

抄 録

第6回中国研究皮膚科セミナー

日時：平成22年11月13日（土）16：30～19：15

平成22年11月14日（日）9：00～10：30

場所：第1日目 広島国際会議場

B2F小会議室「ラン」

第2日目 リーガロイヤルホテル広島3F

「安芸の間」

共催：中国研究皮膚科セミナー

協和発酵キリン株式会社

学術情報提供

「痒みと知覚神経C線維の表皮への伸長」

協和発酵キリン株式会社 研究本部薬理研究所

田村忠史

研究発表1

座長 島根大学医学部皮膚科学

講師 金子 栄 先生

1. 蛍光標識二次元電気泳動を用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の感受性に関わる分子の探索

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学分野¹⁾,
国立がん研究センター研究所²⁾○藤井一恭¹⁾, 池田佳寿子¹⁾, 竹島千夏¹⁾, 鈴木規弘¹⁾,
山本剛伸¹⁾, 濱田利久¹⁾, 近藤 格²⁾, 岩月啓氏¹⁾

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤は、近年種々の悪性腫瘍に対する治療薬として研究が進められている。多くの臨床試験が進行しているが、他の悪性腫瘍に先駆けて難治性T細胞リンパ腫 (CTCL) の治療薬としてHDAC阻害剤の1種である vorinostat がFDAによって認可された。本邦でも同剤のCTCLに対する治験が進行中である。しかし、その効果には細胞間、個体間によってばらつきがあり、効果予測因子には不明な点が多い。HDAC阻害剤に対する感受性を予測するタンパク質を同定す

るために、HDAC阻害剤に対する感受性が異なる細胞のタンパク質の発現プロファイルを蛍光標識二次元電気泳動のデータを用いて比較した。33株のリンパ球系悪性腫瘍の細胞株において、代表的なHDAC阻害剤であるバルプロ酸に対する50%阻害濃度 (IC50) を測定したところ、72時間刺激後のIC50は0.2mMから6.0mMで、平均は1.8mMであった。IC50値と各々の細胞株の発現プロファイルを比較すると、データベース上の389タンパク質スポットのうち20スポットの濃度がIC50と相関関係があった (Spearmanの順位相関係数 $r_s > 0.4$)。このうち高感受性群 (IC50がバルプロ酸の血中至適濃度である0.72mM以下の細胞株) と不応群 (IC50が3.0mM以上の細胞株) との間で濃度の平均値に2倍以上の差を認めるものとして、4スポット3タンパク質を、1.5倍以上2倍未満の差を認める物として6スポット5タンパク質を同定した。これらのタンパク質はこれまでにHDAC阻害剤との関連が指摘されておらず、新たなHDAC阻害剤の感受性因子となり得ると考えた。またこれらの分子にはアポトーシスや細胞増殖などに関わる分子が含まれており、HDAC阻害剤に対する治療抵抗性のメカニズムにも関与している可能性も示唆された。

2. フコイダンのIgE抑制効果

広島大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

○岩本和真, 平郡隆明, 柳瀬雄輝, 森桶 聡,
三原祥嗣, 秀 道広

アトピー性皮膚炎 (AD) は慢性炎症性皮膚疾患であり、多くのAD患者においては血清IgEが高値を示し、様々な環境抗原 (ハウスダスト, ダニなど) に対する特異的IgEをもつことが知られている。また、IgEは表皮樹状細胞やT細胞を介して皮膚炎の増悪に関与しており、IgEの制御は重要な治療戦略の一つである。

フコイダンは、モズクなど褐藻類に含まれている硫酸化多糖体の一種であり、これまで抗腫瘍効果などの生物学的な活性について研究されてきた。我々は、フコイダンの抗アレルギー効果に着目し、フコイダンがマウスの脾臓由来のB細胞でクラススイッチを阻害して、IgEの産生を抑制する作用を持つこ

とを報告した。またその後、OVA感作マウスにOVA感作前にフコイタンを腹腔内投与することで、IgEの上昇が抑制されることも報告した。これらのマウスの実験の結果から、フコイタンはクラススイッチに作用してIgE産生を抑制すると考えられた。この作用機序は、T細胞でのサイトカイン (IL-4, IL-5) 産生を抑制しIgE産生を抑えるトシル酸スプラタストとは異なり、新たな作用機序でIgE産生を抑制できる可能性がある。今回、ヒト末梢血単核球をIL-4+抗CD40抗体により刺激しIgE産生を誘導させる実験系を用いて、フコイタンの添加、非添加によりIgE産生に対する効果を検討した。さらに、すでに血清総IgEが高値を示しているAD患者由来の末梢血単核球も用いて、同様の検討を行った。その結果、健常人およびAD患者由来の末梢血単核球ともに、フコイタン添加によりIgE産生が抑制されていた。また、B細胞を分離してmRNAの発現を検討したところ、mature IgE遺伝子の前駆体であるC ϵ germline transcriptionの発現が抑制されており、作用機序はマウスと同様にクラススイッチに作用していると考えられる。

3. プロテオミクス解析技術を用いた牛肉アレルギー抗原の解析

島根大学医学部皮膚科学

○高橋 仁, 千貫祐子, 森田栄伸

【目的】 食物アレルギーは食物抗原に対する即時型アレルギーであるが、しばしば食品間で交叉反応を示す。牛肉アレルギーは、牛肉のみならず豚肉なども交叉反応してアレルギー症状を示すことが臨床的に知られている。本研究は、牛肉アレルギー患者の血清中抗原特異的IgEによって認識されるタンパク質を同定し、他の肉類との交叉反応を検討することを目的とした。

【方法】

① 1次元SDS-PAGEによる抗原の解析

牛肉の摂取により、蕁麻疹などのアレルギー症状を示す7例の患者を対象とした。市販の牛肉を破碎し、粗抽出液を調製した。粗抽出液をSDS-PAGEにて展開し、患者血清を用いたプロットを行い、anti-human IgE抗体を用いて反応する抗原を可視化した。

② 2次元電気泳動

粗抽出液を硫酸アンモニウムにて分画し、患者血清を用いたウエスタンブロット解析を行い、主要な抗原は20-40%濃度間で沈殿することを確認した。硫酸アンモニウムによる粗分画中のタンパク質は、pH 3-8の等電点電気泳動と7.5%SDS-PAGEから構成される二次元電気泳動にて展開した後、PVDF膜に転写し、患者血清、および、anti-human IgE抗体を用いたウエスタンブロットに供した。全タンパク質を蛍光色素で可視化した2次元電気泳動ゲルから、患者血清中IgEが反応したタンパク質のスポットを切り抜き、トリプシン消化した後、以下の質量分析を行った。

③ 質量分析による抗原の同定

トリプシン消化によって得られたペプチドの質量は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization, MALDI) を用いて測定した。

タンパク質の同定は、プロテアーゼ消化によって生じたペプチドの質量 (MS) とその質量リストをデータベース中の理論値と照合する「ペプチドマスフィンガープリンティング法」、および、質量分析計内部で各々のペプチドを断片化し、生じた断片の質量 (MS/MS) から部分アミノ酸配列を推測し、データベース中のアミノ酸配列と照合する「シークエンスタグ法」を用いた。

【結果】

1次元SDS-PAGEによるウエスタンブロットの結果、患者血清中抗原特異的IgEは、220kDaと140kDaのタンパク質と強く反応した。2次元電気泳動によって展開したタンパク質に対するウエスタンブロットの結果、患者血清中IgEと反応したタンパク質は、pI 5からpI 6の間に位置する220kDaと140kDaのタンパク質であった。両タンパク質に対するペプチドマスフィンガープリンティング解析、および、シークエンスタグ解析の結果、220kDaのタンパク質は、データベース上のウシlaminin γ -1と一致し、140kDaのタンパク質は、collagen alpha-1 (VI) chainと一致した。

この結果から、牛肉アレルギーにおける抗原は、ウシlaminin γ -1、および、collagen alpha-1 (VI) chainであることが明らかとなった。豚肉のこれらの蛋白質との交叉反応についても考察する。

研究発表2

座長 島根大学医学部皮膚科学

助教 千貫祐子 先生

4. 皮膚糸状菌のヒト角層での寄生形態の電子顕微鏡観察

鳥取大学医学部感覚運動医学講座皮膚病態学分野

○山田七子, 中島圭子, 山元 修

表在性皮膚真菌感染における角層での菌の寄生形態の電子顕微鏡は以前より行われている。走査電子顕微鏡（走査電顕）観察では、目標とする構造物（糸状菌）を試料の最表面に露出させなければならぬため、生毛部白癬では両面粘着テープを用いた角層剥離法やシアノアクリレート系接着剤による角層剥離法による観察が用いられてきた。しかし、爪白癬については応用が難しく、今までは罹患爪の最表面からの観察が中心であった。我々は、爪白癬の肥厚した爪を2.5%グルタルアルデヒドで固定後アルカリ処理を行う方法を用いて走査電顕観察を試みている。この方法では角質細胞が表層から徐々に消化され、爪白癬でのより深層（背側）の角層中での菌糸の走行や寄生形態をより広範囲に観察することが可能になる。このような方法を用いた爪白癬病巣での、菌糸の形態や走行、角質細胞の形態変化について報告する。さらにこの方法を足白癬の鱗屑にも用い、抗真菌剤の外用前後で鱗屑中の菌糸に変化がみられるか否かを観察したので併せて報告する。In vitroでの抗真菌剤添加による菌糸の形態変化については各種外用剤で詳細に観察が行われているが、in vivoについてはあまり報告がない。我々の観察では、外用後には、走査電顕では菌糸の部分的な膨張、ねじれ、扁平化、大小不同が確認された。透過電子顕微鏡観察では、糸状菌の細胞壁の厚さの変化や、走査電顕で見られた扁平化や膨張に相当すると思われる像が確認できた。

5. 表皮細胞の接着能における表皮型脂肪酸結合蛋白の関与

山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野¹⁾,
信州大学医学部皮膚科学教室²⁾,
山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野³⁾
○根本 圭¹⁾, 奥山隆平²⁾, 中村好貴¹⁾,
一宮 誠¹⁾, 大和田祐二³⁾, 武藤正彦¹⁾

脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein ; FABP) は約15kDの低分子量細胞内蛋白質群で、脂肪酸の細胞内取り込みや貯蔵の制御、細胞内シグナル伝達の制御、核内受容体の活性調節などの生体内機能に関与していることが考えられている。最近の研究から、表皮型であるFABP5は表皮細胞の遊走能に関与し、乾癬や創傷治癒の再生上皮において過剰発現していることが明らかとなった。今回我々は野生型とFABP5ノックアウトマウスモデルから皮膚を採取し、ケラチノサイトを初代培養し、DNAマイクロアレイ解析を行った。FABP5ノックアウトマウスではカドヘリン群およびフィブロネクチン群で遺伝子発現が低下していたが、インテグリン群では著変はなかった。次に接着能について評価するために、IV型コラーゲンコートディッシュを用いてadhesion assayを行ったところ、FABP5ノックアウトマウスでは野生型に比べ接着能が67%低下していた。この結果から創傷治癒の上皮化過程におけるFABP5の関与が示唆された。

特別講演

座長 島根大学医学部皮膚科学

教授 森田栄伸 先生

「ヒストン翻訳後修飾と発癌」

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
生命医科学講座生化学

教授 伊藤 敬 先生

教育講演

座長 広島大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学

教授 秀 道広 先生

「落屑が語る皮膚病態学」

島根大学医学部皮膚科学

教授 森田栄伸 先生