

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 皮膚細菌叢と宿主の相互作用理解に基づく炎症性疾患制御法の開発
(英語) Development of novel therapeutic strategies for inflammatory diseases based on the host and skin microbiota interplay

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Amagai, Professor and Chair, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 皮膚微生物側、角層側からの統合的解析による皮膚炎発症機序の解明
開発課題名： (英語) Clarification of the pathogenic mechanisms of skin inflammation by integrated analyses of skin microbiota and stratum corneum

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Amagai, Professor and Chair, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

1) ヒト皮膚細菌叢バンクの構築

健康人及び各種炎症性皮膚疾患患者から採取した皮膚細菌群を保存し、皮膚症状や細菌叢メタ 16S 解析データと紐付けた皮膚細菌叢バンクの構築を開始した。皮膚細菌群を各細菌種に絞って分離培養し、臨床分離菌株バンクとして樹立することを目指している。

2) 皮膚炎発症ノトバイオートマウスにおける免疫応答の解析

皮膚炎モデルマウスである *Tmem79* KO マウスを無菌環境下で経時観察すると、SPF 環境下と認められる皮膚炎を発症しなかった。また SPF 環境下で皮膚炎発症時に皮膚及びリンパ節で様々な免疫細胞が誘導される一方で、無菌環境下では免疫細胞の誘導は認められなかった。これらの観察事項により、皮膚細菌叢の皮膚炎発症において病的役割をしていることが示唆された。

3) 角層構成成分の網羅的同一化、および機能解析

表皮顆粒層最外層にある SG1 細胞に GFP を発現するノックインマウス (SG1-GFP マウス) から、マウス SG1 細胞を分離し、SG1 細胞トランスクリプトームを解析することを試みた。しかし、SG1 細胞は DNA, RNA, 蛋白質の分解が容易に起きてしまうことが明らかとなった。そこで、黄色ブドウ球菌表皮剥脱性毒素 (ET) を用いてマウス表皮 SG1/SG2 細胞シートを作製し、トランスクリプトーム解析を行い、マウス表皮基底層細胞と比較解析を開始した。

4) 角層 pH 動態の可視化

角層 pH イメージングのために開発したトランスジェニックマウス (*Venus^{H1486}-mCherry* マウス) の麻酔を安定的に行うため、イソフルレンの吸入麻酔による持続麻酔や、ソムノペンチルの腹腔注射麻酔による麻酔維持方法を確立した。また、ヘアレスマウスへの戻し交配を終了させた。このことにより、従来は耳の皮膚しかできなかった *in vivo* live imaging がほぼ全身の皮膚で安定的に可能になった。

5) 角層形成における顆粒層 SG1 細胞死の分子機序の解明

理研 CDB より、核・ミトコンドリア・ゴルジ体を可視化できるマウス系統の導入を完了し、核・ミトコンドリア・ゴルジ体等の消失の過程を、分離した SG1 細胞を用いてタイムラプスイメージング観察する系を、確立した。露光時間や培養条件を調節することにより顆粒消失とオルガネラ消失のタイミングの経時的解析ができるようになった。

6) アトピー性皮膚炎発症に関与する黄色ブドウ球菌因子の同一化

フィラグリン KO マウスを用いてアトピー性皮膚炎由来株 TF3378 の皮膚固着時の網羅的遺伝子発現解析を行うための予備検討を行い、実験条件で細菌を固着させたマウス皮膚から十分な total RNA を回収できることを確認した。

7) 黄色ブドウ球菌可視化株の作製

blaZ promoter に *sod* (superoxide dismutase gene) の RBS を融合した fluorescent protein expression vector を開発し、蛍光タンパク質 (GFPsa, EGFP, mEmerald, Citrine, Cerulean and BFP) を臨床分離株で発現させることに成功した (Sci Reports in press)。

英文

1) Establishment of human skin microbe bank

We collected skin microbes from patients with various skin inflammation and healthy controls and started to build a skin microbe bank with 16S rRNA gene sequencing analysis data and skin symptoms.

2) Immune response in dermatitis-model mice in gnotobiotic state

Germ free Tmem79 KO mice were generated. Germ free Tmem79 KO mice did not show any symptom of dermatitis, which was induced in SPF condition. While various immune cells were activated in skin and lymph node of Tmem79 KO mice in SPF condition, no induction of immune cells were observed in those in germ free condition. These findings indicate a role of skin microbiota in the induction of skin inflammation in Tmem79 KO mice.

3) Identification and characterization of stratum corneum components

We isolated SG1 cells from transgenic mice expressing GFP protein in SG1 cell layer (outermost layer of stratum granulosum) of epidermis. However, isolated SG1 cells were very fragile and their DNA/RNA/proteins were easily degraded during isolation procedure. Instead, we prepared mouse SG1/SG2 cell sheet by intradermal injection of exfoliative toxin A (ET-A). We started to perform DNA microarray and RNAseq analysis of RNA prepared from mouse SG1/SG2 cell sheet or mouse epidermal sheet that contain the entire layer of epidermis.

4) *in vivo* imaging analyses of stratum corneum pH

We have recently generated SC-pH imaging transgenic mice line (Venus^{H148G}-mCherry mice). To stably anesthetize this mouse line for live-imaging, we optimized the method of inhalation anesthesia by isoflurane or intraperitoneal injection anesthesia by somnopentyl. We also finished backcross of Venus^{H148G}-mCherry mice with hairless mouse background (Hos:HR-1). This hairless mouse line enabled us to examine SC-pH of the various body sites.

5) Molecular mechanism of cell death in stratum granulosum cells (SG1 cells) during cornification

We have optimized and established *in vitro* imaging system to observe the degradation of nucleus, mitochondria and golgi apparatus of isolated mouse SG1 cells by using fluorescent protein-expressing mice.

6) Identification of *S. aureus* factor(s) involved in triggering atopic dermatitis

TF3378 is an isolate from atopic dermatitis and it preferentially adheres to back skin of Filaggrin KO mouse. To analyze systemic gene expression of TF3378 adhering to Filaggrin KO mouse, we succeeded in isolating enough total RNA from the bacteria recovered from the back skin.

7) Visualization of *S. aureus* clinical isolates

We developed a plasmid carrying *blaZ* promoter fused with *sod* gene (superoxide dismutase gene) RBS. By using this plasmid, we succeeded in expressing a variety of fluorescent proteins (GFPsa, EGFP, mEmerald, Citrine, Cerulean and BFP) in clinical isolates (Sci Reports in press).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 3件、国際誌 1件)

1. Yokouchi M, Atsugi T, Logtestijn MV, Tanaka RJ, 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, (doi: 10.7554/eLife.19593), 2016.
2. 横内麻里子, 久保亮治, 天谷雅行: 皮膚バリアの破綻とアトピー性皮膚炎. **Medical Science Digest**, 42 (6), 268-271, 2016.
3. 天谷雅行: 皮膚バリアとアトピー性疾患. **日本食品免疫学会講演記録集**, 2 139-141, 2016.
4. 川崎洋, 川上英良, 天谷雅行, 古関明彦: アトピー性皮膚炎のリバーストランスレショナルリサーチ. **実験医学**, 35 (1), 33-39, 2017.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure in atopic disorders. **31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum**, Charleston, South Carolina, USA, 2016. 4. 3- 8. (国外、口頭)
2. 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 回分子皮膚科学フォーラム**, 大阪, 2016. 4. 15-16. (国内、口頭)
3. Amagai M: Skin Barrier function and dysfunction in atopic diseases. **4th Taiwan Dermatology Aesthetic Conference/2016 Taiwanese Dermatological Association Spring Meeting**, Taiwan, 2016. 4. 30- 5. 1. (国外、口頭)
4. Ruebsam M, Mertz A, Goranci G, Horsley V, Dufresne E, Ziegler W, Kubo A, Amagai M, Niessen CM: Tissue polarization of mechano-adhesive signals, cytoskeleton and EGFR signaling controls skin barrier formation. **The 75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Scottsdale, Arizona, USA, 2016. 5. 11-14. (国外、ポスター)
5. 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. **The 75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology**, Scottsdale, Arizona, USA, 2016. 5. 11-14. (国外、口頭およびポスター)
6. RübSam M, Mertz A, Kubo A, Dufresne ER, Horsley V, Ziegler W, Wickström SA, Amagai M, Niessen AC: E-cadherin intergrates EGFR signaling and mechanotransduction to control tissue polarization and barrier formation. **46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research**, Munich, Germany, 2016. 9. 7- 10. (国外、口頭およびポスター)
7. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure in atopic dermatitis. **25th European Academy of Dermatology and Venereology Congress**, Vienna, Austria, 2016. 9. 28- 10. 2. (国外、口頭)
8. 天谷雅行: アトピー性皮膚炎と皮膚バリア障害. **第 53 回日本小児アレルギー学会**, 群馬, 2016. 10. 8-9. (国内、口頭)
9. Amagai M: The skin as a barrier in a dirty world. **136th Annual Meeting of American Dermatological Association**, Santa Barbara, CA, USA, 2016. 10. 19-23. (国外、口頭)
10. 久恒順三, 増田加奈子, 佐藤祐介, 小野久弥, 胡東良, 中根明夫, 萩谷英大, 水谷哲, 原田和俊, 本多皓, 伊勢美咲, 船越建, 天谷雅行, 大毛宏喜, 菅井基行: 侵襲性感染症由来 Staphylococcus aureus が保有する表皮細胞分化抑制因子 EDINA-エンテロトキシン SEZ プラスミドの解析. **第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第 63 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会**, 新潟, 2016. 10. 26-28. (国内、口頭)

11. 天谷雅行: 皮膚バリア恒常性機構とその破綻. **第 68 回日本皮膚科学会西部支部学術大会**, 米子, 2016. 11. 19-20. (国内、口頭)
12. 松井毅, 白井景子, 葛野菜々子, 古市祐樹, 平林愛, 天谷雅行: 皮膚表皮顆粒層細胞動態から明らかにする陸上脊椎動物の気相環境への適応進化機構. **第 39 回日本分子生物学会**, 横浜, 2016. 11. 30- 12. 2. (国内、口頭)
13. Amagai M: Atopic diseases as a result of skin barrier failure. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭)
14. Furuichi Y, Matsui T, Amagai M: Real time 3D in vivo pH imaging of stratum corneum revealed complex morphology-based in mice. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭およびポスター)
15. Kawasaki H, Kasai H, Endo TA, Ashizaki K, Yasuda F, Amagai M, Ebihara T: The classification of atopic dermatitis patients using machine learning method, based on the therapeutic outcome for the proactive treatment. **41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology**, Sendai, Japan, 2016. 12. 9-11. (国内、口頭およびポスター)
16. Amagai M: Skin barrier homeostasis and its failure. **2017 NHRI / IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease**, Taiwan, 2017. 2. 16-17. (国外、口頭)
17. Amagai M: Mechanisms of Skin Barrier Homeostasis. **RIKEN IMS Retreat 2016**, Hayama, Kanagawa, Japan, 2017. 2. 20-21. (国外、口頭)
18. Amagai M, Furuichi Y, Matsui T: 3D in vivo pH imaging analysis of stratum corneum. **The 27th Annual Meeting of the Korean Society for Investigative Dermatology**, Seoul, Korea, 2017. 3. 24-25. (国外、口頭)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 皮膚細菌叢と宿主の相互作用理解に基づく炎症性疾患制御法の開発
(英語) Development of novel therapeutic strategies for inflammatory diseases based on the host and skin microbiota interplay

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名： (英語) Masayuki Amagai, Professor and Chair, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 皮膚角層環境解析による皮膚細菌叢生態の解明
開発課題名： (英語) Understanding of skin microbiome through analysis of epidermal stratum corneum

研究開発分担者 (日本語) 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
副チームリーダー 松井 毅
所属 役職 氏名： (英語) Takeshi Matsui, Deputy Team Leader, Laboratory for Skin Homeostasis, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences(IMS)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：慶應義塾大学・医学部・天谷雅行 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 3D in vivo pH imaging analysis of stratum corneum、ポスター、Amagai M, Furuichi Y, Matsui T、The 27th Korean Society for Investigative Dermatology、2017/3/24-25、国外
2. Real time 3D in vivo pH imaging of stratum corneum revealed complex morphology-based regulation in mice、口頭、Furuichi Y, Matsui T, Amagai M、The 41th Japanese Society for Investigative Dermatology、2016/12/9-11、国内
3. 皮膚表皮バリアの形成機構、口頭、松井 毅、異分野融合ワークショップ 公開シンポジウム「刺激を与えて細胞を制御する：化合物、紫外線からプラズマまで」、2017/3/6、国内
4. 皮膚表皮顆粒層細胞動態から明らかにする陸上脊椎動物の気相環境への適応進化機構、口頭、松井 毅、第39回日本分子生物学会年会、2016/12/1、国内
5. Initiation of cornification is regulated by Ca²⁺ and pH in isolated mouse stratum granulosum cells、口頭、T Matsui、27th CDB Meeting [Body Surface Tactics: Cellular crosstalk for the generation of super-biointerfaces]、2016/11/14、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 皮膚細菌叢と宿主の相互作用理解に基づく炎症性疾患制御法の開発
(英語) Development of novel therapeutic strategies for inflammatory diseases based on the host and skin microbiota interplay

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷雅行
所属 役職 氏名：(英語) Masayuki Amagai, Professor and Chair, Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

実施期間：平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ヒト疾患由来黄色ブドウ球菌の皮膚炎誘導病原性の解明
開発課題名：(英語) Elucidation of pathogenic mechanisms of dermatitis induced by *Staphylococcus aureus* human isolates

研究開発分担者 (日本語) 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
所属 役職 氏名：(英語) Motoyuki Sugai, Professor, Department of Bacteriology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical & Health Sciences

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合
研究開発代表者：慶應義塾大学・医学部・天谷雅行 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Fuminori Kato, Motoki Nakamura, Motoyuki Sugai. The development of fluorescent protein tracing vectors for multicolor imaging of clinically isolated *Staphylococcus aureus*. Sci. Reports in press 2017

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし