

Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection

江崎, 仁一

<https://hdl.handle.net/2324/4495983>

出版情報：九州大学, 2021, 博士（医学）, 論文博士
バージョン：

権利関係：(c) 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Published by Mosby, Inc.
All rights reserved.



氏 名：江崎 仁一

論 文 名：Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection

(レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いたアトピー性皮膚炎における免疫異常ならびにバリア機能異常に関与する新規遺伝子の同定)

区 分：乙

論 文 内 容 の 要 旨

アトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis、以下 AD)病変部皮膚の分子表現型として、表皮でのバリア機能異常とともに免疫・アレルギー障害として Th2 型炎症反応が重要であることが明らかとなっている。しかしながら、皮膚を構成している表皮および真皮それぞれがどの程度バリア機能異常や免疫障害に寄与しているかを検討した報告はない。そこで、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(Laser-capture microdissection、以下 LCM)を用いて、AD 患者から採取した病変部、非病変部皮膚、ならびに健常者から採取した皮膚それぞれを表皮と真皮に分離させ、各々から RNA を抽出し、それぞれの遺伝子発現をマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 array) およびリアルタイム PCR にて検討した。統計学的解析には統計解析ソフトである R (<http://www.r-project.org>) と Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>)を用いて行った。

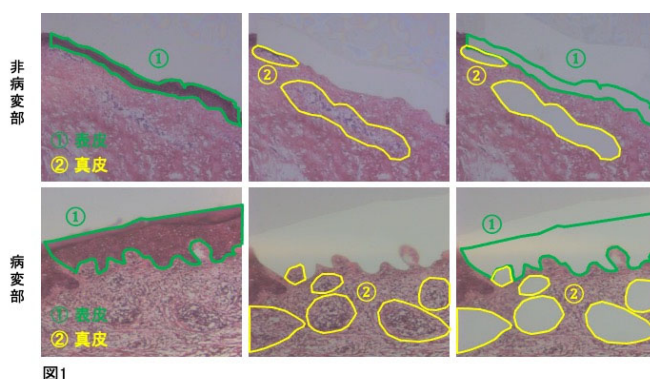


図1

LCM は、顕微鏡直視下に組織片から採取したい部分をレーザー光にて切離することが可能な技術である。必要な領域のみを切り出して解析に使用することができるため、コンタミネーションなく、バックグラウンドが低い特異性の高いデータを得ることができる。

実際に LCM にて表皮と真皮をどのように分離させたかについて、代表例を図 1 に示した。真皮成分については、真皮乳頭層および網状層に見られる炎症細胞を主として採取した。表皮と真皮に正確に分離可能であったかどうか、表皮特異的な発現遺伝子として FLG、真皮特異的な発現遺伝子として CXCL12 を用いて、リアルタイム PCR にて検討した。図 2 に示すように、FLG はこれまでの論文で報告されているように病変部表皮で健常表皮と比較して有意に発現が低下しており、真皮でほとんど発現がなかった。また CXCL12 は真皮でのみ発現がみられ、表皮で

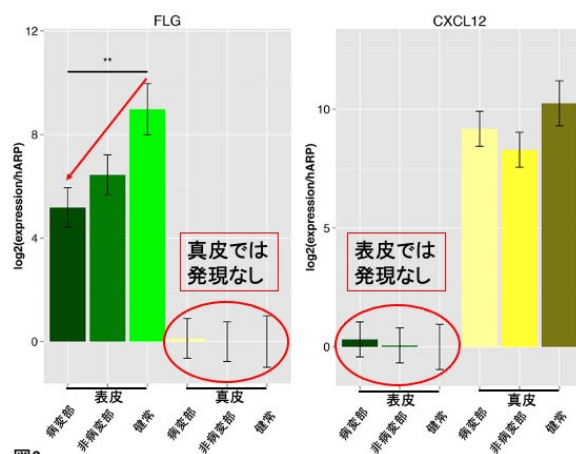


図2

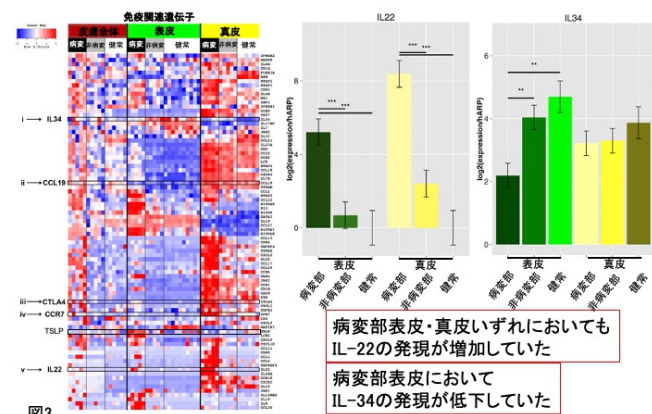


図3

新たに DEG として同定することができた。

免疫関連遺伝子発現を具体的に検討したところ、図3に示すように、これまでの皮膚全体の bulk 組織を用いて行った遺伝子解析では DEG として検出できなかった IL22 や CCL22、CCL26 を病変部

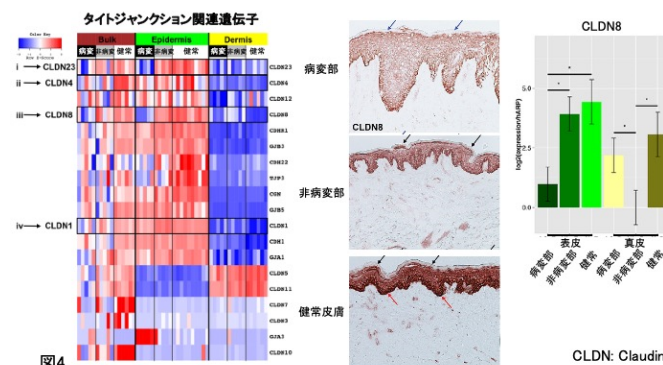


図4

ものの、AD 病変部表皮で AD 非病変部や健常皮膚表皮と比較して発現が低下していることを我々が初めて確認した。詳細な機能については確認していないが、AD における増悪抑制因子としての働きを持っている可能性があるため、今後のさらなる検討が必要である。

続いて、表皮バリア機能に関連する遺伝子発現を検討したところ、図4に示すように病変部表皮で Claudin 4 および 8 を、病変部真皮で Claudin11 を新たな DEG として同定した。Claudin 8 は腎臓や腸管での発現が確認されていたが AD では報告がなく、病変部表皮で非病変部表皮および健常表皮と比較して有意に発現が低下していた。TJ に重要な分子である複数の Claudin を DEG として同定したが、それぞれの機能については明らかにしていないため、AD のバリア機能異常における表現型に寄与している可能性があり、今後のさらなる検討が必要である。

今回の報告では、これまでの皮膚全体を用いて行われた遺伝子発現解析と比較して、LCM の技術を用いることで表皮と真皮に切り分け、それぞれにおける遺伝子発現を解析することでより多くの DEG をその局在と共に同定することが可能であった。また、これまでの皮膚全体を試料とした遺伝子発現解析では検出感度以下であったと考えられる遺伝子群を DEG として同定することができ、さらにアトピー性皮膚炎における免疫障害ならびにバリア機能異常において重要と考えられる分子を DEG として新たに発見できたことで、AD の病態解明の一助となった。

ほとんど発現がなかった。以上の結果から、LCM にて正確に表皮と真皮に分けることができたと考えた。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、発現変動遺伝子（以下、differentially expressed gene ; DEG）を Fold change (FCH) が 2 より大きく、False discovery rate (FDR) が 0.05 より小さい場合、とこれまでの報告と同様に定義した。全体として、発現が上昇していた 674、発現が低下していた 405 の遺伝子を

真皮の DEG として、また TSLP を病変部表皮の DEG として同定した。さらに、これまで炎症性皮膚疾患で DEG として同定されたことのないものとして、病変部表皮において IL34 を同定した。IL34 は colony-stimulating factor 1 receptor の macrophage-colony stimulating factor に次いで 2 番目の ligand として同定されたサイトカインである。IL34 はヒトの健常皮膚で発現が確認されている