

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15422

研究課題名(和文)皮膚タイトジャンクションバリア破綻が誘発する痒みと皮膚炎発症の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the itch sensation and skin inflammation induced by epidermal tight junction barrier deficiency

研究代表者

久保 亮治(Kubo, Akiharu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：70335256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：TJ構成蛋白クローディン(CLDN)1をタモキシフェン誘導性に皮膚特異的に成体マウスにおいてノックアウトすることが可能なCldn1 flox/flox・K14-creERTマウスを作成した。本マウスを用いて、成体マウスにおいて表皮特異的にCLDN1欠損を誘導し、表皮タイトジャンクションバリアの漏洩を引き起こすことにより、マウス皮膚に起こるフェノタイプの解析を行った。特に、タイトジャンクションバリア漏洩が引き起こす痒み刺激に着目して解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The stratum corneum (SC) and tight junctions (TJs) form physical barriers in the skin. A congenital TJ barrier defect caused by a deficiency of claudin-1, which encodes a major epidermal TJ adhesion molecule, results in early neonatal death in mice and neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome in humans. These observations suggest the essential role of TJs in skin homeostasis. Here, we established tamoxifen (TAM)-inducible epidermis-specific claudin-1 knockout mice (K14-creERT+/-, Cldn1flox/flox mice) and investigated the pathophysiology of epidermal TJ defects in adult mice. To clarify the barrier defects of the SC and TJ separately, we measured water evaporation through isolated SC sheets (WETIS) ex vivo. On day 8, claudin-1 staining disappeared, but no elevation of WETIS was observed. On day 18, compact hyperkeratosis and increased WETIS were observed, suggesting that the TJ barrier leakage secondarily induced the SC barrier defect.

研究分野：皮膚科学

キーワード：タイトジャンクション 皮膚バリア かゆみ アトピー性皮膚炎

#### 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ニ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タイトジャンクションバリアが存在する。アトピー性皮膚炎患者皮膚において、角質バリア障害と共にタイトジャンクションバリアの破綻が観察される。しかし、タイトジャンクションバリア破綻がアトピー性皮膚炎の病態形成にどのように寄与しているかは、明らかではなかった。

我々は皮膚タイトジャンクションバリアの解析で世界をリードする研究を行ってきた。フィラグリニン欠損による角質障害そのものはタイトジャンクションバリアに影響しないが、皮膚炎症はタイトジャンクションバリア破綻を引き起こすことを明らかにしていた。タイトジャンクションバリア破綻が角化異常を引き起こすことから、一旦皮膚炎が起こると、炎症がタイトジャンクションバリアを障害することで角質形成異常が起こり、経皮抗原侵入が加速して新たな皮膚炎を引き起こすという悪循環が、アトピー性皮膚炎患者皮膚で起こると予想された。しかしタイトジャンクションバリア破綻の病態生理を角質バリア障害と分離して *in vivo* で解析した研究はこれまでに存在しなかった。

#### 2. 研究の目的

表皮特異的にタイトジャンクションバリア破綻を誘導できるモデルマウスを作成し、タイトジャンクションバリア破綻をスタート地点として引き起こされる病態の解析を行うことを目的とした。

#### 3. 研究の方法

TJ 構成蛋白クローディン(CLDN)1 をタモキシフェン誘導性に皮膚特異的に成体マウスにおいてノックアウトできる、*Cldn1<sup>flox/flox</sup> · K14-creERT* マウスを作成し、成体マウスにおいて表皮特異的に CLDN1 欠損を誘導し、表皮タイトジャンクションバリアの漏洩を引き起こすことにより、マウス皮膚に起こるフェノタイプの解析を行った。特に、タイトジャンクションバリア漏洩が引き起こす痒み刺激に着目して解析を行った。

#### 4. 研究成果

我々が作成した *Cldn1<sup>flox/flox</sup> · K14-creERT* マウスを用いることで、成体マウスにてタモキシフェン誘導性に表皮特異的に *Cldn1* を ablation することが可能となった。本マウスの解析より、タモキシフェン投与5日後には表皮 TJ バリアが完全に破綻すること、しかしその時点ではまだ角質バリアは正常なこと、TJ バリア破綻により二次的に角質への分化異常が起こり、角質が TJ 破綻後に作られたものと置換される約1週間の間に角質バ

リア障害が明らかになること(図1)を明らかにした。

*Cldn1* cKO マウスは、タモキシフェン投与後18日目には明らかな皮膚炎症状を生じた。一方、タモキシフェン投与から皮膚炎が生じるまでの過程における痒み刺激について、SCLABA を用いた総搔爬時間測定によって解析したところ、驚くべきことにタモキシフェン投与5日目には TJ バリア破綻とほぼ同時に、角質バリアが正常な状態で痒み刺激が始まることが明らかになった。同時期にはほぼ表皮全面的なランゲルハンス細胞の活性化も観察された。

以上の結果は、タイトジャンクションバリア破綻を起点として、ランゲルハンス細胞の活性化および痒み刺激が、角質バリア破綻とは独立して生じる可能性を示唆している。

#### 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)

英語論文(全て査読あり)

1. Yokouchi M, Atsugi T, Logtestijn M, Tanaka R, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape *eLife*. 5 e19593, 2016. DOI: 10.7554/eLife.19593

[学会発表](計 30 件)

国際学会招待講演

1. Kubo A. Epidermal barrier homeostasis and its breakage in skin diseases. *The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology*, 仙台国際センター(宮城県仙台市青葉区), 2016.12.9
2. Kubo A. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. *2nd International Symposium on 'Autoinflammation breaks Barriers'*, Munster, Germany, 2016.11.21
3. Kubo A. Spatiotemporal orchestration of epidermal cell turnover based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. *CDB International Symposium "Body Surface Tactics"*, 理化学研究所多細胞システム形成研究センター(兵庫県神戸市中央区), 2016.11.14
4. Kubo A. Homeostasis and Dysfunction of the Epidermal Barriers. *12th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology*, 軽井沢プリンスホテル(長野県軽井沢市), 2016.10.13
5. Kubo A. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's

- tetradecahedron cell shape. *14th Meeting of the European Epidermal Barrier Research Network.*, Munchen, Germany, 2016.9.8
6. Kubo A. Epidermal barrier homeostasis and its breakage in skin diseases. *2016 IHEIB (Institute of Human-Environment Interface Biology) Symposium*, Seoul, Korea, 2016.2.20
  7. Kubo A. Epidermal barrier homeostasis and its breakage in skin diseases. *10th Annual Symposium in Institute of Human-Environment Interface Biology*, Seoul, Korea, 2016.2.20
  8. Kubo A. Significance of cell shape in the epidermal cell turnover across tight junctions. *2015 Global Skin Disease Research Consortium Symposium in Tokyo*, 慶應義塾大学(東京都新宿区), 2015.12.9
  9. Kubo A. Vicious Cycle in Atopic Dermatitis: Epidermal Barriers, Allergic Sensitization and Inflammation. *The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology*, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2015.11.18
  10. Kubo A. Tight junctions, the skin barrier and atopic dermatitis. *23rd World Congress of Dermatology*, Vancouver, Canada, 2015.6.8-14

#### 国際学会発表

1. Yokouchi M, Atsugi T, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A. Cell shape determines the regulatory mechanisms for maintaining tight junction barrier homeostasis in epidermal turnover. *76th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology*, Kierland, Arizona, USA, 2016.5.14
2. Yokouchi M, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A. Homeostatic cell turnover mechanisms that maintain tight junction barrier integrity in the epidermis. *The 6th Annual Congress of Pan Asian Pacific Skin Barrier Research Society PAPSBRs*, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区), 2015.12.14
3. Yokouchi M, Kajimura M, Suematsu M, Furuse M, Amagai M, Kubo A. Homeostatic cell turnover mechanisms that maintain tight junction barrier integrity in the epidermis. *The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology*, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区), 2015.12.12
4. Rubsam M, Kubo A, Mertz A, Boggetti B, Goranci G, Dufresne E, Horsley V, Amagai M, Niessen C. Classical cadherins control polarized organization of junctions and

cytoskeleton in stratified epithelia. *The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology*, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区), 2015.12.12

5. Atsugi T, Yokouchi M, Hirabayashi A, Ohyama M, Amagai M, Kubo A. Functional tight junction barriers in sebaceous glands: defects in holocrine secretion in claudin-1 deficient mice. *The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology*, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区), 2015.12.12
6. Kubo A, Hirano T, Kawasaki H, Yokouchi M, Atsugi T, Amagai M. Epidermis-specific ablation of claudin-1 in adult mice demonstrates a key role of tight junction barrier in the development of atopic dermatitis. *The 64th Meeting of Japanese Society of Allergology*, グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区), 2015.5.27
7. 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

#### 国内学会招待講演

1. 久保亮治. なぜペンギンはしもやけにならないの? ~生物の環境適応戦略から考える皮膚の発生と多様性~. **第40回日本小児皮膚科学会**, ANA クラウンプラザホテル広島(広島県広島市), 2016.7.2
2. 久保亮治. 皮膚表皮タイトジャンクションバリアの恒常性維持機構の解析. **第37回日本炎症再生医学会**, 京都勧業館 みやこめっせ(京都府京都市左京区), 2016.6.17
3. 久保亮治. 皮膚タイトジャンクションバリアとアトピー性皮膚炎. **第65回日本アレルギー学会学術大会**, 東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2016.6.17
4. 久保亮治. 皮膚バリア障害の病態 ~遺伝性疾患からアトピー性皮膚炎まで~. **第115回日本皮膚科学会総会**, 国立京都国際会館(京都府京都市左京区), 2016.6.5
5. 久保亮治. アトピー性皮膚炎表皮におけるタイトジャンクションバリアと樹状細胞の解析. **第43回日本臨床免疫学会総会**, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区), 2015.10.23
6. 久保亮治. 皮膚角層バリアの進化と機能. **第39回日本小児皮膚科学会学術大**

- 会, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市), 2015.7.18-19
7. 久保亮治. 角化重層上皮におけるタイトジャンクションバリアの恒常性を維持した細胞ターンオーバーメカニズム. **第67回日本細胞生物学会大会**, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2015.6.30-7.2
  8. 久保亮治. バリア破綻と皮膚炎がもたらす悪循環 ~アトピー性皮膚炎における経皮感作を考える~. **第64回日本アレルギー学会学術大会**, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都港区), 2015.5.27

国内学会発表

1. 厚木徹, 横内麻里子, 平林愛, 大山学, 天谷雅行, 久保亮治. claudin-1 欠損マウスを用いた脂腺タイトジャンクションバリアの解析. **第23回分子皮膚フォーラム**, ホテルグランヴィア大阪(大阪市区), 2016.4.15
2. 横内麻里子, 梶村真弓, 末松誠, 天谷雅行, 久保亮治. タイトジャンクションバリアの恒常性を維持しながら, 表皮細胞は如何にターンオーバーするのか. **第36回日本炎症・再生医学会**, 虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区), 2015.7.21-22
3. 佐々木貴史, 塩濱愛子, 安田文世, 久保亮治, 川崎洋, 松井毅, 天谷雅行. Tmem79 欠損マウスは黄色ブドウ球菌増殖を伴う部位特異的皮膚炎を自然発症する. **第36回日本炎症・再生医学会**, 虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都港区), 2015.7.21-22
4. 横内麻里子, 吉田和恵, 梶村真弓, 末松誠, 天谷雅行, 久保亮治. 常にターンオーバーする表皮においてタイトジャンクションバリアの恒常性を維持するメカニズムの解析. **第22回分子皮膚科学フォーラム**, ホテル日航高知旭ロイヤル(高知県高知市), 2015.4.17-18
5. 平野尚茂, 横内麻理子, 厚木徹, 天谷雅行, 久保亮治. 成体マウスにおける表皮特異的クローディン 1 欠損はタイトジャンクションバリアの漏洩と皮膚炎を引き起こす. **第22回分子皮膚科学フォーラム**, ホテル日航高知旭ロイヤル(高知県高知市), 2015.4.17-18

〔図書〕(計 3 件)

1. 久保亮治. ランゲルハンス細胞による抗原認識機構. Monthly Book Derma (全日本病院出版会). 245:8-14, 2016
2. 久保亮治. 皮膚タイトジャンクションバリアとアトピー性皮膚炎. アレルギーの臨床(北隆館/ニュー・サイエンス社). 35:931-935, 2015
3. 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(羊土社). 33:563-569, 2015

〔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

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・准教授  
研究者番号: 7 0 3 3 5 2 5 6

(2) 連携研究者

岡田 峰陽 (KUBO, Akiharu)  
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー  
研究者番号: 5 0 4 5 2 2 7 2