

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)))

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 2 6 年度 総括研究報告書

研究代表者 天谷 雅行

平成 2 7 (2 0 1 5) 年 5 月

目 次

・平成26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
研究代表者 慶應義塾大学医学部 皮膚科学 教授 天谷 雅行

・平成26年度分担研究報告

- 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.....11
(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
- アトピー性皮膚炎診療ガイドラインの作成.....14
京都府立医科大学大学院医学研究科 皮膚科学 教授 加藤 則人
- 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.....17
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
- 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.....23
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
- 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.....26
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 佐々木 貴史
- アトピー性皮膚炎モデルマウスの作成と解析.....29
慶應義塾大学医学部 皮膚科学 専任講師 久保 亮治

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.....32
(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 松井 毅

. 研究成果の刊行に関する一覧表.....35

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)))
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 (AD) 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 AD 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。H26 年度において、基礎研究では、アトピー性疾患発症関連遺伝子として昨年新規同定された Tmem79 を欠損したマウス (Tmem79 KO マウス) を作成し、モデルマウスを確立した。また、ヒト皮膚におけるタイトジャンクション (TJ) バリアとランゲルハンス細胞 (LC) の挙動を観察し、アトピー性皮膚炎患者皮膚において認められる inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) は、LC よりも表皮内の深い場所に位置しており、その樹状突起を水平方向に伸ばし、TJ バリアとはドッキングしていないことを明らかにした。スキンケアによる乳児湿疹・AD 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 AD の発症予防に有効であることが世界で初めて示された。ハイリスク新生児 (両親兄弟に AD がある) 118 名を対象に、ランダムに介入群 59 名、コントロール群 59 名に割り付けし、介入群には連日全身に乳液タイプの保湿剤を塗布し、32 週までの AD の累積発症率をコントロール群 (沐浴と乾燥時のみの保湿剤塗布) と比較した。コントロール群では 28 名が発症しているのに対して、介入群では 19 名のみ AD を発症しており、介入群では AD の発症を 32% 減らすことができた。本年度は、ここ数年の本研究班での活動が大きな成果として形になった年であり、次年度以降の研究展開がさらに期待される。

研究分担者

斎藤 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
加藤 則人 京都府立医科大学大学院 医学研究科 皮膚科学 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
松井 毅 (独) 理化学研究所 統合生命医科学研究センター (IMS) ・皮膚恒常性研究チーム 上級研究員
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

昨年度までの研究により、Flaky tail マウスの皮膚炎原因変異が Tmem79 p.Y280* である事を同定した。この Flaky tail マウスは、CBA マウスコロニーから突然変異体として分離され C57BL/6 と交配されたマウスであるが、7 割程度しか C57BL/6 マウスゲノムと置き換えられていない事、Tmem79 が存在する染色体上の近接領域に FLG を含む皮膚分化に關与する遺伝子がクラスターする Epidermal Differentiation Complex 領域が存在し、皮膚の表現型にこの領域に含まれている未知の遺伝子変異が寄与している可能性を否定できない事から、Tmem79 ノックアウト (KO) マウスを作製した。さらに、Tmem79KO マウスと matted マウスの表現型の比較検討を行った。

2) アトピー性皮膚炎におけるタイトジャンクションバリア (TJ) と表皮内樹状細胞動態の解析

正常皮膚およびアトピー性皮膚炎患者より採取した紅斑部皮膚より単離した表皮シートを用いて、TJ 関連分子および各種

の表皮内樹状細胞マーカーを用いた whole mount 染色を行い、コンフォーカル顕微鏡を用いた 3 次元観察により、TJ バリアと樹状細胞の形態観察を行った。

3) アトピー由来黄色ブドウ球菌の新たな遺伝子改変法の開発及び病原因子候補遺伝子の解析

これまでに、フィラグリンノックアウトマウスを用いて、アトピー性皮膚炎患者由来黄色ブドウ球菌 (AD 株) がフィラグリン KO マウスの皮膚に選択的に定着する事を明らかにした。AD 株は常法による遺伝子改変が不可能だったため、新たな遺伝子改変法の開発を試みた。CRISPR/Cas9 技術を用いた黄色ブドウ球菌用プラスミドを作製し、本菌の宿主への固着に関わると考えられる関連遺伝子のノックアウト/ノックダウンを試みた。また、AD 株が特異的に保有するエンテロトキシン様タンパク毒素について、mRNA の発現量を AD 株と非 AD 株とで比較した。

4) 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

2010 年 11 月から 2013 年 11 月までの 3 年間にハイリスク新生児 (両親兄弟に AD がある) 118 名を対象に、ランダムに介入群 59 名、コントロール群 59 名に割り付けした。介入群には連日全身に乳液タイプの保湿剤を塗布し、32 週までの AD の累積発症率をコントロール群 (沐浴と乾燥時のみの保湿剤塗布) と比較した。また、皮膚バリア機能 (TEWL/SCH/pH)、抗原特異的 IgE 抗体価も比較した。

5) アトピー性皮膚炎診療ガイドラインの作成

皮膚科診療を専門とする医師を対象として、新たに公表された臨床研究データと既存のガイドラインとの関連性についてレビューし、これまでの推奨の根拠となっているエビデンスをより強化するなど存在するエビデンスギャップを埋める診療ガイドラインを作成する。

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

Tmem79 遺伝子の exon2,3 を欠失した

C57BL/6N ES 細胞の受精卵への注入によりキメラマウスを樹立し、C57BL/6N と交配する事により F1 世代のマウスを得た。PCR により Tmem79 exon2,3 を欠失するマウスをスクリーニングし、さらに交配し Tmem79 欠損マウスを得た。Tmem79 欠損マウスでの Tmem79 mRNA 及びタンパク質の発現を確認した結果、matted マウスでは野生型マウスと比較し mRNA が半減するが N 末側部分タンパク質が検出されたのに対し、Tmem79 欠損マウスでは Tmem79 mRNA 及びタンパク質は確認されず、Tmem79 遺伝子が完全欠損していた。樹立した Tmem79 欠損マウスは、matted マウスと同時期に類似部位に皮膚炎を発症することから、皮膚炎の程度を比較するために Tmem79 欠損マウスと matted マウスの skin severity score、搔爬回数、TEWL などを詳細に比較した結果、同程度の皮膚炎を発症していた。

2) アトピー性皮膚炎におけるタイトジャンクションバリアと表皮内樹状細胞動態の解析

正常皮膚において、MHC class II が核周囲に集積している定常状態のランゲルハンス細胞は、常に TJ バリアの内側に存在していた。一方 MHC class II が細胞膜表面に移動した活性化 LC は、樹状突起を TJ バリアとドッキングさせており、その樹状突起の先端には langerin 分子の集積が観察され、TJ バリア外からの抗原取得が活性化していると考えられた。次に、アトピー性皮膚炎患者の紅斑部皮膚の観察を行った。アトピー性皮膚炎表皮には、LC の他に、langerin 陰性の inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) と呼ばれる樹状細胞が出現する。紅斑部では、TJ バリアのバリア機能が保たれた状態で、活性化して TJ バリアと樹状突起をドッキングさせた LC の数が増えていた。一方 IDEC は LC よりも表皮内の深い場所に位置しており、周囲のランゲルハンス細胞が活性化した状態においても、その樹状突起を水平方向に延ばし、TJ バリアとはドッキングしていなかった。LC と IDEC のいずれも、アトピー性皮膚炎皮膚では IgE に対する高親和性 FcεR1

レセプターを発現していた。活性化し TJ とドッキングした LC において、langerin が樹状細胞先端に集積したのに対し、FcεR1 は細胞膜全体に均等に分布し、樹状突起先端には濃縮していなかった。

3) アトピー由来黄色ブドウ球菌の新たな遺伝子改変法の開発及び病原因子候補遺伝子の解析

作製したゲノム編集プラスミドを黄色ブドウ球菌に導入することで Cas9 の mRNA が発現することを確認した。このプラスミドに *icaA* 特異的 guideRNA の配列を組み込み、目的の変異を含む一本鎖 DNA オリゴを共導入することで、*icaA* のノックアウト株が作製できたが、その効率は 2% 以下と非常に低かった。一方 CRISPRi は表層タンパク遺伝子上流配列を guideRNA として組み込むことで、RNA レベルで約 1/10、タンパクレベルで検出限界以下までその発現が低下し、菌の凝集能の低下を確認した。

AD 株では非 AD 株と比べ培養初期 (3h) での毒素の発現が高いことが明らかになった。また組換え毒素の投与群ではコントロール群と比べ、被験マウスの全身の皮膚表面の血管の拡張と紅潮が認められた。さらに、興味深い事に、被験動物の全身における産毛の消失が認められた。

4) 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

生後 32 週の時点で、介入群では 19 名が AD を発症しているのに対し、コントロール群では 28 名が発症しており、介入群ではアトピー性皮膚炎の発症を 32% 減らすことができた。(Log rank test $p=0.012$) 卵白抗原への感作率は両群で有意差は認められなかったが、皮疹のある群と無い群で比較すると有意に皮疹のある群で感作率が高いことが分かった。牛乳抗原の感作率に有意差はなかったが、介入群が低い傾向が認められ、特異的 IgE 抗体価は介入群が有意に低かった。

5) アトピー性皮膚炎診療ガイドラインの作成

本年度までに計 6 回の作成委員会を開催し、重要臨床課題を基に患者にとって重要なアウトカムを改善するために必要な問題を重要臨床課題として 20 件程度設定し、文献を検索し、エビデンスの評価と統合で

求められたエビデンスの強さ、益と害のバランスのほか、患者の価値観の多様性、経済学的な視点も考慮して、推奨とその強さを決定した。また、これらのエビデンスをもとにした解説文を第1章として記載し、第4章には構造的抄録を付記した診療ガイドラインを作成中である。

D . 考察

本年度、ヒト皮膚におけるタイトジャンクション (TJ) バリアとランゲルハンス細胞 (LC) の挙動を観察し、アトピー性皮膚炎患者における LC を含む表皮内樹状細胞の動態を解析することで、TJ バリアと表皮内樹状細胞がアトピー疾患の病態形成にどのように関わるについて解析した。ヒト表皮においても、マウスと同じく活性化した LC は TJ バリア外からの抗原取得を行うと考えられ、外来因子に対する先制免疫の獲得に役立つ一方で、外来抗原に対するアレルギー感作を引き起こしていることが考えられた。アトピー性皮膚炎皮膚では、本機構が活性化することにより、更なるアレルギー感作を促進し、皮膚炎のみならず食物抗原などへの感作の拡大を引き起こしアトピーマーチの成立に関わる可能性が示唆された。また、アトピー性皮膚炎患者皮膚において認められる inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) は、LC よりも表皮内の深い場所に位置しており、その樹状突起を水平方向に延ばし、TJ バリアとはドッキングしていないことが初めて観察された。LC と IDEC の 2 種類の樹状細胞の挙動の相違点を明らかにすることは、アトピー性皮膚炎発症機序の解明に重要な知見を与えた。

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が世界で初めて示された。コントロール群では 28 名が発症しているのに対して、介入群では 19 名のみ AD を発症しており、介入群ではアトピー性皮膚炎の発症を 32% 減らすことができた。本介入試験において、成育医療センターでは出生児に全員白色ワセリンを 20g 配布しており、またコントロール

群でも倫理的な問題から保湿剤の使用を禁止しなかった。そのためコントロール群でも保湿剤を一部使用していたが、量は 0.101g/日と介入群(7.86g/日)に比較しわずかな量であり、保湿剤使用群と非使用群の比較として問題の無い量と判断した。保湿剤を一切使用しないコントロール群を設定することが可能であった場合は、介入群との差はさらに顕著になったと想像される。卵白感作に関しては、保湿剤塗布では予防効果は認められなかったが、本研究で使用した測定法は非常に感度の高い新測定法であり臍帯血でも特異的 IgE 抗体が検出されている。従って、必ずしも生後感作を受けたとは限らないこと、また食物アレルギーの有無については負荷試験による診断ができていないことから、さらなる精査が必要であるが、スキンケアによる AD 発症予防が食物アレルギーの予防にもつながる可能性は十分考えられた。

アトピー性皮膚炎ガイドラインの策定は、アトピー性皮膚炎の患者が、その居住する地域にかかわらず等しく科学的見地に基づく適切な医療を受けることができるようにするために喫緊の課題である。今後、アトピー性皮膚炎の診療の均霑化のためには、アトピー性皮膚炎の診療に携わるすべての医師が用いることを想定した新たなガイドラインの作成を視野に入れて準備を進めていくことが重要と考える。

E . 結論

本年度は、皮膚炎発症に重要な役割を担う表皮樹状細胞の実態が明らかにされ、アトピー性皮膚炎発症病態の解明に寄与したのみならず、ランダム化介入試験により、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可能であることが示された。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、抑制する方法論を確立する上で大きな節目となる成果をあげることができた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表 (平成 26 年度)

< 論文発表 >

《英語論文》

1. Daito J, Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, 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.
2. Masaki K, Suzuki Y, Kagawa S, Kodama M, Kabata H, Miyata J, Tanaka K, Fukunaga K, Sayama K, Oguma T, Kimura T, Amagai M, Betsuyaku T, Asano K: Dual role of interleukin-23 in epicutaneously-sensitized asthma in mice. **Allergol Int** 63 (Suppl 1), 13-22, 2014.
3. Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, Katoh N: Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol** 70 (5), 882-888, 2014.
4. Asai J, Harada Y, Beika M, Takenaka H, Katoh N, Takamatsu T: Photodynamic diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in mouse squamous cell carcinoma. **J Dermatol Sci** 74 (2), 171-173, 2014.
5. 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.
6. 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.
7. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, Katoh N, Asai J: Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. **J Cutan Pathol** 41 (7), 561-567, 2014.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Matsumoto K, Saito H: Eczematous sensitization, a novel pathway for allergic sensitization, can occur in an early stage of eczema. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 134 (4), 865-866, 2014.
12. 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.
13. 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.
14. Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai M: Tripoli metallo-beta-lactamase-I (TMB-1)-producing Acinetobacter spp. with decreased resistance to imipenem in Japan. **Antimicrob Agents Chemother** 58 (4), 2477-2478, 2014.
15. Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, Katoh N, Sakai T: The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells. **PLoS One** 9 (11), e113217, 2014.
16. Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, Murota H, Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S,

- Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, Katoh N: Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8. **Br J Dermatol** 172 (1), 272-275, 2015.
17. 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.
 18. Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, Kuwahara R, Kakuhama 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.
 19. 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.
 20. Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, Katoh N: Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis. **J Invest Dermatol** 135 (2), 411-417, 2015.
 21. Kido-Nakahara M, Katoh N, Saeki H, Mizutani H, Hagihara A, Takeuchi S, Nakahara T, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nakagawa H, Omoto Y, Matsubara K, Furue M: Comparative Cut-off Value Setting of Pruritus Intensity in Visual Analogue Scale and Verbal Rating Scale. **Acta Derm Venereol** 95 (3), 345-346, 2015.
 22. Horimukai K, Hayashi K, Tsumura Y, Nomura I, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Total serum IgE level influences oral food challenge tests for IgE-mediated food allergies. **Allergy** 70 (3), 334-337, 2015.
 23. Matsui T, Amagai M: Dissecting the formation, structure, and barrier function of the stratum corneum. **Int Immunol** (epub, doi: 10.1093/intimm/dxv013), 2015.
- 《日本語論文》
1. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の生活指導に生かしたい最近の知見. **日本小児皮膚科学会雑誌**, 33 (1), 19-22, 2014.
 2. 加藤則人: 皮膚疾患のQOL評価. **MB Derma**, 216 219-224, 2014.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 加藤則人: アトピー性皮膚炎の心身医学的な診療スキル-コミュニケーションスキルを中心に. **臨床免疫・アレルギー科**, 61 (6), 633-637, 2014.
 6. 加藤則人: 小児アトピー性皮膚炎の治療アドヒアランスを高めるために. **日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌**, 8 (3), 143-146, 2014.
 7. 加藤則人: 診療に生かしたいアトピー性皮膚炎の最近の話題. **日本臨床皮膚科医学会雑誌**, 31 (4), 494-496, 2014.
 8. 加藤則人: アトピー性皮膚炎のproactive療法. **アレルギーの臨床**, 34 (10), 841-845, 2014.
 9. 加藤則人: プロアクティブ療法. **MB Derma**, (224), 25-29, 2014.
 10. 加藤則人: アドヒアランスから考える外用薬の現状. **Progress in Medicine**, 34 (12), 2095-2098, 2014.
 11. 久保亮治: 皮膚表皮が持つバリア構造と機能からみたアレルギー疾患治療戦略. **薬学雑誌**, 134 (5), 623-627, 2014.
 12. 久保亮治: 皮膚バリア構造・機能のイメージング手法. **感染・炎症・免疫**, 44 (2), 120-130, 2014.
 13. 久保亮治: 皮膚バリアとタイトジャンクション. **炎症と免疫**, 22 (4), 2014.
 14. 久保亮治: 角層の形成機構と先天性角層バリア破綻疾患. **日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号**, 124 (13), 2672-2674, 2014.
 15. 久保亮治, 天谷雅行: 表皮バリア不全と経皮感作が招くアレルギー疾患. **実験医学**, 33 (4), 563-569, 2015.

< 学会発表 >
《英語発表》

1. Masaki K, Suzuki Y, Kagawa S, Kodama M, Kabata H, Miyata J, Tanaka K, Fukunaga K, Sayama K, Oguma T, Amagai M, Asano K, Betsuyaku T: Dual role of interleukin-23 in epicutaneously-sensitized asthma in mice. **第54回日本呼吸器学会学術講演会**, 大阪, 2014. 4. 25- 27.
2. 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.
3. Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M: Mutations in SERPINB7, encoding a serine protease inhibitor, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis **73rd Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology**, Albuquerque, New Mexico, USA, 2014. 5. 7- 10.
4. Amagai M: How much do we learn from mouse models for human atopic dermatitis? **11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology**, Heidelberg, Germany, 2014. 6. 11- 14.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Amagai M: Skin barrier dysfunction and atopic dermatitis. **24th International Symposium of Itch**, 東京, 2014. 10. 18.
9. Amagai M: Dissecting function and dysfunction of skin barriers in atopic dermatitis. **The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Osaka, Japan, 2014. 12. 12- 14.
10. 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.
11. Suzuki Y, Kagawa S, Masaki K, Tanosaki T, Fukunaga K, Betsuyaku T, Amagai M, Asano K: Tape stripping of stratum corneum reduces airway eosinophilic inflammation in a murine asthma model. **2015 AAAAI Annual Meeting (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology)**, Houston, Texas, USA, 2015. 2. 20- 24.
12. 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.
13. Amagai M: Skin Barrier Dysfunction and Atopic Dermatitis. **University of Minnesota Department of Dermatology Research Day and Grand Rounds**, Minnesota, USA, 2015. 3. 25.

《日本語発表》

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. 天谷雅行: 皮膚におけるバリア機能とその破綻. **第51回日本臨床分子医学会学術集会**, 東京, 2014. 4. 11- 12.
3. 天谷雅行: 皮膚バリア障害とアトピー性皮膚炎. **千葉県皮膚科医会総会・学術講演会**, 千葉, 2014. 4. 12.
4. 天谷雅行: 天疱瘡とアトピー性皮膚炎. **Advanced Seminar Series on Microbiology & Immunology**, 大阪, 2014. 4. 24.
5. 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.

6. 正木克宜, 鈴木雄介, 加川志津子, 加畑宏樹, 福永興巻, 小熊剛, 天谷雅行, 別役智子, 浅野浩一郎: 経皮感作喘息モデルにおけるIL-23の役割. **第26回日本アレルギー学会春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9- 11.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 森田久美子, 堀向健太, 近藤麻伊, 成田雅美, 新関寛徳, 佐合治彦, 大矢幸弘, 斎藤博久: 新生児期からのスキンケアによる乳児アトピー性皮膚炎の発症予防. **第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9- 13.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 天谷雅行: 皮膚バリア機能とその破綻. **LEGEND/Abcam Seminar**, 東京, 2014. 9. 18.
21. 林光葉, 広田朝光, 佐伯秀久, 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: 日本人の尋常性乾癬およびアトピー性皮膚炎患者における36カ所の乾癬疾患感受性遺伝子部位の解析. **第29回日本乾癬学会学術大会**, 高知, 2014. 9. 19- 20.
22. 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.
23. 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.
24. 加藤則人: 小児アトピー性皮膚炎の治療 - 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.
25. 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.
26. 天谷雅行: 皮膚バリアとその破綻. **国立成育医療研究センター 第20回アレルギー臨床懇話会 / 第1回せたたま小児皮膚**

フォーラム特別合同講演会, 東京, 2014.
10. 16.

27. 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回本小児アレルギー学会**, 四日市市, 2014. 11. 8- 9.
28. 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.
29. 天谷雅行: 皮膚バリア機能障害とアトピー性皮膚炎. **第10回知っておきたい皮膚疾患研究会**, 盛岡, 2014. 11. 27.
30. 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.
31. 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.
32. 天谷雅行: イメージング技術により明らかにされた皮膚バリア機構. **免疫疾患イメージングシンポジウム**, 東京, 2015. 2. 12.
33. 天谷雅行: 皮膚バリア破綻とアトピー性皮膚炎. **第47回東京都皮膚科医会学術集会 / 第48回臨床研究会**, 東京, 2015. 3. 7.

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 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/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
発明の名称: アレルギー疾患モデル動物

< 実用新案登録 >

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

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
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
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
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 教授
菅井 基行 広島大学大学院医歯薬学保健学研究院 細菌学 教授

研究要旨

小児アレルギー疾患の発症は、乳児期早期のアトピー性皮膚炎がその後の食物アレルギー等アレルギー疾患のリスクファクターであることがわかってきた。これまで、アレルギー疾患発症予防に関して行われた臨床研究介入試験はいずれも発症予防と明記した主要評価項目を達成したものはなかった。我々は、新生児期早期からの保湿剤塗布による介入が生後 32 週までのアトピー性皮膚炎累積発症率を低下させるという主要評価項目を事前登録し、ランダム化比較試験を実施し、32%発症リスクを低下させるという主要評価項目を満たす結果を世界で初めて得ることができた。

研究協力者

堀向 健太 (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
森田久美子 同生体防御系内科部
アレルギー科医師
成田 雅美 同生体防御系内科部
アレルギー科医師
松本 健治 同研究所
免疫アレルギー研究部長
井上 栄介 同社会・臨床研究センター
生物統計室長
左合 治彦 同周産期センター長

ってきた。そこで AD を発症する前の新生児期からバリア機能を補強するケアを行うことで AD を予防できるのではないかと考え、ハイリスク新生児を対象に新生児からの保湿剤塗布が AD の発症予防に有効かをランダム化比較試験によって検証した。

B . 研究方法

2010 年 11 月から 2013 年 11 月までの 3 年間にハイリスク新生児(両親兄弟に AD がある)118 名を対象に、ランダムに介入群 59 名、コントロール群 59 名に割り付けした。介入群には連日全身に乳液タイプの保湿剤を塗布し、32 週までの AD の累積発症率をコントロール群(沐浴と乾燥時のみの保湿剤塗布)と比較した。また、皮膚バリア機能 (TEWL/SCH/pH)、抗原特異的 IgE 抗体価も比較した。

A . 研究目的

アトピー性皮膚炎 (AD) 発症の予防方法は様々な研究が行われてきたが未だ確立されていない。特に、経皮感作という概念が生まれてからは、小児領域において AD の予防が重要な課題となっていた。近年 AD の病態解明が進み、皮膚バリア機能の破綻が発症と増悪に関与していることが分か

C . 研究結果

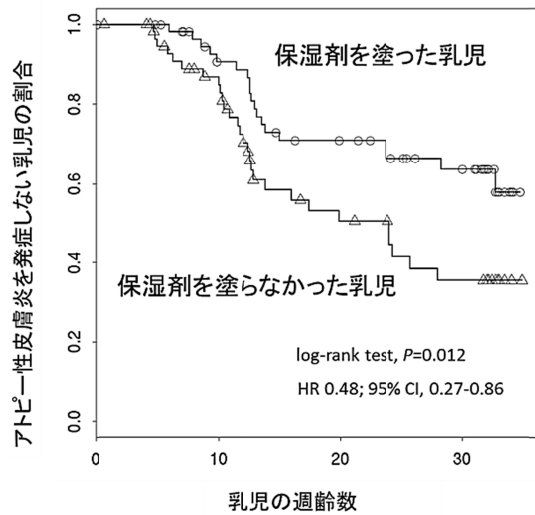


図 1 .

生後 32 週の時点で、介入群では 19 名が AD を発症しているのに対し、コントロール群では 28 名が発症しており、介入群ではアトピー性皮膚炎の発症を 32%減らすことができた(Log rank test $p=0.012$) (図 1)。

卵白抗原への感作率は両群で有意差は認められなかったが、皮疹のある群と無い群で比較すると有意に皮疹のある群で感作率が高いことが分かった(図 2 ; 分担研究者の木戸らが開発した微量検体で測定可能な高感度測定システムによる卵白特異的 IgE 抗体価 CAP-FEIA 換算値として 0.35 kUA/L 以上を感作ありと判定した時のオッズ比 2.86; 95% 信頼区間 1.22-6.73)。

D . 考察

国立成育医療研究センターでは出生児に全員白色ワセリンを 20g 配布しており、またコントロール群でも倫理的問題から保湿剤の使用を禁止しなかった。そのためコントロール群でも保湿剤を一部使用していたが、量は 0.101g/日を一ヶ月に一回以下塗布したのみであり、介入群(7.86g/日)に比較しわずかな量であり、保湿剤使用群と非使用群の比較として問題の無い量と判断した。

卵白感作に関しては、全ての症例でアトピー性皮膚炎発症後に感作が確認されたことから、アトピー性皮膚炎が食物抗原感作の引き金である可能性を示した国立成育医療研究センターの出生コホート研究など近年の観察研究を支持する結果であった。しかし、保湿剤塗布では予防効果は認められなかったことより、いったんアトピー性皮膚炎を発症すると抗原の取り込みが抑制できない可能性が示唆された。

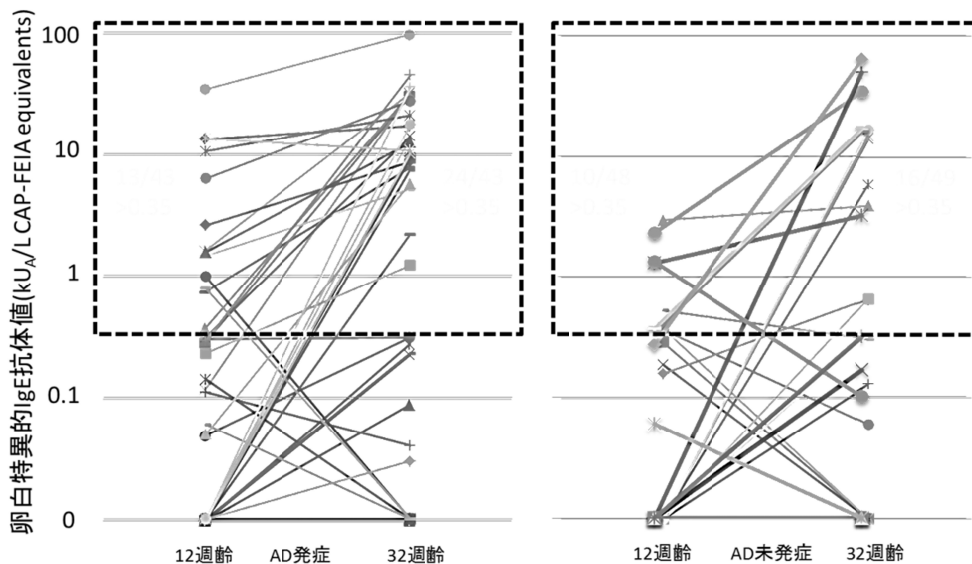


図 2 .

本研究で使用した測定法は非常に感度の高い新測定法であり臍帯血でも低親和性の特異的 IgE 抗体が検出されている。従って、必ずしも生後感作を受けたとは限らないこと、また食物アレルギーの有無については負荷試験による診断ができていないことから、さらなる精査が必要であるが、スキンケアによる AD 発症予防が食物アレルギーの予防にもつなげる可能性は十分考えられる。

E . 結論

新生児期からの全身の保湿剤塗布でアトピー性皮膚炎の発症を 32%減らすことができた。皮疹がある群で有意に感作率が高いことが分かり、皮疹が食物抗減感作のリスクであることが確認された。

F . 健康危険情報

保湿剤によると疑われる副反応は認めなかった。

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. Matsumoto K, Saito H: 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.
本原著論文の結果を広く周知する目的から、著作権を本研究費にて買い取り、Open accessとして営利目的以外の配布は全て自由に実施できることとした。
3. Horimukai K, Hayashi K, Tsumura Y, Nomura I, Narita M, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K: Total serum IgE level influences oral food challenge tests for IgE-mediated food allergies. **Allergy**, 70 (3), 334-337, 2015.
4. Horimukai K, Morita K, Inoue E, Saito H, Ohya Y: Reply. **J Allergy Clin Immunol**,

135 (4), 1088-1089, 2015.

< 学会発表 >

1. 森田久美子, 堀向健太, 近藤麻伊, 成田雅美, 新関寛徳, 佐合治彦, 大矢幸弘, 齋藤博久: 新生児期からのスキンケアによる乳児アトピー性皮膚炎の発症予防. **第26回日本アレルギー学会・春季臨床大会**, 京都, 2014. 5. 9- 13.

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
臨床試験登録番号: UMIN000004544

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

アトピー性皮膚炎診療ガイドラインの作成

研究分担者 加藤 則人 京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学 教授

研究要旨

皮膚科診療を専門とする医師を対象として、新たに公表された臨床研究データと既存のガイドラインとの関連性についてレビューし、これまでの推奨の根拠となっているエビデンスをより強化するなど存在するエビデンスギャップを埋める診療ガイドラインを作成することを目指している。これまでに合計 6 回の作成委員会を開催し、重要臨床課題を 20 件程度設定し、文献を検索し、エビデンスの評価と統合で求められたエビデンスの強さ、益と害のバランスのほか、患者の価値観の多様性、経済学的な視点も考慮して、推奨とその強さを決定した。また、これらのエビデンスをもとにした解説文を第 1 章として記載し、第 2 章には構造的抄録を付記した診療ガイドラインを作成している。

研究協力者

佐伯 秀久 日本医科大学皮膚科学
教授
中原 剛士 九州大学医学研究院
体表感知学講座准教授
田中 暁生 広島大学大学院
医歯薬保健学研究院
皮膚科学助教
椋島 健治 京都大学大学院
医学研究科皮膚生命科学
講座准教授
菅谷 誠 東京大学大学院
医学研究科皮膚科学
准教授
室田 浩之 大阪大学大学院
医学系研究科情報統合医学
皮膚科学准教授
海老原 全 慶應義塾大学医学部
皮膚科准教授
片岡 葉子 大阪府立呼吸器・アレルギー
医療センター皮膚科
主任部長
相原 道子 横浜市立大学大学院
医学研究科環境免疫病態
皮膚科学教授

江藤 隆史 東京通信病院
皮膚科部長
益田 浩司 京都府立医科大学大学院
医学研究科皮膚科学講師
峠岡 理沙 京都府立医科大学大学院
医学研究科皮膚科学助教

A . 研究目的

アトピー性皮膚炎は、科学的なエビデンスに基づく治療によって自然寛解も期待される疾患である。皮膚科診療を専門とする医師を対象として、新たに公表された臨床研究データと既存のガイドラインとの関連性についてレビューし、これまでの推奨の根拠となっているエビデンスをより強化するなど存在するエビデンスギャップを埋める診療ガイドラインを作成することを目的とする。

B . 研究方法

重要臨床課題を基に患者にとって重要なアウトカムを改善するために必要な問題を重要臨床課題として設定し、Medline,

Cochrane Library, 医学中央雑誌を用いて文献を検索し、エビデンスレベルの評価と統合で求められたエビデンス総体としてのエビデンスの強さ、益と害のバランスのほか、患者の価値観の多様性、経済学的な視点なども考慮して、GRADE システムを参考にして推奨とその強さを決定したものを第 4 章とする。メインアウトカムは、益として皮疹（医師の評価、患者の評価）、かゆみ、QOL、再燃回数、害として治療や検査などによる有害事象と無治療による有害事象とする。また、アトピー性皮膚炎の診療に重要な項目の解説文を第 1 章とする。

C . 研究結果

これまでに計 6 回の作成委員会を開催し、重要臨床課題を基に患者にとって重要なアウトカムを改善するために必要な問題を重要臨床課題として 20 件程度設定し、文献を検索し、エビデンスの評価と統合で求められたエビデンスの強さ、益と害のバランスのほか、患者の価値観の多様性、経済学的な視点も考慮して、推奨とその強さを決定した。また、これらのエビデンスをもとにした解説文を第 1 章として記載し、第 4 章には構造的抄録を付記した診療ガイドラインを作成中である。

D . 考察

アトピー性皮膚炎の患者が、その居住する地域にかかわらず等しく科学的見地に基づく適切な医療を受けることができるようにするためのリソースになるガイドラインを作ることは、喫緊の課題である。今後、アトピー性皮膚炎の診療の均霑化のためには、アトピー性皮膚炎の診療に携わるすべての医師が用いることを想定した新たなガイドラインの作成を視野に入れて準備を進めていくことが必要と考える。

E . 結論

新たに公表された臨床研究データと既存のガイドラインとの関連性をレビューし、エビデンスギャップを埋めた診療ガイドラインを作成している。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表（平成 26 年度）

< 論文発表 >

1. Daito J, Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, 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.
2. Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, Katoh N: Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol**, 70 (5), 882-888, 2014.
3. Asai J, Harada Y, Beika M, Takenaka H, Katoh N, Takamatsu T: Photodynamic diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in mouse squamous cell carcinoma. **J Dermatol Sci**, 74 (2), 171-173, 2014.
4. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, Katoh N, Asai J: Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. **J Cutan Pathol**, 41 (7), 561-567, 2014.
5. Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, Katoh N, Sakai T: The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells. **PLoS One**, 9 (11), e113217, 2014.
6. Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, Murota H, Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S, Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, Katoh N: Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8. **Br J Dermatol**, 172 (1), 272-275, 2015.
7. Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, Katoh N: Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis. **J Invest Dermatol**, 135 (2), 411-417, 2015.
8. Kido-Nakahara M, Katoh N, Saeki H, Mizutani H, Hagihara A, Takeuchi S, Nakahara T, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nakagawa H, Omoto Y, Matsubara K, Furue M: Comparative Cut-off Value Setting of Pruritus Intensity in Visual Analogue Scale and Verbal Rating Scale. **Acta Derm**

Venercol, 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 - 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

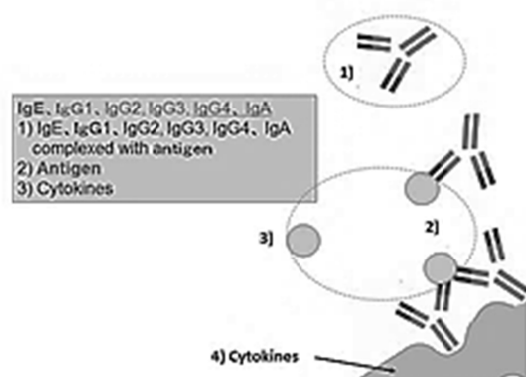


図 1 . アレルギー発症に関与する因子群

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っ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、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技術の開発

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、-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。

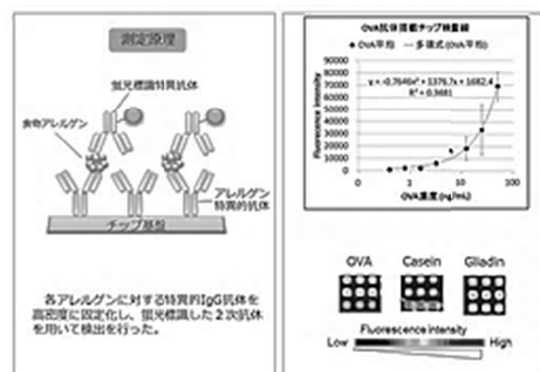


図 2 . 抗体固定化 DCP チップでのアレルゲン検出

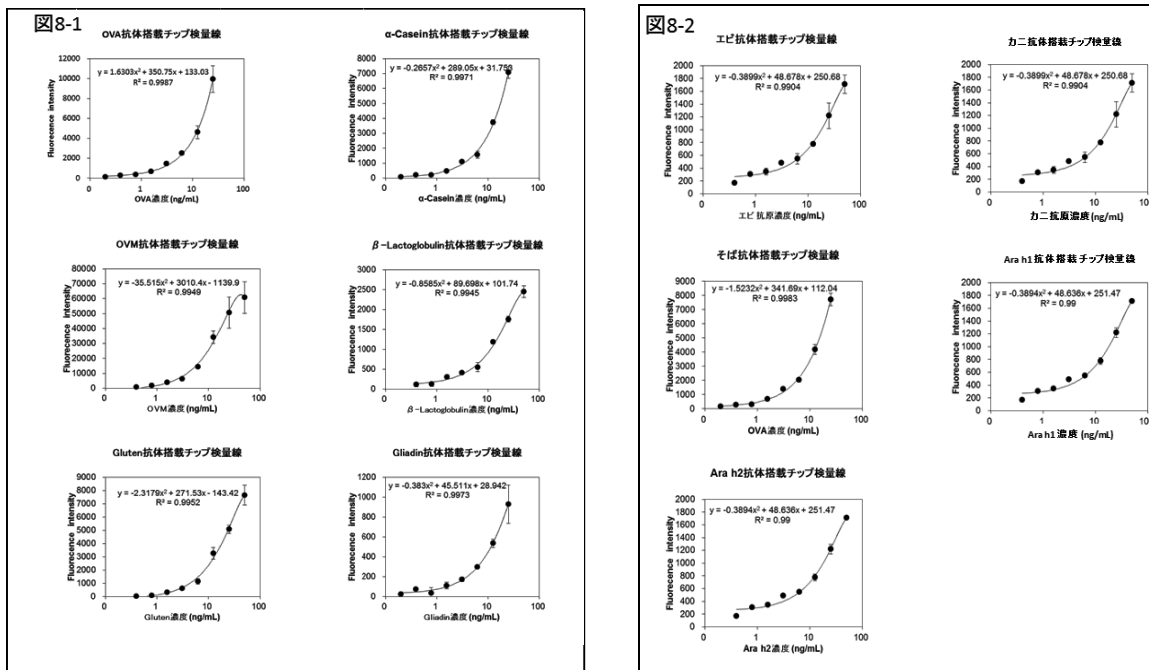


図3 . 各種抗原特異的 IgG を搭載したアレイでの抗原量の定量

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。

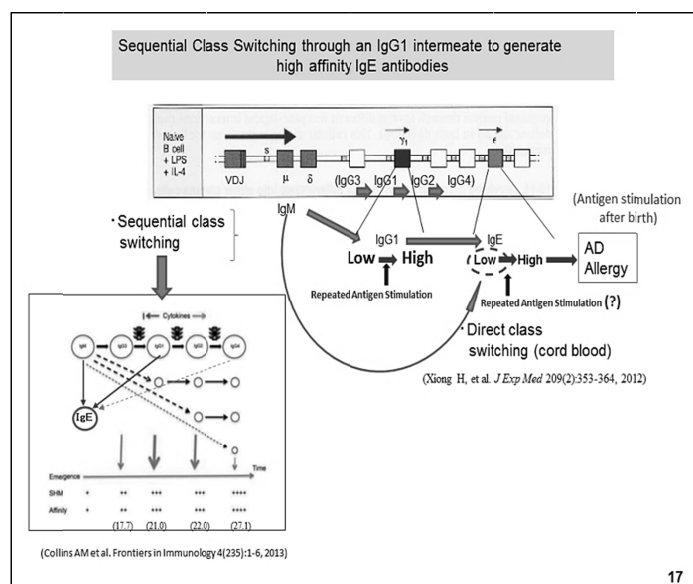


図4 . クラススイッチと Low affinity IgE, High affinity IgE の産生機序

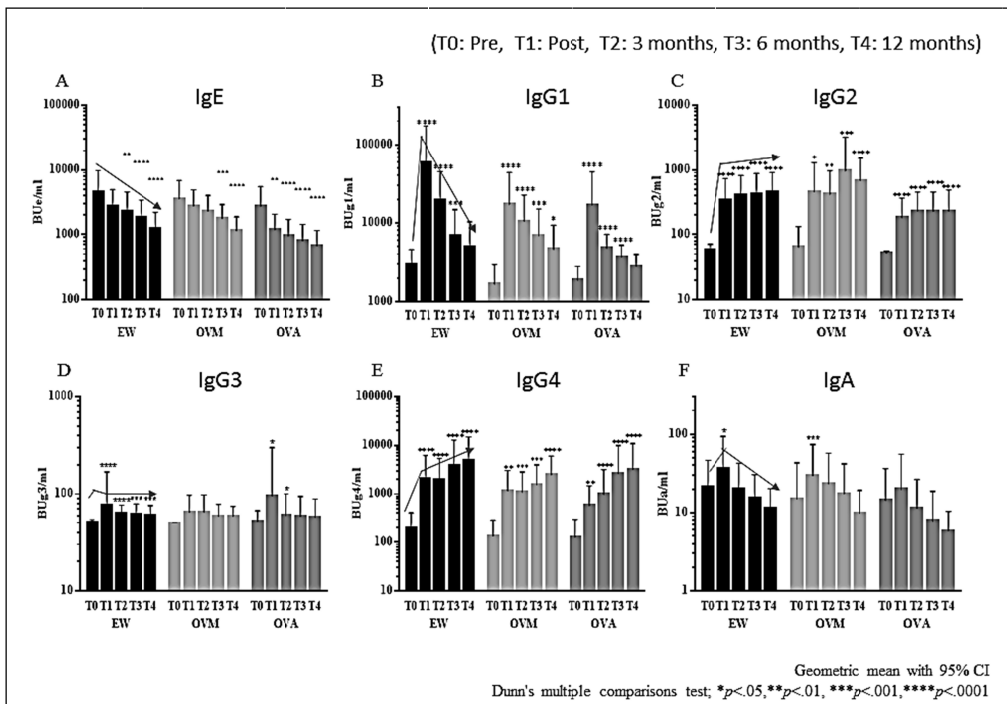


図5 . 卵減感作療法の経過に伴う抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA のモニター

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。

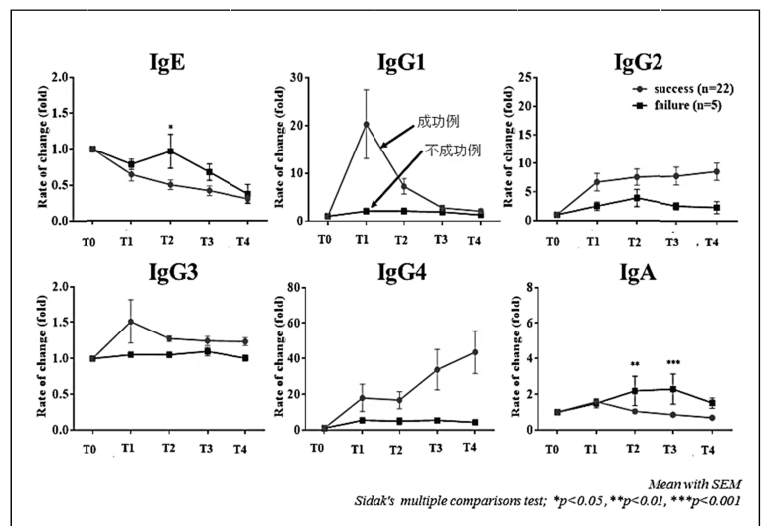


図6 . 卵減感作療法の経過に伴う減感作成功群と不成功群の各種抗体価の推移
減感作前(T0)の抗体価を 1 と表示している。

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 の存在比が少なくは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。

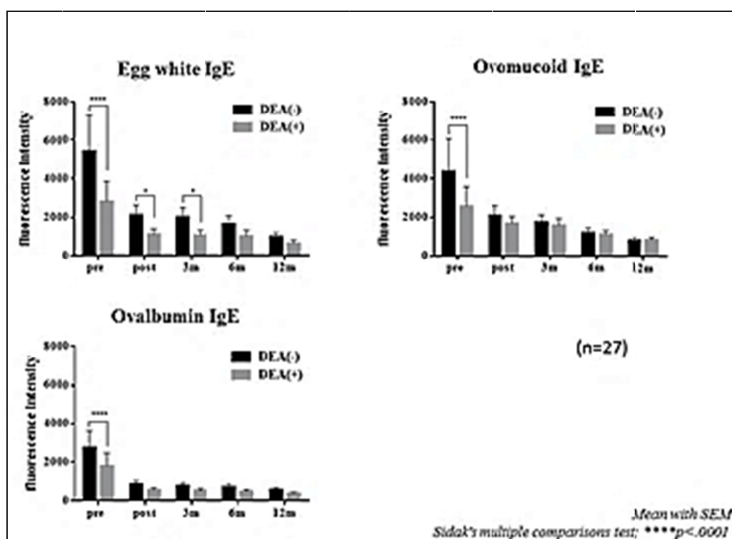


図 7 . 卵減感作療法の経過に伴う DEA 感受性 Low affinity IgE 存在率の減少経過

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溶性が高い遺伝子に着目し、組換え体をヘアレスFKO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FKO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、tracerRNA 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ススキンケア・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^{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

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 から 0 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

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, Katoh N, 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, <u>Sasaki T</u> , <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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Asai J, Harada Y, Beika M, Takenaka H, <u>Katoh N</u> , Takamatsu T	Photodynamic diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in mouse squamous cell carcinoma	J Dermatol Sci	74 (2)	171-173	2014
<u>Sasaki T</u> , Furusyo N, Shiohama A, Takeuchi S, Nakahara T, Uchi H, Hirota T, Tamari M, Shimizu N, Ebihara T, <u>Amagai M</u> , 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
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, <u>Ebihara T</u> , <u>Amagai M</u> , 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
Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, <u>Sugai M</u> , 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
Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, <u>Katoh N</u> , Sakai T	The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells	PLoS One	9 (11)	e113217	2014
Horimukai K, Hayashi K, Tsumura Y, Nomura I, Narita M, <u>Ohya Y</u> , <u>Saito H</u> , Matsumoto K	Total serum IgE level influences oral food challenge tests for IgE-mediated food allergies	Allergy	70 (3)	334-337	2015
Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Kinoshita S, <u>Katoh N</u>	Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis	J Invest Dermatol	135 (2)	411-417	2015
Kido-Nakahara M, <u>Katoh N</u> , Saeki H, Mizutani H, Hagihara A, Takeuchi S, Nakahara T, Masuda K, Tamagawa-Mineoka R, Nakagawa H, Omoto Y, Matsubara K, Furue M	Comparative Cut-off Value Setting of Pruritus Intensity in Visual Analogue Scale and Verbal Rating Scale	Acta Derm Venereol	95 (3)	345-346	2015
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, <u>Sugai M</u>	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Furue M, Onozuka D, Takeuchi S, Murota H, Sugaya M, Masuda K, Hiragun T, Kaneko S, Saeki H, Shintani Y, Tsunemi Y, Abe S, Kobayashi M, Kitami Y, Tanioka M, Imafuku S, Abe M, Inomata N, Morisky DE, <u>Katoh N</u>	Poor adherence to oral and topical medication in 3096 dermatological patients as assessed by the Morisky Medication Adherence Scale-8	Br J Dermatol	172 (1)	272-275	2015
Yokouchi M, <u>Kubo A</u> , Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, <u>Amagai M</u>	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
<u>Matsui T</u> , <u>Amagai M</u>	Dissecting the formation, structure, and barrier function of the stratum corneum	Int Immunol	Epub ahead of print DOI: 10.1093/intimm/dxv013		2015

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
<u>加藤則人</u>	アトピー性皮膚炎の生活指導に生かしたい最近の知見	日本小児皮膚科学会雑誌	33 (1)	19-22	2014
<u>加藤則人</u>	皮膚疾患の QOL 評価	MB Derma	216	219-224	2014
<u>佐々木貴史</u> , <u>天谷雅行</u>	フィラグリン (filaggrin)	分子消化器病	11 (2)	88-93	2014
<u>佐々木貴史</u> , <u>塩濱愛子</u> , <u>天谷雅行</u>	皮膚バリア異常を示す自然発症皮膚炎マウスモデル	日本臨床免疫学会誌	37 (3)	160-165	2014
<u>加藤則人</u>	アトピー性皮膚炎の心身医学的な診療スキル-コミュニケーションスキルを中心に	臨床免疫・アレルギー科	61 (6)	633-637	2014
<u>加藤則人</u>	小児アトピー性皮膚炎の治療アドヒアランスを高めるために	日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌	8 (3)	143-146	2014
<u>加藤則人</u>	診療に生かしたいアトピー性皮膚炎の最近の話題	日本臨床皮膚科医会雑誌	31 (4)	494-496	2014
<u>加藤則人</u>	アトピー性皮膚炎の proactive 療法	アレルギーの臨床	34 (10)	841-845	2014
<u>加藤則人</u>	プロアクティブ療法	MB Derma	224	25-29	2014
<u>加藤則人</u>	アドヒアランスから考える外用薬の現状	Progress in Medicine	34 (12)	2095-2098	2014
<u>久保亮治</u>	皮膚表皮が持つバリア構造と機能からみたアレルギー疾患治療戦略	薬学雑誌	134 (5)	623-627	2014
<u>久保亮治</u>	皮膚バリア構造・機能のイメージング手法	感染・炎症・免疫	44 (2)	120-130	2014
<u>久保亮治</u>	皮膚バリアとタイトジャンクション	炎症と免疫	22 (4)	251-255	2014
<u>久保亮治</u>	角層の形成機構と先天性角層バリア破綻疾患	日本皮膚科学会雑誌・臨時増刊号	124 (13)	2672-2674	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
久保亮治, 天谷雅行	表皮バリア不全と経皮感作が招くアレルギー-疾患	実験医学	33 (4)	563-569	2015

日本語書籍

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
加藤則人	アトピー性皮膚炎	門脇孝 小室一成 宮地良樹	診療ガイドライン Up-To-Date 2014-2015	メディカル レビュー 社	東京	606-611	2014
加藤則人	アトピー性皮膚炎の原因は何でしょうか	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	5-7	2014
海老原全	経費感作やアレルギーマーチについて教えてください	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	8-9	2014
加藤則人	ステロイドはどのような皮疹にいつまで塗るのにすればよいか教えてください	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	27-29	2014
加藤則人	成人アトピー性皮膚炎のステロイド外用薬のランクはどのような基準で決めるのですか	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	30-31	2014
大矢幸弘	小児アトピー性皮膚炎のステロイド外用薬のランクはどのような基準で決めるのですか？	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	32-33	2014
大矢幸弘	塗り薬を嫌がる子どもへの対処のポイントを教えてください	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	74-75	2014
海老原全	プロアクティブ療法について教えてください	加藤則人	エキスパートが答える！アトピー性皮膚炎 Q&A55	診断と治療社	東京	86-87	2014
加藤則人	アトピー性皮膚炎	山口徹 北原光夫 福井次矢 高木誠 小室一成	今日の治療指診 2015 年版 - 私はこちら治療している	医学書院	東京	1136-1138	2015
加藤則人	アトピー性皮膚炎	瀧川雅浩 渡辺晋一	皮膚疾患 最新の治療 2015-2016	南江堂	東京	31-33	2015