

## 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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590507

研究課題名（和文） 抜去した毛包由来幹細胞によるオーダーメイド医療のための基礎研究

研究課題名（英文） Basic research to enable personalized medicine using follicular bulge-derived stem cells

研究代表者

吉川 良恵（YOSHIKAWA YOSHIE）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10566673

研究成果の概要（和文）：バイオプシーせず低侵襲で得られる抜去毛包より培養したバルジ領域幹細胞由来ケラチノサイト（FDK）を、オーダーメイド医療に利用することを目的とした。アトピー性皮膚炎患者と非罹患コントロール由来 FDK の遺伝子発現比較解析より、前者は後者よりインフラマゾーム構成分子の *NLRP2* 発現が高く、*Wnt* シグナル阻害因子 *DKK1* の発現が低かった。またそれぞれの細胞に *IFN-γ* を添加 24 時間後の *IL32*, *IL1B*, *IL8*, *CXCL1* 等の遺伝子発現がアトピー性皮膚炎群ではコントロール群に比べ有意に高いことが明らかとなった。このことは前者で *IFN-γ* 応答能が高まっていることを示す。よって、FDK を用いアトピー性皮膚炎予測の可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We cultured human hair follicle-derived keratinocytes (FDKs) from plucked hairs. FDKs may be an ideal cell source for personalized medicine, since they can be established without invasive biopsies. We undertook a comparative study of gene expression in FDKs from adult donors with atopic dermatitis (AD-FDKs) and non-atopic donors (Non-AD-FDKs). AD-FDKs showed higher expression of *NLRP2*, which encodes a component of inflammasome, and lower expression of *DKK1*, which encodes an inhibitor of *Wnt* signalling, than Non-AD-FDKs. Treatment with *IFN-γ* for 24 hours induced the enhanced expression of *IL32*, *IL1B*, *IL8*, and *CXCL1* in AD-FDKs compared to Non-AD-FDKs, showing increased *IFN-γ* responses in AD-FDKs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ヒト組織利用研究

## 1. 研究開始当初の背景

我々は毛包バルジ領域に存在する幹細胞に着目し、頭髪を抜去して得られる毛包よりケラチノサイトを効率的に培養する手法を確

立した。培養された毛包由来のケラチノサイトを FDK とよぶ。ほぼ提供者全例の毛包から FDK の培養に成功しており、FDK は個人別に低侵襲で得られる細胞系といえる。FDK は、

皮膚ケラチノサイトに比べ分化にやや抵抗性を示すものの、その遺伝子発現プロファイルは類似しており、皮膚ケラチノサイトの代用として、FDK は有用な研究資材となりうると考えた。たとえば皮膚アレルギー反応を誘因する感作物質を検出する in vitro 感作物質試験は、入手しやすい血球由来細胞を用いた系が中心で、皮膚ケラチノサイトへの直接作用を研究する手立てはなかった。FDK を用い皮膚刺激物質（ラウリル硫酸ナトリウム）や感作物質（2,4-ジニトロクロロベンゼンや硫酸ニッケル）で刺激すると、感作物質特異的に HMOX1 や ID2 など特定の遺伝子発現が上昇する現象を見いだした。HMOX1 の発現誘導は血球細胞でも生じたが、ID2 の発現誘導はケラチノサイト特有であった。またこれらの遺伝子の発現誘導能に個体差があることを報告していた。

## 2. 研究の目的

(1) in vitro 皮膚感作試験への適用検討：FDK 培養系に、刺激物質、感作物質を添加し、両者を判別して発現変動する遺伝子を見出し、動物実験代替となる in vitro 試験法を確立する。

(2) FDK 提供者が皮膚感作の起こりやすい体質であるか否か診断のため、FDK に関する分子遺伝学的基礎データを蓄積する。

(3) アトピー性皮膚炎の病態へのこれら分子の関与につき考察する。

(4) 上記を通じて、FDK のオーダーメイド医療への利用を図る。

(5) 遺伝子多型によりアトピー性皮膚炎由来 FDK の IFN- $\gamma$  反応性予測が可能かどうか検討する。

## 3. 研究の方法

アトピー性皮膚炎患者と健常人ボランティアから培養した FDK を用いて下記の解析を行う。すなわち、皮膚感作を誘導する物質を添加しその反応性の違いを、遺伝子の発現誘導を基に解析した。解析には、マイクロアレイ、定量 RT-PCR を用いた。

(1) 感作物質添加時には誘導され、刺激物質では誘導されない遺伝子を同定し、その遺伝子発現誘導能を用いて in vitro 感作試験実施のための至適条件を設定する。

(2) 添加物質無しで対数増殖時の遺伝子発現を網羅的に調べ、両 FDK を分別可能な遺伝子を探索する。

(3) 炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  添加後の両群の遺伝子応答を解析し、有意に差がある遺伝子を見出す。

(4) IFN- $\gamma$  応答遺伝子領域、及びアトピー性皮膚炎との関連性が報告された SNP30 か所につき、(3) の解析に用いた FDK 樹立者を含む毛包提供者の遺伝子多型解析をおこなう。

その結果、明らかになった遺伝子多型と AD、もしくは IFN- $\gamma$  への反応性との関連性について関連解析をおこなう。

## 4. 研究成果

(1) in vitro 皮膚感作試験への適用検討：継代 3~4 代目の FDK を培養し、種々の感作物質、及び刺激物質を添加して、細胞毒性が低く HMOX1 および ID2 遺伝子発現誘導の高い実験条件をまず検討した。遺伝子発現はリアルタイム PCR にて非添加時の発現を 1 とし、添加 4.5 時間（発現誘導がピーク付近に達する時間）後の発現を誘導率として求めた。表 1 に示すように、代表的な感作物質である 2,4-ジニトロクロロベンゼンに対しては HMOX1 および ID2 とともに高い遺伝子発現誘導が生じたが、他の感作物質に対しては、HMOX1 は高い発現誘導が生じるが ID2 はほとんど誘導されなかった。HMOX1 は感作物質特異的に誘導され刺激物質では誘導されないことから両者を判別するマーカーとして適していることが確認された。

表1：感作物質によるHMOX1およびID2遺伝子の発現誘導

分類*	薬剤	濃度	遺伝子発現誘導率	
			HMOX1	ID2
S	2,4-Dinitrochlorobenzene	10 $\mu$ M	226	22.9
S	p-Phenylenediamine	100 $\mu$ M	28.2	1.4
S	Ethylene Dimethacrylate	600 $\mu$ M	40.8	1
S	Citral	100 $\mu$ M	512	0.6
S	NIS04	5mM	2.6	1.8
S&I	Benzalkonium chloride	0.00%	4.4	1.3
I	Methyl Salicylate	2mM	0.9	1
I	Glycerol	2mM	1.6	1.6
I	Sodium dodecyl sulfate	0.00%	1.2	1.1
NC	Dimethyl sulfoxide	0.10%	0.8	0.9

\*S:感作物質(Sensitizer), I:刺激物質(Irritant), NC:ネガティブコントロール  
添加前のFDKにおける遺伝子発現を1とし、各物質添加4.5hr後の発現を比率で表した

問題点は FDK が primary culture cell であることから良好な細胞増殖が維持できるのは継代 5 代目くらいまでで、その後増殖能が著しく低下し、反応性の安定した in vitro 試験実施可能な状態維持が難しいことである。FDK の培養には熟練を要し、継代維持が難しいため、温度感応性ポリマーを利用しトリプシン処理による細胞ダメージ削減ができないかなど培養法の改変を試みたが、効果的な方法はいまだ見つかっていない。また、FDK に SV40 ラージ T 抗原を導入し不死化を試みたが、残念ながら不死化株の取得にはいたっていない。

(2) アトピー性皮膚炎患者由来 FDK (AD-FDK, N=11) と健常人由来 FDK (Non-AD-FDK, N=7) のベーサルな遺伝子発現の違い：継代 3~4 代目 FDK の対数増殖期の遺伝子発現をマイクロアレイを用い網羅的に解析し両群の発現を比較した。

両者で 2 倍以上の発現差を示す遺伝子は 11

個で、DKK1, RRM2, CDKN3, CDK1, GMFB, NCAPG は AD-FDK において Non-AD-FDK に比べ低発現、TREM2, IL32, CYP2S1, PRRC2A, NLRP2 は AD-FDK で高発現であった (図 1)。

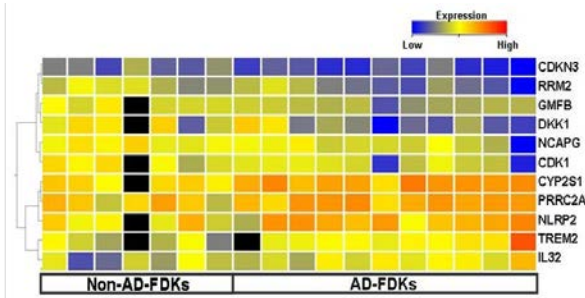


図1: アトピー性皮膚炎由来FDKと非罹患コントロール由来FDK間で2倍以上発現差を示す遺伝子

DKK1, TREM2, IL32, NLRP2 の両群における発現差はリアルタイム RT-PCR でも確認された。TREM2, IL32, NLRP2 の遺伝子発現が高いことは、AD-FDK が遺伝的に炎症性サイトカイン産生能が高いことを示している。とくに NLRP2 は炎症反応においてみられるタンパク質複合体インフラマソームの構成因子であり、カスパーゼ1を活性化することによって炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) の前駆体 (pro-IL-1 $\beta$ ) をプロセシングし、IL-1 $\beta$  を分泌できる状態にすることから、AD 病態への関与がうかがえる。CDKN3 や CDK1 を含むその他の遺伝子は細胞増殖の制御遺伝子であり、DKK1 は幹細胞の増殖を制御する Wnt シグナルの阻害因子である。皮膚ケラチノサイトを DKK1 処理すると細胞増殖が促進し皮膚の厚みが増すと報告があることから、AD における DKK1 の低発現は皮膚の脆弱性と関連しているのかもしれない。ただ FDK におけるこれらベーサルな遺伝子発現差で、アトピー性皮膚炎とコントロールの判別は難しい。

(3) アトピー性皮膚炎患者由来 FDK (AD-FDK, N=11) と健常人由来 FDK (Non-AD-FDK, N=7) の炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  に対する遺伝子応答の比較解析: 継代 3~4 代目の FDK に炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  や TNF $\alpha$ , 炎症を誘発するザイモザン添加や紫外線 UVB 照射後の遺伝子応答をマイクロアレイで解析したところ、IFN- $\gamma$  に対して最も多くの遺伝子の発現変動が生じたため、AD-FDK と Non-AD-FDK の IFN- $\gamma$  に対する遺伝子応答を比較解析した。50 ng/ml の IFN- $\gamma$  を FDK に添加し、0, 6, 12, 24 時間後の遺伝子発現を解析したところ AD-FDK は Non-AD-FDK に比べ、IL32 や IL8 を含む特定のサイトカイン・ケモカインの発現が早期に高く誘導されることが特徴としてあげられた。IL32 は皮膚ケラチノサイトにアポトーシスを誘導すること、また AD では血中の IL32 濃度が高く、AD 重症度と血中 IL32

濃度に相関性があると報告されていることから IL32 がアトピー性皮膚炎の病態発展に関与することが推測されている。そこで、我々は IFN- $\gamma$  添加 24 時間後の IL32 とその下流の遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析し、AD-FDK と Non-AD-FDK 群で比較した。図 2 に示すように、IL32 とその下流遺伝子である IL1B, CXCL1, IL8 はいずれも AD で有意に高発現していた (IL32:p=0.0002, IL1B:p=0.026, CXCL1:p=0.031, IL8:p=0.038)。ICAM1 については有意性はなかったが、AD で発現が高い傾向にあった。

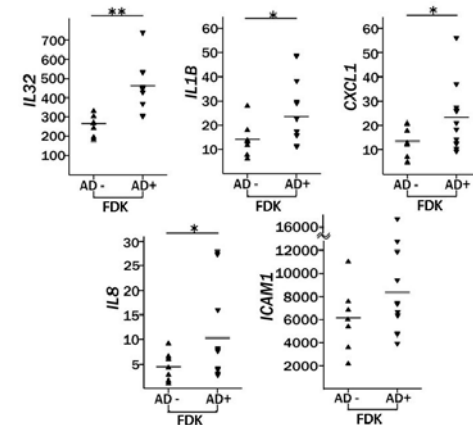


図2: IFN- $\gamma$  添加24時間後の各遺伝子発現; アトピー性皮膚炎由来FDKと非罹患コントロール由来FDK間における比較

また各 FDK の IL32 と IL1B 発現, IL32 と ICAM1 発現間には相関性が見られた (IL1B:Spearman  $r=0.61$ ,  $p=0.011$ ; ICAM1:Spearman  $r=0.74$ ,  $p=0.002$ , 図 3)。

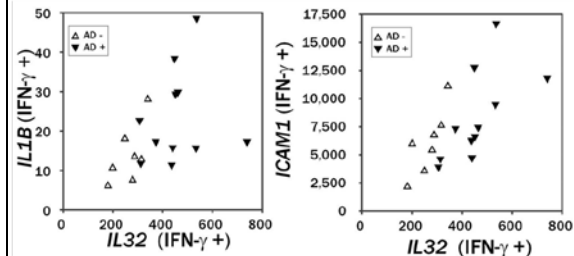


図3: IFN- $\gamma$  添加24時間後の各FDKにおけるIL32とIL1B遺伝子間、およびIL32とICAM1遺伝子間の発現相関性

以上より、AD では何らかの遺伝因子により炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  による IL32 発現誘導が高いことが、明らかとなった。AD では炎症時産生される IFN- $\gamma$  刺激によるケラチノサイトの ICAM1 発現が高く、Th1 細胞とケラチノサイト間の相互作用が高まり、それがより一層 Th1 細胞から IFN- $\gamma$  産生を高めると予想される。高まった IFN- $\gamma$  により IL32 が高度に産生され、IL32 はケラチノサイト、単球、ランゲルハンス細胞などに IL1 $\beta$  前駆体の産生を促す。AD ではケラチノサイトの NLRP2 発現が高くインフラマソームによる IL1 $\beta$  前駆体から IL1 $\beta$  への活性化が促進していると考えられる。この結果、IL8 や CXCL1 を含む炎

症反応を惹起する多くのサイトカイン/ケモカイン産生が高まるのではないかと推測された。ADにおいて高いIL32遺伝子発現誘導がなぜ起こるかについては現在検証中である。IFN- $\gamma$ 添加直後から24時間までの遺伝子発現変動を詳細に解析しており、STAT1のリン酸化制御因子がADとNon-AD間で発現差が見出されたが、今後検体数を増やして検証予定である。

(4) 遺伝子多型解析: FDK樹立に協力いただいたADボランティア21名、Non-ADボランティア20名の末梢血ゲノムDNAを用いて30か所のSNPタイピングを実施した。解析SNP領域(dbSNP ID)を以下に示す。RAB31(rs684949, rs587351, rs591067), IFITMクラスター(rs3809112, rs7395116, rs741738), DUSP1(rs17075181), CCL5(rs2107538), IRF1(rs17848435, rs9282762), IRF2(rs3756094), TNFA(rs1799724), IL4RA(rs1801275), IL12B(rs3212227), IL12RB1(rs393548, rs436857), IL1RL1(rs6543116), IL4(rs2070874, rs2243250), CCL17(rs5030969), CCR4(rs2228428), IL13(rs1881457, rs1800925, rs20541), CCL11(rs16969415, rs17809012, rs3744508), MS4A2(rs569108), PLA2G7(rs76863441), ADRB2(rs1042714)。まずアレル頻度とアトピー性皮膚炎との関連解析では、CCL5(rs2107538)がオッズ比2.45(90%信頼区間1.15-5.26), CCL17(rs5030969)がオッズ比2.47(90%信頼区間1.05-5.84)で有意性は低いものの関連傾向は示した。欧米の研究では、皮膚ケラチノサイトのIFN- $\gamma$ 応答遺伝子IFITM cluster, RAB31, DUSP1の遺伝子多型がADと関連するとの報告がある。しかし、我々の検体ではADとの関連性は見られず、またFDKのIFN- $\gamma$ 反応の強弱と関連を示す遺伝子多型は上記30サイトには見つからなかった。よって、単一ローカスの遺伝子多型でAD発症予測は難しいことが確認された。以上、個人別に低侵襲で得られるFDKは、炎症性サイトカインや感作物質に対して高い反応性を示し、病態と遺伝的背景との関連研究には好適の材料となることが示せた。

## 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1件)

① Yoshikawa Y, Sasahara Y, Takeuchi K, Tsujimoto Y, Hashida-Okado T, Kitano Y, Hashimoto-Tamaoki T. Transcriptional Analysis of Hair Follicle-Derived Keratinocytes from Donors with Atopic

Dermatitis Reveals Enhanced Induction of IL32 Gene by IFN- $\gamma$ . Int J Mol Sci. 有. 2013 Feb 5;14(2):3215-27. doi: 10.3390/ijms14023215.

[学会発表] (計1件)

① 吉川良恵、アトピー性皮膚炎罹患ドナーから培養したバルジ由来ケラチノサイトはIFN- $\gamma$ 刺激によって高いIL32産生能を有する、日本分子生物学会、2012年12月13日、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 良恵 (YOSHIKAWA YOSHIE)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10566673

### (2) 研究分担者

玉置 知子 (TAMAOKI TOMOKO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10172868

森永 伴法 (MORINAGA TOMONORI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10351818

喜多野 征夫 (KITANO YUKIO)  
兵庫医科大学・医学部・名誉教授  
研究者番号: 70028538