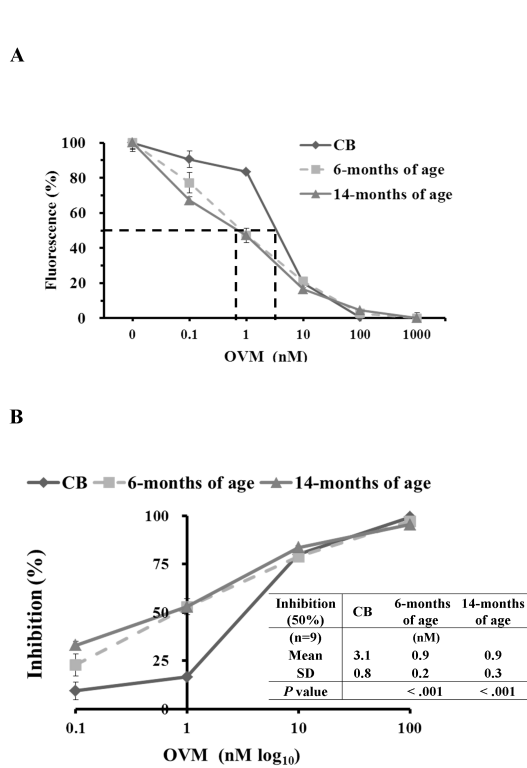


図2、OVM 固相化基板への抗 OVM IgE 抗体の結合反応における種々の濃度の OVM による結合の競合阻害反応(A)。各検体に対する 50%結合阻害に要する OVM 濃度(B)。

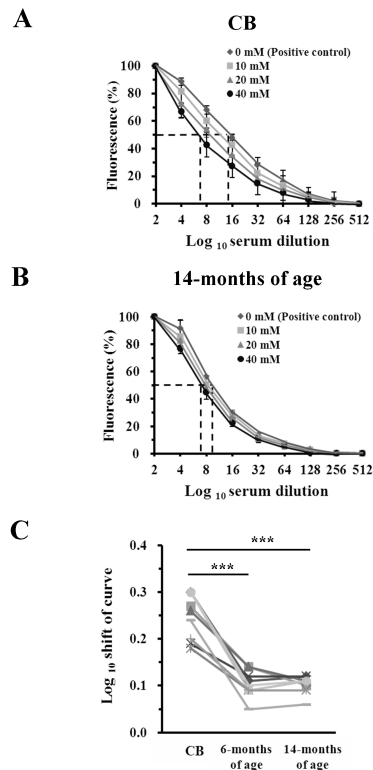
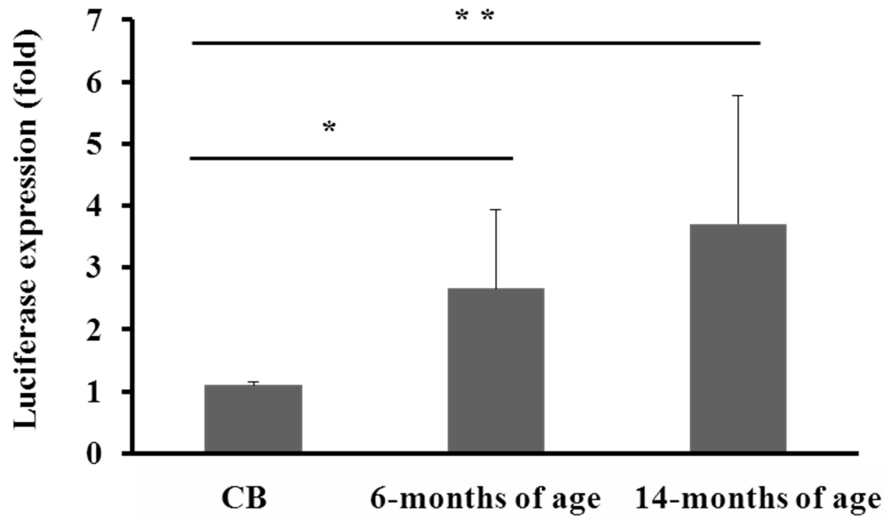


図3、臍帯血検体(A)、14 ヶ月齢検体(B)の DEA による抗 OVM IgE 抗体の OVM 固相化基板への結合阻害効果と、DEA 存在下における臍帯血、6 ヶ月齢、14 ヶ月齢検体の 50% 結合に要する検体の希釈倍率(C)。



**図4**、臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の抗-OVM 特異的 IgE 抗体の Fc R1 を介するシグナル伝達の検証

ヒトの Fc R1 を導入し、ヒスタミン遊離シグナル伝達系としてルシフェラーゼレポーターを組み込んだ肥満細胞類似系(RS-ATL8)を使用して、1 nM の OVM 抗原存在下に各検体のヒスタミン遊離シグナル伝達系を検証した。測定値は、OVM の無い無刺激時の値を1として臍帯血、6ヶ月齢、14ヶ月齢乳児の血液の値を示した。なお、各検体は抗-OVM 特異的 IgE 抗体価として 100 BUe/mL に合わせて評価した。

## 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
Matsumoto K, <u>Saito H</u>	Epicutaneous immunity and onset of allergic diseases -per-"eczema"tous sensitization drives the allergy march	<b>Allergol Int</b>	62 (2)	291-296	2013
<u>Kubo A</u> , Shiohama A, <u>Sasaki T</u> , Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J-i, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, <u>Niizeki H</u> , Kabashima K, Mitsunashi Y, <u>Amagai M</u>	Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis	<b>Am J Hum Genet</b>	93 (5)	945-856	2013
Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Ishino T, Imon K, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, <u>Sugai M</u>	The first case of septicemia caused by imipenem-susceptible, meropenem-resistant Klebsiella pneumoniae	<b>Ann Lab Med</b>	88 (1)	182-184	2013
Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, Kato F, Kayama S, <u>Sugai M</u>	Emergence of Staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B	<b>Antimicrob Agents Chemother</b>	57 (12)	6131-6140	2013
Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, <u>Kido H</u> , Takahashi T, <u>Ohya Y</u> , <u>Saito H</u> , Matsumoto K	Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2.	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	131 (2)	590-592	2013
<u>Sasaki T</u> , Shiohama A, <u>Kubo A</u> , Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, <u>Amagai M</u>	A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	132 (5)	1111-1120	2013
Yoshida K, Yokouchi M, <u>Nagao K</u> , Ishii K, <u>Amagai M</u> , <u>Kubo A</u>	Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis	<b>J Dermatol Sci</b>	71 (2)	89-99	2013
Hata T, Nishimoto S, <u>Nagao K</u> , Takahashi H, Yoshida K, Ohyama M, Yamada T, Asano K, <u>Amagai M</u>	Ectopic expression of epidermal antigens renders the lung a target organ in paraneoplastic pemphigus.	<b>J Immunol</b>	191 (1)	83-90	2013

Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S, Hirakawa H, Itaha H, Ohge H, Gotoh N, Usui T, Matsubara A, <u>Sugai M</u>	Identification and characterization of a novel aac(6')-Iag associated with the blaIMP-1-integron in a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa	<b>PLoS One</b>	8 (8)	e70557	2013
<u>Kubo A</u> , Ishizaki I, Kubo A, Kawasaki H, <u>Nagao K</u> , Ohashi Y, <u>Amagai M</u>	The stratum corneum comprises three layers with distinct metal-ion barrier properties	<b>Sci Rep</b>	3	1731	2013
Kanda S, <u>Sasaki T</u> , Shiohama A, Nishifuji K, <u>Amagai M</u> , Iwasaki T, Kudoh J	Characterization of canine filaggrin gene structure and protein expression in dog skin	<b>Vet Dermatol</b>	24 (1)	25-31	2013
Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, <u>Kido H</u>	Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth.	<b>J Allergy Clin Immunol</b>	133 (3)	904-905	2014

## 日本語論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
久恒順三, 達川伸行, 佐藤祐介, 加藤文紀, 鹿山鎮男, 菅井基行	黄色ブドウ球菌	<b>感染症内科</b>	1(3)	275-285	2013
<u>久保亮治</u>	皮膚バリア機能障害からみたアトピー性疾患の病態解明	<b>日本小児科医学会報</b>	45	31-37	2013
<u>久保亮治</u>	バリア異常からみたアトピー性皮膚炎の病態と治療	<b>日本皮膚科学会雑誌</b>	123 (13)	2702-2706	2013
<u>久保亮治</u> , <u>天谷雅行</u>	経皮感作はなぜ重要か? 皮膚バリア障害からみたアトピー疾患	<b>皮膚アレルギーフロンティア</b>	11 (3)	131-135	2013
川崎洋, <u>天谷雅行</u>	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	<b>臨床免疫・アレルギー科</b>	59 (2)	153-159	2013
<u>大矢幸弘</u>	経皮感作とアレルギー スキンケアによるアトピー性皮膚炎の発症予防	<b>臨床免疫・アレルギー科</b>	59(5)	581-586	2013
<u>佐々木貴史</u> , <u>天谷雅行</u>	アトピー性皮膚炎の皮膚バリアからみた病態	<b>臨床免疫・アレルギー科</b>	60 (3)	276-281	2013

## 英語書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
<u>Kubo A</u> , <u>Nagao K</u> , <u>Amagai M</u>	3D visualization of epidermal Langerhans cells	Has C., Sitaru C	<b>Methods in Molecular Biology 961: Molecular Dermatology Methods and Protocols</b>	Humana Press	NY	119-127	2013