

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893238

研究課題名(和文) 二次予防を目的としたアトピー性皮膚炎の初期病態を反映するバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Research on a novel biomarker for early stage of atopic dermatitis

研究代表者

飯泉 恭一 (Iizumi, Kyoichi)

順天堂大学・医学部・特任研究員

研究者番号：30439351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎(AD)の患者数は増加しており、有病率を低下させる対策が求められている。本疾患の治療には早期発見と早期治療が効果的であるが、早期の病態を評価するための有効なバイオマーカーは存在しない。そこで、本研究ではADのモデルマウスを用い、その血漿よりバイオマーカーを探索することにした。AD患者の表皮では、一部のタンパク質のトリプトファン残基がニトロ化修飾を受け、6-ニトロトリプトファン(6-NO₂Trp)が生成されることが知られている。そこで6-NO₂Trpを指標として候補タンパク質の探索を試みた。その結果、免疫グロブリンGがADのバイオマーカーとして利用できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis (AD) is chronic inflammatory skin disease, which affects at least 15-30% of children and 2-10% of adults in industrialized countries. In order to prevent increase in AD, early detection and early treatment are required. However, there is no effective biomarker for AD at early stage. Therefore, we have sought a new biomarker for AD at early stage. In this study, we used plasma of NC/Nga mice which demonstrate AD like skin disorder. We have previously reported that residues of tryptophan in some proteins were nitrated in epidermis of patients with AD. Thus, we focused on 6-nitrotryptophan-containing protein as biomarker in plasma for AD. As a result, we identified immunoglobulin G (IgG) as a biomarker candidate for AD.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス アトピー性皮膚炎 ニトロトリプトファン ニトロ化

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の患者数は増加しており、先進国では子供の15%、大人の2~10%が罹患していると想定されている。我が国でもほぼ同様の結果が報告されており、有病率を低下させる対策が求められている。

アトピー性皮膚炎は慢性の炎症性皮膚疾患であり、主症状のかゆみによりQOLの著しい低下をもたらす。患者の8割では病変部においてTh2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)が発現しIgEの増加が見られる。一方、残りの2割程度の患者ではIFN- γ などのTh1系サイトカインの発現が亢進し、IgEの発現増加は見られない。どちらのタイプも治療では炎症に対する対症療法を実施し、同時に皮膚のバリア機能を高めることで寛解を目指すことになる。治療が遅れると「掻破→皮膚バリア機能の破壊→抗原の進入」の悪循環が起こり症状を増悪させる。このため、早期の治療開始による二次予防が重要となる。

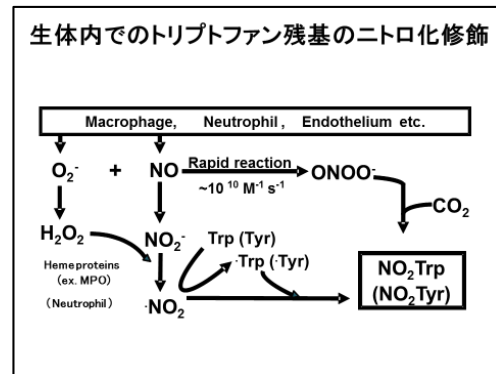
二次予防の推進には、アトピー性皮膚炎の初期症状を鋭敏に検知できるバイオマーカーが必要不可欠である。通常、皮膚科を受診するのは紅斑が見られてからであるが、この時点では上述の悪循環が進行していると考えられる。有効なマーカーを利用し小児期の健康診断で定期的に確認することができれば、発症の最初期の時点で適切な治療を受けることができる。発症の初期は皮膚のバリア機能の損傷も少なく治療期間の短縮が期待される。またステロイド製剤も免疫抑制効果の弱いもので対応することができ副作用の危険性を低下させることができる。

2. 研究の目的

本研究では、皮膚のバリア機能の破壊から炎症の初期までを対象に、発症を鋭敏に検知できるバイオマーカーの探索を試みることにした。現在、アトピー性皮膚炎のバイオマーカーとしては血中のIgE値、TARC(thymus and activation-regulated chemokine)値等が利用されている。しかしながら、IgE値は約2割の患者(Th1系サイトカインの発現が優勢なタイプ)では上昇が見られないという欠点があり、TARC値は症状との相関性が高く病勢マーカーとしては優れているが、疾患の初期の検出には適していないという欠点がある。これらの理由から、より多くの患者で利用でき、病態初期を鋭敏に検出することができる新たなマーカーの探索を試みることにした。

アトピー性皮膚炎の病態初期を検出するマーカーとして、本研究ではニトロ化修飾を受けたタンパク質に注目した。ニトロ化修飾

は翻訳後修飾の一つであるが、一酸化窒素(NO)と活性酸素の存在下で修飾が行われる。よって、ニトロ化修飾を受けたタンパク質の存在は体内で炎症が発生したことを強く示唆する。さらに、それらの修飾タンパク質は炎症部位近傍に存在した可能性が高い。したがって、ニトロ化修飾を受けたタンパク質の中からマーカー分子を探索することは、すべての分子を網羅的に探索するよりも非常に効率的である。



3. 研究の方法

(1) 動物モデルを用いたバイオマーカーの探索

アトピー性皮膚炎のバイオマーカーを探索するために、本疾患のモデル動物であるNC/Ngaマウスを利用した。NC/Ngaマウスはコンベンショナル環境下で飼育するとアトピー性皮膚炎を発症する(以下AD-NC/Nga)が、SPF環境下では発症しない。そこで、SPF環境下で飼育したNC/Ngaマウス(以下SPF-NC/Nga)を対照としてニトロ化修飾率の違いを調べた。さらに、アトピー性皮膚炎の素因を持たないICRマウスも対照とした。

採取サンプルは血液および皮膚組織とした。血液はマウスを麻酔後、後大静脈より採取した。採取にはヘパリン入り注射筒を用い、遠心処理により血漿を分離した。皮膚組織はマウスを安楽死させた直後に採取し、パラホルムアルデヒドにより固定した。

血漿タンパク質のニトロ化修飾はウエスタンブロット法により明らかにした。検出には6-ニトロトリプトファン抗体を用い、トリプトファン残基がニトロ化修飾を受けたタンパク質のバンドを明らかにした。タンパク質の同定は質量分析により行った。

皮膚組織におけるニトロ化修飾タンパク質の局在は免疫蛍光抗体法により明らかにした。固定した皮膚組織から定法にしたがい凍結切片を作製し、抗6-ニトロトリプトファン抗体および抗IgG抗体を反応させた。これ

らのシグナルは共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

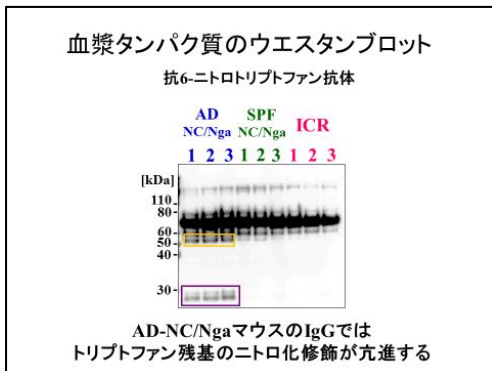
(2) アトピー性皮膚炎患者(ヒト患者)における確認

動物モデルによって同定されたバイオマーカー候補のヒト患者における有効性を確認するため、アトピー性皮膚炎患者、他の炎症性疾患患者(乾癬、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ)、健康者の血漿を用いてウエスタンブロット法を実施した。さらに、ニトロ化修飾を受けたタンパク質を質量分析し、ニトロ化トリプトファン残基の部位を明らかにした。

4. 研究成果

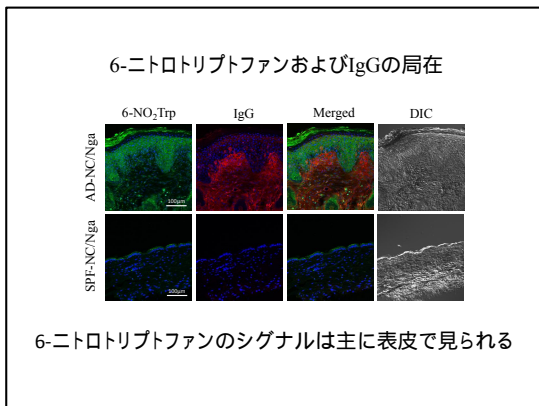
(1) 動物モデルを用いたバイオマーカーの探索

AD-NC/Nga、SPF-NC/Nga、ICR(それぞれ10週齢)マウスより血漿を採取した。ウエスタンブロット法により、これらの血漿に含まれるタンパク質のニトロ化修飾を確認した。その結果、AD-NC/NgaマウスのIgGにおいてトリプトファン残基が有意にニトロ化修飾を受けることが明らかとなった。



SPF-NC/NgaマウスやICRマウスではほとんどニトロ化修飾が見られないことから、この修飾はアトピー性皮膚炎と関係している可能性が考えられた。

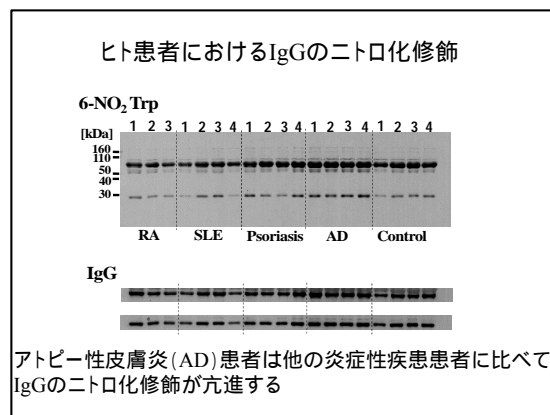
IgGがニトロ化修飾を受ける部位は皮膚である可能性が高いため、AD-NC/Ngaマウスの皮膚における6-ニトロトリプトファンとIgGの局在を調べた。



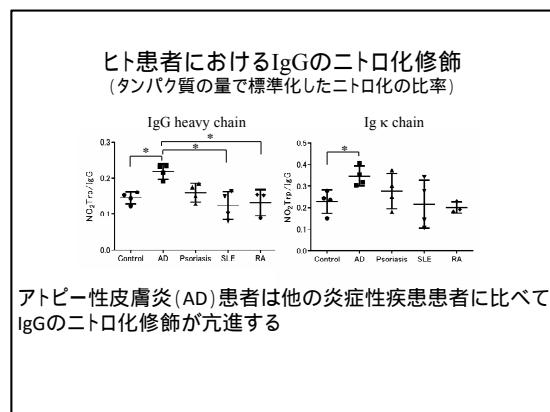
その結果、ニトロトリプトファンシグナルは主に表皮において観察された。一方、IgGのシグナルは主に真皮で見られたが、表皮の細胞の細胞間隙(または細胞膜上)でも見られた。このことは、IgGのニトロ化修飾が表皮で生じている可能性を強く示唆している。

(2) アトピー性皮膚炎患者(ヒト患者)における確認

ニトロ化修飾を受けたIgGがアトピー性皮膚炎のマーカーとして利用可能であるかを確認するため、ヒト患者血漿を用いて確認を行った。ウエスタンブロット法によりニトロ化修飾の程度を調べたところ、他の炎症性疾患や健康者に比べIgGのニトロ化は亢進していた。

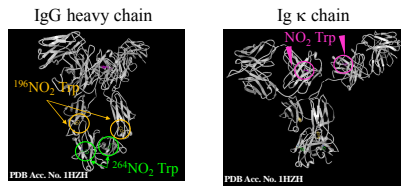


6-ニトロトリプトファンのシグナルをタンパク質の量で標準化し、多重比較検定を実施したところ、IgGの重鎖においては乾癬群以外のすべての群と統計的に有意な差が見られた。一方、軽鎖に関しては、重鎖ほどの差は見られなかった。



次に質量分析により、ニトロ化修飾を受け得るトリプトファン残基の位置を調べたところ、3カ所のトリプトファン残基が修飾を受けていた。これらのトリプトファン残基は抗原との結合部位近傍や、立体構造の維持に重要な部位であるので、病態とも関連している可能性が示唆された。

アトピー性皮膚炎患者のIgGにおける
ニトロトリプトファン¹の位置



立体構造の維持に重要な部位、抗原との結合部位の
近傍がニトロ化されている

以上の結果は、トリプトファン残基のニトロ化修飾に着目することで、IgG がアトピー性皮膚炎のバイオマーカーとして利用できる可能性があることを示している。今後、初期のアトピー性皮膚炎を検出可能かについても調べる予定である。

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)

(1) Kawasaki H, Tominaga M, Shigenaga A, Kamo A, Kamata Y, Iizumi K, Kimura U, Ogawa H, Takamori K, Yamakura F. Importance of tryptophan nitration of carbonic anhydrase III for the morbidity of atopic dermatitis. Free Radic Biol Med. 73:75-83. 2014 (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 飯泉恭一、富永光俊、川崎広明、重永綾子、加茂敦子、鎌田弥生、高森建二、山倉文幸 6-ニトロトリプトファンの血漿バイオマーカーとしての可能性 - アトピー性皮膚炎 - 第 36 回日本トリプトファン研究会学術集会、旭川医科大学(旭川) 2014 年 10 月

(2) 川崎広明、馬場猛、松本綾子、飯泉恭一、池田啓一、高森建二、山倉文幸 2 型糖尿病モデルマウスにおける 6-ニトロトリプトファンの生体内生成 第 36 回日本トリプトファン研究会学術集会、旭川医科大学(旭川) 2014 年 10 月

(3) 川崎広明、池田雅彦、酒居一雄、松本綾子、飯泉恭一、宇田宗弘、馬場猛、高森建二、山倉文幸 脳卒中易発生高血圧自然発症ラット SHR-SP での 6-ニトロトリプトファン生成 ~ タンパク質機能障害と病態形成の関連性の解明 ~ 第 14 回日本 NO 学会学術集会、ホテルニューオータニ佐賀(佐賀) 2014 年 5 月

(4) 飯泉恭一、富永光俊、川崎広明、重永綾子、加茂敦子、鎌田弥生、高森建二、山倉文幸 6-ニトロトリプトファンはアトピー性皮膚炎患者の血漿バイオマーカーとなり得るか? 第 35 回日本トリプトファン研究会学術集会、京都大学(京都) 2013 年 9 月

(5) 飯泉恭一、富永光俊、川崎広明、重永綾子、加茂敦子、鎌田弥生、高森建二、山倉文幸 抗 6-ニトロトリプトファン抗体を用いた血漿バイオマーカーの探索 第 13 回日本 NO 学会学術集会、沖縄県医師会館(沖縄) 2013 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯泉 恭一 (Kyoichi IIZUMI)

順天堂大学・医学部・
特任研究員

研究者番号：30439351