

平成 22 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790824
 研究課題名（和文） 炎症性皮膚疾患における新規血液 RNA 診断システムの開発
 研究課題名（英文） Development of novel blood RNA diagnostic system for inflammatory skin disease
 研究代表者
 津田 達也（TSUDA TATSUYA）
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号：80434942

研究成果の概要（和文）：

アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬患者の末梢血リンパ球より抽出した RNA をマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。その結果を臨床症状や他の血液検査データと統計解析をおこない、相関が認められる CCL23 と S100P に注目した。これらの遺伝子を搭載して、安価かつ簡易的に臨床に使用できる「選抜アレイ」を作成しようと試みたが実用化できるほどの感度を得ることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

We performed DNA microarray analysis of total RNA obtained from peripheral blood of psoriasis vulgaris and atopic dermatitis patients. We focused on CCL23 and S100P relating with clinical symptoms and other blood data, and tried to develop focused array to detect these two genes with low costs and easy operation. However, developed focused array did not have enough sensitivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：炎症性皮膚疾患、網羅的解析、末梢血、RNA マーカー、選抜アレイ

1. 研究開始当初の背景

代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎や尋常性乾癬、膿疱性乾癬などの病勢の評価、治療効果の判定および治療方法の選択は、皮膚科医の視診と末梢血中の白血球数

およびCRPなどの非特異的炎症性マーカーをもとにおこなわれてきた。しかし、皮膚科医の熟練度には個人差があり、従来の血液マーカーは疾患特異的でないために、客観的に皮膚疾患を評価するマーカーは少なく、疾患特異的な病勢の評価や治療効果の判定に利用で

きる新規マーカーの開発が望まれている。従来の血液検査では、酵素などの蛋白質、あるいは、それが触媒して生じる産物の濃度や活性を測定し、マーカーとして用いてきた。分子生物学の臨床応用が進展し、大量のシーケンスやDNAチップを用いて転写産物を網羅的かつ効率的に解析することが可能となった。このような「トランスクリプトーム」の解析技術の進歩により、血液中の蛋白質のみならず、そこに存在する微量のRNAを検出、同定することも困難ではなくなった。血中のRNAプロフィールが示すトランスクリプトームの臨床的有用性については、まだ十分研究が進んでいるわけではない。しかし、少なくとも、従来の検査では見いだせなかった新たな診断情報を血中のRNAプロフィールから引き出せる可能性が推測される。

現在でもDNAチップは非常に高価な消耗品であり、経済的な問題から臨床現場でルーティーンの検査に使えるものではない。有用な新規RNAマーカーの候補が見つかったとしても、従来のDNAチップを用いる手法では経済的な理由から臨床現場への普及が望めず、臨床応用が確立されないことが予想される。

臨床に携わる皮膚科医は求めているのは、安価かつ信頼性の高い新規マーカーである。

2. 研究の目的

(1) アトピー性皮膚炎をはじめとする種々の炎症性皮膚疾患の患者末梢血細胞より RNA を採取し、スプライシングバリエーションを含めた全転写産物をマイクロアレイを用いて包括的かつ網羅的にスクリーニングし、これらの疾患で発現上昇を認める転写産物の候補を選択する。

(2) 選択した転写産物の発現の増減を、臨床症状の推移や従来の血液マーカーの推移と比較し、炎症性皮膚疾患の新規血液 RNA マーカーとして応用可能な転写産物を絞り込む。

(3) これらの転写産物を検出するプローブを搭載し、発色法で解析可能な「選抜アレイ」を作成する。

(4) 「選抜アレイ」を用いて、実際に、炎症性皮膚疾患患者血液中の RNA マーカーを解析し、臨床的有用性を評価する。

以上により、炎症性皮膚疾患の病勢や治療効果の客観的指標として臨床的に有用な血液 RNA を用いた新規診断システムを構築する。

以上の4つの段階を経て、炎症性皮膚疾患において実際の臨床に使用可能な新規 RNA マーカーを発見することおよびそれらを搭載した安価な選抜アレイを作成することが目的であった。

2. 研究の方法

(1) 炎症性皮膚疾患の患者末梢血細胞で発現上昇を認める遺伝子のスクリーニング

文書により研究同意を得た炎症性皮膚疾患患者および健常人ボランティアより PAX gene RNA 採血管 (QIAGEN) をもちいて末梢血 10 ml の提供を受けた。提供された末梢血 10 ml から PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) 用いて全 RNA を抽出した。抽出後、兵庫医大共同利用研究施設に設置されているマイクロチップ電気泳動システムを用いて、RNA サンプルの純度検定を行い試料の分解がないことを確認した。それらの試料を鋳型として Amino allyl messageAmp TMII aRNA amplification kit (Applied bio system Inc) および Cy3 mono reactive pack を使用して逆転写反応と Cy3 標識反応を行い、試料に含まれる全ての mRNA から Cy3 標識された cDNA を合成した。マイクロアレイには高感度の発現プロファイリングを可能にする 3D-GENE(東レ)をもちいた。Cy3 標識された cDNA をマイクロアレイにハイブリダイゼーションを行った後、兵庫医大共同利用研究施設に設置されているマイクロアレイシステムにてデータの取り込みを行った。正常人とのデータの比較および階層的クラスタリングの結果、新規 RNA マーカーの候補になる遺伝子を絞り込んだ。

(2) Real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) による候補遺伝子の検証

マイクロアレイによるスクリーニングで絞り込んだ候補遺伝子について、TaqMan プローブを用いて、兵庫医大共同利用研究施設に設置されているリアルタイム PCR システム (ABI 7900HT 等) で定量的な RT-PCR を実施した。テンプレートとして上記のサンプルを用いて経時的に候補遺伝子の発現変動を測定した。また、その結果を PASI SCORE や SCORAD SCORE 等の臨床的な病勢スコアおよび CRP や白血球数などの非特異的炎症マーカーと統計処理をおこない、選抜アレイを作成する遺伝子として CCL23 と S100P を選択した。

(3) 「選抜アレイ」の作製

CCL23 と S100P の塩基配列を Genbank データベースより入手し、現有の Genetyx 遺伝子

解析ソフトウェアを用いて転写産物特異的なDNAプローブをデザインした。前項(1)のサンプルを鋳型としてPrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA)をもちいてRT-PCRを行い、エラーの少ないアンチセンスDNAプローブを作製した。

作製したアンチセンスDNAプローブを精製後、バイオチップ用プラスチック基板であるPrime Surfaceにスポットティングして80度でベーキングしてCCL23とS100Pを搭載した「選抜アレイ」を作成した。前項(1)のサンプルでリアルタイムPCRによりCCL23とS100Pの発現が確認されているサンプルを鋳型として、逆転写反応およびビオチン標識反応をおこない、ビオチン標識したcDNAを合成した。このサンプルを作成した「選抜アレイ」に対して、種々の条件でハイブリダイゼーションをおこなった。抗ビオチン抗体を用いた発色反応および発光反応で検出を行ったが実用に耐えるシグナルを得ることはできなかった。

3. 研究成果

炎症性皮膚疾患患者末梢血RNAをマイクロアレイにて網羅的解析を行い、得られた結果をPASI SCOREやSCORAD SCORE等の臨床的な病勢スコアおよびCRPや白血球数などの非特異的炎症マーカー臨床データと統計解析を行い、CCL23とS100Pの2つの遺伝子に着目した。

この2つの遺伝子を搭載した選抜アレイを作成したが、実用に使用可能な感度を得ることができなかった。

しかし、炎症性皮膚疾患で大きな役割を果たしていると推測される末梢血の白血球の遺伝子発現はこれらの疾患ではダイナミックに変動していること、また、RNAレベルでの遺伝子の変動は炎症性皮膚疾患における疾患マーカーとして意義があること、そして発現変動の観察された遺伝子の中でCCL23とS100Pは疾患特異的なマーカーとしては非常に有望であることは本実験により示唆された。

CCL23とS100Pについては、疾患特異的なマーカーとしては非常に有望であるので患者血清に対する蛋白質レベルでの解析をELISA法等をもちいて検討したい。

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5件)

① Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H, Nakagawa N, Yamanishi K. Tetracyclines

modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 査読有、53巻、2009、1760-1765

② Sugimura Y, Hosono M, Kitamura M, Tsuda T, Yamanishi K, Maki M, Hitomi K. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1--development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *The FEBS Journal*. 査読有、275巻、2008、5667-77.

③ Nakagawa N, Tsuda T, Yamamoto M, Ito T, Futani H, Yamanishi K. Adult cutaneous alveolar rhabdomyosarcoma on the face diagnosed by the expression of PAX3-FKHR gene fusion transcripts. *Journal of Dermatology*. 査読有、35巻、2008、462-467.

④ Tsuda T, Ishikawa C, Nakagawa N, Konishi H, Tarutani M, Matsuki M, Yamanishi K. A novel point mutation of keratin 17 (KRT17) in a Japanese family with pachyonychia congenita type 2: an RNA-based genetic analysis using a single hair bulb. *British Journal of Dermatology*. 査読有、159巻、2008、730-732.

⑤ Fujimoto T, Tsuda T, Yamamoto M, Tarutani M, Natsuaki M, Minami S, Ito T, Kozuka T, Yamanishi K. Cutaneous malignant fibrous histiocytoma (undifferentiated pleomorphic sarcoma) arising in a chronic scalp ulcer of a patient with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 査読有、23巻、2008、202-203

[学会発表] (計4件)

① 今井康友、古川紗綾佳、津田 達也、上田英一郎、山西清文、膿胞性乾癬に対する白血球除去療法、第87回兵庫県皮膚科医会総会・学術集談会、2009年11月28日、生田神社会館、兵庫県

② 山本 雅章、津田 達也、小西 弘江、山西 清文 急性腎障害を合併したケラチン10の新規ミスセンス変異をもつ水疱型先天性

魚鱗癬様紅皮症、日本皮膚科学会総会、2009年4月24～26日、福岡国際会議場

③津田 達也、松木正人、小西弘江、山西清文（瀧澤俊広、トランスグルタミナーゼ1へのアルギニン142点突然変異導入マウスの表現型解析
第22回表皮細胞研究会、2008年12月6日、ホテル日航東京

④M Tarutani, Y Imai, T Tsuda, K Nakinishi, K Yamanishi、Psoriasis like hyperplastic and inflammatory lesions produced by epidermis specific, inducible activation of Raf in mice. International Investigative Dermatology 2008、2008年5月14日～17日、京都国際会議場

⑤S Aochi, K Tsuji, M Sakaguchi, N Huh, T Tsuda, K Yamanishi, M komine, K Iwatasuki演題名 : Serum calcium-binding S100A8/A9 proteins in patients with psoriatic arthritis are derived from not only the skin lesions but also circulating monocytes. International Investigative Dermatology 2008 2008年5月14日～17日、京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 達也 (TSUDA TATSUYA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80434942