

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791089

研究課題名（和文） 表皮角質層・タイトジャンクションバリアの生成維持、制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） the mechanisms of the generation, maintenance and control of stratum corneum and tight junctions

研究代表者

横内 麻里子 (YOKOUCHI MARIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50571478

研究成果の概要（和文）：

皮膚のバリアは角質層、tight junction(TJ)の2層のバリアで構成される。角質層の構成蛋白フィラグリンの変異に起因した皮膚バリアの破綻による経皮的抗原曝露がアトピー性皮膚炎の発症要因であるとする説が支持されているが、フィラグリン変異下において、TJバリアがどのような構造・機能を示すのかは明らかでなかった。そこで本研究では、表皮におけるフィラグリンの発現を完全に欠損させたフィラグリン欠損マウスを用い、表皮 TJ の構造と機能を調べた。共焦点顕微鏡を用いて表皮 TJ 構成蛋白の発現を立体的に可視化したところ、フィラグリン欠損マウスの TJ 構成蛋白の発現と局在に変化はみられなかった。また、トレーサーとして約 500Da の蛋白であるビオチン化試薬を用い、TJ の機能評価を行ったところ、新生仔マウス、成体マウスともにフィラグリン欠損マウス皮膚 TJ のバリア機能が保持されていることが示された。これらの結果は、フィラグリンの欠如は直接、TJ バリアの構造および機能に影響を与えないことを示している。

研究成果の概要（英文）：

Mammalian skin consists of two sets of barriers: stratum corneum (SC) and tight junctions (TJs). Filaggrin is a structural protein of SC. The loss-of-function mutations in filaggrin gene are reported as a major predisposing factor for atopic dermatitis, suggesting that disrupted SC barrier might result in increased entry of external antigens. Epidermal TJ also functions as an outside-in barrier, however, TJ barrier function under filaggrin-deficient conditions has not been investigated. In this study, we examined the epidermal TJ structure and functions in filaggrin knockout mice, which completely lack filaggrin expression in the epidermis. 3D structure of epidermal TJ was investigated in a whole-mounted ear epidermis using confocal microscopy. In filaggrin KO mice, the expression and localization of TJ-related proteins were not affected. TJ-permeability assay using a primary amine-reactive biotinylation reagent as a tracer revealed that the barrier function of TJ against water-soluble ~500 dalton molecule was neither altered in neonatal mouse nor adult mice of these filaggrin-deficient models. These results suggested that the absence of filaggrin does not alter the barrier function of TJ directly.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総 計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：重層扁平上皮、可視化、Tight junction

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は生命体が環境と接する最前線にあって、生体と外界を隔てる境界となり、生命維持に不可欠なバリア機能を備える。長年にわたり、皮膚バリアは全て角質層が担うと考えられてきたが、近年、角質層の下に TJ が存在することが明らかとなり、皮膚の TJ がバリア機能において重要な役割をもつことが示唆された。

さらに、皮膚バリア機能の破綻が様々な疾患と密接に結びつくことが注目されているが、その代表的なものがアトピー性皮膚炎である。2006 年、アトピー性皮膚炎の発症要因として角質層の主要構成物質であるフィラグリンの遺伝子変異が報告され、皮膚バリアの破綻による抗原の皮内への侵入がアトピー性皮膚炎の主たる発症原因であるとする説が広く支持されている。しかしながら、アトピー性皮膚炎発症において、皮膚バリア機能の一翼を担う TJ がどのように関与しているのかは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではフィラグリンに注目し、TJ の主要構成物質である claudin-1 欠損マウス (TJ バリア障害モデル) との比較とともに、フィラグリン欠損マウスの表皮 TJ の構造・機能解析を行った。フィラグリンは角質層の主要構成物質であり、ケラチン繊維を凝集させ束ねるとともに、それ自身が分解され角質層の天然保湿因子として働くと考えられている。我々のグループはフィラグリンを角質層バリア形成に重要な蛋白質であると考え、角質層バリア障害モデルとしてフィラグリン欠損マウスの作成に成功し、角質層の構造が正常マウスと異なっており、また機能においても脆弱性と高い物質透過性を示し、角質層バリア機能が一部障害されていることを示している。(Kawasaki H, et al. J. allergy Clin Immunol. 2012)。このフィラグリン欠損マウスを角質層バリア障害モデルと定義し、皮膚におけるもう一つの主要なバリア機構である TJ バリアの解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) フィラグリン欠損マウス TJ の機能解析

フィラグリン欠損マウスについて、表皮 TJ の構成因子がどのような発現を示すか蛍光免疫染色法と共焦点顕微鏡を用いて解析した。我々のグループが独自に開発した、表皮 TJ バリアを立体的に可視化する方法 (Kubo A, et al. J. Exp Med, 2009) を用いて、表皮 TJ 構成蛋白である claudin-1、occludin、tricellulin、表皮 TJ の裏打ち蛋白である ZO-1 などについて、フィラグリン欠損マウス

表皮での発現を正常マウスと比較した。

### (2) フィラグリン欠損マウス TJ の機能解析

フィラグリン欠損マウス (新生仔マウス) について、古瀬らが claudin-1 欠損マウス (新生仔マウス) の TJ 障害の評価過程において行ったビオチン化試薬を用いた TJ 機能評価法、TJ permeability assay (Furuse M, et al. J. Cell Biol, 2002) を行った。さらに、フィラグリン欠損マウス (成体マウス) について、組織透過性を高めるため Exfoliative toxin A を併用するなど TJ permeability assay に一部改変を加え、TJ の機能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) フィラグリン欠損マウス TJ の構造解析

はじめにフィラグリン欠損マウス、正常マウスの皮膚より凍結切片を作成し、TJ 構成要素の免疫染色を行った。主要な構成要素である claudin-1、occludin、ZO-1 の発現は、両者で差はみられなかった。

さらに、マウス耳介表皮をシート状のまま固定・染色・包埋し、共焦点顕微鏡を用いて撮像した画像を 3 次元で再構成することにより、フィラグリン欠損マウスと正常マウスの表皮 TJ の構造を立体的に比較した (図 1)。主要な TJ 構成要素である claudin-1、occludin、ZO-1 の発現は双方で明らかな違いはみられず、局在にも差はなかった。

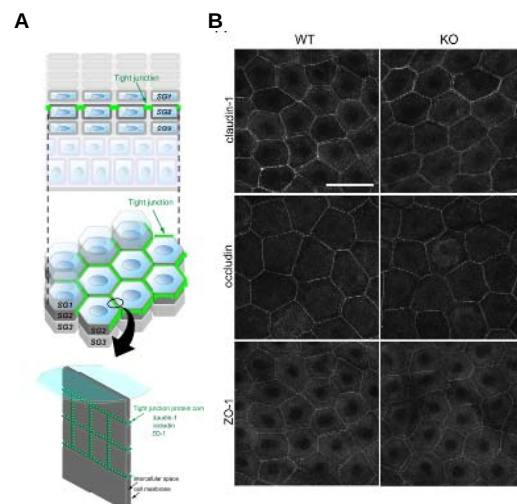


図 1 表皮 TJ の 3D 可視化手法を用いたフィラグリン欠損マウス (KO) と正常マウス (WT) の TJ 構成要素 ZO-1、claudin-1、occludin の比較

また、3細胞が接する部は tricellular tight junction (tTJ) とよばれる特殊な TJ 構造を形成しているが (図 2B)、tTJ の構成蛋白である tricellulin、LSR についても、発現および局在の違いは認められなかった (図 2A)。

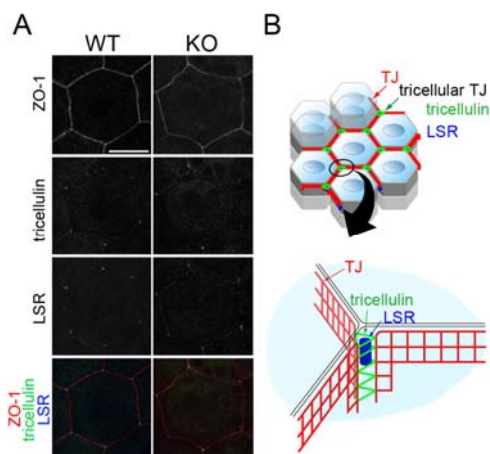


図2 フィラグリン欠損マウス (KO) と正常マウス (WT) の tTJ 構成要素 tricellulin、LSR の比較

## (2) フィラグリン欠損マウス TJ の機能解析

さらに、ビオチン化試薬をトレーサーとして用いた TJ 機能評価法、TJ permeability assay (Furuse M, et al. J. Cell Biol, 2002) を行い、フィラグリン欠損新生仔マウスの表皮 TJ の機能を検討した。

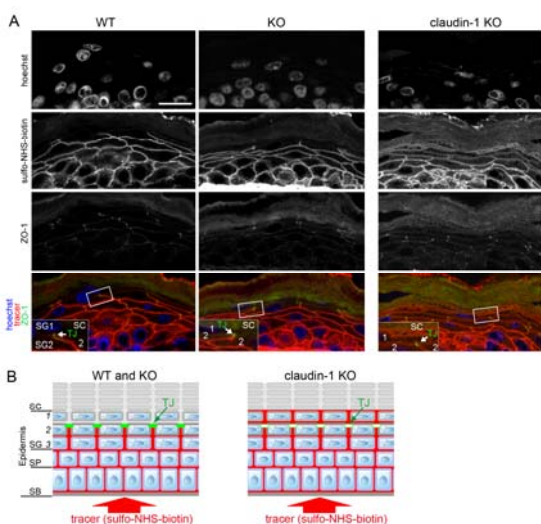


図3 フィラグリン欠損マウス (KO) と正常マウス (WT) の TJ permeability assay。皮下に注射したトレーサー

は KO、WT マウスともに TJ 直下で止まるが、TJ が障害されている claudin-1 KO マウスでは、TJ を越えて角質層直下に達している。

図3のごとく、TJ 障害マウスモデルである claudin-1 欠損マウスでは、皮下に注射したトレーサーであるビオチン化試薬 (約 500Da) が TJ を越えて角質層下にまで浸透するのに対し、フィラグリン欠損マウスでは正常マウスと同様、トレーサーの浸透が TJ でブロックされているのが確認された。

さらに、成体マウスに対しては組織透過性を高めるために exfoliative toxin A を併用し、同じくビオチン化試薬を用いた permeability assay を行ったところ、新生仔マウスと同様の結果が得られた。

これにより、フィラグリン欠損マウスにおいて、TJ のバリア機能は保持されていることが示された。

以上の結果より、フィラグリンの欠損は角質層バリアを障害するが、直接 TJ バリアの構造、機能に影響を与えないことが示された。本研究は、皮膚バリア機能異常にその病因を有するアトピー性皮膚炎発症機序の詳細な解明につながることを期待される。

今後は TJ を green fluorescent protein (GFP) を用いて可視化した遺伝子組み換えマウスを作成し、TJ の動態を *in vivo* でライブ観察することで、TJ バリアの生成維持過程を追跡し、皮膚バリアにおける、角質層バリアと TJ バリアの相互作用と役割分担を明らかにするべく解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Ouchi T, Kubo A, Yokouchi M, Adachi T, Kobayashi T, Kitashima DY, Fujii H, Clausen BE, Koyasu S, Amagai M, and Nagao K. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. J Exp Med. 208:2607-2613, 2011. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kubo A, Yokouchi M, Atsugi T, Ohyama M, and Amagai M. Investigation of the tight junction barrier in hair follicles and sebaceous glands. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology,

Kyoto, 2011.12.9-10

②Kubo A, Yoshida K, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. Langerhans Cell Meeting 2011, Innsbruck, 2011.10.4-6

③Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Nagao K, and Amagai M. Langerin-positive Langerhans cells but not Langerin-negative inflammatory dendritic epidermal cells penetrate epidermal tight junction barriers in atopic dermatitis. 41st Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Barcelona, 2011.9.8-10

④Yoshida K, Kubo A, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Ebihara T, Ohyama M, Nagao K, and Amagai M. Human epidermal tight junctions are functional and allow penetration of activated Langerhans cell dendrites. 71th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona, 2011.5.5

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横内 麻里子 (YOKOUCHI MARIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50571478