

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670507

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎における皮膚タイトジャンクションバリア破綻の病的意義の解明

研究課題名(英文)Evaluation of the tight junction barrier impairment in the pathogenesis of atopic dermatitis

研究代表者

久保 亮治 (Kubo, Akiharu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70335256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：角質バリア障害がアトピー性皮膚炎を始めとする様々なアレルギー疾患の発症要因となることが示されている。一方、表皮には角質バリアの内側にタイトジャンクション(TJ)バリアが存在する。今回我々は、TJバリアの破綻が皮膚炎を誘導し得るのかについて、TJバリア構成蛋白Claudin1のタモキシフェン誘導性表皮特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析した。本マウスではタモキシフェン投与後8日で表皮TJバリア破綻が誘導された。一方、角質バリアの破綻と経皮的水分蒸散の増加、および皮膚炎の表現型が、投与後18日目において観察された。以上の結果はプライマリなTJバリア破綻が皮膚炎を誘導し得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：The stratum corneum (SC) and tight junctions (TJs) form physical barriers in the skin. Impairment of SC and/or TJ barriers has been reported in atopic dermatitis skin, however, the direct consequence of TJ barrier dysfunction on dermatitis onset is unknown. In this study, we established tamoxifen (TAM)-inducible epidermis-specific claudin-1 knockout mice and investigated the pathophysiology of primary epidermal TJ defects in adult mice.

TJ leakage was initially observed focally on day 4 after TAM injection, and had developed fully on day 8. By contrast, the elevation of transepidermal water loss (TEWL) commenced later, on day 10, and reached its peak by day 18. The dermatitis phenotype, including erythema with scales, also became apparent on day 18. Water evaporation through the isolated SC sheets was normal on day 8 but significantly increased on day 18. Therefore, SC barrier impairment and TEWL elevation were secondarily induced after TJ leakage in this mouse model.

研究分野：細胞生物学、皮膚科学

キーワード：タイトジャンクション 皮膚バリア アトピー性皮膚炎 アレルギー 角質バリア バリア破綻

### 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン変異の発見を皮切りとして、角質バリア障害がアトピー性皮膚炎を始めとする様々なアレルギー疾患の発症要因となることが示されつつあった。一方、表皮には角質バリアの内側に TJ バリアが存在する。TJ 構成蛋白のクローディン 1(Cldn1)を欠損したマウスは、TJ バリア破綻による水分喪失により生後 1 日で死亡する。また、ヒト CLDN1 欠損症患者はマウスと異なり生後すぐに死亡することはないが、NISCH 症候群(主要症状は、角質形成異常、乏毛、乏歯、硬化性胆管炎)となる。ただし、CLDN1 欠損症患者は現在までに世界で 3 家系しか見つからず、彼らが皮膚のバリア障害によりアレルギー疾患を引き起こしやすいかどうかについては報告されておらず、現在も不明のままである。角質バリア障害を先天的に持つ時に TJ バリア障害が直接に誘導されるのか、また表皮 TJ バリアの異常がアトピー性皮膚炎の発症・悪化要因となりえるかどうか、不明であった。

### 2. 研究の目的

表皮 TJ バリア障害の病態を明らかにし、皮膚における TJ バリアの存在意義を明らかにすることを目的とした。これまでは、角質バリア障害が TJ バリア障害を誘導し、外来抗原の侵入が増加することで感作が成立し、アトピー性皮膚炎の発症に至ると考えられてきた。しかし我々は、角質バリア障害のみでは TJ バリアは障害されないこと、正常な TJ バリアの外側から樹状細胞が抗原取得をおこなうことで、角質バリア障害のみでも感作の亢進が起こり得ることを示していた。本研究では、アトピー性皮膚炎の病態に、「炎症□TJ バリア障害□角質形成異常□経皮的抗原侵入増加□さらなる炎症」という悪循環サイクルが存在するという仮説を検証することを目的として、TJ バリア障害を端緒とした時に皮膚に生じる表現型を解析するためのマウスモデルの作成と解析を行った。

### 3. 研究の方法

皮膚 TJ バリア障害を起点とした時の表現型解析を行うために、表皮特異的タモキシフェン誘導性 Cldn1 コンディショナル KO マウスを作成した。Cldn1 を先天的に欠損するマウスは生後 1 日以内に死亡するため、皮膚の TJ バリア破綻の病態を長期間にわたって解析することが、これまで不可能であったが、本マウスでは成体マウスにおいて表皮特異的に Cldn1 をノックアウトするが可能となり、成体マウスにおいて表皮 TJ バリア漏洩を特異的に誘導することが可能となった。本マウスにおける、TJ バリア機能の変化、角層バリア機能の変化、TJ バリア漏洩時の表現型を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) Cldn1 コンディショナル KO マウスの作成

Cldn1 の 1st exon を flox 配列で挟んだ Cldn1 flox マウスと、表皮幹細胞特異的に cre を発現する K5-cre マウスまたは表皮幹細胞特異的に creERT を発現する K14-creERT マウスとを掛け合わせ、K5-cre +/-, Cldn1 flox/flox マウス、および K14-creERT+/-, Cldn1 flox/flox マウスを樹立した。

K5-cre +/-, Cldn1 flox/flox マウスは、生後 1 日以内に、経皮的水分蒸散の過剰にともなう体重減少のため死亡した。一方、K14-creERT+/-, Cldn1 flox/flox マウスは正常に発育した。

次に、K14-creERT+/-, Cldn1 flox/flox マウスが 8 週齢以上に成長した後、腹腔内にタモキシフェンを投与した。タモキシフェン投与後 4 日目には、表皮有棘細胞層において Cldn1 の発現量低下が観察され、投与後 8 日目には、表皮有棘層～顆粒層の Cldn1 の発現は完全に消失した。以上より、本マウスにおいて、Cldn1 のコンディショナル KO がタモキシフェン投与により誘導可能なことが確認された(図 1)。

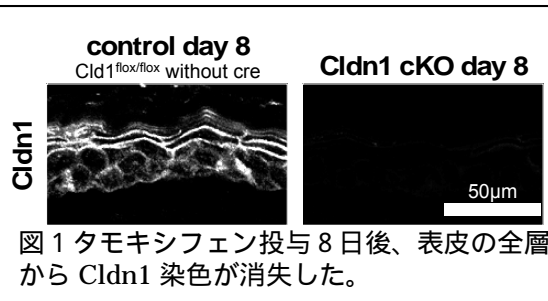


図 1 タモキシフェン投与 8 日後、表皮の全層から Cldn1 染色が消失した。

興味深いことに、新生児マウスにおいては表皮特異的 Cldn1 cKO は致死性であったが、成体マウスにおいてはヒトの CLDN1 欠損(NISCH 症候群患者)と同様に致死性ではなかった。経皮的水分蒸散の増加に耐えられるだけの体重を有することがその理由ではないかと考えられた。

#### (2) Cldn1 コンディショナル KO マウスの TJ バリア評価

皮下に投与した sulfo-NHS-LC-biotin 試薬の拡散防止機能の破綻を指標として、表皮の TJ バリア機能を評価した。表皮 TJ バリアは、タモキシフェン投与後 4 日目より破綻し始め、投与後 8 日目には完全に破綻した(図 2)。

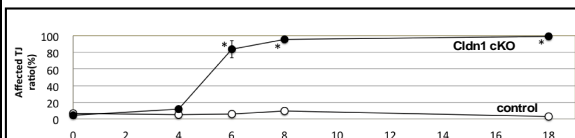


図 2 TJ バリア機能破綻はタモキシフェン投与後 4 日目より散発的に観察され始め、8 日目には表皮のほぼ全域で TJ バリア破綻が観察された。

### (3) Cldn1 コンディショナル KO マウスの角質バリア評価

一方、タモキシフェン投与後 8 日目の、TJ バリアが完全に破綻した時点で、マウス耳内側皮膚における経皮的水分蒸散量 (TEWL) を測定したところ、野生型マウスとの間に違いは見られなかった。TEWL はタモキシフェン投与後 10 日目より徐々に上昇しはじめ、18 日目にピークに達した (図 3)。この結果は、TEWL の上昇は表皮 TJ バリア破綻の指標とはなり得ないことを示している。

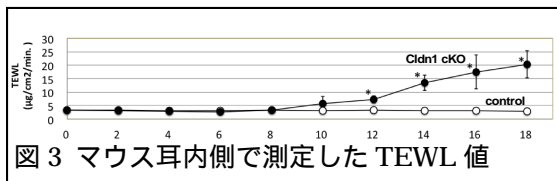


図 3 マウス耳内側で測定した TEWL 値

我々は、本マウスで観察された TEWL の上昇は、TJ バリアの破綻による水の通過性の上昇によるものではなく、TJ バリアの破綻により正常な角質分化が障害され、不完全な角質バリアが形成されることによるものではないかと考えた。

そこで、マウス耳内側皮膚を採取し、ディスペルゼ処理により表皮と真皮を分離した後、トリプシン処理にて生細胞を取り除き、角質層のみからなるシートを作成した。アガロースゲルを充填したエッペンドルフチューブを角質層シートにて覆い、チューブの重量変化を測定することにより、角質層シートを通過して蒸散する水分量を評価した。タモキシフェン投与後 8 日目では、TJ バリアは破綻していたが、角質層シートの水蒸散に対するバリア機能は正常であった。一方、タモキシフェン投与後 18 日目には、角質層シートのバリア機能が低下し、角質層シートを通過して蒸散する水分量が増加していた (図 4)。

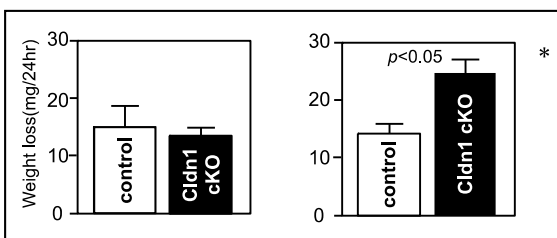


図 4 タモキシフェン投与後 8 日目 (左) と 18 日目の経角質シート水分蒸散量の比較

### (4) Cldn1 コンディショナル KO マウスの皮膚表現型解析

タモキシフェン投与後 18 日目には、Cldn1 コンディショナル KO マウス特異的に皮膚炎の形成が認められ、その後、徐々に脱毛が進行した。

### (5) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

本成果は、皮膚 TJ バリアの特異的な障害

により、皮膚炎形成と角層バリア障害が引き起こされることを世界で初めて示したことにより、国際的にも高く評価されている。これまでアトピー性皮膚炎の病態形成機構においては、角層バリア機能の障害によりアレルギーの侵入増加と、免疫機能異常によるアレルギーに対する過剰反応という、2つの機構が主に注目されてきた。本研究成果は、皮膚表皮が持つ第 2 のバリアである、TJ バリアの機能異常が、直接的に皮膚炎形成に関わり得ることを示した点で、非常にインパクトが大きい。

### (6) 今後の展望

本研究において、表皮の TJ バリアの機能異常が角層バリアの破綻だけでなく、直接に皮膚炎形成にも関わることが明らかとなった。アトピー性皮膚炎患者皮膚では、慢性炎症の結果として、表皮 TJ バリア破綻が誘導されていると考えられる。今後、表皮 TJ バリアの機能異常を修正することにより、正常な角層バリアの形成を促すような新しい治療法の開発が望まれる。

### 5. 主な発表論文等

(\* corresponding author)

[雑誌論文](計 4 件)

1. 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.(doi:10.1016/j.jdermsci.2014.11.007) 査読有
2. 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 patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 134 (4) 856-864, 2014. (doi: 10.1016/j.jaci.2014.08.001) 査読有
3. 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.(doi:10.1016/j.jdermsci.2013.04.021) 査読有
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 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.e1114, 2013. (doi:  
10.1016/j.jaci.2013.08.027)査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Kubo A, Hirano T, Yokouchi M, Kawasaki H, Atsugi T, Amagai M. Tight junction barrier dysfunction induced by epidermis-specific claudin-1 ablation is sufficient to cause dermatitis in mice *75th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology*, Atlanta, 2015.5.6-9
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*, Kyoto international conference center, Kyoto, 2014.12.13
3. Atsugi T, Yokouchi M, Ohyama M, Amagai M, Kubo A. Tight junction barriers are functionally organized in hair follicles and sebaceous glands. *74th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology*, New Mexico, 2014.5.10
4. 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. *International Investigative Dermatology 2013*, Edinburgh, 2013.5.8-11

〔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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

久保 亮治 (Kubo Akiharu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70335256

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし