

Cap analysis of gene expression
(CAGE) 法を用いた nestin-induced
Ikk2 deficient マウスにおける皮膚炎の
分子病態解析

Molecular pathology analysis of dermatitis
in nestin-induced Ikk2 deficient mice using
cap analysis of gene expression (CAGE)
method

2023

富山大学大学院 医学薬学教育部（博士課程）
生命・臨床医学専攻 臨床分子病態検査学講座

31561020 吉田 聡

目次

第1章 概要	1
第2章 研究背景	3
第3章 実験方法	5
3.1 動物実験	5
3.2 モデルマウスの作成	5
3.2.1 Nestin ^{Cre} ;Ikk2 ^{FL/FL} マウスの作成	5
3.2.2 Genotyping	5
3.3 皮膚組織の採取	6
3.4 組織学的、免疫組織学的評価	6
3.5 RNA 抽出	7
3.6 Cap analysis of gene expression (CAGE) 法	7
3.7 発現解析	8
3.7.1 発現解析	8
3.7.2 発現変動解析	9
3.8 トファンチニブ塗布による治療効果	9
3.9 統計解析	9
第4章 結果	11
4.1 組織学的検討	11
4.2 遺伝子発現量のクラスタリング	16
4.3 発現変動遺伝子の傾向	18
4.4 エンリッチメント解析	19
4.5 発現変動遺伝子ごとの解析	20
4.6 トファンチニブ塗布による変化	23
第5章 考察	26
5.1 Ikk2 knock-out のターゲットとなっている細胞	26
5.2 組織学的考察	26
5.3 遺伝子発現からの考察	27

5.4 トファシチニブ塗布による影響	31
第6章 結語	33
第7章 謝辞	34

第1章 概要

[目的]

アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患と定義される。主に若年期に発症し、ときに成人型アトピー性皮膚炎に移行し慢性化する。佐賀大学の布村、富山大学の北島らのグループは、主に胎生期中枢神経系の形成過程で発現する Nestin の promoter/enhancer 制御下に Cre 遺伝子を発現し、炎症を司る NF- κ B パスウェイの中核を担う IKK2 を特異的に knock-out した Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウスを作成し、同マウスが生後1ヶ月以内にアトピー性皮膚炎に酷似した顔面皮膚炎を呈し、激しい掻痒行動を示すことを示し、Facial atopic dermatitis with scratching (FADS) マウスと命名し報告した。

本研究では、この Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウスを用いて、生後3、6日の若年期および生後28日の成熟期における皮膚炎症状の病態と発症機序について、組織学的および Cap analysis of gene expression (CAGE) 法を用いた転写開始点レベルにおける網羅的遺伝子発現を検討した。

[方法]

Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウス (KO マウス) はメスの Ikk2^{FL/FL} マウスとオスの Nestin^{Cre}; Ikk2^{FL/+} マウスとの交配により作成した。Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/+} マウスを control とした。

生後3日目、6日目、7日目、28日目、35日目の KO マウスと control マウスをイソフルラン麻酔下で放血し、顔面皮膚、背部皮膚を採取した (各群 n=3)。JAK 阻害薬トファシチニブ (#5001, Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) 塗布群は、0.05%(w/vol) を生後9日から27日まで隔日塗布し、生後28日目に皮膚組織を採取した。

生後3日目、7日目、35日目の皮膚組織は、ホルマリン固定後、パラフィン標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および抗 CD11b 抗体、抗 Vimentin 抗体等を用いた免疫組織化学染色を行った。光学顕微鏡下で観察し、組織学的評価に用いた。

生後3日目、6日目、28日目のマウスから採取した皮膚組織は、採取後すぐに - 80°C で凍結し、RNA を回収した。採取した RNA からライブラリを調整した後、CAGE 法を用いてシーケンシング、マッピングを行い、転写開始点ごとの遺伝子発現量を計測した。遺伝子発現群の変化は、Metascape を用いエンリッチメント解析をおこなった。遺伝子発現量は一般化線形モデルを用いた尤度比検定で検定し、FDR <0.01 を有意水準と定めた。

[結果]

KO マウスは生後 6・7 日目という比較的幼若な時期から皮膚炎症状を示し、真皮には M2 マクロファージが集簇した炎症像が観察され、生後 35 日目には真皮乳頭の延長や真皮肥厚など慢性炎症像が観察された。組織学的所見に加え、CAGE 法による主成分分析、機能的アノテーションにより、生後 3 日目からすでに炎症に関わる遺伝子群がエンリッチされており、若年期から炎症が誘導されていることが示唆された。また、3 日目の遺伝子発現変動では炎症にかかわる多数の遺伝子発現が上昇しているにもかかわらず、Ubiquitin conjugating enzyme の一種である Ubiquitin conjugating enzyme D2 (Ube2d2) 遺伝子発現が減少していた。そこで、転写開始点レベルでの発現変動を検討したところ、Ube2d2 遺伝子の第 4,5 転写開始点での発現が、Control 群では上昇しているにもかかわらず KO 群で低下しているという特異な変化が確認できた。一方で、アトピー性皮膚炎患者に対して炎症を緩和させる効果が期待されている JAK 阻害薬トファシチニブを塗布することにより、Ube2d2 の第 5 転写開始点での遺伝子発現が再び増加へ転ずることが明らかになった。Ube2d2 の発現変動が KO マウスの皮膚炎症に関わる病態に関与している可能性が示唆されたことから、同マウスでの炎症発生機序に Nuclear factor kappa-B (NF- κ B) 関連分子のユビキチン化が関与している可能性が示唆された。

[総括]

アトピー性皮膚炎モデルマウスである FADS マウスの皮膚炎発症機序に対して、組織学および経時的な遺伝子発現を解析した。皮膚病巣部位における炎症誘導や JAK 阻害薬トファシチニブの塗布による炎症軽減過程において、Ube2d2 遺伝子の転写開始点での増減が関与していることを明らかにした。

[key words]

CAGE 法、Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウス、FADS マウス、NF- κ B、転写開始点、Ube2d2、Ubiquitin conjugating enzyme、ユビキチン-プロテオーム系、トファシチニブ、JAK 阻害薬

第2章 研究背景

アトピー性皮膚炎は、増悪寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患として定義される [1,2]。主に乳児期・小児期に発症し、年齢が進むにつれて患者数は減少するとされているが、一部の患者では成人型アトピー性皮膚炎に移行し、難治化する。

アトピー性皮膚炎の病態解明のために、アトピー性皮膚炎様の症状を呈するモデルマウスが複数報告されている [3] が、それぞれのマウスは、ヒトのアトピー性皮膚炎とは異なった症状を示す場合も多い。特に、アトピー性皮膚炎の定義にも含まれている掻痒を示すマウスはほとんど報告されていなかった。

Nuclear factor kappa-B (NF- κ B) は炎症をコントロールする中心的な分子として働き、刺激がない状態では不活性化されて細胞質内にとどまるが、刺激によって活性化されると核内に移行し、種々の炎症性サイトカイン等の転写因子として働く [4]。この転写因子を活性化する分子が欠けると免疫不全を起こし、逆に過剰になると自己免疫疾患や癌を発症する。実際に、NF- κ B の活性化は、アトピー性皮膚炎、関節リウマチなど異常な炎症や免疫関連の疾患を引き起こし、病態を悪化させることが指摘されている。NF- κ B を活性化するシグナル伝達経路には、主に Canonical pathway、Alternative pathway、Atypical pathway の3種類が知られている。いずれの経路も、inhibitor of NF- κ B (I κ B) をリン酸化する酵素である I κ B キナーゼ (I κ B kinase, IKK) 複合体の活性化が関与する [5]。今回、我々が解析のターゲットとしている IKK 複合体の構成成分である IKK2 は主に Canonical pathway において I κ B のリン酸化に働き、IL-1 β や TNF- α 、LPS などの刺激に反応して、NF- κ B の核移行を調整する。

これらのパスウェイを理解する方法として標的遺伝子の knock-out は有効な手段であるが、NF- κ B は生体内で種々の分子の発現を調整しているため、IKK2 を始めとした NF- κ B に関連する分子の knock-out は容易に胎生致死を引き起こす [6] ため Conditional knock-out マウスの作成が必要不可欠である。Manolis Pasparakis らは 2002 年に、Cre/loxP システムを用いてケラチン 14 (K14) 存在下に Ikk2 を knock-out する Conditional knock-out マウスを作成し、K14 依存的な Ikk2 の knock-out が皮膚炎症状を呈することを示した [6]。また M. Schmidt-Supprian らは、IKK2 複合体の構成要素の一つである NF- κ B essential modulator (NEMO) を knock-out したマウスが皮膚炎症状を呈することを報告している [7]。

佐賀大学の布村、富山大学の北島らの研究グループは、炎症のレギュレーターである NF- κ B の働きを調べるモデルマウスを作成していく中で、胎生期中枢神経前駆細胞に発現する Nestin の promoter/enhancer 制御下に Cre を発現させた Nestin-Cre を用いて Ikk2 を Conditional knock-out

したマウス、すなわち Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウス (FADS マウス) が、掻痒を伴う皮膚炎を呈することを発見し報告した [8,9]。本マウスでは、生後 10 日前後からアトピー性皮膚炎に酷似した顔面皮膚炎が出現し始め、早期から頻繁なひっかき行動を示すことが特徴的であった。さらに特筆すべきことに、このマウスで発現上昇・低下を示す遺伝子はヒトのアトピー性皮膚炎患者の遺伝子発現と高い一致率を示す。遺伝子発現のレベルでも、アトピー性皮膚炎の病態をよく反映していると報告している。

先に示した通り、アトピー性皮膚炎を含む皮膚炎症状の中には、幼少期、小児期で発症するものも少なくないが、若年期から皮膚炎症状を呈するモデルマウスは少なく、若年期の皮膚炎モデルマウスに対する報告は少ない。先行研究 [8,9] でも、解析対象となっているのは生後 2~4 ヶ月の成熟したマウスが対象であり、若年期のマウスの動態については解明されていなかった。近年の分子生物学の発展に伴って、生体内の反応について、分子レベルでの解析や理解が進んできている。特に次世代シーケンサー (Next generation sequencer, NGS) を用いた網羅的な遺伝子解析の技術革新は著しく、単純に DNA の変異や RNA の発現を捉えるのみならず、プロモーターやエンハンサーといった転写調節単位のレベルでの解析や、1 細胞レベルでの解析、あるいは空間的・形態的情報とシーケンス情報を統合した Spatial transcriptome 解析など、応用分野は多岐にわたっている。加えて、DNA, RNA, タンパク質に関する大規模データベースの整備がますます進んできており、各々のシーケンスデータだけでなく、各データと公開データベースの情報とを総合的に解釈することも盛んに行われるようになってきた [10-12]。

今回解析に用いた Cap analysis of gene expression (CAGE) 法は、RNA 全体をシーケンスするのではなく、RNA の転写開始点から 50 塩基程度の範囲を集中的に、しかしながらすべての RNA の転写開始点について解析できるという点に特色を持つ検出方法である。これによって、RNA がどの転写開始点から転写されているかを解析することができ、そこから転写を制御するプロモーターやエンハンサーを解析することができる。Haverie v. らは 2014 年に、ゼブラフィッシュの初期胚の解析により、プロモーター配列 1 つに対して 2 つの転写制御メカニズムが独立に作用する転写制御の仕組みを報告した [13]。その後の研究で、プロモーター配列の多くは複数の転写開始点を制御することがわかり、特に疾患などによって転写開始点に変化すること (Promoter shift) が観察され、転写開始点とプロモーターの変化が疾患構造に関与していることが明らかになってきた [14,15]。

本研究では、生後 3 日、6 日の若年マウスと、比較のため生後 28 日の成熟したマウスを解析対象とし、幼弱なマウスでの Ikk2 knock-out による皮膚炎症状の病態について、組織学的、分子生物学的に解明することを目的とした。特に、分子生物学的な検討では、CAGE 法を用いて、各遺伝子の発現を転写開始点のレベルでより詳細に分析した。加えて、近年アトピー性皮膚炎の経皮治療薬として用いられるようになった JAK 阻害薬 [16,17] を塗布し、JAK 阻害薬塗布による影響と分子生物学的な機序について考察した。

この論文は Plos One に投稿中である。

第3章 実験方法

3.1 動物実験

動物実験は、富山大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。(動物実験番号：A2017MED-10)

3.2 モデルマウスの作成

3.2.1 Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウスの作成

Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウスの作成法については、布村らの報告に従った [8]。ここでは簡潔に knock-out マウス作成法を記す。

Nestin^{Cre} マウス、Ikk2^{FL/FL} マウスはそれぞれ Dr. Gail R. Martin 博士および Dr. Manolis Pasparakis 博士より提供を受けた。遺伝子改変マウスはいずれも C57BL/6J より作成され、通常飼料によって飼育した。

Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウス(以下、KO マウスとする)はメスの Ikk2^{FL/FL} マウスとオスの Nestin^{Cre}; Ikk2^{FL/+} マウスの掛け合わせにより作成した。Nestin^{Cre}; Ikk2^{FL/+} マウスをコントロールマウスとして用いた(以下、Control マウスとする)。Nestin^{Cre} マウス、Ikk2^{FL/FL} マウスは富山大学動物実験センターで、Specific pathogen free の条件下で飼育した。マウスは1ケージあたり2~5匹を入れ、12時間ごとの昼夜サイクルとし、水および飼料を ad libitum で与えた。生後3、6、7、28、35日目のマウスを解析対象とした。

3.2.2 Genotyping

採取した尾組織を1.5 mL チューブに入れ、25 μ L の Lysis solution(0.1 mg/mL proteinase K) を加え、55°C で2時間インキュベートし、組織を溶解した。溶解液に500 μ L の蒸留水を加え、95°C で10分間インキュベートし、15000 rpm で10秒間遠心してDNAを得た。得られたDNAを用いてPCRを実施し、Genotypingを行った。用いたプライマーおよびPCR条件をTable 1、Table 2に示す。

Name	Forward primer	Reverse primer	T _m (°C)
Cre	TTACGGCGCTAAGGATGACT	TTGCCCCTGTTTCACTATCC	55
IKK-Flox	TCCTCTCCTCGTCATCCTTCG	ACAGTGACACACCCCATTTCCA	55
IKKb	GTTCAGAGGTTTCAGTCCATTATC	TAGCCTGCAAGAGACAATACG	58

Table 1: PCR primer

Temp (°C)	Time	Cycle
95	10 min	1
95	30 s	40
60	1 min	40
95	1 min	1
55	30 s	1
95	30 s	1

Table 2: PCR 条件

3.3 皮膚組織の採取

生後3日目、6日目、7日目、28日目、35日目のKOマウスとControlマウスをイソフルラン麻酔下で放血し、顔部皮膚、背部皮膚を採取した。(各群 n=3)

生後3日目、7日目、35日目の皮膚組織は、ホルマリン固定後、パラフィン標本を作成し組織学的評価に用いた。生後3日目、6日目、28日目のマウスから採取した皮膚標本は1.5 mLのサンプルチューブに入れ、採取後すぐに-80°Cで凍結した後、別に記載するRNA抽出法に従い、RNAを回収した。

3.4 組織学的、免疫組織学的評価

採取した皮膚組織をホルマリンで固定した後、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、100%エタノールで順次脱水し、パラフィンに包埋し、4 μm厚の薄切切片を作成した。切片は脱水後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色した。

免疫組織標本は、脱パラフィン後、クエン酸緩衝液(pH6.0)にて賦活化し、一次抗体として抗好中球抗体 Anti-neutrophil antibody (Rat monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)、抗CD11b抗体 Anti-CD11b antibody (Rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)、抗Vimentin抗体 Anti-vimentin antibody (Rabbit monoclonal, Cambridge, UK)、抗CD86抗体 Anti-CD86 antibody (Mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)、抗Iba-1抗体 Anti-Iba-1 antibody (Rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)、抗Liver arginase抗体 Anti-Liver arginase antibody (Goat monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)、抗α-SMA抗体 Anti-alpha smooth muscle actin antibody (Rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)を用い、4°Cで一晩反応した。

二次抗体として biotin conjugated rabbit IgG antibody (ヒストファイン: (株)ニチレイバイオサイエンス、東京)あるいは Goat anti rat IgG H & L(HRP) (Abcam, Cambridge, UK)を用い、DAB基質キット (ヒストファイン: (株)ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)にて発色し、ヘマトキシリンにて核染色を行った。染色した組織は Leica DMRBE 顕微鏡 (Leica, Wetzlar, Germany)、DP73 system (Olympus Co. 東京、日本) および CellSense(Olympus Co. 東京、日本)を用いて撮影、観察した。

3.5 RNA 抽出

凍結した組織に対し ca.15 ビーズを 0.35 g/tube 加え、RNAiso Plus(Takara,Japan) を 1 mL 加えた。遠心機で 5000 rpm, 30 秒遠心し、氷上で 1~2 分静置した。この遠心と氷上静置を 3 回繰り返して、完全に組織を破碎した後、室温で 5 分間静置して細胞を破壊した。

この後の操作の簡便のため、1.5 mL チューブ 2 本に分注した。分注したチューブを 4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。クロロホルムを開始容量 (500 μ L) の 0.2 倍量 (100 μ L) 加え、転倒混和してから室温で 5 分インキュベートし、4°C、15000 rpm で 15 分遠心した。上清を除き、開始容量の 0.5 倍 (250 μ L) のイソプロパノールを加え、転倒混和し、室温で 10 分間インキュベートした後に 4°C、15000 rpm で 10 分遠心した。上清を捨ててから、開始容量と等量 (500 μ L) の 75%エタノールを加えて洗浄した。4°C、15000 rpm で 20 分遠心した後、上清を捨て、室温で 10 分間乾燥させた後に 100 μ L の DEPC treated water に溶解し、RNA を得た。

得られた RNA は RNeasy mini kit (# 74104, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。精製した RNA を Nano drop One (ThermoFisher scientific, Waltham, USA) にて計測し、RNA 濃度、吸光度 (A260/280, A260/230) を求めた。採取した RNA の総量の平均は、48.38 μ g、A260/230 値の平均が 2.15、A260/280 値の平均が 2.12 であった。

3.6 Cap analysis of gene expression (CAGE) 法

CAGE 法は、理化学研究所が中心になって開発された網羅的な RNA 解析法の一つで、真核生物の mRNA の 5' 末端にある 5'-cap 構造を特異的に捉える手法 (Cap trapper 法) を用いて、mRNA の 5' 末端から 20 - 70 ヌクレオチド (nt) を特異的にシーケンシングする技術である [18,19]。5' 末端の RNA 配列を選択的に捉えることにより、転写開始点での遺伝子発現をより詳細に捉えることができ、1 塩基の精度で転写開始点のシフトを検出できることが特徴である。

CAGE 法では、ランダムプライマーを用いて鋳型となる mRNA から cDNA を複製する点は RNA-Seq と共通しているが、CAGE 法では 5' 末端から得られた cDNA 断片のみを解析対象とすることで、得られた mRNA とシーケンスする cDNA が 1 : 1 に対応するため、定量性に優れている [20]。一方、CAGE 法では RNA-Seq と違って mRNA 全体の配列をシーケンスすることがないので、Splicing variant や融合転写物といった mRNA の構造を評価することはできない [21] (Figure 1)。

CAGE 法によるライブラリ調整、シーケンシング、マッピングは株式会社ダナフォーム (横浜) にて実施した。RNA の品質は Bioanalyzer (Agilent) を用いて評価し、RNA integrity number (RIN) が 7.0 以上であり、A260/280 比および A260/230 比が 1.7 以上であることを確認した。得られた cDNA より 5' キャップ領域の RNA を転写し、転写された cDNA 配列に、識別用の CAGE バーコードタグ配列を付与し、Illumina/Solexa 次世代シーケンサーにてシーケンスを行った。得られたキャップ配列のシーケンス結果からシーケンス精度が低く正確にシーケンスできていないと考えられるなど

マッピングに適さない配列を除去し、BMA software (v.0.5.9) を用いてマウス mm9 参照配列にマッピングし、CAGE transcription start sites (CTSS) を同定した。

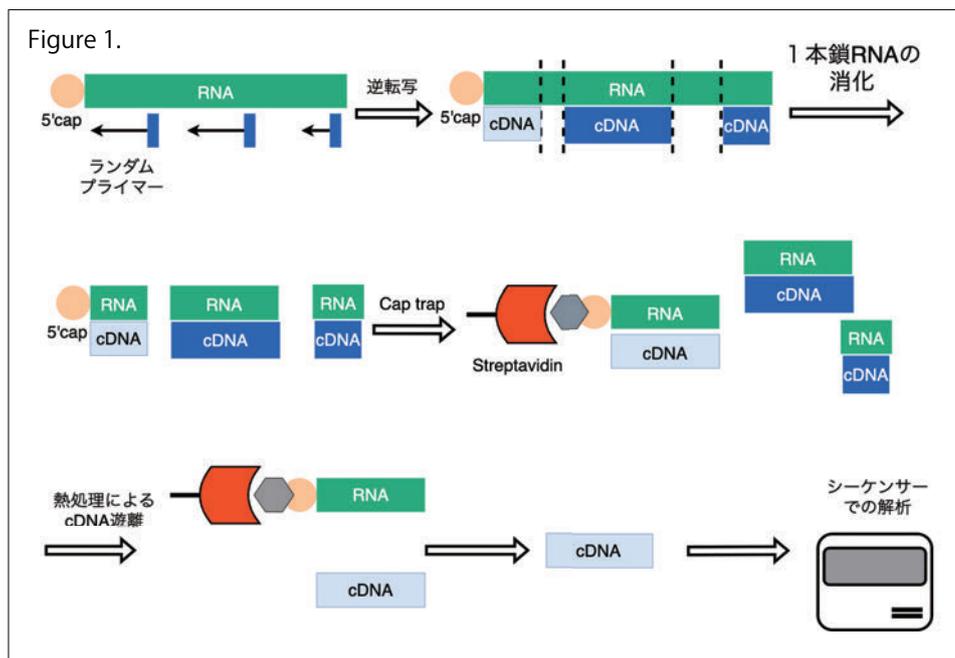


Figure 1. CAGE 法概略

ランダムプライマーによって逆転写を行う点は RNA-Seq と共通だが、その後一本鎖 RNA の消化、Cap trap を行う点が異なっている。また、Cap trap されるのは 1 転写産物につき 1 つの領域のみなので、転写産物と cDNA が 1 : 1 に対応し、定量性に優れる。

3.7 発現解析

3.7.1 発現解析

得られた CTSS の発現量を FANTOM5 project [11,12] で得られた CAGE peak データにマッピングし、各転写開始点の発現量を得た。報告されている 158,966 の転写開始点のうち、発現量がいずれの個体においても 10 counts per million (CPM) 以下である発現量の少ないものを除き、また、有意変動を示さないもの (False discovery rate: FDR 0.01 以上) を除いて、7,970 の転写開始点を解析対象とした。

得られた転写開始点の発現量に基づいて主成分分析を行い、第 1, 第 2 主成分についてプロットした。また、各マウスの転写開始点ごとの遺伝子発現量に基づいて、Spearman の相関係数から類似度を計算し、マウス間の距離とした。求めたマウス間の距離を基に平均距離法で階層的クラスタリングを行い、デンドログラムを作成した。さらに、KO 群と Control 群との発現量の差について、MA-plot を作成した。MA-plot は日齢ごとに KO 群と Control 群の遺伝子発現量の平均発現量と発

現変動量を比較するものであり、縦軸に遺伝子の発現量比 (M: minus in the log scale)、横軸に遺伝子の平均発現量 (A: average in the log scale) を取った。M および A を以下のように定義した。

$$\begin{aligned} M &= \log_2 \frac{\text{KO}}{\text{Control}} \\ &= \log_2 \text{KO} - \log_2 \text{Control} \\ A &= \frac{1}{2}(\log_2 \text{KO} + \log_2 \text{Control}) \end{aligned}$$

KO および Control はそれぞれ KO 群と Control 群での、各転写開始点での遺伝子発現量である。

3.7.2 発現変動解析

発現変動とは knock-out などの処理によりどれだけ遺伝子の発現が変化するかを表したものである。ここでは、KO 群と Control 群との発現量の比率を Fold change (FC) と定義し、解析の対象とした。得られた転写開始点の発現量について、edgeR (ver. 3.34.1) [22,23] を用いてマウスの日齢、Ikk2 knock-out の有無について実験群を分け、一般化線形モデルを用いて尤度比検定を行った。発現変動量について log fold change (logFC) , False discovery rate (FDR) と p-value を計算した [24,25]。logFC は次式で表される量である。

$$\log \text{FC} = \log_2 \text{FC} = \log_2 \frac{\text{KO}}{\text{Control}} (= M)$$

FDR <0.01 以下の転写開始点を有意変動した転写開始点とし、発現変動解析の対象とした。

3.8 トファシチニブ塗布による治療効果

トファシチニブは JAK1/JAK2/JAK3 阻害薬として、主に関節リウマチなどの治療に用いられる薬剤で、JAK-STAT pathway に起因する炎症を抑える効果を持つ。0.05% (w/vol) のトファシチニブ (#5001, Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) をアセトン DMSO(9:1) 混合物に溶解した。アセトン DMSO 混合物を Vehicle control に用いた。Ikk2 knock-out マウスに、生後 9 日から 27 日まで隔日塗布し、生後 28 日目で麻酔下に放血し、皮膚組織を採取した。

3.9 統計解析

発現変動解析を含む統計解析は主に統計解析向けプログラミング言語である R (ver.3.6.3) [26] と、R の統合開発環境である Rstudio(ver.1.2.1335) [27,28] を用いて行った。発現解析には edgeR(ver.3.34.1)

[22,23,29] を用いた。発現量の検定は尤度比検定による多重検定を行い、FDR による多重補正を行った。FDR < 0.01 以下の発現変動量を示す転写開始点を有意変動を示す転写開始点とした。

第4章 結果

4.1 組織学的検討

生後3日目 (Day3) , 7日目 (Day7) および生後35日目 (Day35) の KO マウスの皮膚について、組織学的な検討を行った (Figure 2)。

Day3の KO マウスでは、特に表皮 (Ep) には形態的な変化が認められないが、真皮層 (Der) に多くの紡錘状の細胞の集積が観察された (Figure 2-A: 1,1-1)。この紡錘形細胞は Vimentin (+) (Figure 2-A: 2-1))、CD11b (-) (Figure 2-A: 3)、Nestin (-) (Figure 2-A: 4)、 α -SMA (-) であった (Figure 2-A: 5)。

Day7の KO マウス皮膚の HE 像では急性期の炎症像が観察された。真皮中層～浅層、表皮にかけて、炎症細胞浸潤が著しく (Figure 2-B: 1 矢印) があり、表皮では角化が亢進していた (Figure 2-B: 1 両矢印)。免疫組織化学染色では、表皮内の浸潤細胞は抗好中球抗体 (-)、Vimentin (+)、CD11b(+)、CD86 (-)、Iba-1(-)、Liver Arginase(±) (Figure 2-B: 2,3,5,6,7 黒矢印) だが、真皮層の浸潤細胞は抗好中球抗体 (-)、Vimentin (+)、CD11 b (+)、CD86 (-)、Iba1 (+)、Liver Arginase (+) であった (Figure 2-B: 2, 3,5,6,7 赤矢印)。真皮から表皮にかけて存在する浸潤細胞は、好中球ではなく、単球・マクロファージ系の細胞が主体であった。

Day35では中期～慢性期の皮膚炎像が観察された。表皮への炎症細胞の集簇よりは痂皮を伴う表皮障害 (Figure 2-C ②) が顕著であり、真皮乳頭の延長 (Figure 2-C ③) を認めた。免疫組織化学染色では、Day7と比べて CD11b (+) の細胞が表皮、真皮ともに著しく減少した。

Figure 2-A: Day3

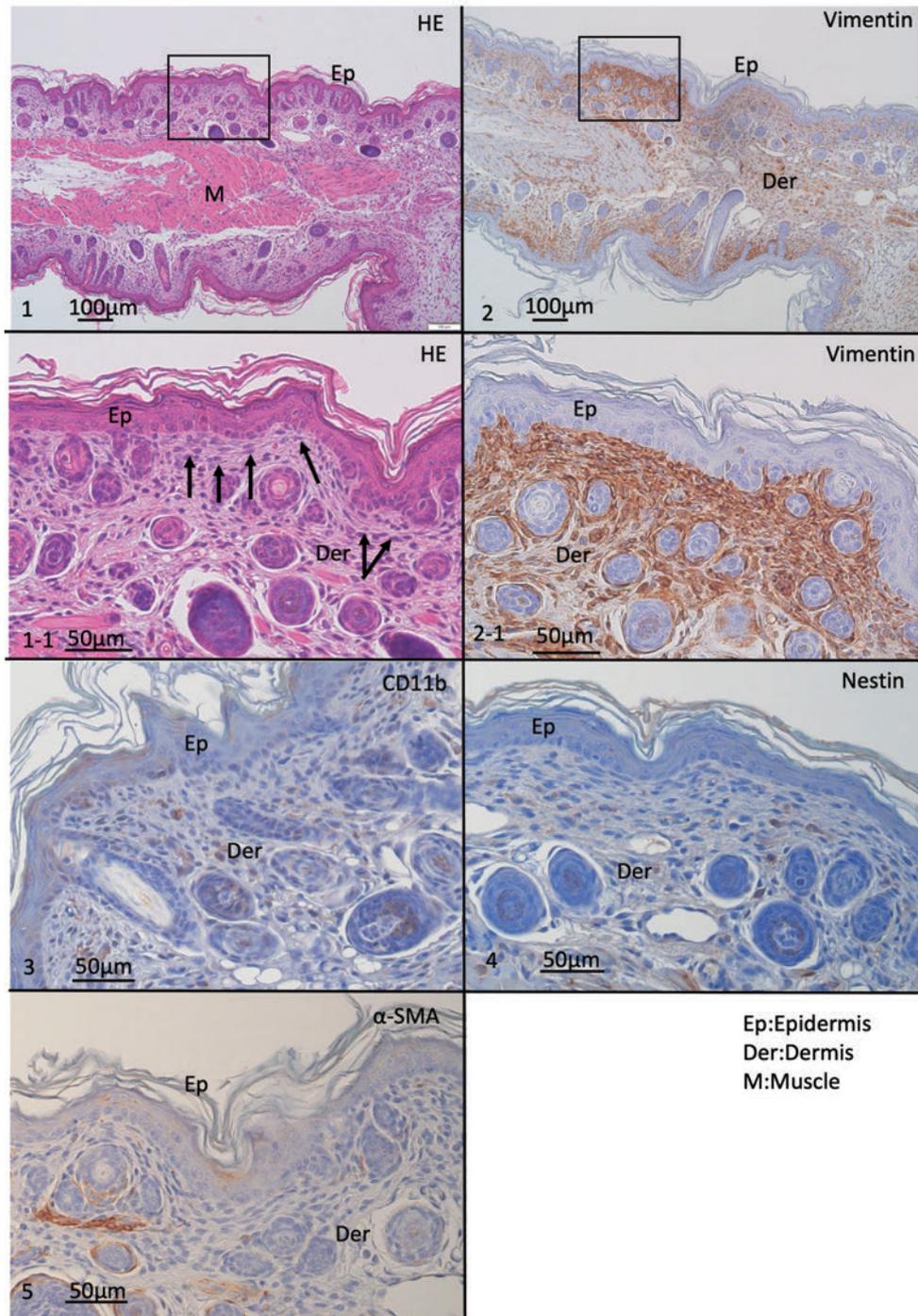


Figure 2-B: Day7

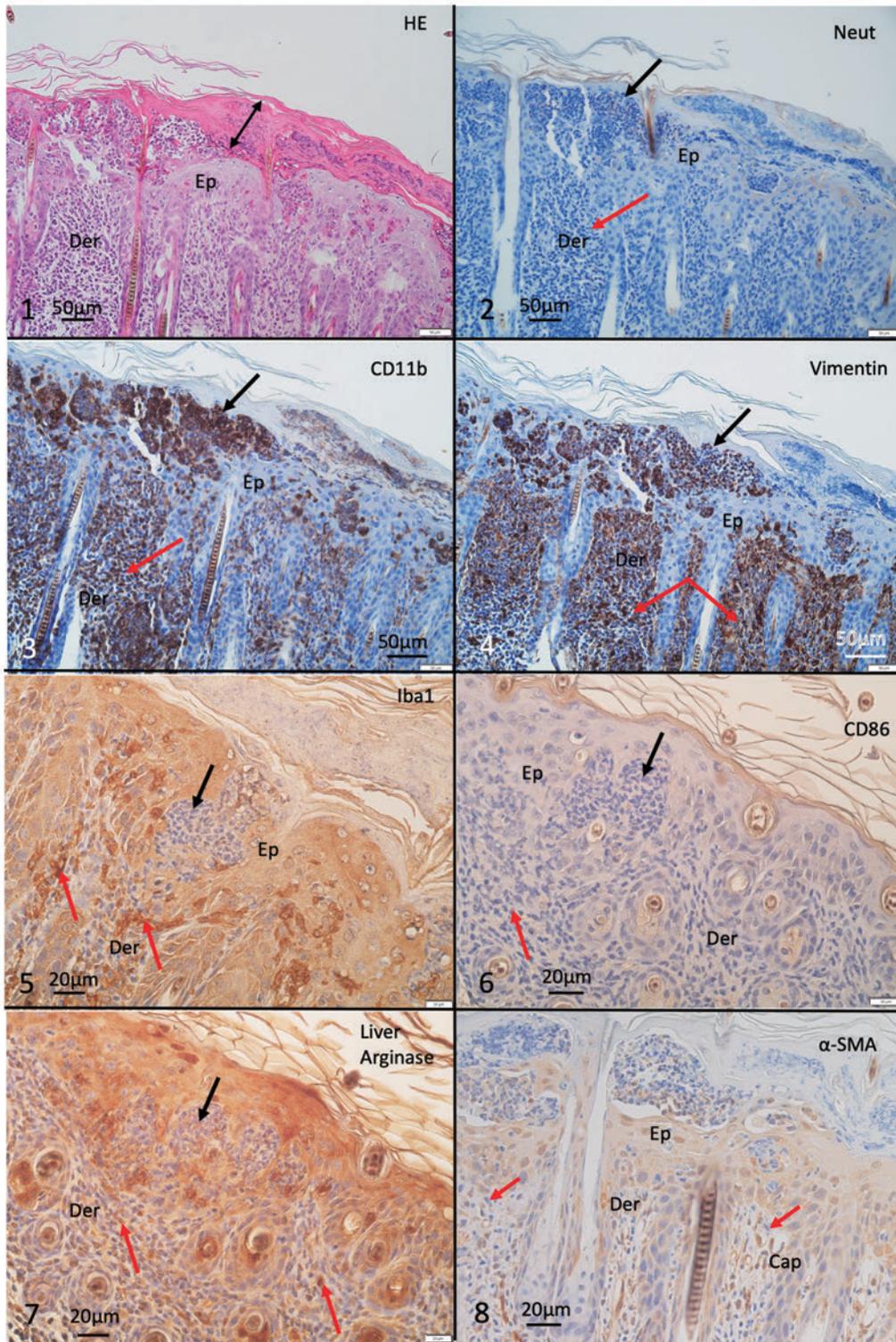


Figure 2-C: Day35

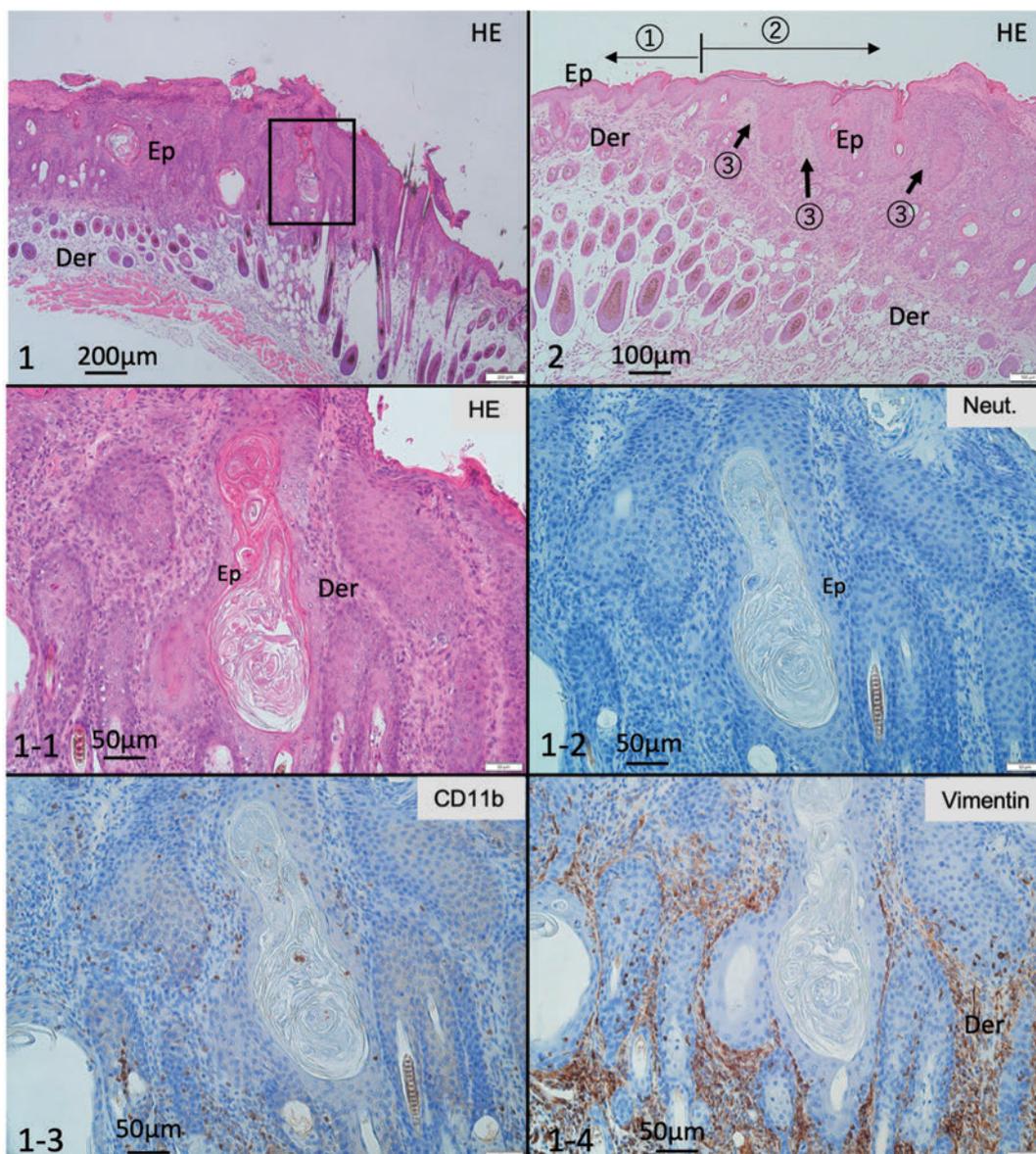


Figure 2. KO マウス皮膚の組織学的検討

Figure 2-A: Day3 KO マウスの皮膚所見

1 H-E 染色像

1-1 1 の枠内の拡大像。表皮直下の真皮に紡錘状の細胞（矢印）が多数存在しているのが確認された。

2 Vimentin による免疫染色: 表皮直下に集簇して Vimentin (+) 細胞が散在性に存在した。

2-1 2 の枠内の拡大像。表皮直下の真皮に存在する細胞。すべて Vimentin (+) である。

3 CD11b による免疫染色: 真皮層に存在する紡錘状の細胞は CD11b (-) である。

4 Nestin による免疫染色: 真皮層に存在する紡錘形の細胞は Nestin (-) である。

5 α -SMA による免疫染色: 毛包周囲の細胞は α -SMA (+) だが、真皮層に存在する紡錘状の細胞は α -SMA (-) である。

Figure 2-B: Day7 KO マウスの皮膚所見

1 H-E 染色像

2 抗好中球抗体による免疫染色: 表皮および真皮に存在する浸潤細胞は抗好中球抗体 (-) であった。

3 CD11b による免疫染色: 表皮および真皮に存在する浸潤細胞はいずれも CD11b (+) である。

4 Vimentin による免疫染色: 表皮および真皮に存在する浸潤細胞はいずれも Vimentin (+) である。

5 Iba-1 による免疫染色: 表皮に存在する浸潤細胞は Iba-1 (-)、真皮に存在する細胞は Iba-1 (+) であった。

6 CD86 による免疫染色: 表皮および真皮に存在する浸潤細胞はいずれも CD86 (-) であった。

7 Liver arginase (LA) による染色: 表皮に存在する浸潤細胞は LA (-)、真皮に存在する浸潤細胞は LA (+) であった。

8 α -SMA による染色: 血管や立毛筋は (+) だが、その他の紡錘形細胞は (-) であった。

Figure 2-C: Day35 KO マウスの皮膚所見

1 H-E 染色像

1-1 1 の枠内の拡大像。表皮では角化が亢進していた。

1-2 抗好中球抗体による免疫染色: 染色像は観察されなかった。

1-3 CD11b による免疫染色: 表皮にも真皮にも陽性細胞はほとんど存在しなかった。

1-4 Vimentin による免疫染色: 真皮層に Vimentin (+) の細胞が存在した。

2 H-E 染色像。①と比較し、②の領域において表皮 (Ep) の肥厚、角質層の肥厚、痂皮の形成、真皮乳頭の延長 (③) が観察された。

4.2 遺伝子発現量のクラスタリング

転写開始点の遺伝子発現量に基づく主成分分析 (Figure 3-1) およびデンドログラム (Figure 3-2) を用いクラスタリングした。

転写開始点ごとの発現量を主成分分析で分類した結果、第1主成分 (PC1) の寄与率は 44.15 %、第2主成分 (PC2) の寄与率は 21.72 %であり、PC1,PC2 の累積寄与率は 65.87 %であった。主成分分析によるプロットをみると、各サンプルは Day3、Day6、Day28 の日齢ごとに大きく分類された (Figure 3-1)。

knock-out の有無による遺伝子発現量を明確にするために、各マウス個体の遺伝子発現量をデンドログラムで表記した (Figure 3-2)。Day3、Day6、Day28 の各群は明瞭に区別された。しかし、各群内での KO マウスと Control マウスを比較すると、Day28 のマウスでは明瞭に区別されたが、Day3 および Day6 のマウスでは KO マウスと Control マウスが同一のグループに分類される場合とされない場合とがあり、マウス間での分類が不明瞭であった。

さらに遺伝子発現量を MA-plot で表すと、Day3 では、発現変動が少なく、Day6 では発現変動が上昇する傾向が強く、Day28 では多く発現量が増加するとともに発現変動も増加する傾向があった (Figure 3-3)。

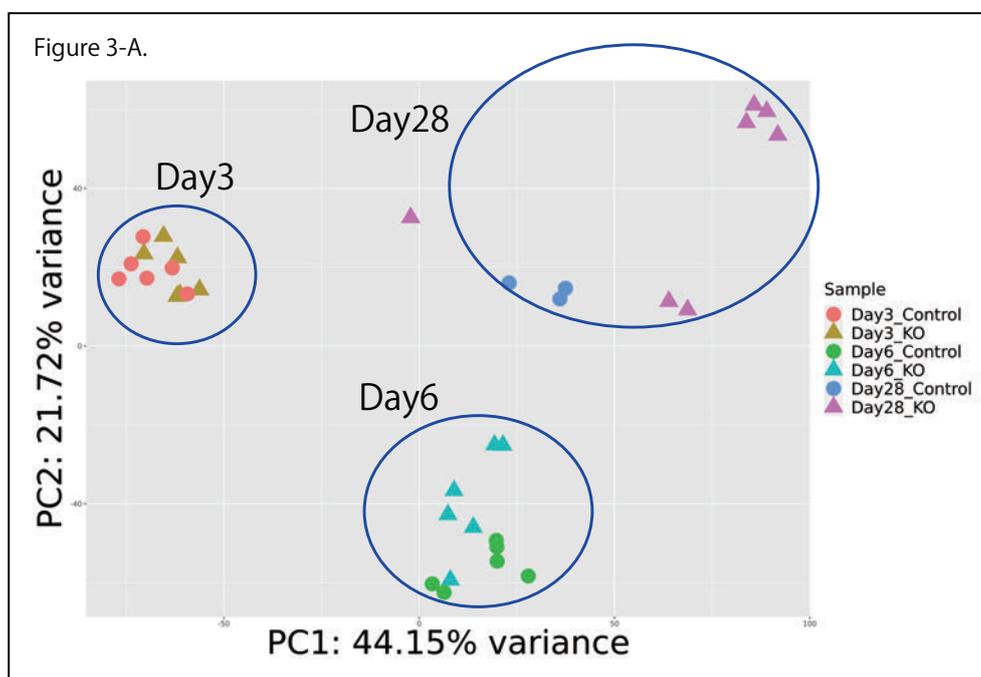


Figure 3. 遺伝子発現量に基づく解析

Figure 3-1. 各マウスの遺伝子発現量に注目した主成分分析

各マウスでの発現遺伝子量に基づいて主成分分析を行い、二次元グラフ上に図示した。PC1 の寄与率は 44.15%、PC2 の寄与率は 21.72% であり、PC1, PC2 の累積寄与率は

65.87% である。各マウスは日齢ごとに明確にグループ分けされている。

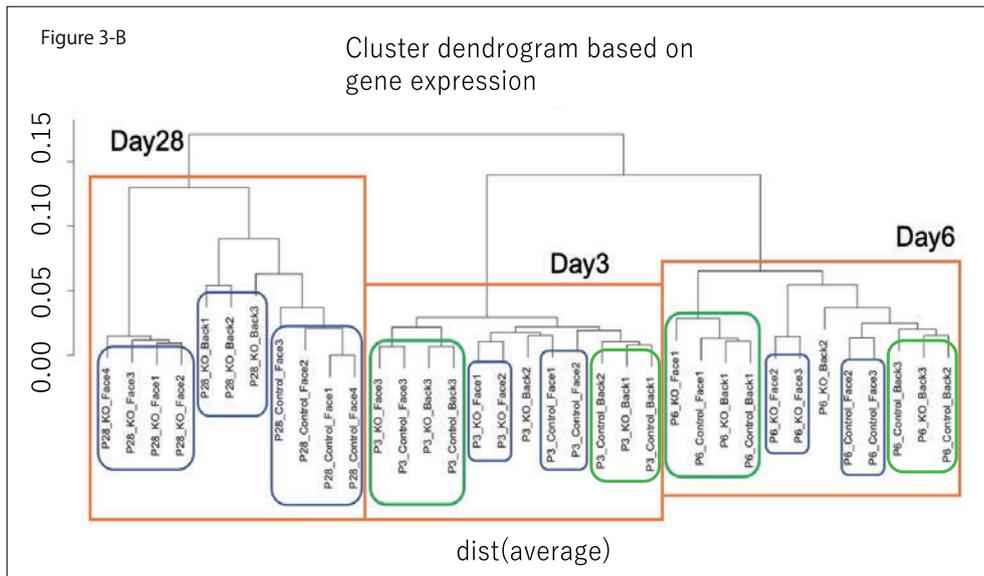


Figure3-2. デンドログラムを用いた階層的クラスタリング

各マウスの遺伝子発現の特徴を距離として計算し、デンドログラムで示した。Day3, Day6, Day28の各マウスは、日齢ごとのクラスターに明確に分類されている。日齢ごとの群内では、Day28ではKO群とControl群が別のグループに分類されている（青枠部）が、Day3, Day6ではKOマウスとControlマウスが同一のグループに分類される場合と、別のグループに分類される場合とがあり、分類が不明瞭である（緑枠部）。

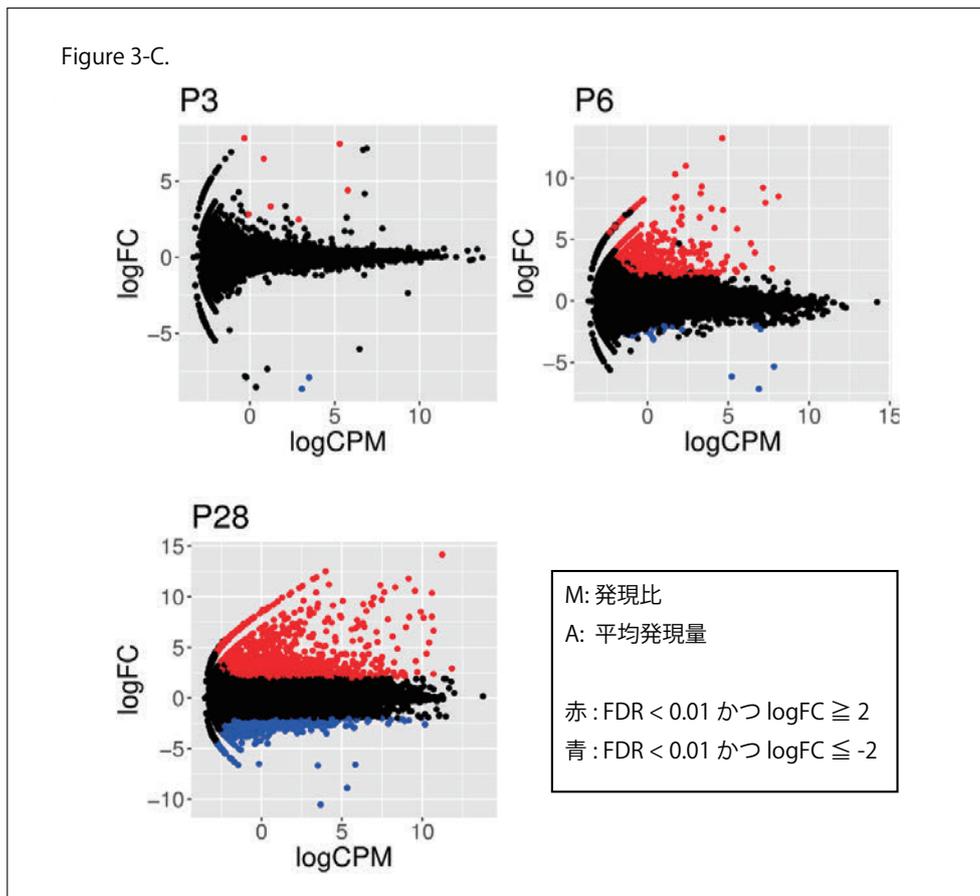


Figure3-3 Day3、Day6、Day28 マウスの MA-Plot

Day3, Day6, Day28 で発現変動している転写開始点を MA-Plot を用いて表す。縦軸 (M) は転写開始点ごとの発現変動比 (Minus in the log scale) を示し、横軸 (A) は転写開始点ごとの発現量の平均 (Average in the log scale) を示す。Day3 では変動している転写開始点が少ないが、日齢が進むごとに変動する転写開始点が増えている。

4.3 発現変動遺伝子の傾向

Control 群に対する KO 群の遺伝子発現の比率、すなわち発現変動についてヒートマップを作成し、さらに Metascape を用いたエンリッチメント解析を行った結果を示す。Day3, Day6 および Day28 で発現変動している遺伝子が明確に区別でき、Day28 の前後で遺伝子の発現パターンが変化していることがわかった (Figure 4)。

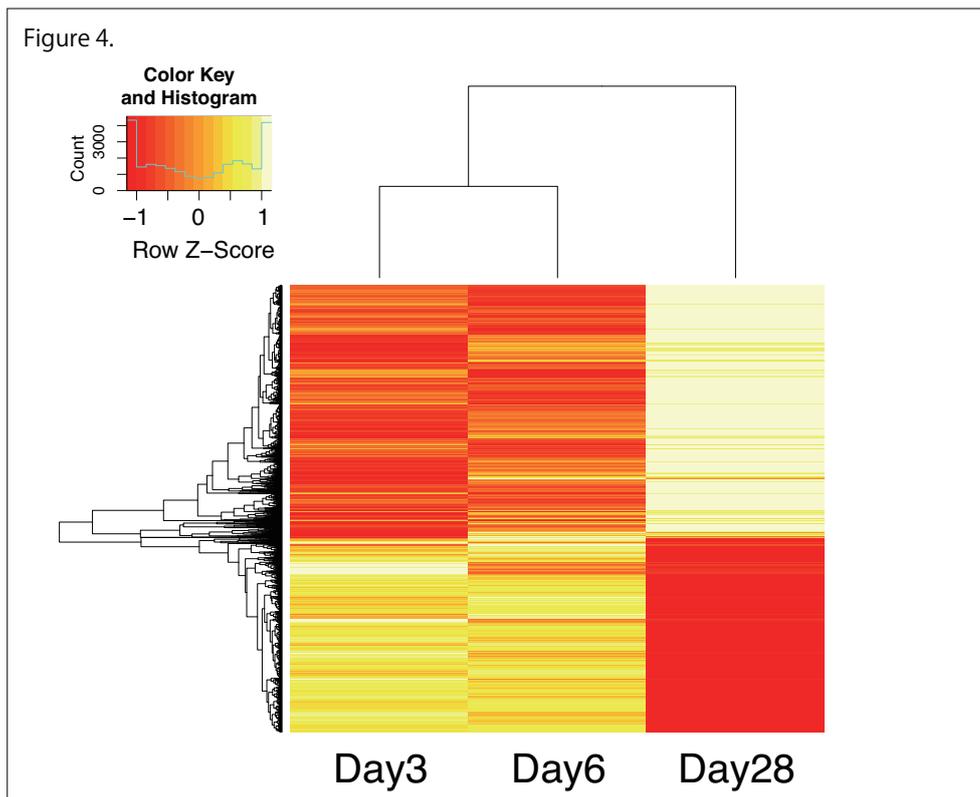


Figure 4. 発現遺伝子のヒートマップ

Day3, Day6, Day28 の発現変動遺伝子をクラスタリングして図示した。発現遺伝子は $FDR < 0.001$ 以下の遺伝子を抽出した。Day28 と Day3, Day6 の間で発現している遺伝子に明確な違いが見られる。

4.4 エンリッチメント解析

Day3, Day6 と Day28 とでどのような遺伝子群が変化しているのかを解析するため、特に発現変動の目立つ遺伝子を抽出し Metascape [30] を用いてエンリッチメント解析をおこなった。エンリッチメント解析した遺伝子を機能的アノテーションに基づいてヒートマップにより分類した (Figure 5)。Figure 5-A は Figure 5-B で示したエンリッチされた遺伝子を、より上位の Biological process (top-level Gene Ontology) によって分類したものである。

まず、Day6 で最も多彩な遺伝子が発現しており、特に炎症細胞浸潤に関わる遺伝子 (Figure 5-B. 上段赤枠) は Day6 で主にエンリッチされていた (Figure 5-B. 上段矢印)。一方、炎症のパスウェイに関わる遺伝子群は Day3 からすでにエンリッチされてきており (Figure 5-B 中段矢印、中段赤枠)、遺伝子発現のレベルでは、生後 3 日目から炎症が起こっていることがわかった。また、Day28 には角化に関連する遺伝子群がエンリッチされており (Figure 5-B. 下段矢印、下段赤枠)、角化を示す組織像と合致していた。

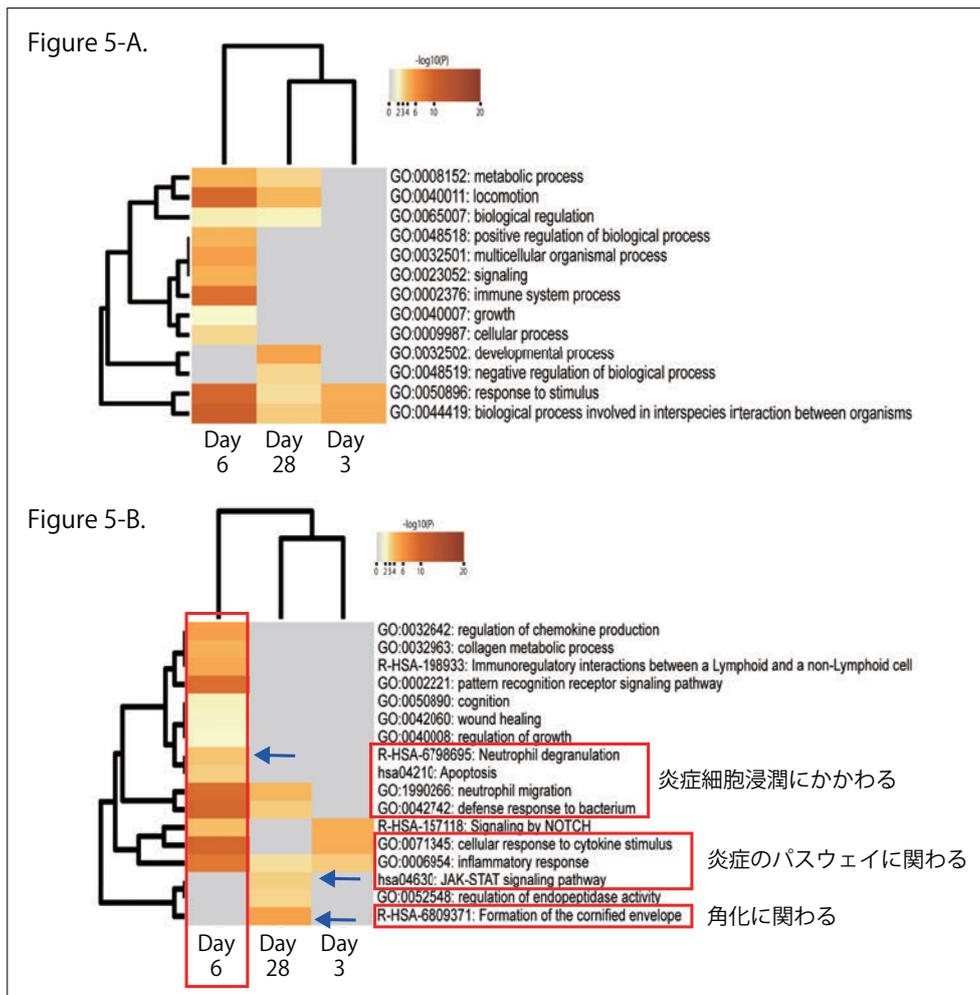


Figure 5. 発現変動遺伝子のエンリッチメント解析

Day3, Day6, Day28 の発現変動遺伝子を Metascape を用いてエンリッチメント解析した。A は B のより上位の分類 (top-level Gene Ontology) を示す。Day6 では Cellular response to cytokine stimulus や Neutrophil migration など、炎症細胞浸潤に関わる遺伝子がエンリッチされている (中段赤枠および青矢印)。また、Day28 では、角化に関わる Formation of the cornified envelope に分類される遺伝子がエンリッチされている (下段赤枠および青矢印)。

4.5 発現変動遺伝子ごとの解析

これに基づき、日齢による遺伝子発現変動の関係をみた (Figure 6-1. A,B)。Day3 と Day6 での発現変動に注目すると、IL24 や Chi3l4, Fgf23 などの炎症に関与する遺伝子が、Day3、Day6 の双方で上昇していた。しかし、Ubiquitin conjugating enzyme D2 (Ube2d2, Ubch5) の第5転写開始点での発現が、Day3で大きく低下し、Day6で変動していないという特徴があった。(LogFC= -8.966, FDR = 2.790 e-38) また、Day6 と Day28 の遺伝子発現変動を見ると、主には Day6、Day28 の双方で上昇している遺伝子が目立ったが、FGFR1 oncogene partner (Fgfr1op) は Day6 で上昇し、Day28

で低下するという特徴を示していた。

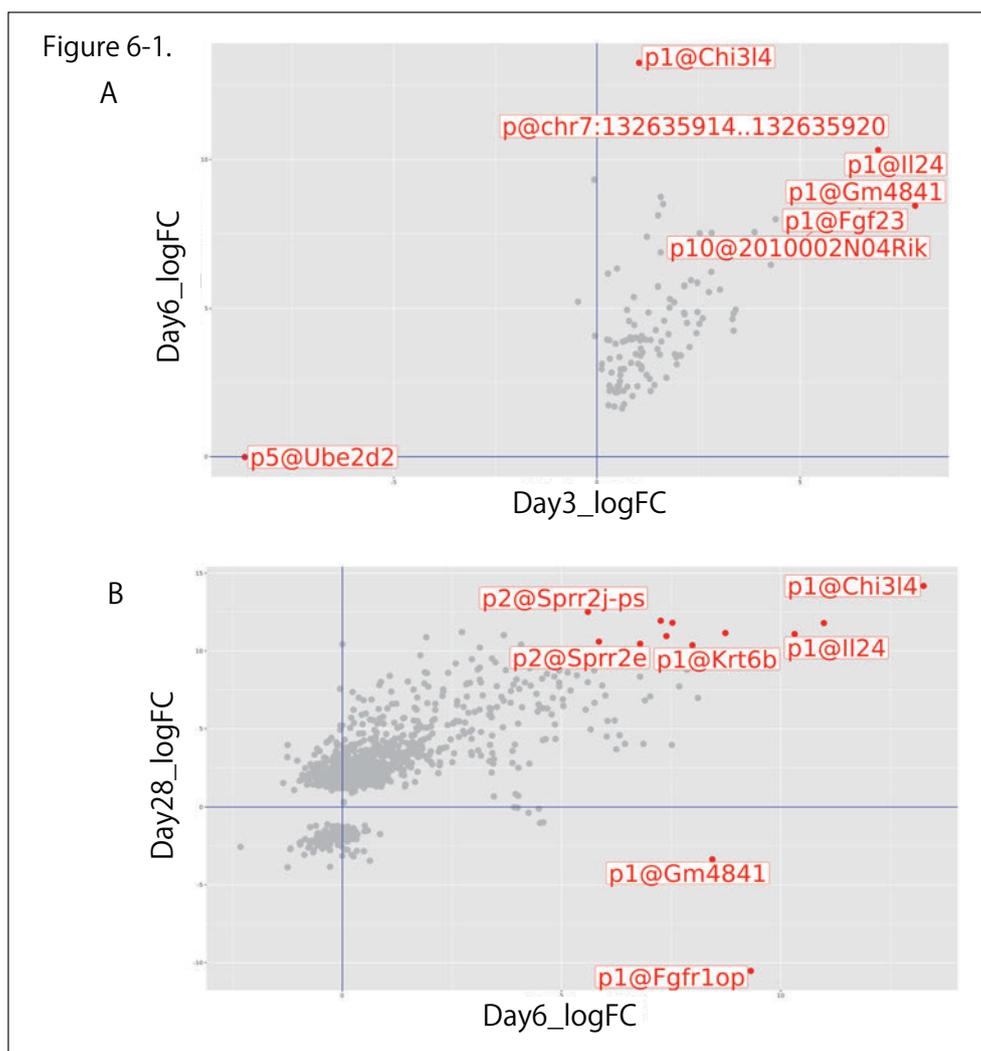


Figure 6. 発現変動遺伝子ごとの動態

Figure 6-1. 日齢ごとの発現変動遺伝子の関係

多くの遺伝子が Day3、Day6 の双方で上昇する一方で、Ube2d2 の第 5 転写開始点での遺伝子発現が大きく低下している。また、Day6 と Day28 の関係ではよりばらつきが大きくなるものの、Fgfr1op が Day 6 で上昇し、Day 28 で低下していた。

この発現変動遺伝子のうち、特に変動幅が大きく、Day3 で特異的に減少している Ube2d2 の発現変動について、Day3、Day6、Day28 の KO 群と Control 群での転写開始点での発現量を比較した (Figure 6-2)。

第 4、第 5 転写開始点での発現が、Day3 の Control 群でのみ著明に上昇し、KO 群ではほとんど発現がみられなかった。Day6、Day28 では、Control 群、KO 群にかかわらず、いずれも第 4、第 5 転写開始点での発現は低下していた。しかし、第 8 転写開始点での発現は、Day28 の Control 群では上昇していなかったが、KO 群では上昇していた (Figure 6-2,3)。このように、Ube2d2 の発現開始点での遺伝子発現は、マウスの日齢の違い、処置の違いにより変化した。

Figure 6-2.

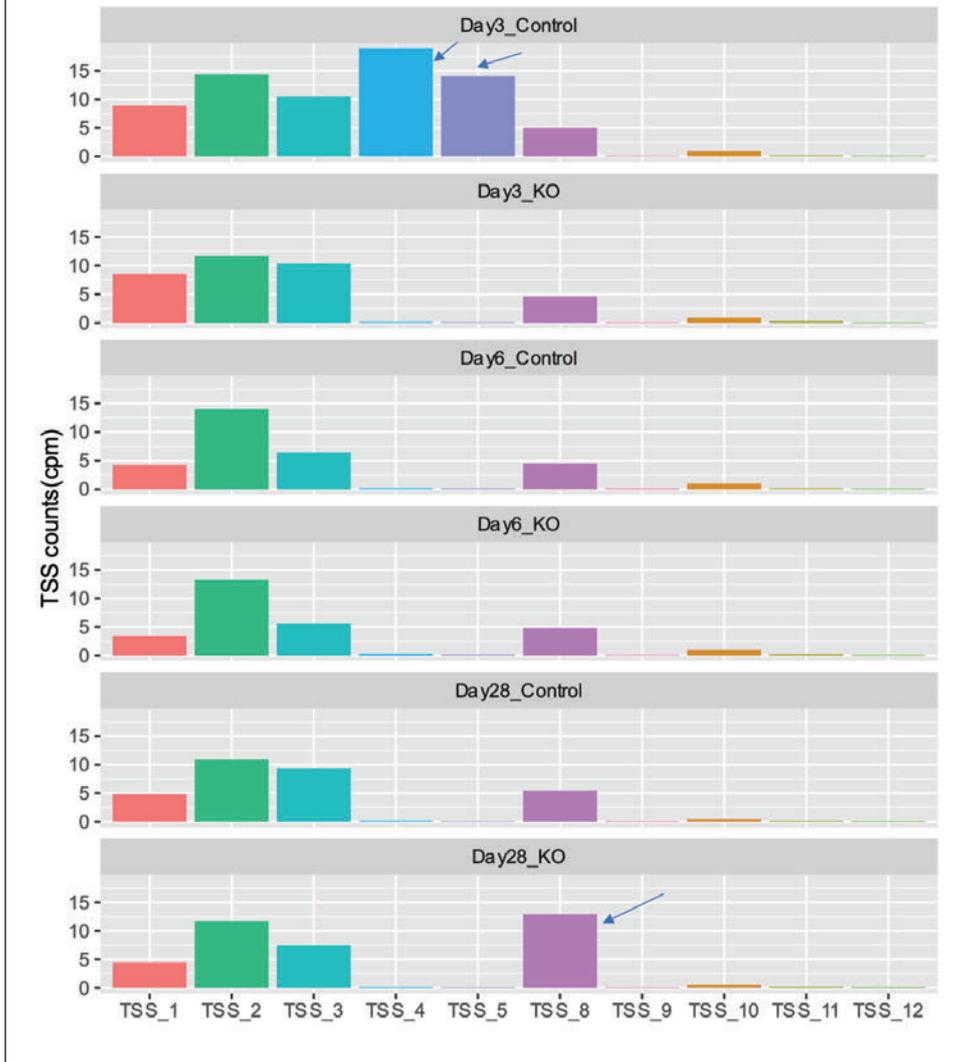


Figure 6-2. Ube2d2 の転写開始点ごとの発現変化

Ube2d2 の転写開始点ごとの遺伝子発現量 (CPM) を示す。第 4、第 5 転写開始点での発現が、Day3 の Control 群では上昇しているが、KO 群では抑制されている (第 4 転写開始点: $\logFC = -7.909$, $FDR = 2.755 \times 10^{-4}$, 第 5 転写開始点: $\logFC = -8.966$, $FDR = 2.790 \times 10^{-38}$)。第 4、5 転写開始点の発現上昇は Day3 のみで見られる現象であり、他の日齢では認めなかった。一方、第 8 転写開始点での発現は Day28 の KO 群でのみ上昇を認めていた ($\logFC = 1.257$, $FDR = 2.070 \times 10^{-16}$)。

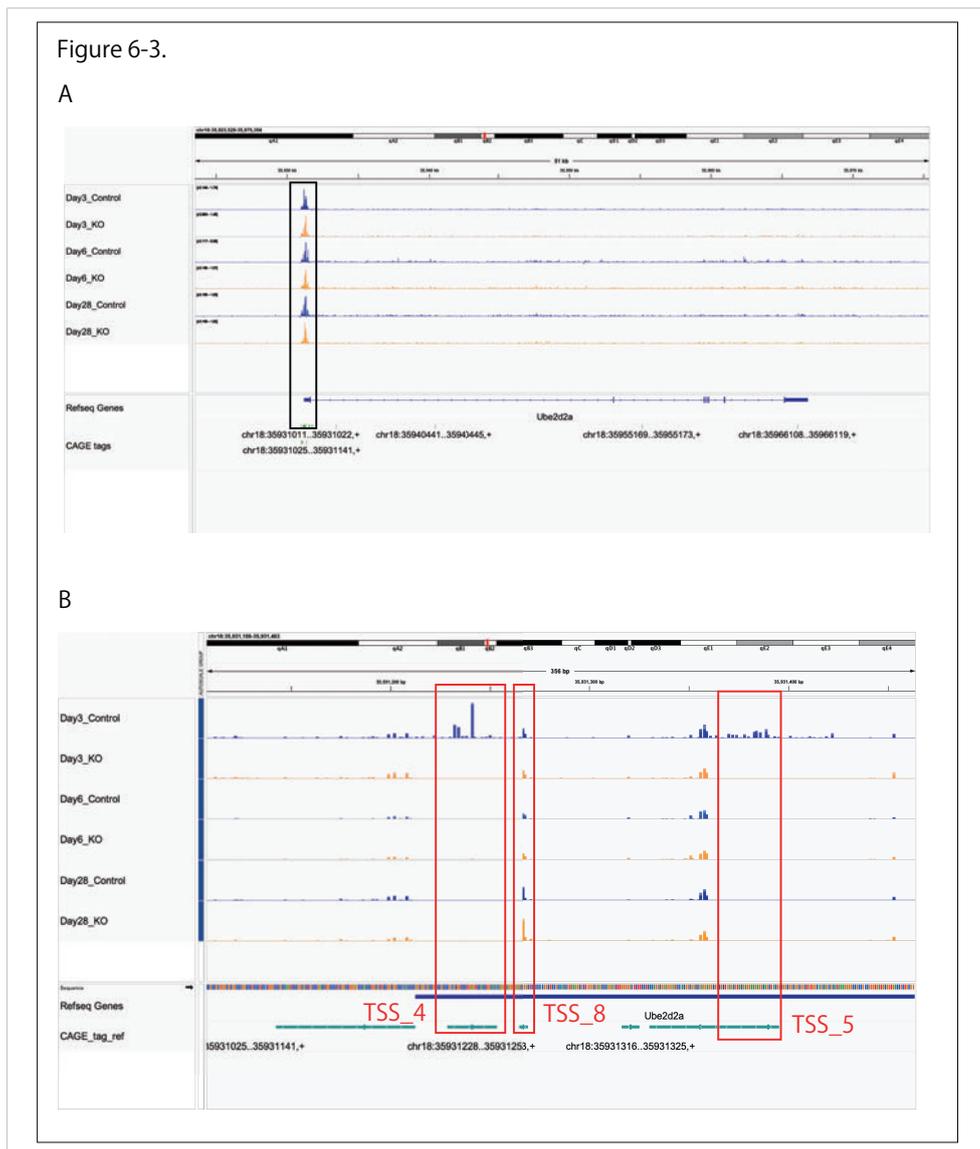


Figure 6-3. Ube2d2 の Gene structure と転写産物

Ube2d2 の転写開始点ごとの発現を Reference genome 上にマッピングした。B は A の黒枠内の拡大を示す。CAGE tag の情報は FANTOM5 データベース [10] による。第 4 転写開始点 (TSS_4) は chr18:35931228..35931253,+、第 5 転写開始点 (TSS_5) は chr18:35931365..35931395,+、第 8 転写開始点 (TSS_8) は chr18:35931264..35931269,+ に位置する。

4.6 トファシチニブ塗布による変化

Day3, Day6, Day28 およびトファシチニブ塗布群 (Treat) の遺伝子発現変動の結果を示す (Figure 7)。

変動している遺伝子を Metascape を用いてエンリッチメント解析すると、Day3, Day6, Day28 で発現している炎症に関わる遺伝子群がほとんどエンリッチされていない (Figure 7-A. 青枠部)。一

方、ユビキチン・プロテオソーム系に関わる遺伝子がエンリッチされていた (Figure 7-A. 上段赤枠部)。Ube2d2 の転写開始点レベルでの発現をトファシチニブ塗布群で比較すると (Figure 7-C)、第 8 転写開始点での発現は KO 群では上昇するのに、トファシチニブ塗布群では変化せず、第 5 転写開始点での発現の上昇が顕著であった ($\log FC = 8.307$, $FDR = 7.902 \times 10^{-3}$)。

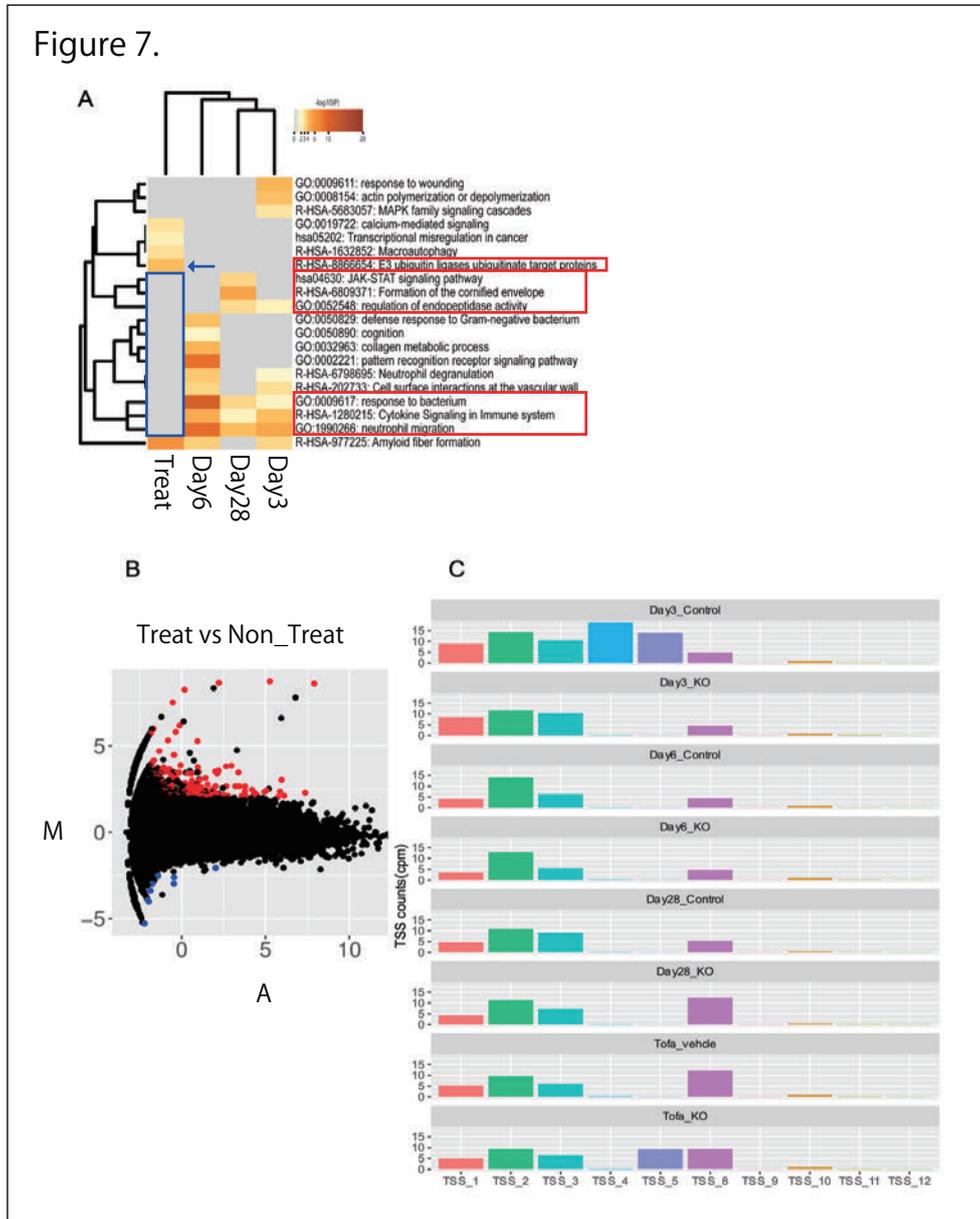


Figure 7. トファシチニブ塗布による変化

Figure 7-A. トファシチニブ塗布群を含めたエンリッチメント解析トファシチニブ塗布群と Day3、Day6、Day28 群の遺伝子についてのエンリッチメント解析。トファシチニブ塗布群では炎症のパスウェイ (中段赤枠) や炎症細胞浸潤 (下段赤枠) に関する遺伝子群はほとんどエンリッチされておらず (青枠)、ユビキチン・プロテオソーム系がエンリッチされている (青矢印、上段赤枠)

Figure 7-B. トファシチニブ塗布群の MA-plot

トファシチニブ塗布群の Ikk2 knock-out マウスの遺伝子発現量と基材塗布群 (vehicle control) の Ikk2 knock-out マウスの遺伝子発現量を比較し、MA plot を作成した。logFC >2 の転写開始点を赤、logFC < -2 の転写開始点を青で示す。-2 < logFC < 2 の変動の少ない転写開始点ではばらつきが大きいですが、発現量が多く、変動幅も大きい遺伝子群も観察された。

Figure 7-C. トファシチニブ塗布群の Ube2d2 転写開始点での発現変化

トファシチニブ塗布群を含めた、Ube2d2 の転写開始点ごとの発現を示す。生後 28 日目の KO マウスや基剤塗布群では第 5 転写開始点での発現上昇がほとんど認められなかったが、トファシチニブ塗布群では第 5 転写開始点が発現上昇している。

第5章 考察

5.1 Ikk2 knock-out のターゲットとなっている細胞

本マウスは、Rat nestin promoter/enhancer 制御下に Cre を発現させた Nestin^{Cre} マウスの雄と、Ikk2 を loxP 配列で挟んだ Ikk2^{FL/FL} マウスの雌を掛け合わせることで作成している [8,31]。Nestin は神経外胚葉の前駆細胞に特有の中間径フィラメントであり、神経幹細胞、神経前駆細胞 (Neural stem cell, neural progenitor cell) に発現するが、成熟した Neuron や Astrocyte では発現しない。マウスの発生においては、顔面の大部分 (真皮と皮下組織) は頭部神経ヒダの縁から鰓弓へと遊走してきた神経堤細胞に由来する [32] ことが報告されている。神経堤細胞には nestin 陽性細胞が存在し、胚内の特定の場所に遊走し、さまざまな構造物に分化する特殊な細胞集団である。このことから、KO マウスの顔面皮膚病変が、顔組織を構成する第一鰓弓由来の Nestin を発現する未分化間葉系細胞が関与していると考えられる。今回実験に使用した KO マウスの Nestin-Cre は、胎生期における中枢神経細胞で発現が確認されている [31]。

布村ら [8] は、Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} にさらに LacZ を発現させたマウス Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL}; Rosa26^{LacZ} を作成し、Ikk2 が knock-out されている細胞の分布を確認した。X-Gal 染色では LacZ は真皮間葉系細胞で染色され、顔の皮膚では強発現するが、胸部の皮膚では弱発現を示していた。表皮 keratinocyte、肥満細胞、好中球では染色されなかった。また、Ikk2 の免疫染色では顔の Dermal fibroblast、つまり顔の真皮に存在する線維芽細胞 (真皮間葉系細胞に属する) において Ikk2 が knock-out されており、好中球、好酸球、肥満細胞などの血球系細胞、keratinocyte では knock-out されていなかった。以上の結果から、本マウスでは生後は、顔の Dermal fibroblast で Nestin が強く発現して Ikk2 が Conditional knock-out された、つまり Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウスでターゲットとなっている細胞は、顔の Dermal fibroblast であることが示唆された。本研究においても、Day3 の KO マウスで Vimentin 陽性の紡錘状の細胞が真皮に集簇して存在しているのが観察されており、この紡錘形細胞と上述の Dermal fibroblast との関係について、今後より詳細な検討が求められる。

5.2 組織学的考察

Day 7 の組織では、Vimentin に強陽性で、抗好中球抗体陰性の細胞が表皮内および真皮内に多数浸潤している像が観察された。細胞浸潤が著しいものの、抗好中球抗体が陰性であることから、本浸潤は細胞などの感染ではないと判断された。表皮内に浸潤する細胞は CD11b (+)、CD86 (-)、Iba-1 (-)、Liver arginase (±) であり、真皮内の浸潤細胞は CD11b (+)、CD86 (-)、Iba-1 (-)、Liver

arginase (+)であった。免疫染色により、浸潤細胞は M1 型マクロファージのマーカーである CD86 が陰性で、M2 型マクロファージのマーカーである Liver arginase が弱陽性あるいは陽性であることから、これらの細胞は M2 型マクロファージ系の細胞であることが示唆された。M2 型の浸潤細胞があることはアトピー性皮膚炎の特徴であるが、マクロファージの表現型は多彩である [33,34] ため、さらなる検討が必要である。

Day35 のマウスでは、表皮への細胞浸潤はほとんど見られず、真皮乳頭の延長や表皮の肥厚などが観察されたことから、痂皮を伴うなど掻痒に伴う修飾はあるものの、慢性皮膚炎の組織像と判断された。

Day3 マウスの幼若な組織所見では、Day7、Day35 とは異なって、表皮の構造は保たれ、表皮内への細胞浸潤を認めなかった。しかし、表皮直下の真皮層では Vimentin 陽性の紡錘形細胞が散在性に集簇して存在するなど、急性炎症とは断定できない、非典型的な組織像を示しており、Ikk2 knock-out の影響が現れている可能性が考えられた。

5.3 遺伝子発現からの考察

遺伝子発現の面からみると、Day6 の多様な遺伝子がエンリッチメントされている状況とは異なるものの、炎症のパスウェイに関わる遺伝子はすでに Day3 からエンリッチされており、Day3 における遺伝子発現のレベル変化が炎症を誘導していることが示唆された。発現変動遺伝子に注目すると、Day3 でのみ、Ube2d2 の第 4、第 5 転写開始点での発現が Control 群で上昇し、KO 群で低下していた。その後、この転写開始点の発現遺伝子は Control 群、KO 群共に変化しない。

Ube2d2 は Ubiquitin conjugating enzyme D 2 をコードする遺伝子であり、Ubiquitin conjugating enzyme (E2) は、Ubiquitin Ligase (E3) がタンパク質にユビキチンを付加するのを助ける働きを持つ。NF- κ B の活性化には inhibitor of NF- κ B(I κ B α) や p100 の分解が関わっているが、この分解にユビキチン化が深く関与している [35,36]。Figure 8 に NF- κ B パスウェイの概略を示す [4]。

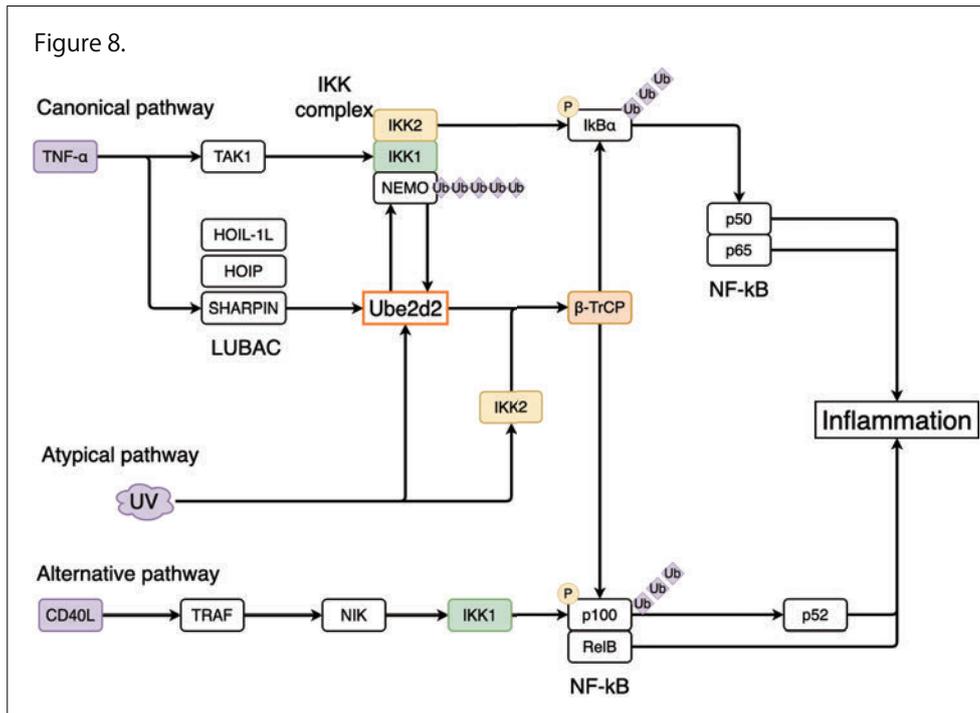


Figure 8. NF- κ B パスウェイ概略図

NF- κ B の主要な活性化経路の概略を図示した。図は KEGG pathway database [37] より作成した。

NF- κ B は免疫応答や細胞の生存など多彩な生命現象に関与しており、リウマチ・アレルギー疾患、がんなどでその活性が亢進していることから、この因子を抑制すれば、炎症を抑制する事ができると考えられていた。NF- κ B は大きく分けて、Canonical pathway, Alternative pathway, Atypical pathway という 3つの活性化経路を持っており、その活性経路は複雑である。

Canonical pathway は、Toll-like receptor (TLR) スーパーファミリーへの LPS などのリガンドの結合や、TNF 受容体へのリガンド (TNF- α) の結合などにより始まる。これによって受容体の細胞内ドメインに Tumor necrosis factor receptor associated domain (TRAF) などのアダプタータンパク質が細胞膜上に誘導され、さらにこのアダプタータンパクが IKK 複合体を誘導する。Canonical pathway では、IKK 複合体は IKK α (IKK1)、IKK β (IKK2) のホモダイマーもしくはヘテロダイマーと、NF- κ B essential modulator (NEMO) と呼ばれるスカフォールドタンパクから構成される。NF- κ B に結合している I κ B は IKK 複合体によってリン酸化され、プロテアソーム系によって分解される [6]。I κ B が分解されて活性化した NF- κ B ダイマーは核内への移行が可能となり、核内移行した NF- κ B は様々なターゲット遺伝子の発現を誘導する。

一方、Alternative pathway はリンフォトキシン β (Lymphotoxin β) や B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) によって刺激され、リンパ器官の発生において機能するとされているが、それだけでなく細胞表面受容体にリガンドが結合すると、NF- κ B inducing kinase (NIK) が活性化され、IKK 複合体をリン酸化する。

Atypical pathway は 2010 年に土屋らによって報告された第 3 の NF- κ B 活性化経路であり、UV による NF- κ B 活性化の機序とされ、I κ B がリン酸化を介さずに誘導性に分解されるという機構を持つ [38]。このパスウェイにおいて、IKK2 はキナーゼとして働くのではなく、後述する β -Transducin repeat Containing Protein (β -TrCP) と I κ B との会合を介在するアダプタータンパク質として働く。

Ube2d2 によるユビキチン化は、複数の経路で NF- κ B の活性化に関与することが報告されている [35,39]。

Canonical pathway では、Ube2d2 は β -TrCP を誘導して、I κ B に K48 型ポリユビキチン鎖を付加する。K48 型ポリユビキチン鎖が付加された I κ B α はプロテオソーム系によって分解され、NF- κ B の p50/p65 サブユニットが核内に移行し、転写因子として働けるようにする。

Alternative pathway では、Ube2d2 に誘導された β -TrCP は p100 に K48 型ポリユビキチン鎖を付加し、p100 の限定分解を促し、p52 サブユニットを作る。p52 サブユニットは RelB と二量体を作り、核内に移行して転写因子として働く。

Atypical pathway では、Ube2d2 に誘導された β -TrCP は I κ B のリン酸化を介さずに IKK2 と複合体を形成する。この複合体が I κ B α と会合し、I κ B α のユビキチン化、プロテオソーム分解を誘導する。

以上のように、Ube2d2 は NF- κ B の 3 つの主要なパスウェイのすべてに関与し、プロテオソーム系を介したタンパク質の分解に関与する。さらに、Ube2d2 は TRAF2, TRAF5, cellular inhibitor of apoptosis protein 1(c-IAP1), c-IAP2, Linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) などのユビキチンリガーゼと協同して、K63 型ポリユビキチン鎖、直鎖型ポリユビキチン鎖、K11 型ポリユビキチン鎖などを作って TGF- β activated kinase 1 (TAK1)、IKK の活性化に関わり [35]、プロテオソーム系を介さない NF- κ B の活性化にも関わる。

LUBAC は直鎖型ユビキチン鎖を選択的に形成するユビキチンキナーゼであり、Heme-oxidized IRP2 ligase 1L (HOIL-1L, RBCK1)、HOIL-1 interacting protein (HOIP, RNF31)、SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein (SHANK) -associated RH domain-interacting protein (SHARPIN) の 3 つのサブユニットからなる。LUBAC は CD40, TNF- α などの刺激に反応して、NEMO に直鎖型ポリユビキチン鎖を付加することで NF- κ B を活性化させる [39-41]。

つまり、Ube2d2 は K48 型ポリユビキチン化によって、プロテオソーム系を介した NF- κ B 活性化に関与するだけでなく、直鎖型ポリユビキチン化や K63 型ポリユビキチン化、K11 型ポリユビキチン化などの、プロテオソーム系を介さない経路での NF- κ B 活性化にも関与していることが明らかになってきた。

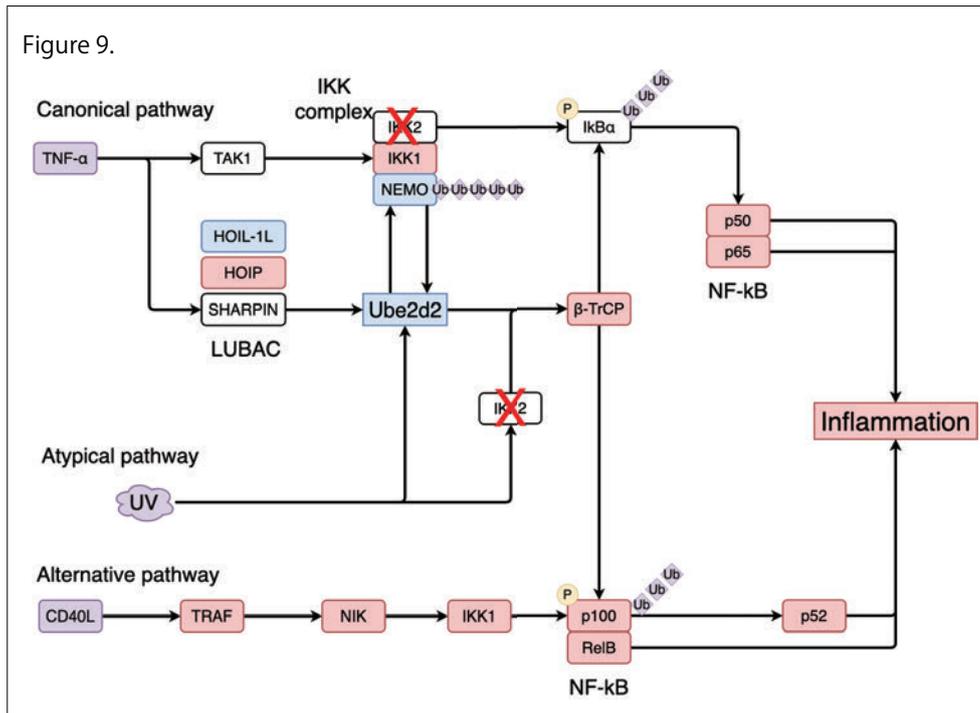


Figure 9. KO マウスにおける NF- κ B パスウェイ関連分子の発現変動

KO マウスの NF- κ B パスウェイでの発現変動を図示した。赤は発現上昇している遺伝子、青は発現低下している遺伝子を示す。白は有意変動を示さない遺伝子を表す。

本研究において KO マウスでの遺伝子発現を、NF- κ B パスウェイ上で検討すると (Figure 9)、まず、Ube2d2 の遺伝子の発現は、Day3 の Control 群では上昇しているが、KO 群では低下していた。また、Ikk2 を knock-out しているので Canonical pathway に関わる TAK1 や I κ B α の遺伝子発現は低下しているが、逆に Alternative pathway と Atypical pathway での遺伝子発現が上昇していた。

Day28 での NF- κ B 関連分子の発現と併せて検討すると [8]、皮膚病変部位では、Ikk2 の著明な発現低下は維持されているものの、Ikk1、p100 は高発現しており、Alternative pathway に関わる遺伝子はすべて発現上昇していた。さらに生後 28 日では、皮膚組織全体で、p65 と p50 の遺伝子発現が上昇し、炎症が増強していた。Ikk2 の knock-out により Canonical pathway は働かないものの、代償的に Alternative pathway、Atypical pathway が活性化されていることがわかった。

Ube2d2 は Day3 の Control 群で上昇し、KO 群で低下していたことから、本来であれば Ube2d2 を介した NF- κ B パスウェイの活性化が起こらなければいけない時期 (日齢) に Ube2d2 が低下しており、そのことが NF- κ B パスウェイに起因する炎症を惹起している可能性が示唆された。NF- κ B の canonical pathway はその活性が増加すると I κ B の発現が誘導され、NF- κ B 活性化抑制 (オートレギュレーション) が誘導され、生理学的に自律性が確立される。Ikk2 の knock-out によってその自律性が破綻され、NF- κ B の Canonical pathway の遮断により、補完的に Alternative pathway が強く活性化され、炎症が誘導された可能性が推定された。IKK1 を介するリン酸化やユビキチン化に対する解析をすすめ、この分子機序を明らかにすることは、重要な課題である。

5.4 トファシチニブ塗布による影響

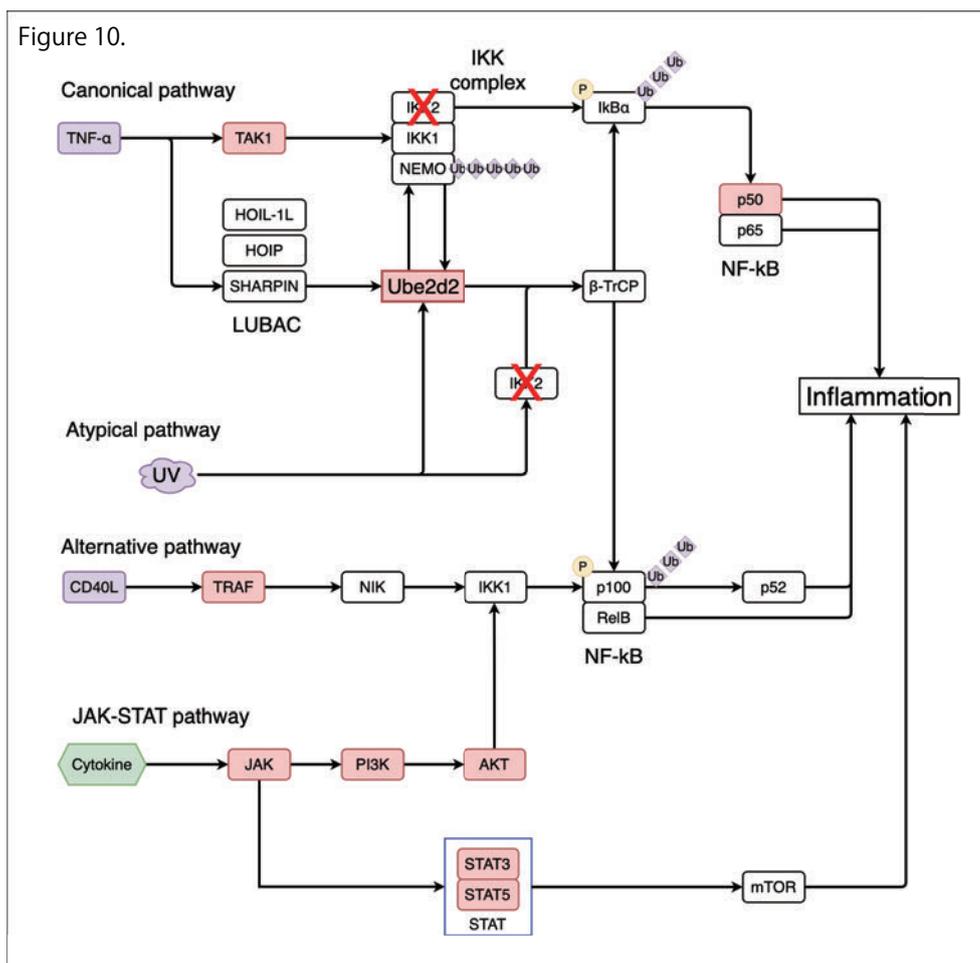


Figure 10. トファシチニブ塗布による NF- κ B パスウェイ関連分子の発現変動

トファシチニブ塗布後の NF- κ B パスウェイ、JAK-STAT パスウェイを示す。JAK、PI3K、AKT、STAT の発現が上昇している。一方、NF- κ B パスウェイは、Canonical pathway, Alternative pathway, Atypical pathway の 3 系統とも発現低下していた。

トファシチニブ塗布による発現変動への影響を Figure 10 に示した。

トファシチニブを塗布したマウスでは、Ube2d2 の発現は上昇しており、Canonical pathway, Alternative pathway, Atypical pathway のすべての系統が抑えられていた。これと KO 群での遺伝子発現とを合わせて考えると、Ikk2 の knock-out が Ube2d2 の遺伝子発現に何らかの影響を与えており、Ube2d2 の発現変動と関連して、Atypical pathway や Alternative pathway の発現上昇がもたらされている可能性が示唆された。

JAK-STAT 系は JAK-STAT-AKT pathway を介して IKK2 を活性化し、NF- κ B による炎症を惹起する。本マウスでは、JAK-STAT 系のシグナルも活性化され、皮膚免疫染色で皮下炎症組織や集簇している炎症細胞に STAT6 のリン酸化が生じていることが報告されている [8]。トファシチニブ塗布群の実験では、NF- κ B の上流の JAK を阻害することによって NF- κ B パスウェイが抑えられて

いと推察できるが、皮膚炎に対する治療効果は限定的で約 50% 程度の炎症抑制効果であった。

JAK-STAT 阻害薬は、JAK の ATP 結合部位に阻害薬が会合し、シグナル伝達を抑制するという効果を持つ。トファシチニブ塗布後に JAK-STAT 系に関連する遺伝子 (JAK1/2、STAT1/3/4/5/6) の発現が上昇しているが、その下流にある JAK-STAT-AKT パスウェイの発現が抑えられ、NK- κ B パスウェイの遺伝子発現が抑えられていることから、JAK-STAT 系遺伝子の発現上昇は JAK 阻害によるフィードバックの可能性が考えられた。

NF- κ B パスウェイでは Canonical pathway, Alternative pathway, Atypical pathway の 3 系統で部分的な遺伝子発現が抑えられていることは認められたため、詳細な NF- κ B シグナル系と JAK-STAT 系のクロストークに関わる遺伝子群を明らかにすることで JAK 阻害薬の作用分子が明らかになると考えられる。

第6章 結語

今回の解析結果から、Control マウス（正常マウス）で Ube2d2 の第 4、5 転写開始点が時期特異的に上昇していることが明らかになった。また、KO マウスではその上昇が抑えられていたことから、時期特異的な Ube2d2 の抑制が、その後の皮膚炎症状の生成に関与している可能性が示唆された。

トファシチニブ塗布により炎症の軽減がみられ、トファシチニブ塗布群では Ube2d2 の転写開始点での発現が上昇していたが、この第 5 転写開始点での発現上昇が、炎症の抑制や治癒に作用している可能性が考えられた。FANTOM5 プロジェクトの大規模データから、Ube2d2 の第 4、5、8 転写開始点での発現は Macrophage や T cell, B cell, megakaryocyte などで多いことがわかっており、本研究での転写開始点での発現変化は、Macrophage や T cell といった免疫細胞の動きを反映している可能性がある。

CAGE 法では、RNA の Isoform や Splicing variant そのものを検出することはできないが、Ube2e2 の第 4、5 転写開始点での発現の違いが、RNA isoform や Splicing variant を反映している可能性もあり、Isoform の存在の有無と炎症の関連性などについても今後さらに研究する必要がある。

生後 3 日目、6 日目、28 日目の KO マウスを CAGE 法で解析することにより、Ube2d2 遺伝子の第 4、5 転写開始点の発現がある日齢で特異的に上昇し、Ikk2 の KO によって、その上昇が抑制されることがわかった。また、若年期に Ube2d2 の発現が抑制されることで皮膚炎症状が惹起されることが示された。JAK1/JAK2/JAK3 阻害薬のトファシチニブは、この Ube2d2 の第 5 転写開始点での発現低下を改善させ、炎症を抑えうることがわかった。

これらの知見は CAGE 法を用いた網羅的な転写開始点の解析によって初めて明らかになったものであり、CAGE 法を用いた解析が、種々の疾患の病態解明に大きく寄与する可能性が示された。

第7章 謝辞

本研究を実施するに際し、Nestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL} マウス (FADS マウス) の提供および研究指導を頂きました臨床分子病態検査医学講座 北島勲教授、CAGE 法解析に関して指導を賜りました国立研究開発法人理化学研究所, 生命医科学研究センター, チームリーダー 村川泰裕博士 (現 京都大学高等研究院・教授)、動物の管理や実験のサポートをしてくださった臨床分子病態検査学講座技官の江尻直子さん並びに北島緑さん、臨床生体材料応用講座技官の古市恵津子さんに心より感謝いたします。

参考文献

- [1] 公益社団法人日本皮膚科学会 and 一般社団法人日本アレルギー学会. アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2021. 日本皮膚科学会雑誌, 131(13):2691–2777, 2021.
- [2] D. M. R. Davis, A. M. Drucker, A. Alikhan, L. Bercovitch, D. E. Cohen, J. M. Darr, L. F. Eichenfield, L. Frazer-Green, A. S. Paller, J. I. Silverberg, A. M. Singh, and R. Sidbury. American academy of dermatology guidelines: Awareness of comorbidities associated with atopic dermatitis in adults. J Am Acad Dermatol, 86(6):1335–1336 e18, 2022.
- [3] S. Nakajima, T. Nomura, J. Common, and K. Kabashima. Insights into atopic dermatitis gained from genetically defined mouse models. J Allergy Clin Immunol, 143(1):13–25, 2019.
- [4] M. S. Hayden and S. Ghosh. Shared principles in nf-kappa b signaling. Cell, 132(3):344–62, 2008.
- [5] S. Ghosh and M. S. Hayden. New regulators of nf-kappa b in inflammation. Nat Rev Immunol, 8(11):837–48, 2008.
- [6] M. Pasparakis, G. Courtois, M. Hafner, M. Schmidt-Supprian, A. Nenci, A. Toksoy, M. Kramper, M. Goebeler, R. Gillitzer, A. Israel, T. Krieg, K. Rajewsky, and I. Haase. Tnf-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of ikk2. Nature, 417(6891):861–6, 2002.
- [7] Marc Schmidt-Supprian, Wilhelm Bloch, Gilles Courtois, Klaus Addicks, Alain Israël, Klaus Rajewsky, and Manolis Pasparakis. Nemo/ikk γ -deficient mice model incontinentia pigmenti. Molecular Cell, 5(6):981–992, 2000.
- [8] S. Nunomura, N. Ejiri, M. Kitajima, Y. Nanri, K. Arima, Y. Mitamura, T. Yoshihara, K. Fujii, K. Takao, J. Imura, H. J. Fehling, K. Izuhara, and I. Kitajima. Establishment of a mouse model of atopic dermatitis by deleting ikk2 in dermal fibroblasts. J Invest Dermatol, 139(6):1274–1283, 2019.
- [9] S. Nunomura, I. Kitajima, Y. Nanri, M. Kitajima, N. Ejiri, I. S. Lai, N. Okada, and K. Izuhara. The fads mouse: A novel mouse model of atopic keratoconjunctivitis. J Allergy Clin Immunol, 148(6):1596–1602 e1, 2021.

- [10] I. Abugessaisa, H. Shimoji, S. Sahin, A. Kondo, J. Harshbarger, M. Lizio, Y. Hayashizaki, P. Carninci, Fantom consortium, A. Forrest, T. Kasukawa, and H. Kawaji. Fantom5 transcriptome catalog of cellular states based on semantic mediawiki. *Database (Oxford)*, 2016, 2016.
- [11] R. Andersson, C. Gebhard, I. Miguel-Escalada, I. Hoof, J. Bornholdt, M. Boyd, Y. Chen, X. Zhao, C. Schmidl, T. Suzuki, E. Ntini, E. Arner, E. Valen, K. Li, L. Schwarzfischer, D. Glatz, J. Raithel, B. Lilje, N. Rapin, F. O. Bagger, M. Jorgensen, P. R. Andersen, N. Bertin, O. Rackham, A. M. Burroughs, J. K. Baillie, Y. Ishizu, Y. Shimizu, E. Furuhata, S. Maeda, Y. Negishi, C. J. Mungall, T. F. Meehan, T. Lassmann, M. Itoh, H. Kawaji, N. Kondo, J. Kawai, A. Lennartsson, C. O. Daub, P. Heutink, D. A. Hume, T. H. Jensen, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, F. Muller, A. R. R. Forrest, P. Carninci, M. Rehli, and A. Sandelin. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 507(7493):455–461, 2014.
- [12] FANTOM Consortium, the RIKEN PMI, CLST (DGT), A. R. Forrest, H. Kawaji, M. Rehli, J. K. Baillie, M. J. de Hoon, V. Haberle, T. Lassmann, I. V. Kulakovskiy, M. Lizio, M. Itoh, R. Andersson, C. J. Mungall, T. F. Meehan, S. Schmeier, N. Bertin, M. Jorgensen, E. Dimont, E. Arner, C. Schmidl, U. Schaefer, Y. A. Medvedeva, C. Plessy, M. Vitezic, J. Severin, C. Semple, Y. Ishizu, R. S. Young, M. Francescato, I. Alam, D. Albanese, G. M. Altschuler, T. Arakawa, J. A. Archer, P. Arner, M. Babina, S. Rennie, P. J. Balwierz, A. G. Beckhouse, S. Pradhan-Bhatt, J. A. Blake, A. Blumenthal, B. Bodega, A. Bonetti, J. Briggs, F. Brombacher, A. M. Burroughs, A. Califano, C. V. Cannistraci, D. Carbajo, Y. Chen, M. Chierici, Y. Ciani, H. C. Clevers, E. Dalla, C. A. Davis, M. Detmar, A. D. Diehl, T. Dohi, F. Drablos, A. S. Edge, M. Edinger, K. Ekwall, M. Endoh, H. Enomoto, M. Fagiolini, L. Fairbairn, H. Fang, M. C. Farach-Carson, G. J. Faulkner, A. V. Favorov, M. E. Fisher, M. C. Frith, R. Fujita, S. Fukuda, C. Furlanello, M. Furino, J. Furusawa, T. B. Geijtenbeek, A. P. Gibson, T. Gingeras, D. Goldowitz, J. Gough, S. Guhl, R. Guler, S. Gustincich, T. J. Ha, M. Hamaguchi, M. Hara, M. Harbers, J. Harshbarger, A. Hasegawa, Y. Hasegawa, T. Hashimoto, M. Herlyn, K. J. Hitchens, S. J. Ho Sui, O. M. Hofmann, I. Hoof, F. Hori, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 507(7493):462–70, 2014.
- [13] V. Haberle, N. Li, Y. Hadzhiev, C. Plessy, C. Previti, C. Nepal, J. Gehrig, X. Dong, A. Akalin, A. M. Suzuki, IJcken W. F. J. van, O. Armant, M. Ferg, U. Strahle, P. Carninci, F. Muller, and B. Lenhard. Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters. *Nature*, 507(7492):381–385, 2014.

- [14] S. Dahale, J. Ruiz-Orera, J. Silhavy, N. Hubner, S. van Heesch, M. Pravenec, and S. S. Atanur. Cap analysis of gene expression reveals alternative promoter usage in a rat model of hypertension. *Life Sci Alliance*, 5(4), 2022.
- [15] Y. Murakawa, M. Yoshihara, H. Kawaji, M. Nishikawa, H. Zayed, H. Suzuki, Consortium Fantom, and Y. Hayashizaki. Enhanced identification of transcriptional enhancers provides mechanistic insights into diseases. *Trends Genet*, 32(2):76–88, 2016.
- [16] R. Bissonnette, K. A. Papp, Y. Poulin, M. Gooderham, M. Raman, L. Mallbris, C. Wang, V. Purohit, C. Mamolo, J. Papacharalambous, and W. C. Ports. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase iia randomized trial. *Br J Dermatol*, 175(5):902–911, 2016.
- [17] W. Damsky and B. A. King. Jak inhibitors in dermatology: The promise of a new drug class. *J Am Acad Dermatol*, 76(4):736–744, 2017.
- [18] Hazuki Takahashi, Sachiko Kato, Mitsuyoshi Murata, and Piero Carninci. Cage- cap analysis gene expression: a protocol for the detection of promoter and transcriptional networks. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 786:181–200, 2012.
- [19] M. de Hoon and Y. Hayashizaki. Deep cap analysis gene expression (cage): genome-wide identification of promoters, quantification of their expression, and network inference. *Biotechniques*, 44(5):627–8, 630, 632, 2008.
- [20] M. Kanamori-Katayama, M. Itoh, H. Kawaji, T. Lassmann, S. Katayama, M. Kojima, N. Bertin, A. Kaiho, N. Ninomiya, C. O. Daub, P. Carninci, A. R. Forrest, and Y. Hayashizaki. Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer. *Genome Res*, 21(7):1150–9, 2011.
- [21] H. Kawaji, M. Lizio, M. Itoh, M. Kanamori-Katayama, A. Kaiho, H. Nishiyori-Sueki, J. W. Shin, M. Kojima-Ishiyama, M. Kawano, M. Murata, N. Ninomiya-Fukuda, S. Ishikawa-Kato, S. Nagao-Sato, S. Noma, Y. Hayashizaki, A. R. Forrest, P. Carninci, and Fantom Consortium. Comparison of cage and rna-seq transcriptome profiling using clonally amplified and single-molecule next-generation sequencing. *Genome Res*, 24(4):708–17, 2014.
- [22] W. Huber, V. J. Carey, R. Gentleman, S. Anders, M. Carlson, B. S. Carvalho, H. C. Bravo, S. Davis, L. Gatto, T. Girke, R. Gottardo, F. Hahne, K. D. Hansen, R. A. Irizarry, M. Lawrence, M. I. Love, J. MacDonald, V. Obenchain, A. K. Oles, H. Pages, A. Reyes, P. Shannon, G. K. Smyth, D. Tenenbaum, L. Waldron, and M. Morgan. Orchestrating high-throughput genomic analysis with bioconductor. *Nat Methods*, 12(2):115–21, 2015.

- [23] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. `edgeR`: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics, 26(1):139–40, 2010.
- [24] Yoav Benjamini and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 57(1):289–300, 1995.
- [25] Yoav Benjamini. Discovering the false discovery rate. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology), 72(4):405–416, 2010.
- [26] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, 2022.
- [27] RStudio Team. Rstudio: Integrated development environment for r, 2018.
- [28] Hadley Wickham, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy McGowan, Romain François, Garrett Golemund, Alex Hayes, Lionel Henry, Jim Hester, Max Kuhn, Thomas Pedersen, Evan Miller, Stephan Bache, Kirill Müller, Jeroen Ooms, David Robinson, Dana Seidel, Vitalie Spinu, Kohske Takahashi, Davis Vaughan, Claus Wilke, Kara Woo, and Hiroaki Yutani. Welcome to the tidyverse. Journal of Open Source Software, 4(43), 2019.
- [29] M. Thodberg and A. Sandelin. A step-by-step guide to analyzing cage data using `r/bioconductor`. F1000Res, 8:886, 2019.
- [30] Y. Zhou, B. Zhou, L. Pache, M. Chang, A. H. Khodabakhshi, O. Tanaseichuk, C. Benner, and S. K. Chanda. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. Nat Commun, 10(1):1523, 2019.
- [31] N. C. Dubois, D. Hofmann, K. Kaloulis, J. M. Bishop, and A. Trumpp. Nestin-cre transgenic mouse line `nes-cre1` mediates highly efficient `cre/loxP` mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. Genesis, 44(8):355–60, 2006.
- [32] Thomas.W.Sadler. Langman’s Medical Embryology. Lippincott Williams & Wilkins, 11 edition, 2010.
- [33] M. Nahrendorf and F. K. Swirski. Abandoning `m1/m2` for a network model of macrophage function. Circ Res, 119(3):414–7, 2016.
- [34] F. O. Martinez and S. Gordon. The `m1` and `m2` paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep, 6:13, 2014.
- [35] J. Chen and Z. J. Chen. Regulation of `nf-kappa b` by ubiquitination. Curr Opin Immunol, 25(1):4–12, 2013.

- [36] K. Iwai. Diverse roles of the ubiquitin system in nf-kappa b activation. Biochim Biophys Acta, 1843(1):129–36, 2014.
- [37] M. Kanehisa, M. Furumichi, Y. Sato, M. Ishiguro-Watanabe, and M. Tanabe. Kegg: integrating viruses and cellular organisms. Nucleic Acids Res, 49(D1):D545–D551, 2021.
- [38] Y. Tsuchiya, T. Asano, K. Nakayama, Jr. Kato, T., M. Karin, and H. Kamata. Nuclear ikkbeta is an adaptor protein for i kappa b alpha ubiquitination and degradation in uv-induced nf-kappa b activation. Mol Cell, 39(4):570–82, 2010.
- [39] K. Sasaki and K. Iwai. Role of linear ubiquitination in inflammatory responses and tissue homeostasis. Int Immunol, 2022.
- [40] F. Ikeda, Y. L. Deribe, S. S. Skanland, B. Stieglitz, C. Grabbe, M. Franz-Wachtel, S. J. van Wijk, P. Goswami, V. Nagy, J. Terzic, F. Tokunaga, A. Androulidaki, T. Nakagawa, M. Pasparakis, K. Iwai, J. P. Sundberg, L. Schaefer, K. Rittinger, B. Macek, and I. Dikic. Sharpin forms a linear ubiquitin ligase complex regulating nf-kappa b activity and apoptosis. Nature, 471(7340):637–41, 2011.
- [41] K. Iwai and F. Tokunaga. Linear polyubiquitination: a new regulator of nf-kappa b activation. EMBO Rep, 10(7):706–13, 2009.