

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590431

研究課題名（和文） レーザーマイクロダイセクションによる病変内マスト細胞遺伝子発現プロファイリング

研究課題名（英文） The gene expression profiling of lesional skin mast cells collected by laser capture microdissection

研究代表者

伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273647

研究成果の概要（和文）：

神経とマスト細胞の両者に発現する IgCAM 型接着分子 CADM1 は神経 - マスト細胞相互作用を促進する。ハプテン誘導型アトピー性皮膚炎マウスモデルの病変皮膚及び正常皮膚から、レーザーマイクロダイセクション法によりマスト細胞だけを選択的に採取した。RT-PCR によって病変内マスト細胞における CADM1 の発現上昇が検出された。従って、アトピー性皮膚炎では神経 - マスト細胞相互作用が増強し、マスト細胞の脱顆粒が誘発される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Atopic dermatitis (AD)-like lesional and non-lesional mast cells were separately collected by laser capture microdissection. Increased expression of CADM1 in lesional mast cells appeared to be a cause of enhanced sensory nerve-mast cell interaction in AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：アトピー性皮膚炎、接着分子、炎症、mRNA、CADM1

1. 研究開始当初の背景

レーザーマイクロダイセクション (laser capture microdissection、以下 LCM) 法は、倒立顕微鏡の電動ステージ上のスライドガラスに YAG (3 倍高調波) レーザーのパルスが集光する装置を使って、スライドガラス上の組織切片から目的とする細胞或いは組織のみを迅速に容易にかつコンタミネーションなく採取する実験手法である。この方法は 10 年程前から医学・生物学の分野で繁用されるようになり、これまでに多くの研究成果が報告されている。LCM 法を適用すれば、細胞種ごとに分別的に採取することが可能である。しかしながら今日までに病変内に個々ばらばらに存在するような病態に責任性或いは関連性を有する細胞 (炎症細胞など) 自身を標的とした形で LCM 法が応用された報告例は著しく少ない。その理由は主として採取後の検体処理方法・解析方法の限界にあったと思われる。しかし、最近の分子生物学分野におけるめざましい技術革新の結果、1 細胞からでも DNA、RNA 抽出を可能とするキットや、ごく微量 (例えば pg オーダー) の DNA、RNA を各分子間の相対的な存在比を変えることなく μg オーダーまで増幅するキットなどが市販されるようになり、実際に広く使用されている。また、遺伝子変異や遺伝子発現を網羅的に検索するためのマイクロアレイ技術がここ 5 年の間に急速に進化し信用性の高いデータが得られるようになってきた。これらの最新の技術を LCM 法と組み合わせれば、種々の病変内に存在する個々の病態責任細胞或いは病態関連細胞について網羅的な遺伝子変異・遺伝子発現解析を行うことが可能であると期待される。そこで本研究課題では、この可能性を実現し実用化するためのモデルケースとして 1 つの

病変における 1 種類の細胞を実験対象に据え実験手順の具体的なノウハウについて検討する。

2. 研究の目的

ヒトの疾患ではしばしば病態に責任性或いは関連性を有する細胞が集まって 1 つの病変を形成している。病変を構成する細胞における遺伝子発現や蛋白発現は従来 *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色により対象を限定して個別的に調べられてきたが、近年の技術革新の結果、病変内の個々の細胞における遺伝子発現を網羅的に解析できる可能性が出てきた。本研究課題では、レーザーマイクロダイセクション法を活用してこの可能性が現実的なものかどうか検討する。モデルケースとしてハプテン誘導マウス皮膚炎病変に多数出現するマスト細胞を解析対象とする。

3. 研究の方法

A. ハプテン誘導マウス耳介皮膚炎モデルの作出 本モデルは奈良県立医科大学皮膚科学教室 (主任教授 浅田秀夫先生) にて共同研究として作出して頂く。罹患耳介と未処理の耳介 (陰性対照) は個体から切離したら直ちに凍結切片作製用にマウント剤とともに急速凍結し冷凍保存する。

B. レーザーマイクロダイセクション法によるマスト細胞の採取と RNA 抽出 ①罹患耳介及び対照耳介の凍結検体から凍結切片 ($5\ \mu\text{m}$ 厚) を作製し、 -80 度にて保存する。②スライドを 1 枚取り出し、トルイジンブルーで素早く染色する。乾燥後、直ちに LCM 法に供する。メタクロマジーにより赤紫に染まっているマスト細胞を選択的に採取する。他の細胞や間質組織の混入が最小限に抑えられ、

かつマスト細胞が集簇している領域を切り取るよう留意する。以上の操作を1切片ごとに行い、採取した組織はすぐに凍結保存する。同一病変について約20～50枚の凍結切片からマスト細胞を採取する。③LCM法で採取された組織専用のキット（例えば、Macherey-Nagel社製 NucleoSpin カラム）を用いて罹患耳介と対照耳介のそれぞれから全RNAを採取する。

C. 遺伝子発現の網羅的比較解析 ①計画Bで採取できる全RNAの量は高々pgオーダーと見込まれる。絶対量がDNAマイクロアレイ解析に必要な最小限を下回る場合には、市販品（例えば、Epicentre社製 TargetAmp aRNA Amplification Kit）を使えば、 μg オーダーまで増幅できるとされている。②DNAマイクロアレイ解析の実施は大阪大学感染症DNAチップ開発センター（センター長 野島博先生）との共同研究を予定している。取得データは同センターが有する高度に洗練された遺伝子発現ソーティングなどの解析ソフトを使って解析する。③接着分子 cell adhesion molecule-1 (CADM1) は過敏性皮膚炎やアトピー性皮膚炎増悪因子の可能性があるので、罹患耳介マスト細胞において発現が上昇する遺伝子群の中にCADM1が含まれないか注目する。

4. 研究成果

①ハプテン誘導マウス耳介皮膚炎モデルにおいて、病変部は炎症細胞の浸潤を伴って肥厚していた。②アルシヤンブルー染色によって、病変部マスト細胞数 ($321.2 \pm 31.2/\text{mm}^2$) は正常部 ($89.0 \pm 11.6/\text{mm}^2$) よりも有意に上昇していることを明らかにした。③RNA分解を最小限に止める必要があるため、短い時間で鮮明に染色できる方法としてアルシヤンブルー染色よりもトルイジンブルー染色

のほうが適していた。また、メタクロマジーにより赤紫に染まっているため、LCM法によってマスト細胞だけを選択的に採取することができた。④LCM法によって採取したマスト細胞から全RNAを抽出後、RT-PCRによってCADM1の発現を比較したところ、病変内マスト細胞におけるCADM1の発現上昇が検出された。

以上の結果より、アトピー性皮膚炎など神経原性炎症病変内のマスト細胞においては一過性にCADM1の発現が上昇した結果、神経-マスト細胞相互作用が増強し、マスト細胞の脱顆粒が誘発される可能性が示唆された。また、1つの病変における1種類の細胞を実験対象に据えた実験手順を確立することができた。

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17件）（全て査読有）

①Fukui R, Saitoh S, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, Onji M, Matsumoto M, Akira S, Yoshida N, and Miyake K: Unc93B1 Restricts Systemic Lethal Inflammation by Orchestrating Toll-like Receptor 7 and 9 Trafficking. **Immunity**, 35:69-81, 2011.

②Tabara H, Naito Y, Ito A, Katsuma A, Sakurai MA, Ohno S, Shimizu H, Yabuta N, and Nojima H: Neonatal lethality in knockout mice expressing the kinase-dead form of the gefinitib target GAK is caused by pulmonary dysfunction. **Plos One**, 6:e26034, 2011.

③Hosokawa Y, Hagiwara M, Iino T, Murakami Y, and Ito A: Noncontact estimation of intercellular breaking force

- using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108:1777-1782, 2011.
- ④Hagiyama M, Furuno T, Hosokawa Y, Iino T, Ito T, Inoue T, Nakanishi M, Murakami Y, and Ito A: Enhanced nerve—mast cell interaction by a neuronal short isoform of cell adhesion molecule-1, CADM1. **J Immunol**, 186:5983-5992, 2011.
- ⑤Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, and Murakami Y: Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. **Int J Cancer**, 130: 1329-1337, 2011.
- ⑥Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, and Satou T: Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. **J Neural Transm**, 118:193-202, 2011.
- ⑦Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, and Satou T: Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. **J Neural Transm**, 118:1263-1272, 2011.
- ⑧Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi Y, Hagiyama M, Ito A, Sakurai-Yageta M, and Murakami Y: Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. **Genes Cells**, 16:791-802, 2011.
- ⑨Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y: Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. **Breast Cancer**, in press, 2011.
- ⑩Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, and Satou T: (-)-epigallocatechin-3-gallate protects against neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. **Neuromol Med**, 13:300-309, 2011.
- ⑪Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, and Murakami Y: CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells: possible involvement of CADM1 in pathogenesis of ATL. **J Biol Chem**, 285:15511-15522, 2010.
- ⑫Murray PG, Fan Y, Davies G, Ying J, Geng H, Ng KM, Li H, Gao Z, Wei W, Bose S, Anderton J, Kapatai G, Reynolds G, Ito A, Marafioti T, Woodman CB, Ambinder R, and Tao Q: Epigenetic silencing of a proapoptotic cell adhesion molecule, the immunoglobulin superfamily member IGSF4, by promoter CpG methylation protects Hodgkin lymphoma cells from apoptosis. **Am J Pathol**, 177:1480-1490, 2010.
- ⑬Mimae T, Hirayasu T, Kimura KB, Ito A, Miyata Y, and Okada M: Advantage of absorbable suture material for pulmonary artery ligation. **Gen Thorac Cardiovasc Surg**, 58:511-515, 2010.
- ⑭Chung SH, Seki K, Choi BI, Kimura KB,

Ito A, Fujikado N, Saijo S, and Iwakura Y: CXC chemokine receptor 4 expressed in T cells plays an important role in the development of collagen-induced arthritis.

Arthritis Res Ther, 12:R188, 2010.

⑮ Omori Y, Nakayama F, Li D, Kanemitsu K, Semba S, Ito A, and Yokozaki H: Alternative lengthening of telomeres frequently occurs in mismatch repair system-deficient gastric carcinoma. **Cancer Sci**, 100:413-418, 2009.

⑯ Hagiwara M, Ichiyanagi N, Kimura KB, Murakami Y, and Ito A: Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth. **Am J Pathol**, 174:2278-2289, 2009.

⑰ Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Ito A, and Murakami Y: Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. **Biochem Biophys Res Commun**, 390:977-982, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

① 伊藤彰彦 「組織構築を再現した培養形における細胞間接着の力学的解析：フェムト秒レーザーの応用」 第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2011 年 10 月

② Ito A 「A kinetic analysis of nerve-mast cell adhesion using femtosecond laser」 The joint international meeting of the 76th annual meeting of the Japanese society for interferon and cytokine research, the 19th international symposium of macrophage molecular and cell biology 2011 (Osaka) 2011 年 5 月

③ 伊藤彰彦 「CADM1 のスプライシングによる神経 - マスト細胞相互作用の発生時期特

異的な制御」 第 100 回日本病理学会総会 (横浜) 2011 年 4 月

④ 伊藤彰彦 「フェムト秒レーザーによる白血球 - 血管内皮細胞間接着力の評価」 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010 年 9 月

⑤ 伊藤彰彦 「マウス脳における接着分子 CADM1 分泌型アイソフォームの発現同定と神経伸長ガイダンスへの関与」 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2009 年 10 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤彰彦 (ITO AKIHIKO)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし