

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659541

研究課題名（和文） 炎症性皮膚疾患浸潤細胞の組織分布による遺伝子発現変化の解析

研究課題名（英文） Analysis of gene expression profiles in inflammatory skin disorders

研究代表者

相場 節也 (AIBA SETUYA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80159269

研究成果の概要（和文）：

Laser microdissection の技術を皮膚疾患の解析に応用する目的で、まず、表皮細胞の基底層を含む下層と顆粒層を中心とした上層での遺伝子発現分布を解析した。filaggrin 遺伝子発現を上層と下層で比較したところ、予想通り filaggrin 遺伝子発現は表皮上層で優位に増強していた。そこで、それをを用いて、表皮における鉄代謝関連酵素の発現を検討したところ、表皮の分化に伴う鉄排出関連遺伝子の発現増強が確認でき、この所見は実際の表皮内鉄分布と一致した。最後に、乳房外パージェット病における免疫制御遺伝子 RANKL の発現を検討し、病変部表皮における当該分子の発現増強を確認した。

研究成果の概要（英文）：

To apply the analysis using laser microdissection to skin diseases, we first compared mRNA expression between the lower and upper epidermis. When we examined filaggrin mRNA expression as a representative gene expressed only in the granular layer, the analysis using laser microdissection clearly demonstrated more abundant expression of filaggrin mRNA in the upper epidermis than in the lower epidermis. Next, we demonstrated augmented expression of mRNA related with the excretion of iron from inside to outside of the cell in the course of keratinization, which corresponds with the iron distribution in the epidermis. Finally, we examined immune-related gene, RANKL mRNA expression in extramammary Paget's disease. We could demonstrated more RANKL mRNA in the epidermis containing Paget's cells than the normal epidermis

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

**1) 炎症性皮膚疾患病変部における mRNA 発現解析の現状**

乾癬の病態解析における DNA microarray の果たした役割を挙げるまでもなく、病変部皮膚の mRNA 発現の詳細な検討は炎症性皮膚疾患病態解析において重要な役割をしめる。そ

の際に、現在主に用いられている手法は、皮膚組織から RNA を抽出し DNA microarray や PCR を行う解析法か、組織切片を用いた in situ hybridization である。しかし、前者の方法では、発現の認められた mRNA が皮膚組織のどこに存在する細胞に由来するかの情報は全く得られない。一方、mRNA の局在を同

定する目的では、in situ hybridization が理想的な方法ではあるが、希望する mRNA を標識できる probe を作るのは必ずしも容易ではなく、しばしば、作成できないこともある。また、至適条件の検討にも多大な時間を要する。そこで、組織学的局在部位、可能であれば、どの細胞に由来するかが明らかな mRNA 発現解析法の開発が望まれる。

## 2) Laser microdissection (LMD) を用いた mRNA 発現解析とその現状

LMD は、1996 年、Emmert-Buck らにより Science (8:274:998-1001) に報告され知られるようになった方法で、切片上の特定の部位を laser により切り取り、その切り取った組織から RNA、DNA、タンパクなどを回収する手法である。したがって、この手法を用いれば、原理的には、炎症性皮膚疾患の切片上の希望する特定部位から RNA を回収し、それを PCR により解析することが可能である。しかし、実際には、これまでいくつかの技術上の問題が存在したため、現在、PubMed で検索する限りにおいて、炎症性皮膚疾患の解析にこの手法を用いた報告は存在しない。

### 2. 研究の目的

確立した LMD を用いた遺伝子発現解析法を用いて、炎症性皮膚疾患の浸潤部位による遺伝子発現の相違を明らかにする。また、その際に、プロトコルを改良し、より少ない細胞から解析が可能な方法を確立するとともに、従来の LMD では得られなかった採取した RNA がどの細胞種由来であるかを明らかにするためのマーカー遺伝子を決定し、単一細胞集団の遺伝子解析プロトコルを確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Laser dissection を用いた皮膚疾患の遺伝子発現解析

##### 平成 23 年度

- ① 組織の採取  
東北大学医学系研究科倫理委員会の承諾後、患者のインフォームドコンセントを得た後に皮膚生検を行い、円形脱毛症（6 例）、乳房外パージェット病（6 例）、結節性痒疹（6）の組織を採取した。
- ② 採取組織の処理  
採取した組織は、OCT compound に包埋後速やかに -80 度に凍結保存する。その後、cryostat で 8・m 切片を作成し、亜鉛固定液で 60 秒固定後 HistoGene™ LCM Frozen Section Kit で染色した。
- ③ Laser microdissection 上記処理を行った切片を Zeiss PALM マイクロダイセクションシステムを用いて、目的とする部位に局在する浸潤細胞あるいは腫瘍組織を回収した。
- ④ RT-PCR  
回収した浸潤細胞、組織より RNA を回収し、種々の方法（RiboAmp™ RNA amplification kit あるいは、QuantiTect™ Whole Transcriptome など）で遺伝子増幅を試み Taqman Gene Expression Assay を行い、mRNA の半定量を行った。
- ⑤ 対象とする遺伝子(1)（サイトカイン、ケモカイン）  
今回、炎症性皮膚疾患の病態解析を行うに当たり、代表的な炎症性サイトカイン（IL-1・、TNF-・、IL-2、IL-4、IFN-・）、に関して real-time PCR により mRNA 発現解析を行った。

##### 平成 24 年度

- ① 対象とする遺伝子(2)（表皮細胞ならびに腫瘍細胞に存在する遺伝子）正常表皮細胞に関しては、表皮細胞の分化に伴い発現が誘導されることが知られている filaggrin 遺伝子、また、鉄の代謝に

関連する hemoxygenase-1, hemoxygenase-2, transferrin, ceruloplasmin, hephaestin, IRP1, IRP2, ferroportin, ferritin, heavy chain, transferrin receptor 1, LC11A2 などの遺伝子発現、細胞外パジェット病に関しては、骨代謝に関連すると同時に免疫制御にも重要な役割を果たす RANKL 遺伝子発現を Laser microdissection により解析した。

#### 4. 研究成果

表皮細胞の分化にともなう遺伝子発現変化の解析

表皮細胞は、基底層から有棘層、顆粒層、角層にいたる角化という分化過程で遺伝子発現を著しく変化させる。そこで、まず、その代表的遺伝子である filaggrin に注目して、Laser microdissection により表皮下層と上層から遺伝子を採取し発現の変化を定量 RT-PCR (qPCR) にて比較した。まず、図の様に Laser microdissection により表皮上層、下層より組織を採取した(図1)。

引き続き、採取した組織より RNA を回収し qPCR を施行した。その結果、filaggrin 発現が表皮上層で著しく発現が亢進することを確認できた(図2)。



図1. Laser microdissectionによる凍結切片からの表皮上層、下層からの遺伝子採取

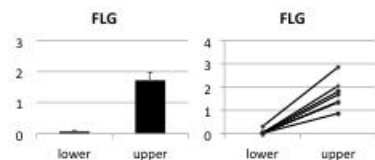


図2. Laser microdissectionにより採取した表皮上層、下層のfilaggrin遺伝子発現 (n=6)

角化に伴う鉄代謝遺伝子の発現解析

そこで、表皮細胞における鉄代謝関連遺伝子

の発現が角化にともないどのように変動するかを解析した。その際に、得られた遺伝子発現解析の結果がタンパク発現と相関するか否かを免疫染色で確認した。その結果、検討した hemoxygenase-1, hemoxygenase-2, transferrin, ceruloplasmin, hephaestin, IRP1, IRP2, ferroportin, ferritin, heavy chain, transferrin receptor 1, LC11A2 などの遺伝子全てについて、mRNA 発現とタンパク発現の相関が確認できた。(図3)

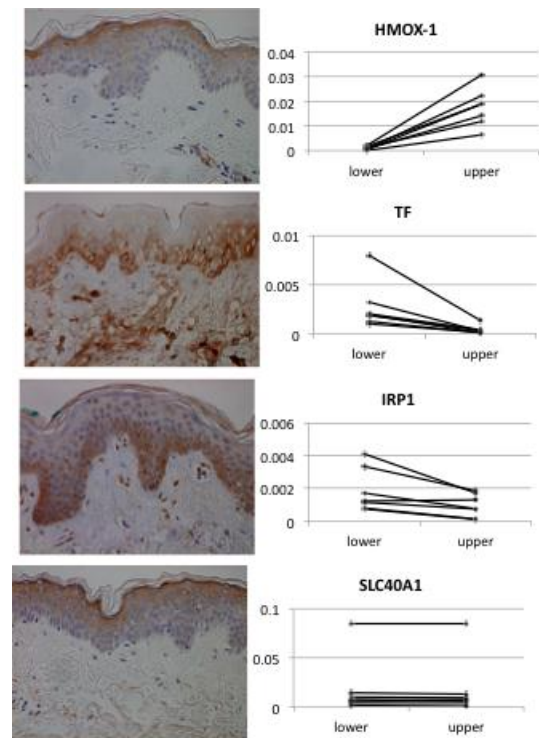


図3. 表皮細胞の分化にともなう鉄代謝関連分子の遺伝子およびタンパク発現

乳房外パジェット病における RANKL 遺伝子の発現

我々は、最近免疫染色により乳房外パジェット病の腫瘍細胞が特異的に RANKL 遺伝子を発現していることを見いだした。そこで、果たしてその免疫染色の結果が染色上のアーティファクトでないか、また、タンパク発現は転写レベルで調節されているか否かを Laser microdissection による遺伝子発現解析により検討した。その結果、遺伝子発現、タンパク

ク発煙の間で極めて良好な相関が得られた。  
(図4)

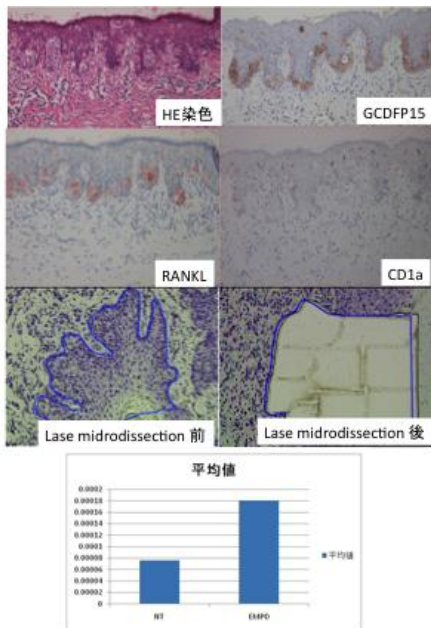


図4. 乳房外パジェット病におけるRANKLmRNAの発現増強

#### 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)

1. Takahashi, T., Y. Kimura, K. Niwa, Y. Ohmiya, T. Fujimura, K. Yamasaki, and S. Aiba. 2013. In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape-stripping. *J Invest Dermatol* in press (査読有り)
2. Tsuchiyama, K., S. Wakao, Y. Kuroda, F. Ogura, M. Nojima, N. Sawaya, K. Yamasaki, S. Aiba, and M. Dezawa. 2013. Functional Melanocytes Are Readily Reprogrammable from Multilineage-Differentiating Stress-Enduring (Muse) Cells, Distinct Stem Cells in Human Fibroblasts. *J Invest Dermatol* in press (査読有り)
3. Kambayashi, Y., T. Fujimura, and S. Aiba. 2013. Comparison of Immunosuppressive and Immunomodulatory Cells in Keratoacanthoma and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Acta Derm Venereol* in press (査読有り)
4. Mayama, H., T. Fujimura, M. Asano, Y. Kambayashi, Y. Numata, and S. Aiba. 2013. Squamous Cell Carcinoma Arising from Keratitis-Ichthyosis-Deafness Syndrome. *Acta Derm Venereol* in press (査読有り)
5. Asano, M., T. Fujimura, C. Wakusawa, Y. Aoki, Y. Matsubara, and S. Aiba. 2013. A case of almost unilateral focal dermal hypoplasia resulting from a novel mutation in the PORCN gene. *Acta Derm Venereol* 93:120-121. (査読有り)
6. Sadayasu, A., T. Fujimura, T. Haga, Y. Kambayashi, S. Furudate, and S. Aiba. 2013. Pigmented Epithelioid Melanocytoma: Immunohistochemical Profiles of Tumour-infiltrating Histiocytes. *Acta Derm Venereol* in press (査読有り)
7. Wakusawa, C., T. Fujimura, Y. Kambayashi, S. Furudate, A. Hashimoto, and S. Aiba. 2013. Pigmented Necrobiosis Lipoidica Accompanied by Insulin-dependent Diabetes Mellitus Induces CD163 Proinflammatory Macrophages and Interleukin-17-producing Cells. *Acta Derm Venereol* in press (査読有り)
8. Hirota, M., H. Kouzuki, T. Ashikaga, S. Sono, K. Tsujita, H.

- Sasa, and S. Aiba. 2013. Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol In Vitro* 27:1233-1246. doi: 10.1016/j.tiv.2013.02.013 (査読有り)
9. Okuma, A., K. Hoshino, T. Ohba, S. Fukushi, S. Aiba, S. Akira, M. Ono, T. Kaisho, and T. Muta. 2013. Enhanced Apoptosis by Disruption of the STAT3-IkappaB-zeta Signaling Pathway in Epithelial Cells Induces Sjogren's Syndrome-like Autoimmune Disease. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.016 *Immunity* 38:450-460. (査読有り)
10. Wakusawa, C., T. Fujimura, T. Haga, and S. Aiba. 2013. Granulomatous pigmented purpuric dermatitis associated with primary Sjogren's syndrome. *Acta Derm Venereol* 93:95-96. doi: 10.2340/00015555-1502 (査読有り)
11. Fujimura, T., Y. Kambayashi, and S. Aiba. 2012. Crosstalk between regulatory T cells (Tregs) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during melanoma growth. *Oncoimmunology* 1:1433-1434. (査読有り)
12. Fujimura, T., Y. Kambayashi, T. Hidaka, A. Hashimoto, T. Haga, and S. Aiba. 2012. Comparison of Foxp3+ regulatory T cells and CD163+ macrophages in invasive and non-invasive extramammary Paget's disease. *Acta Derm Venereol* 92:625-628. doi:10.2340/00015555-1453 (査読有り)
13. Hidaka, T., T. Fujimura, A. Hashimoto, and S. Aiba. 2012. Successful treatment of pigmented dermatofibrosarcoma protuberance on the nasal root with cyberknife radiosurgery. *Acta Derm Venereol* 92:658-659. doi: 10.2340/00015555-1357 (査読有り)
14. Hidaka, T., T. Fujimura, A. Watabe, A. Hashimoto, T. Haga, K. Onami, M. Mizuashi, and S. Aiba. 2012. Successful treatment of HER-2-positive metastatic apocrine carcinoma of the skin with lapatinib and capecitabine. *Acta Derm Venereol* 92:654-655. doi: 10.2340/00015555-1354 (査読有り)
15. Mizuashi, M., T. Tamabuchi, H. Tagami, and S. Aiba. 2012. Focal presence of molluscum contagiosum in basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 22:424-425. doi: 10.1684/ejd.2012.1699 (査読有り)
16. Shimada, R., T. Fujimura, Y. Kambayashi, T. Ohtani, M. Nasu, Y. Numata, T. Haga, A. Hashimoto, and S. Aiba. 2012. CD163+ adult xanthogranuloma arising from Merkel cell carcinoma treated with local radiotherapy. *Acta Derm Venereol* 92:631-632. doi:

- 10.2340/00015555-1356 (査読有り)
17. Sugawara, T., K. Kikuchi, H. Tagami, S. Aiba, and S. Sakai. 2012. Decreased lactate and potassium levels in natural moisturizing factor from the stratum corneum of mild atopic dermatitis patients are involved with the reduced hydration state. *J Dermatol Sci* 66:154-159. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.02.011 (査読有り)

[学会発表] (計5件)

1. Y. Kambayashi, T. Fujimura, S. Furudate, A. Hashimoto, T. Haga, S. Aiba. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in Angiosarcoma; the possible novel supportive therapies for angiosarcoma. 第37回日本研究皮膚科学会. 2012年12月7日から8日 那覇
2. T. Fujimura, Y. Kambayashi, S. Aiba. Generation of B7H1-expressing CD11b+Gr1+ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) during immune-modulatory therapy for B16F10 melanoma. 第37回日本研究皮膚科学会. 2012年12月7日から8日 那覇
3. S. Furudate, T. Fujimura, Y. Kambayashi, S. Aiba. Comparison of Foxp3+ regulatory T-cells and CD163+ macrophages in invasive and non-invasive extramammary Paget's disease. 第37回日本研究皮膚科学会. 2012年12月7日から8日 那覇
4. T. Fujimura, Y. Kambayashi, S.

- Aiba. Imiquimod augments the expression of B7H1 on CD11b+Gr1+ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in B16F10 melanoma. European Society for Dermatological Research. 2012年9月19日から22日 ヴェニス, イタリア
5. Y. Kambayashi, T. Fujimura, S. Aiba. Comparison of immunosuppressive cells and immunomodulatory cells in keratoacanthoma and cutaneous squamous cell carcinoma. European Society for Dermatological Research. 2012年9月19日から22日 ヴェニス, イタリア

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 免疫毒性評価細胞を用いた TNF- $\alpha$  阻害活性を定量化するシステム

発明者: 相場節也, 木村裕

権利者: 相場節也, 木村裕, 近江谷克裕, 西井重明

種類: 特願

番号: 2012-141412

出願年月日: 2012年6月22日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相場 節也 (AIBA SETSUYA)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 80159269

(2) 研究分担者

水芦 政人 (MIZUASHI MASATO)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 240400369

(3) 連携研究者

伊藤 由美子 (ITO YUMIKO)

東北大学・病院・技術一般職員

研究者番号: 00375057