

## アトピー性皮膚炎を発症したマウス血液中の 単核球における遺伝子発現の網羅的解析について

Comprehensive Analysis of Gene Expression in Blood Mononuclear Cells  
of Mouse with Atopic Dermatitis

加藤 芳伸      鈴木 智宏      孝口 裕一  
市橋 大山      青柳 直樹      内野 栄治

Yoshinobu KATO, Tomohiro SUZUKI, Hirokazu KOGUCHI,  
Daisen ICHIHASHI, Naoki AOYANAGI and Eiji UCHINO

アトピー性皮膚炎 (AD) は、環境要因、遺伝要因といった様々な要因が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられている。そのため、AD の発症の病因や病態の解明に向けて、IgE の産生調節機構と T 細胞の相互作用、神経ペプチドと皮膚炎症との関連性、サイトカイン・ケモカインの役割などさまざまな研究が進められてきた<sup>1-6)</sup>。また、AD と遺伝子多型との関連性についてもいろいろな遺伝子座において解析がなされている<sup>3,7)</sup>。これらの研究を通して、Th 1/Th 2 サイトカインのバランスが AD の免疫アレルギー的な病態と関係する IgE の産生に深く関わっていること、AD では白血球で発現している L-セレクチンの発現による血管マトリックス反応の異常やインターロイキン 12 (IL-12) 受容体 b2 鎖遺伝子の異常といった知見が報告されている<sup>1-3,7)</sup>。しかし、AD の臨床像と遺伝的要因を包含して説明することができる知見はいまだ報告されていない。

近年、分子生物学の進歩により、複数の遺伝子の発現レベルを同じ反応条件下で同時に解析することが可能となった。小さなガラス板に数千個の遺伝子 (DNA 断片) を張り付けた DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析する方法もその一つである<sup>8-11)</sup>。最近、この網羅的遺伝子発現解析手法は、多数の遺伝子要因が存在し、環境要因も組み合わさって引き起こされる疾患に関係する遺伝子を明らかにするのに有効とされ繁用されている。

そこで、DNA マイクロアレイを用いて AD を発症したマウスでの遺伝子発現の様相を網羅的に解析することを試みた。今回は、遺伝子発現の網羅的解析の一環として、炎症組織内で増加が認められる単核球に着目し、AD を発症したマウスの血液での遺伝子発現について解析したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試験材料

実験には、AD を発症することが知られている MC/Mg マウス (オス) を使用した<sup>12)</sup>。三共ラボサービス(株)より購入した 4 週齢のマウスを通常的环境下で 6 週間飼育し、AD が認められたマウス (test) と AD の認められなかったマウス (control) から血液を採取して遺伝子発現の分析試料とした。なお、AD は、頭部・頸部の脱毛、頭部・頸部及び耳介部の出血、頸部の痂皮形成の有無を触・視診することにより確認した。

#### 2. Total RNA の調製

最初に、マウスの血液を等量の生理食塩水で希釈した後、Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) に静かに積層し、1600 rpm, 20 分間の遠心を行った。単核球層を分取して 2500 rpm, 10 分間遠心処理した後、沈殿している単核球を生理食塩水に懸濁して、さらに 10000 rpm, 10 分間遠心を行った。精製した単核球は Isogen (Nippon Gene 社製) 2 mL に懸濁し、ツベルクリン注射筒にて破碎した後、クロロホルム処理し 4°C, 12000 rpm, 10 分間遠心した。上清をマイクロチューブに移し、イソプロパノール処理して再度 4°C, 12000 rpm, 10 分間遠心した。沈殿を 75% エタノール洗浄、乾燥後、DEPC 処理水に溶かして total RNA 溶液とした。

#### 3. mRNA の増幅

DNA マイクロアレイを用いた競合ハイブリダイゼーションにて遺伝子発現量の差異を解析するために、Tabor と Richardson の方法に従い total RNA 中の mRNA を増幅した<sup>13)</sup>。最初に、control 7.5  $\mu$ g と test 7.5  $\mu$ g の total RNA に対して T7 プロモーター配列を付加したオリゴ (dT) 24 プライマーを用いて first strand DNA 合成を行った。次に、この first strand DNA を鋳型にして T7

プロモーター配列を持つ second strand DNA を合成した。最後に、second strand DNA を鋳型にして T7 RNA Polymerase により mRNA の増幅を行った。

#### 4. cDNA の蛍光標識及びハイブリダイゼーション

競合ハイブリダイゼーションを行うために、増幅した mRNA を鋳型としてランダムヘキサマーをプライマーに用いて aminoallyl-dUTP 存在下で逆転写酵素反応を行い、aminoallyl-dUTP を導入した cDNA を作成した。逆転写酵素反応では、control に由来する cDNA を Cy 3, test 由来の cDNA を Cy 5 とのカップリング反応により蛍光標識した<sup>14)</sup>。

次に、Cy 3 標識-cDNA 溶液と Cy 5 標識-cDNA 溶液を等量ずつマイクロチューブに採り混合した後、セントリコーンカラムにて Cy 標識した cDNA を精製した。精製した Cy 標識-cDNA 溶液をハイブリダイゼーションのためのプローブ液とした。プローブ液は 100°C で処理した後、マイクロポア-ウルトラフリーフィルターにてろ過してから白血球やリンパ球で発現している約 8000 の遺伝子が張り付けられている Mouse cDNA Microarray (Agilent 社製) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは 65°C で 17 時間行った。

#### 5. 遺伝子発現の解析

Cy 3 と Cy 5 蛍光強度のスキニングは、ScanArray 500 (GSI Luminonics 社製) を用いて行った。画像データから数値データへの変換は、専用ソフト Quant Array (GSI Luminonics 社製) を使用した。また、Microarray に張り付けられている細菌、酵母等マウス以外の生物の遺伝子の蛍光値 (negative control) をバックグラウンドとして各スポットの蛍光値の補正を行った。さらに、control と test 間のノーマリゼーションはグローバルノーマリゼーションを用いた。なお、スキニング時のフォトマルチプライヤーの蛍光強度の取り込み範囲 (ゲイン) は high と low の 2 種類で行った。遺伝子発現量の解析に当たって、high ゲインによる取得時に蛍光強度が飽和していた遺伝子については、low ゲインでのデータを採用した。

### 結果及び考察

通常的环境下で 6 週間飼育した MC/Mg マウス 16 匹のうち 10 匹に AD が認められた。AD が認められたマウスの混合血液と AD の認められなかったマウスの混合血液からそれぞれ単核球の mRNA を調製した。この mRNA を鋳型にして調製した Cy 3 標識-cDNA と Cy 5 標識-cDNA を Mouse cDNA Microarray にハイブリダイズさせた後、Cy 3 と Cy 5 蛍光強度のスキニングを行った画像データを Fig. 1 に示した。control に由来する cDNA は Cy 3 蛍光標識、test 由来の cDNA は Cy 5 で蛍光標識を行っているため control で強く発現している遺伝子は緑色、test で強く発現している遺伝子であれば赤色に、両者で同じように発現している遺伝子は黄色に発色する。Fig. 1 に示すように AD を発症したマウスの血液中には、多数

の遺伝子の発現が抑制あるいは活性化されていることが認められた。Fig. 2 は、Fig. 1 の画像データを基に得られた数値データを使い、control と test 間での各遺伝子の蛍光強度の相関を示したものである。このグラフは、control と test の血液中の各遺伝子の発現レベルを示している。マイクロアレイによる遺伝子発現解析の場合、control と test 試料との比較で 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子のみが変動遺伝子と判定されている。このことから、Fig. 2 のデータを基に AD を発症したマウスの血液中単核球で 2 倍以上の発現変動を示す遺伝子の選別を行った (Fig. 3)。今回の実験で変動遺伝子は、818 種類あることが確認された。その内訳は、AD を発症することで発現が促進される遺伝子 506 種類、反対に発現が抑制される遺伝子 312 種類であった。

これら 818 種類の遺伝子を免疫応答等の代表的な生体機能との関わりから分類したのが Table 1 である。Table 1

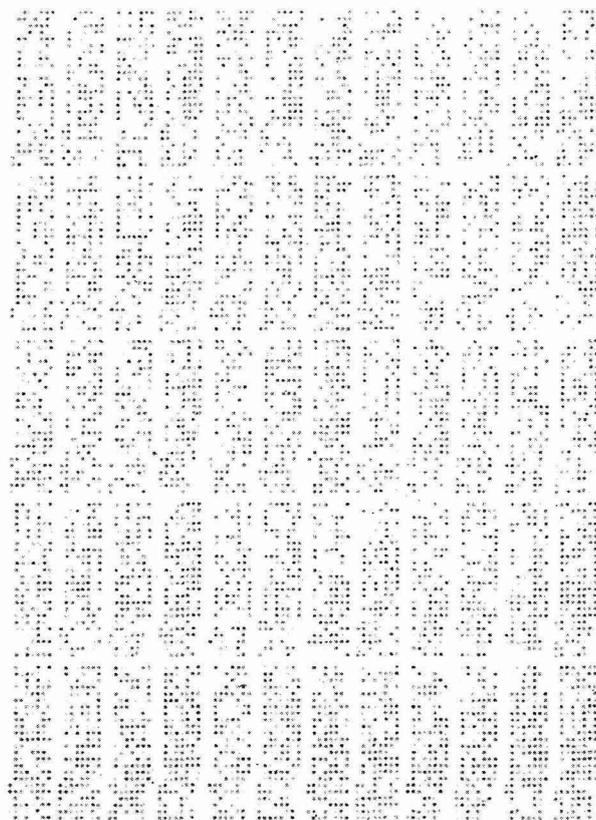


Fig. 1 Reversed Monochromatic Image of cDNA Microarray Hybridization

DNA probes complementary to RNA preparations from both the test and control samples were synthesized by fluorescently labelling with Cy5- and Cy3-dUTP, respectively, through a single round reverse transcription reaction. The fluorescent probes were pooled in equal quantity and allowed to hybridize to 8,000 clones on a Mouse cDNA Microarray (Agilent) under stringent conditions. Extent and characteristic spectra of emission due to fluorescent dyes, Cy5 (red) and Cy3 (green), were measured using Scan Array 500 (GSI Luminonics). In this figure the data are presented as a reversed and monochromated version.

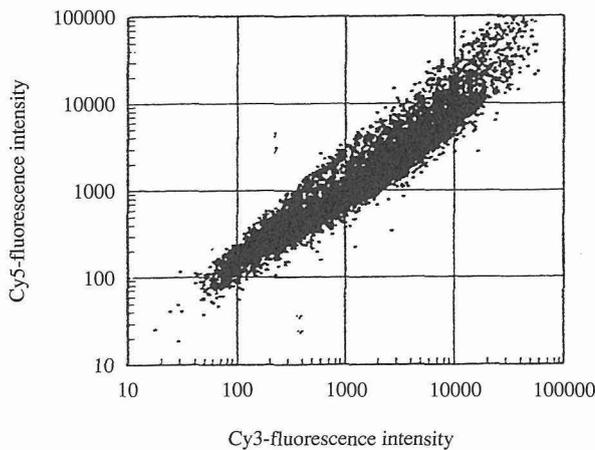


Fig. 2 Scatter Plot of the Expression Level of Test Mononucleous Cells (Cy5) in Contrast to the Expression Level of Control Mononucleous Cells (Cy3)

に示したとおり、ADを発症することにより血液中では、Oxidative stressに関与する16種類の遺伝子、Apoptosis 5種類、Metabolism (fatty acids and amino acids *etc.*)に関与する20種類の遺伝子、それにAdhesion and cell cycle controlといった細胞増殖や血管壁における細胞接着に関与する20種類の遺伝子などが活性化されていることが認められた。これらに対して、Immune responseに関与する10種類の遺伝子やHeat shock responseに関与する遺伝子の発現は強く抑制されることが明らかになった。同定された変動遺伝子のリスト中には、すでにアトピー症との関連で研究が進められているケモカイン、ヒートショックタンパク質、インターロイキンなど<sup>1-3,7)</sup>が含ま

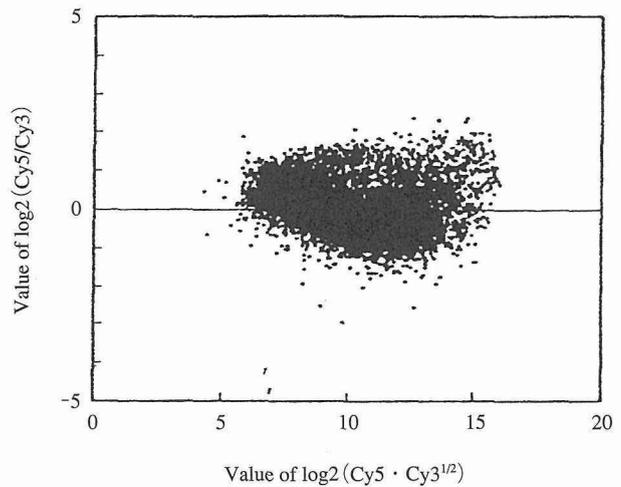


Fig. 3 Differential Expression of 8,000 Genes Investigated by Microarray Hybridization

The vertical axis shows differential expression calculated as the ratio of the values of the Cy5-fluorescence signal and Cy3-fluorescence signal. A positive number indicates that Cy5 (test cells) signal is greater than Cy3 (control cells) signal, whereas a negative number indicates that Cy3 signal is greater than Cy5 signal.

れているほかに、ADとの関連で作用機序の明らかにされていない酸化ストレス、細胞内情報伝達、細胞接着さらにアミノ酸や脂肪酸代謝に関与する遺伝子等が認められる。これらの遺伝子には、ヒトADのメカニズムの研究及び迅速な診断法開発のための指標遺伝子として活用できる可能性がある。従って今後、変動遺伝子の中でも酸化ストレス、細胞内情報伝達に関与する遺伝子群等に注目し、個々の遺伝子の発現状況を経時的に測定してADとの関連を明らかにすることが重要と考える。

Table 1 Activation and Suppression of Gene Expression in Blood Mononuclear Cells of Mouse with Atopic Dermatitis

Gene function	Number of activated genes	Number of suppressed genes
Immune response	5	10
Apoptosis	5	1
Oxidative stress	16	—
Receptor response	4	4
Heat shock response	—	3
Proteolysis and peptidolysis	8	4
Phosphorylation	4	6
Adhesion and cell cycle control	20	7
Translation and transcription	15	10
Amine metabolism	4	—
Metabolism (amino acid, lipids <i>etc.</i> )	20	5
Other functions	388	262
Total	506	312

## 文 献

- 1) 山下 仁, 丹野恭夫: アレルギー, 47, 1168 (1998)
- 2) 片山一朗: アレルギー, 49, 831 (2000)
- 3) 古江増隆: アレルギー, 49, 840 (2000)
- 4) 内野栄治, 小島弘幸, 佐藤洋子, 都築俊文, 長谷川浩: 道衛研所報, 48, 1 (1998)
- 5) 内野栄治, 市橋大山, 青柳直樹: 第38回国際温泉科学会大会・第56回日本温泉科学会大会講演要旨(別府), 207 (2003)
- 6) 内野栄治, 市橋大山, 青柳直樹: 第38回国際温泉科学会大会・第56回日本温泉科学会大会講演要旨(別府), 212 (2003)
- 7) 原 寿郎: 化学と生物, 39, 723 (2001)
- 8) Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS: Electrophoresis, 20, 22 (1999)
- 9) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM: Nature Genetics, 21, 10 (1999)
- 10) Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kuchelapiti R, Childs G: Nature Genetics, 21, 15 (1999)
- 11) Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, Lockhart DJ: Nature Genetics, 21, 20 (1999)
- 12) 市橋大山, 内野栄治: 道衛研所報, 52, 96 (1998)
- 13) Tabor S, Richardson CC: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1074 (1985)
- 14) Shena M, Shaldon D, Davis RW, Brown PO: Science, 270, 467 (1995)