

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08691

研究課題名（和文）掌蹠膿疱症の発症メカニズム：初期水疱形成環境の三次元微細構造解析と実験モデル作成

研究課題名（英文）The 3D imaging and experimental model construction of Palmoplantar pustulosis

研究代表者

村上 正基（Masamoto, Murakami）

愛媛大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：20278302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：二光子励起顕微鏡を用いた掌蹠膿疱症水疱環境におけるバイオイメーキングを行い、三次元的に病変環境の観察に成功した。透明化剤を併用した新規ソルバトクロミック色素による二光子顕微鏡観察方法を確立したことにより、既存HE染色病理組織像と比較しても形態学的に遜色のない詳細な三次元組織像を得ることができるようになった（前年度報告済み）。当該技術は、通常のHEによる病理組織作成並びに診断までの時間と当該新規観察方法による診断までの所要時間が劇的に時間短縮されたこと（1～2週間→3日）、染色方法が極めて簡便でかつ特殊な染色器具などを要しないことなどが特筆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透明化剤と新規ソルバトクロミック色素による新規蛍光組織染色方法を考案し、二光子顕微鏡による観察方法を組み合わせることで、これまで見ることのできなかつた組織三次元構築を既存病理組織染色方法と同レベルで描出することに世界で初めて成功した。さらにin vitroのみならずin vivoでもこの観察方法が応用できる可能性が明らかとなり、さらに技術の発展性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Bioimaging in the blister environment of palmoplantar pustulosis using two-photon excitation microscopy was successfully performed to observe the lesion environment in three dimensions. By establishing a two-photon microscopic observation method using a new solvatochromic dye in combination with a transparency agent, we were able to obtain a detailed three-dimensional histological image that is morphologically comparable to existing HE-stained histopathological images (reported in the previous year). The new technique dramatically shortened the time required to prepare and diagnose pathology using conventional HE staining (from 1-2 weeks to 3 days), and the staining method is extremely simple and does not require any special staining equipment.

研究分野：皮膚科学

キーワード：掌蹠膿疱症 三次元イメージング ソルバトクロミック色素 バイオイメーキング

1. 研究開発当初の背景

難治性皮膚疾患である掌蹠膿疱症の病変が表皮内汗管に生じること、免疫学的エクリン汗システム異常によるものであることを明らかとしてきた。しかし未だに、「何故表皮内汗管にこのような病変が生じるのか」という根本的な掌蹠膿疱症の発生メカニズムの詳細は不明である。現時点でも掌蹠膿疱症のマウスモデルは存在しないため、患者組織から得られる情報が最も重要であるが、通常の病理組織学的検索方法では、病変部を三次元で観察することは極めて困難であった。さらなる形態学的検索を進めるために、我々は二光子励起顕微鏡による詳細なヒトサンプル内エクリン汗腺三次元イメージングのための至適条件検討を行い、*in vivo/vitro* でエクリン汗腺を三次元的に観察すること、並びに当該技術を生かして掌蹠膿疱症の三次元観察ならびに病態解析を着想した。

2. 研究の目的

本研究では掌蹠膿疱症が発症する際に、最も初期に出現する水疱形成環境下でのエクリン汗管細胞及び周囲角化細胞に焦点をあて、微小環境での形態学的変化などを詳細に検討し、さらにエクリン汗腺細胞三次元モデルを用いた汗管閉塞現象(水疱形成機序)の再現を試みた。以下の二点が主目的となる。二光子励起顕微鏡を用いた掌蹠膿疱症水疱環境におけるバイオイメージングを行い、三次元的に病変環境の観察と発生病態に関する物質を網羅的に検索する。三次元ヒト由来エクリン汗腺細胞培養を用いた汗管閉塞(障害)現象の誘導の試み(実験モデルによる初期水疱形成環境再現の試み)。

3. 研究の方法

(1) 二光子励起顕微鏡を用いた掌蹠膿疱症水疱環境のイメージング:

健康人ヒト正常部組織(手指・手掌・足底)により検討されたエクリン汗管の三次元イメージングの実験プロトコルをベースに、愛媛大学医学部附属病院で得られた患者病理検体を用いて、掌蹠膿疱症(初期)水疱、非病変部汗管を観察する。HE染色組織像では“好酸性角栓様構造物”が汗管内に観察され、表皮内汗管の閉塞が強く示唆されていたが、我々は三次元的に汗腺内に脂溶性物質の充填を見出し、その仮説を支持するデータを得ている(図5・未発表データ)。水疱周囲微小環境で生じているイベントを解析するために、炎症性サイトカイン(IL-8, 17, 23など)、単球マクロファージ遊走因子(MCP1, MIP-1 α など)、角層剥離酵素(KLK, LEKTI, CDSNなど)などの蛍光免疫染色を行い、二光子励起顕微鏡を用いて蛍光多重染色を行い、三次元的にこれら物質の共発現などの局在性を観察し病態を考察する

(2) 三次元ヒト由来エクリン汗腺細胞(独立・混合)培養系(モデル)の樹立:

多指症症例の指腹からエクリン汗腺細胞を分離・培養を行い、腺管細胞および腺房細胞をそれぞれ独立して培養、あるいは共培養する。Sub confluent になったところで、マトリジェ

ル培養系 (Li X et al., J Mol Hist 2017)を用いてエクリン汗腺構造構築を形成する。コロニー形成が確認された時点で、汗腺幹細胞と目されている筋上皮細胞には α SMA、CD29CD49f を、暗調細胞および明調細胞分化マーカーとしては、CEACAM5、CHRM3、NKCC1、ANO1/TMEM16A、AQP5 を、汗腺幹細胞と目されている筋上皮細胞には SMA、CD29CD49f を用いて確認をし、汗管培養系、腺管培養系を獲得する。

4. 研究成果

(1) 二光子励起顕微鏡を用いた掌蹠膿疱症水疱環境のイメージング：

掌蹠膿疱症の発症環境である皮膚表皮内の構造物(エクリン汗管、表皮内水疱、表皮内膿疱など)を通常の HE 染色病理組織で観察するために、非常に多くの連続切片を作成し観察を行ったとしても、CT 画像のように水平方向の情報を得ることは難しい。得られた画像を CG 合成し 3D 画像の作成を試みても、そもそも薄切された多くの切片から再構築された画像ゆえ、組織構造の詳細な関係などについて観察することは困難であった。

我々は、新規ソルバトクロミック色素・透明化試薬を組み合わせた二光子顕微鏡観察法によって、三次元及びディープイメージングを行うことに世界で初めて成功した(Acta Histochem Cytochem 2020)。

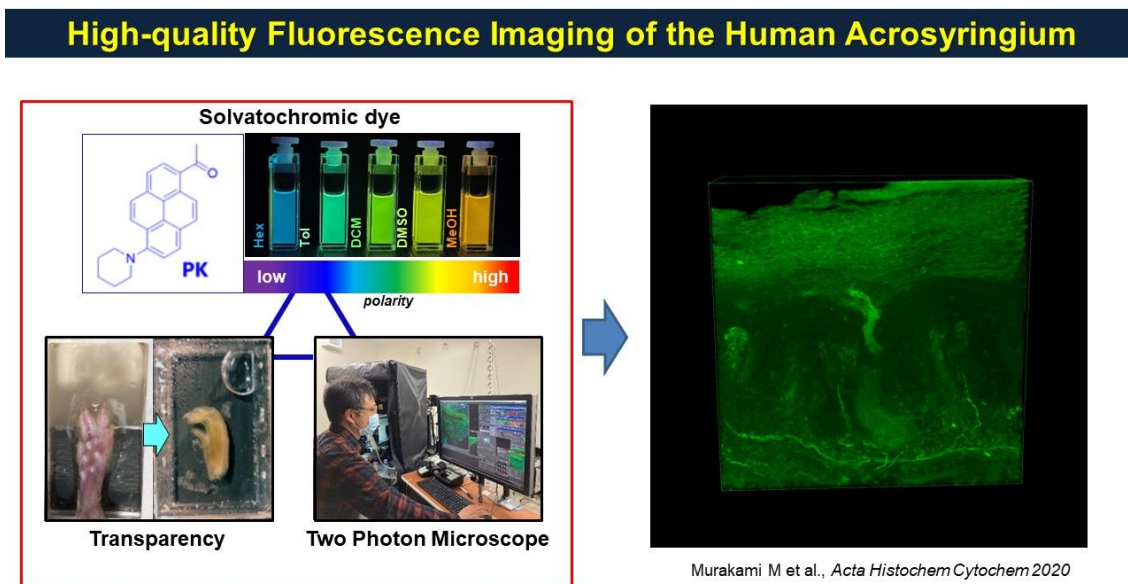


図 1：当該観察方法外用並びに表皮内エクリン汗管の三次元構造。

当該観察方法により、表皮内汗管の微細構造を三次元で確認することが可能となり、これまでの HE 染色を用いた組織切片による観察方法では得られることのできなかつた組織構築を立体的に上下左右のいずれの方向からも観察することが可能となった(図 1)。

当該観察方法が確立されたことにより、表皮内汗管に病態の主座をおく掌蹠膿疱症の病変部組織を三次元的に観察することが可能となった。実際のヒト病変部から、わずか2mmのパンチ生検材料を採取し、これを当該観察方法を用いて、掌蹠膿疱症の水疱・膿疱を観察したところ、掌蹠膿疱症水疱の三次元構造の描出に世界で初めて成功し、あらためて水疱・膿疱とエクリン汗腺の直接的な関連性が三次元画像にて確認・証明された(J Dermatol Res 2021)。

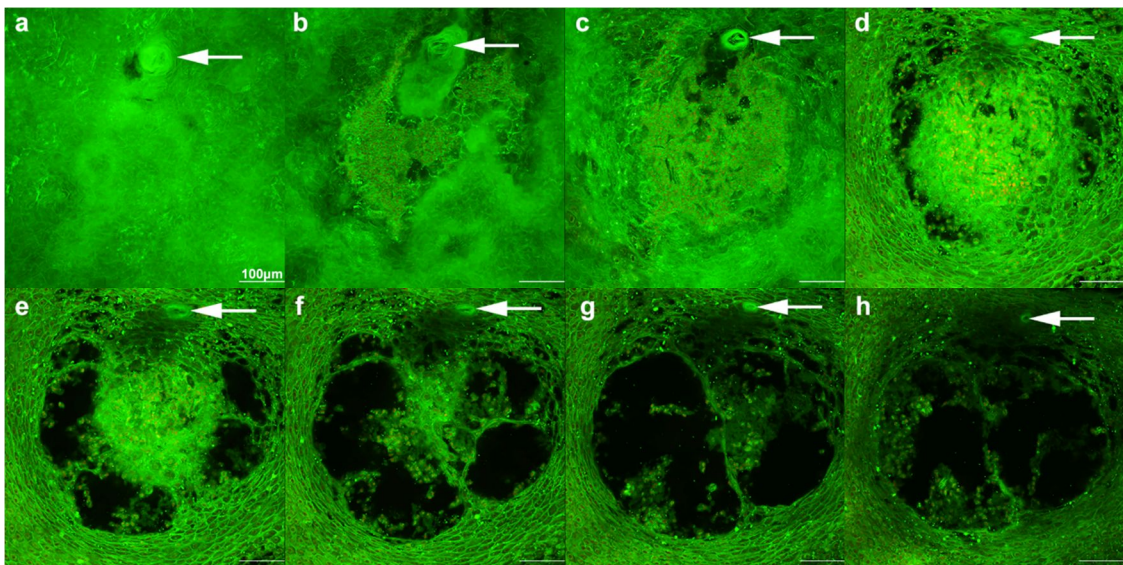


図 2：掌蹠膿疱症水疱膿疱部。角層(a)から表皮下層(h)への連続画像。矢印はエクリン汗管。(f)ではエクリン汗管の一部が欠損し、水疱膿疱との直接連続が示されている。

その後、透明化剤を使用せずに表皮内汗管構造を観察できる、高輝度高感度なソルパトクロミック色素の開発にも成功し、掌蹠膿疱症病態観察を in vitro から in vivo へ展開するための準備に取り掛かっている。

(2) 三次元ヒト由来エクリン汗腺細胞(独立・混合)培養系(モデル)の樹立：

三次元ヒト由来エクリン汗腺細胞(独立・混合)培養系(モデル)を樹立し、得られた結果の再現を試みたが、やはり既報の追試・再現は非常に困難であることが明らかとなり、残念ながら我々が提案した実験方法では、期待した汗腺組織を構築することは不可能であった。新たな実験戦略としては、エクリン汗腺マウスモデルの作成へ方向転換し、マウス指汗管をターゲットとしたライブイメージングの開発に取り掛かっている。

発表論文：

1. Murakami M, Kawakami R, Niko Y, Tsuda T, Imamura T. Research letter: A new

fluorescent three-dimensional and deep-imaging technique for histological identification of individual tumor cells in extramammary Paget's disease. *Exp Dermatol.* 2022, 32(5):712-714. DOI: 10.1111/exd.14759

2. Murakami M, Kawakami R, Niko Y, Tsuda T, Yatsuzuka K, Mori H, Imamura T, Sayama K. New fluorescent three-dimensional and deep-imaging technique confirms a direct relationship between the acrosyringium and vesicles/pustules of palmoplantar pustulosis. *J Dermatol Sci.* 2021; 102(2): 130-132.
3. Murakami M, Kawakami R, Niko Y, Tsuda T, Mori H, Yatsuzuka K, Imamura T, Sayama K. High-quality fluorescence imaging of the human acrosyringium using a transparency-enhancing technique and an improved, fluorescent solvatochromic pyrene probe. *Acta Histochemica et Cytochemica* 2020; 53(6): 131-138.
4. Inoue K, Kawakami R, Murakami M, Nakayama T, Yamamoto S, Inoue K, Tsuda T, Sayama K, Imamura T, Kaneno D, Hadano S, Watanabe S, Niko Y. Synthesis and photophysical properties of a new push-pull pyrene dye with green-to-far-red emission and its application to human cellular and skin tissue imaging. *J Mater Chem B.* 2022 ;10(10):1641-1649.
5. 村上正基：ヒト手掌皮膚におけるエクリン汗腺の三次元画像観察、Nikon APPLICATION NOTE、2021.
6. 村上正基：3新しい検査法と診断法、ソルバトクロミック色素と二光子顕微鏡による新しい皮膚組織観察方法、臨床皮膚科増刊号 2023年、p80-85、医学書院（東京）2023年

学会発表：

1. 村上正基：新しい皮膚組織観察法 —新規蛍光色素による 3次元イメージング【ワークショップ】組織細胞化学の最新研究、第62回日本組織細胞化学会総会、オンライン、2021.09.25
2. 村上正基：ソルバトクロミック色素と二光子顕微鏡による新しい皮膚組織観察方法、【シンポジウム1】皮膚をみる：バイオイメージング法の応用、第121回日本皮膚科学会総会、京都、2022.06.02

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Inoue Kazuki, Kawakami Ryosuke, Murakami Masamoto, Nakayama Taku, Yamamoto Shinkuro, Inoue Keiji, Tsuda Teruko, Sayama Koji, Imamura Takeshi, Kaneno Daisuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru, Niko Yosuke | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Synthesis and photophysical properties of a new push-pull pyrene dye with green-to-far-red emission and its application to human cellular and skin tissue imaging | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B | 6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1649 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1tb02728j | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Murakami Masamoto, Kawakami Ryosuke, Niko Yosuke, Tsuda Teruko, Mori Hideki, Yatsuzuka Kazuki, Imamura Takeshi, Sayama Koji | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 High-quality Fluorescence Imaging of the Human Acrosyringium Using a Transparency: Enhancing Technique and an Improved, Fluorescent Solvatochromic Pyrene Probe | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA | 6. 最初と最後の頁 131 ~ 138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.20-00020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Murakami Masamoto, Kawakami Ryosuke, Niko Yosuke, Tsuda Teruko, Yatsuzuka Kazuki, Mori Hideki, Imamura Takeshi, Sayama Koji | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 New fluorescent three-dimensional and deep-imaging technique confirms a direct relationship between the acrosyringium and vesicles/pustules of palmoplantar pustulosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science | 6. 最初と最後の頁 000-000 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.03.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Murakami Masamoto, Kawakami Ryosuke, Niko Yosuke, Tsuda Teruko, Imamura Takeshi | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Research letter: A new fluorescent three dimensional and deep imaging technique for histological identification of individual tumor cells in extramammary Paget's disease | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Dermatology | 6. 最初と最後の頁 712 ~ 714 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.14759 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 村上正基 |
| 2. 発表標題 新しい皮膚組織観察法;新規蛍光色素による 3次元イメージング |
| 3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村上正基 |
| 2. 発表標題 ソルバトクロミック色素と二光子顕微鏡による新しい皮膚組織観察方法 |
| 3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 八束 和樹 (Yatsuzuka Kazuki) (30844766) | 愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員) (16301) | |
| 研究分担者 | 川上 良介 (Kawakami Ryosuke) (40508818) | 愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301) | |
| 研究分担者 | 森 秀樹 (Mori Hideki) (60325389) | 愛媛大学・医学系研究科・講師 (16301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|