

氏 名 よしだ さとし
吉田 聡

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 419 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目 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)

論文審査委員

(主査)	教授	清水 忠道
(副査)	教授	森 寿
(副査)	教授	嶋田 豊
(副査)	准教授	甲斐田 大輔
(指導教員)	教授	北島 勲

論 文 要 旨

論 文 題 目

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

氏 名 _____ 吉田 聡 _____

備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。

② A4 判とする。

[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、主に胎生期の中樞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を組織特異的にノックアウトした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、顔部皮膚、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 (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、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℃で凍結後、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法を用いてライブラリ調整、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、若年期からすでに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、炎症にかかわる多く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関わらず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マウスの皮膚炎発症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、組織学のおよび経時的な遺伝子発現を解析した。IKK2のノックアウトや抗炎症効果を示すトファシチニブの塗布によるUbe2d2遺伝子の転写開始点での増減が、本マウスのアトピー性皮膚炎の発現と密接に関与していることが明らかになった。この事実は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。

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号	氏 名	吉田 聡
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 准教授	氏 名 清水 忠道 森 寿 嶋田 豊 甲斐田 大輔	
指導（紹介）教員	教 授	北島 勲	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本文の場合は英訳を付記すること) 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)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
[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。主として、胎生期中枢神経系形成過程で発現し、成熟神経細胞では発現しないNestinの promoter/enhancer制御下にCre遺伝子を発現し、炎症を司るNF-κBパスウェイの中核を担うIKK2を特異的にノックアウトした Nestin ^{Cre} ;Ikk2 ^{FL/FL} マウスは、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したため、Facial atopic dermatitis with scratching (FADS) マウスと命名された。吉田氏は本研究において、このFADS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]			
吉田氏はNestin ^{Cre} ;Ikk2 ^{FL/FL} マウス (KOマウス) をメスのIkk2 ^{FL/FL} マウスとオスのNestin ^{Cre} ;Ikk2 ^{FL/FL} マウスの交配により作製した。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、顔部皮膚、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）染色および免疫組織化学色を行った。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-80℃で凍結後、RNAを回収した。採取したRNAから、CAGE法を用いてライブラリ調整、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、Metascapeを用いてエンリッチメント解析を行った。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]

吉田氏は本研究においてNestin^{Cre};Ikk2^{FL/FL}マウスは幼若な時期（生後6, 7日目）から真皮にM2マクロファージが集簇した炎症像を呈し、生後35日目には真皮乳頭延長や真皮肥厚など慢性炎症像を観察した。CAGE法による遺伝子発現変動の主成分分析と機能的アノテーションにより、生後3日目には炎症関連遺伝子群が増加し、若年期からの炎症誘導が示唆された。また、3日目の遺伝子発現変動では、Ubiquitin conjugating enzymeの一種であるUbiquitin conjugating enzyme D2 (Ube2d2) 発現が減少していた。

さらに、Ube2d2遺伝子の第4, 5転写開始点での発現が、Control群の上昇に反してKO群の低下が確認された。一方、JAK阻害薬トファシチニブ塗布により、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確認された。

[総括]

吉田氏は、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遺伝子転写開始点での増減が関与していることを初めて明らかにした。アトピー性皮膚炎の炎症機序にNF-κB関連分子のユビキチン化関与の可能性を示した点に新規性が認められる。本研究の結果は、転写開始点の遺伝子発現を網羅的に捉えることのできるCAGE法の応用により導かれたものであり、転写開始点解析による病態解明は医学における学術的重要性が高いと判断される。本研究は、マウスモデルを用いた成果であるが、臨床的に十分解明されていないアトピー性皮膚炎の炎症初期から慢性炎症に移行する病態に対応した経時的な網羅的遺伝子発現の変化を明らかにし、アトピー性皮膚炎治療薬として臨床的に期待されているJAK阻害薬の分子薬理作用を明らかにした点は、臨床的發展に寄与することが期待できる。以上により、本審査委員会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。