

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670524

研究課題名(和文) 非侵襲的採取角層を用いたプロテオーム解析によるアトピー性皮膚炎バリア異常の評価

研究課題名(英文) Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients using non-invasive tape-stripping method.

研究代表者

戸倉 新樹 (Tokura, Yoshiki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎(AD)において表皮角層バリア異常は病態的に重要性である。バリア機構は構造蛋白質によって構築され、プロテアーゼが調節するため、それらを同時に把握する必要がある。本研究では、AD患者の角層を非侵襲性のテープストリッピング採取することにより得て、角層抽出蛋白質をプロテオーム解析し、炎症関連血漿蛋白質、角層バリア機能に関わる蛋白質、角層バリア機能に関わるプロテアーゼ、抗菌ペプチド、汗関連蛋白質に分けることができた。例えば、汗関連物質の中でGCDFP15がAD角層では減少していることを明らかにし、発汗状態のマーカーになることを示した。

研究成果の概要(英文)：The significance of stratum corneum (SC) barrier has been strengthened in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD). Many other SC constituents and proteases are also known to be involved in the barrier. Here, we sought to identify and quantify wide-ranging proteins by proteome analysis of SC samples obtained by using a noninvasive tape stripping technique. We categorized the representative substances into 5 groups: inflammation-associated substances, SC barrier constituents, SC barrier-related enzymes, antimicrobial peptides, and sweat-associated substances. Many substances were changed in their amounts in AD-SC compared with healthy control (HC) SC. For example, the amounts of GCDFP15 were significantly lower in AD than HC. The sweat samples from AD patients also had lower levels of GCDFP15 concentration. GCDFP15 in SC is a potential marker for dysregulated sweating in AD.

研究分野：皮膚科学

キーワード：免疫学 発現制御 細胞・組織 蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は表皮角層バリアの障害により、外来抗原の角層透過性が亢進し、さらに抗原との接触や搔破が角化細胞、樹状細胞、T細胞の免疫系を促進することによって発症する。表皮バリア機構はフィラグリン(FLG)を始めとする構造蛋白質によって構築され、それを分解するプロテアーゼとそのインヒビターが調節する。従来、バリア機能を測定する方法として経表皮水分蒸散量、角質水分量などが行われてきた。しかしバリア機能を角層蛋白質の種類と量の変化で把握できれば、バリア障害の直接的原因に迫ることが可能である。しかしバリア状態は、併存する炎症、発汗、抗菌ペプチド作働などと深く関わっており、それらを同時に把握する必要がある。

## 2. 研究の目的

角層における蛋白質の種類とその量を包括的に測定することにある。対象疾患としては、外因性AD、内因性AD、尋常性魚鱗癬、健常人である。

## 3. 研究の方法

AD患者、尋常性魚鱗癬患者、健常人の角層を非侵襲性のテープストリッピング採取することにより得た。角層より蛋白質を抽出し、これらをQ-extractable orbitrap LC/MS/MSにて解析した。角層採取から定量までは以下の方法によって行った。

- (1) 角層採取テープをトルエンに浸漬
- (2) 溶解しないテープを除去
- (3) 遠心とトルエン洗浄 6回
- (4) 角層蛋白抽出, 乾燥, Tris-HCl containing 1% SDS に溶解
- (5) 再構築 Urea and ammonium bicarbonate
- (6) 消化 In-solution tryptic digestion and guanidination kit
- (7) 溶解 formic acid solution
- (8) 解析 Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer
- (9) 物質の同定 Mascot search engine against SwissProt database
- (10) 定量 proteome discoverer v.1.4 software

## 4. 研究成果

440 の蛋白質を同定することができた。これらは、1) 角層バリア機能に関わる蛋白質、2) 角層バリア機能に関わるプロテアーゼ、3) 抗菌ペプチド、4) 汗関連蛋白質、5) 炎症関連血漿蛋白質、以上5群に分けることができた。これらの蛋白質の中には、健常人角層での量と有意に異なるもの、外因性と内因性ADによって異なるものなどがあつた。とく

に汗関連物質の中で GCDFP15 の角層抽出蛋白質での定量を行い、AD 角層では減少していることを明らかにした。この GCDFP15 の減少は、エクリン腺分泌部での減少と関連していることを免疫組織学的染色で明らかにした。以上のように様々なバイオマーカーと成りうる分子を同定し、その一部をさらに掘り下げて AD での病態関連分子として解析することができた。

## 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 9 件)

- 1). Sakabe J, Kamiya K, Yamaguchi H, Ikeya S, Suzuki T, Aoshima M, Tatsuno K, Fujiyama T, Suzuki M, Yatagai T, Ito T, Ojima T, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134: 957-967.e8, 2014.
- 2). Nakazawa S, Moriki M, Ikeya S, Sakabe J, Tokura Y: Atopic dermatitis presenting as generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation. *J Dermatol* 41(3): 230-231, 2014.
- 3). Yamaguchi H, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hashizume H, Tokura Y: Psychological aspects of patients with intrinsic atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 24(2): 253-254, 2014.
- 4). Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y: Leukoderma in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 42(2): 215-218, 2015.
- 5). Ito T, Tatsuno K, Fujiyama T, Sakabe J, Tokura Y: Antihistaminic drug olopatadine downmodulates T cell chemotaxis toward CCL17 in patients with atopic dermatitis. *Allergol Int* 64(2): 200-202, 2015.
- 6). Kamiya K, Sakabe J, Yamaguchi H, Suzuki T, Yatagai T, Aoshima M, Ito T, Tokura Y: Gross cystic disease fluid protein 15 in stratum corneum is a potential marker of decreased eccrine sweating for atopic dermatitis. *PLoS One* 10: e0125082, 2015.
- 7). Kuriyama S, Kasuya A, Fujiyama T, Tatsuno K, Sakabe J, Yamaguchi H, Ito T, Tokura Y: Leukoderma in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol* 42: 215-218, 2015.
- 8). Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Waki M, Tokura Y: TSLP directly interacts with skin-homing Th2 cells highly expressing its

receptor to enhance IL-4 production in atopic dermatitis. J Invest Dermatol 135: 3017-3024, 2015.

- 9). Yamaguchi H, Hirasawa N, Asakawa S, Okita K, Tokura Y: Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. Allergol Int 64: 282-284, 2015.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1). Tokura Y: Proteome analysis of corneum from atopic dermatitis patients. World Rendez-vous on Dermatology. 2014.3.11. Tokyo, Japan.
- 2). Tatsuno K, Fujiyama T, Yamaguchi H, Tokura Y: High expression of TSLP receptors in circulating CD4+ T cells in atopic dermatitis. 2014 Annual Meeting Society for Investigative Dermatology. 2014.5.9. Albuquerque, United States of America.
- 3). Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. 8th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis. 2014.5.22. Nottingham, United Kingdom.
- 4). Sakabe J, Kamiya K, Tokura Y: Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan.
- 5). Yuki T, Kusaka A, Komiya A, Tobiishi A, Ota T, Tokura Y: IL-17A weakens the tight junction (TJ) barrier in a human-skin-equivalent model: A possible mechanism of impaired TJ in atopic dermatitis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2014.12.13. Suita, Japan.
- 6). 神谷浩二, 坂部純一, 山口隼人, 鈴木健晋, 矢田貝剛, 青島正浩, 伊藤泰介, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎における発汗低下の指標: GCDFP15 発現量の利用. 第 265 回日本皮膚科学会岡山地方会. 2015.5.16. 岡山市
- 7). 神谷浩二, 坂部純一, 山口隼人, 鈴木健晋, 矢田貝剛, 青島正浩, 伊藤泰介, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎における発汗低下の指標と機序: 角層中 GCDFP15 量の利用. 第 114 回日本皮膚科学会総会. 2015.5.30. 横浜市
- 8). 神谷浩二, 坂部純一, 山口隼人, 鈴木健晋, 矢田貝剛, 青島正浩, 伊藤泰介, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎における発汗低下の指標としての角層 GCDFP15. 第 2 回汗と皮膚疾患の研究会. 2015.8.8. 東

京

- 9). Kamiya K, Sakabe J, Yamaguchi H, Suzuki T, Yatagai T, Aoshima M, Ito T, Tokura Y: Gross cystic disease fluid protein 15 as a potential marker for decreased sweating in atopic dermatitis. 45th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. 2015.9.10. Rotterdam, the Netherlands.

〔図書〕(計 4 件)

- 1). 戸倉新樹: 皮膚疾患の病態 / 内因性アトピー性皮膚炎. 臨床皮膚科 68(5): 38-41, 2014.
- 2). 坂部純一, 山口隼人, 福家辰樹, 池谷茂樹, 神谷浩二, 龍野一樹, 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎患者におけるフィラグリン遺伝子変異と手掌皸瘡・尋常性魚鱗癬との関連. 日小皮会誌 33(2): 27-31, 2014.
- 3). 戸倉新樹: アトピー性皮膚炎の病態 (内因性 vs 外因性). Monthly Book Derma 224: 9-17, 2014.
- 4). 戸倉新樹: 免疫疾患・膠原病 アトピー性皮膚炎. デンタルハイジーン 別冊 / 診療室・多職種稼働の現場で生きる! 歯科衛生士のための全身疾患ハンドブック. 医歯薬出版(東京): pp93-95, 2015

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

浜松医科大学医学部皮膚科学講座ホームページ  
<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/derm/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

戸倉新樹 ( Tokura Yoshiki )  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00172156

(2)研究分担者

坂部純一 ( Sakabe Jun-ichi )  
浜松医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号： 30631494  
H26 年度まで

(3)連携研究者

(         )

研究者番号：