

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15548

研究課題名(和文) 網羅的解析により新規に同定した未知のアトピー遺伝子の機能解明

研究課題名(英文) New atopy gene X identified by multiple transcriptome studies

研究代表者

大日 輝記(Dainichi, Teruki)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20423543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは4種類の異なるアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚のトランスクリプトーム解析を行った結果、共通して発現するただ1つの未知の遺伝子Xを見出した。この遺伝子は、他の皮膚炎モデル、またヒトのアトピー性皮膚炎、乾癬の表皮でも強い発現誘導がみられた。X遺伝子を導入した正常ヒトケラチノサイトでは炎症制御分子の発現が促進した。さらに、X遺伝子導入ケラチノサイトのRNA-Seqの解析結果、遺伝子Xが細胞接着、脂質合成、ミトコンドリアの機能調節に関わる可能性が示された。以上より本遺伝子は、炎症、ストレスに対する応答、表皮バリア機能を含めた皮膚の生体防御機能も制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed transcriptome analysis of four animal models for atopic dermatitis and found only one new gene X. We found that the expression levels of gene X and its translational products are increased also in other dermatitis animal models, and human atopic dermatitis and psoriasis. The expression levels of inflammatory mediators in X-transfected human keratinocytes are higher than those in keratinocytes transfected with control vectors. The gene ontology analysis of the results of their RNA-Seq analysis demonstrated that gene X is involved in cell adhesion and differentiation, lipid synthesis, mitochondria. These results suggested that gene X can be involved in the defense system of the skin, including inflammation, stress responses, and barrier.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮 炎症 ストレス バリア

1. 研究開始当初の背景

2002年、上皮由来サイトカインの TSLP がヘルパー T 細胞(Th)2 型の分化に関わること、アトピー性皮膚炎の表皮は TSLP を高発現することが示された (Soumelis, Nat Immunol 2002)。2006年、アトピー性皮膚炎の患者の一部は皮膚のバリアを担うフィラグリン遺伝子の変異を伴うことが報告された (Palmer, Nat Genet 2006)。その後 10 年間の本疾患の研究の多くが、これら 2 つの先駆的研究に追従することで生まれた。現在では、バリア障害は Th2 型炎症と互いに悪循環の関係にあること、皮膚以外のアトピー疾患の発症にも関与していることが、広く受け入れられている。

しかしながら、TSLP の発現はアトピー性皮膚炎に特徴的な Th2 型炎症に必ずしも特異的ではないこと、フィラグリンの異常は本疾患の多様な病態を必ずしも一元的には説明できず、またマウスではそれだけでは十分な Th2 型炎症の連鎖に至らないことが次第に明らかにされた。

したがって、これら 2 つのアプローチとは異なる新たな切り口によって、疾患の理解を飛躍的に進展させ、これらに比肩するフォローを生む、新たな概念の提唱が必要とされている。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎の発症機序に関して、2002年に上皮由来サイトカインの thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の関与が、2006年にフィラグリン遺伝子変異によるバリア異常の先行が報告された。しかしその後 10 年間の研究は、これら 2 つの先駆的研究に追従した研究がほとんどであり、飛躍的な進歩が待ち望まれている。新たな別のアプローチを目指して、申請者は 4 種類のアトピー性皮膚炎モデル動物の網羅的解析を行い、アトピー性皮膚炎への関与が強く示唆される未知の遺伝子を新規に同定した (未発表)。本研究の目的は、アトピー性皮膚炎における本遺伝子の役割を明らかにすることで、本疾患の全く新しい発症機序の提案を目指すことにある。

3. 研究の方法

1) 遺伝子 X の発現誘導の特異性および動態の評価

遺伝子 X の発現誘導の特異性および動態の評価をさまざまな皮膚炎モデル動物、およびヒトの炎症性皮膚疾患で評価した。

2) 遺伝子 X の発現誘導の培養細胞での評価
ヒト表皮細胞株およびマウスまたはヒト初代培養表皮細胞に既知のさまざまな物理的、薬理的刺激を加え、遺伝子 X の生体での強力な発現誘導の再現を試みた。

3) 遺伝子 X の下流の転写制御の評価

遺伝子 X を表皮細胞株である HaCaT およびヒト培養表皮細胞に遺伝子導入し、各種遺伝子発現への影響を評価した。

4) RNA-Seq による遺伝子 X の機能解析

遺伝子 X または対象ベクターを導入したヒト培養表皮細胞の網羅的 RNA シークエンシングを行い、遺伝子オントロジー解析による遺伝子 X の機能の推測を行った。

4. 研究成果

1) 遺伝子 X の発現誘導の生体での評価

本遺伝子を見出した 4 種類のアトピー性皮膚炎モデル動物以外の 1 つのアトピー性皮膚炎モデル動物、3 つの乾癬モデル動物、1 つのアレルギー性接触皮膚炎モデル動物、1 つの刺激性皮膚炎モデル動物のいずれにおいても、病変部での著しい発現が観察された。ヒトの病変部の生検皮膚検体を用いた免疫組織化学で、遺伝子 X の翻訳産物の発現が、アトピー性皮膚炎の表皮で強くみられただけでなく、乾癬の表皮でも同様に強く誘導されていた。

2) 遺伝子 X の発現誘導の培養細胞での評価

HaCaT 細胞株、またマウスまたはヒト初代培養表皮細胞を各種サイトカイン、TLR リガンド、マイトジェン、pH 変化、浸透圧変化、カルシウム濃度変化などで刺激し、遺伝子 X の生体での強力な発現誘導の再現を試みたものの、2 つの条件を除き、遺伝子 X の発現はほとんど誘導されなかった。

3) 遺伝子 X の下流の転写制御の評価

リポフェクションによる遺伝子 X の遺伝子導入後の転写反応を対照ベクターの導入群と比較した。HaCaT では大きな影響がみられなかった。ヒト培養表皮細胞では、対照と比較して、炎症性メディエーターの遺伝子発現誘導が観察された。

4) RNA-Seq による遺伝子 X の機能解析

遺伝子 X を導入したヒト培養表皮細胞と対象ベクターを導入したヒト培養表皮細胞の網羅的 RNA シークエンシングの結果の比較で、2,186 の遺伝子発現に優位な違いがみられ、このうち対照に対して発現の程度が 2 倍以上を示したものは 611 遺伝子、逆に 2 分の 1 以下を示したものは 183 遺伝子であった。また遺伝子オントロジー解析の結果は、遺伝子 X が、細胞接着、コレステロール合成、ミトコンドリアの機能調節に関わる可能性を示した。

以上より本遺伝子は、皮膚炎において幅広く表皮で発現が誘導されること、炎症の上位を司る制御因子である可能性があること、皮膚においては外的ストレスに対する応答、表皮の細胞接着や角化などのバリア機能を含めた皮膚の生体防御機能も制御する可能性が示された。

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 19 件)

- 1) Dainichi T, Kabashima K. Alopecia areata: What's new in epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutic options? *J Dermatol Sci* 86: 3-12, 2017.
- 2) Dainichi T, Chow Z, Kabashima K. IgG4, complement, and the mechanisms of blister formation in pemphigus and bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 88: 265-270, 2017.
- 3) Ono S, Egawa G, Kitoh A, Dainichi T, Otsuka A, Nakajima S, Honda T, Kabashima K. Local inflammation exacerbates cutaneous manifestations in a murine autoimmune pemphigus model. *J Allergy Clin Immunol* 139: 2026-2028 e2025, 2017.
- 4) Nakamizo S, Honda T, Adachi A, Nagatake T, Kunisawa J, Kitoh A, Otsuka A, Dainichi T, Nomura T, Ginhoux F, Ikuta K, Egawa G, Kabashima K. High fat diet exacerbates murine psoriatic dermatitis by increasing the number of IL-17-producing gammadelta T cells. *Sci Rep* 7: 14076, 2017.
- 5) Murata T, Honda T, Egawa G, Kitoh A, Dainichi T, Otsuka A, Nakajima S, Kore-Eda S, Kaku Y, Nakamizo S, Endo Y, Fujisawa A, Miyachi Y, Kabashima K. Three-dimensional evaluation of subclinical extension of extramammary Paget disease: visualization of the histological border and its comparison to the clinical border. *Br J Dermatol* 177: 229-237, 2017.
- 6) Honda T, Yamamoto O, Sawada Y, Egawa G, Kitoh A, Otsuka A, Dainichi T, Nakajima S, Miyachi Y, Kabashima K. Receptor-interacting protein kinase 3 controls keratinocyte activation in a necroptosis-independent manner and promotes psoriatic dermatitis in mice. *J Allergy Clin Immunol* 140: 619-622 e616, 2017.
- 7) Komori T, Dainichi T, Kusuba N, Otsuka A, Hashimoto T, Kabashima K. Efficacy of intravenous immunoglobulins for the treatment of mucous membrane pemphigoid-like epidermolysis bullosa acquisita. *Eur J Dermatol* 27: 563-564, 2017.
- 8) Kanameishi S, Dainichi T, Endo Y, Otsuka A, Tanioka M, Kabashima K. Successful hair regrowth in an acute diffuse form of alopecia areata during oral tacrolimus treatment in a patient with rheumatoid arthritis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31: e137-e138, 2017.
- 9) Yamashita C, Nakamizo S, Honda Y, Dainichi T, Kabashima K. Combination therapy of prednisolone and i.v. immunoglobulin treatment decreases circulating interleukin-5 and eosinophils in a patient with bullous pemphigoid. *J Dermatol* 44: 101-102, 2017.
- 10) Otake-Irie H, Dainichi T, Kabashima K. Erythema With Nonscarring, Tense Blister Formation Without Circulating Anti-BP180 Antibodies. *JAMA Dermatol* 153: 1185-1186, 2017.
- 11) Kusudo E, Endo Y, Kitayama N, Ishida Y, Fujisawa A, Dainichi T, Kabashima K. Pemphigus foliaceus developed in a patient with long-term erosion on the genital skin. *J Dermatol* 44: e126-e127, 2017.
- 12) Kitayama N, Nakamizo S, Nonomura Y, Kaku Y, Endo Y, Dainichi T, Okura M, Hida T, Yamashita T, Otsuka A, Kabashima K. Case of diffuse panbronchiolitis developed in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *J Dermatol* 44: e363-e364, 2017.
- 13) Kanameishi S, Nakamizo S, Endo Y, Fujisawa A, Dainichi T, Tanaka T, Izawa K, Nishikomori R, Kabashima K. High level of serum human interleukin-18 in a patient with pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31: e115-e116, 2017.
- 14) Honda Y, Nakamizo S, Dainichi T, Sasai R, Mimori T, Hirata M, Kataoka TR, Murata Y, Otsuka A, Kabashima K. Adult-onset asthma and periocular xanthogranuloma associated with IgG4-related disease with infiltration of regulatory T cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31: e124-e125, 2017.
- 15) Kusuba N, Kitoh A, Dainichi T, Honda T, Otsuka A, Egawa G, Nakajima S, Miyachi Y, Kabashima K. Inhibition of IL-17-committed T cells in a murine psoriasis model by a vitamin D analogue. *J Allergy Clin Immunol* 141: 972-981 e910, 2018.
- 16) Kanameishi S, Kaku Y, Goto K, Ishida Y, Endo Y, Dainichi T, Sakurai T, Kataoka T, Miyagawa-Hayashino A, Kabashima K. Angiomatoid fibrous histiocytoma of the scalp mimicking cutaneous angiosarcoma in incisional biopsy containing CD31-positive histiocytes: A potential histopathological pitfall. *J Dermatol* 45: 235-237, 2018.
- 17) Cho M, Nonomura Y, Kaku Y, Dainichi T,

Otsuka A, Kabashima K. Generalized Lichen Nitidus Following Anti-PD-1 Antibody Treatment. *JAMA Dermatol* 154: 367-369, 2018.

- 18) Komori T, Dainichi T, Masuno Y, Otsuka A, Nakano H, Sawamura D, Ishida-Yamamoto A, Kabashima K. p.Glu477Lys mutation in keratin 5 is not necessarily mortal in generalized severe epidermolysis bullosa simplex. *J Dermatol*, 2018. doi: 10.1111/1346-8138.14258. [Epub ahead of print]
- 19) Goto K, Nomura T, Kogame T, Irie H, Kaku Y, Dainichi T, Kabashima K. Improvement of erosive pustular dermatosis of the scalp following discontinuation of chemotherapy with afatinib. *Eur J Dermatol*, 2018. doi: 10.1684/ejd.2018.3220. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) Matsumoto R, Dainichi T, Nomura T, Kabashima K. Keratinocytes regulate psoriatic inflammation via TRAF6-dependent signalling pathways. Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting. Portland, OR, USA, 2017.
- 2) Sakurai K, Dainichi T, Matsumoto R, Nakano Y, Kabashima K. Epidermal activation of p38 MAPK is essential for the induction of IL-17-producing cells and psoriasis-like dermatitis. Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting. Portland, OR, USA, 2017.
- 3) Nakano Y, Dainichi T, Wakae K, Shima K, Muramatsu M, Kabashima K. Induction of APOBEC3s in Merkel cell carcinoma infected with polyomavirus by interferon-gamma. Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting. Portland, OR, USA, 2017.
- 4) Matsumoto R, Dainichi T (Presenter), Sakurai K, Nomura T, Kabashima K. Epithelial TRAF6 Governs Interleukin-17-Mediated Psoriatic Inflammation. Gordon Research Conference on Epithelial Differentiation & Keratinization. Renaissance Tuscany II Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy, 2017.
- 5) Matsumoto R, Dainichi T (Presenter), Kabashima K. Epithelial TRAF6 signaling initiates and propagates Interleukin-17-mediated inflammation. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Kanazawa, Japan, 2017.
- 6) Dainichi T, Yamashita C, Yamagami J,

Amagai M, Kabashima K. Pemphigus decalvans: a pemphigus case dominant in the scalp with hair loss and less lesions in the other sites. 10th World Congress for Hair Research, Kyoto, Japan, 2017.

- 7) Matsumoto R, Dainichi T (Presenter), Sakurai K, Nakano Y, Otsuka M, Nomura T, Kabashima K. A Key signaling molecule for the establishment of inflammatory loop of IL-17 in the skin identified in keratinocytes. European Society for Dermatological Research 2017 Annual Meeting. Salzburg, Austria, 2017.

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 大日 輝記. ジェネリック・OTC 外用薬処方時のピットフォールトは？ 宮地良樹編. 専門医でも聞きたい皮膚科診療 100 の質問. メディカルレビュー社, 2017.
- 2) 大日 輝記. 円形脱毛症にはステロイド局注が第一選択？ 宮地良樹編. 専門医でも聞きたい皮膚科診療 100 の質問. メディカルレビュー社, 東京, 2017.
- 3) 大日 輝記. 接触皮膚炎. 福井次矢, 高木誠, 小室一成編. p.1218-1220. 今日の治療指針 2018. 医学書院, 東京, 2018.

〔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
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~skin/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
大日 輝記 (DAINICHI, Teruki)
京都大学大学院・医学研究科・講師
研究者番号：20423543