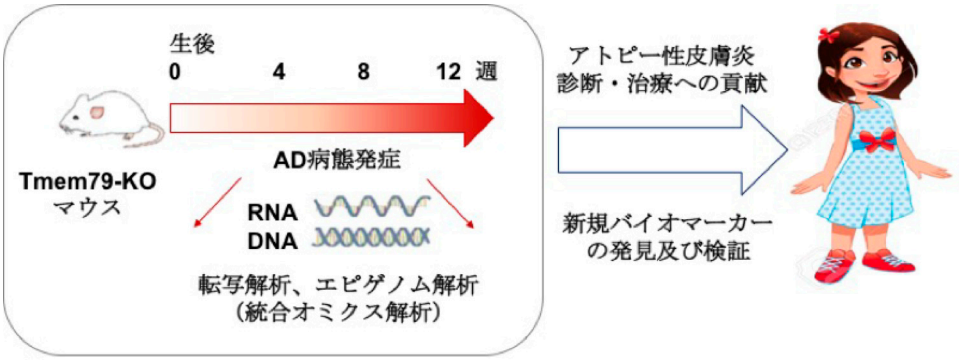
47　統合オミクスを用いたアトピー性皮膚炎の分子基盤解明	ｼｬﾘﾌ　ｼﾞｬﾌｧﾙ

【目的】皮膚疾患の代表的な例であるアトピー性皮膚炎（atopic dermatitis：AD）は、皮膚の痒みや炎症を誘導し、患者にとって身体的な負担を与えるだけでなく、大きな精神的なストレスの要因ともなる。2014 年の統計によると、日本では、AD 患者数は既に 45 万人を超えており、この数は 30 年前と比べて約 2 倍に増えている。このように AD 患者数が年々増え続けることを防ぐには、AD の効果的な診断・治療の開発が急務である。しかし、典型的な多因子疾患である AD の分子病態は未だ解明されていない。これまでの研究から、AD の背景に遺伝的な要因と環境要因（乾燥、ストレスなど）の両方の存在が明らかになっている。すなわち、AD の診断・治療を開発するには、まず、その背景にある分子メカニズムを解明しなければならない。本研究は、AD の分子を基盤解明することにより、新たな診断・治療法の開発を目的としている。

【方法】本研究では、AD に似た症状を誘発する Tmem79-KO マウスを用い、AD 発症の背景にある分子メカニズムを解析した。具体的に、control 及び Tmem79-KO マウス（♂、n＝5）を用い、炎症が顕著に見られる顎下部位の皮膚を採取した。Tmem79-KO の皮膚では、どのような遺伝子発現の変化が起きているのか、その点を明らかにするため、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行なった。本研究では、さらに、AD に関与する新たな分子マーカーの探索を行なった。異時性多発胃がんの発生予測に使われている DNA メチル化による分子診断法を参考にし、control 及び Tmem790-KO マウスの顎下部位の皮膚からゲノム DNA を精製し、RRBS (reduced representation bisulfite sequencing)法による DNA メチル化解析を行なった。

【結果】網羅的な転写解析（RNA-seq、♂、n＝5）により、Tmem79-KO マウスでは、control 群と比べて代謝関連遺伝子や転写関連遺伝子の発現が顕著に変化することを示した。さらに、Tmem79-KO では、Jarid2 や Cdk8 などのエピゲノム制御に関わる遺伝子の発現が低下することを発見した。Jarid2 と Cdk8 のどちらも、ポリコム複合体の構成因子である。ポリコム複合体は、H3K27me3 修飾を媒介することにより、プロモーター部位に CpG アイランド (CGI) を持つ遺伝子の発現を抑制する。Jarid2 などの発現の低下は、ポリコム複合体の機能（H3K27me3 媒介の）低下につながる可能性がある。今後、control 及び Tmem79-KO マウスを用い、CGI における H3K27me3 のレベルを解析したい。ここで、CGI のエピジェネティック制御に、H3K27me3 の他に、DNA メチル化という別の経路も寄与することを述べておきたい。本研究では、RRBS（reduced representation bisulfite sequencing）実験を行い、CGI における DNA メチル化を網羅的に解析した（♂、n＝5）。Tmem79-KO では、いくつかの CGI では DNA メチル化が顕著に変化していることを示した。これらの DNA メチル化変化は、AD の新たな分子マーカーとして利用できる可能性がある。

研究目的及び研究方法



47. 統合オミクスを用いたアトピー性皮膚炎の分子基盤解明

シャリフ　ジャファル

理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫器官形成グループ

Key words：アトピー性皮膚炎（atopic dermatitis：AD），統合オミクス解析，転写制御，エピゲノム，分子マーカー

緒　言

皮膚疾患の代表的な例であるアトピー性皮膚炎（atopic dermatitis：AD）は、皮膚の痒みや炎症を誘導し、患者にとって身体的な負担を与えるだけでなく、大きな精神的なストレスの要因ともなる。2014 年の統計によると、日本でのAD 患者数は既に 45 万人を超えており、この数は 30 年前と比べて約 2 倍に増えている。このようにAD 患者数が年々増え続けることを防ぐには、AD の効果的な診断・治療の開発が急務である。一方、AD は典型的な多因子疾患であり、その背景には遺伝的な要因に加え、様々な環境要因（乾燥、ストレスなど）が存在する［1］。AD の診断・治療の開発には、まず、その背景にある分子メカニズムを解明しなければならない。本研究では、AD の分子を基盤解明することにより、AD の新規治療法の開発を目的としている。

これまでの AD 患者ゲノム・コホート解析から、AD に関与する候補としていくつかの遺伝子座が報告されている。その中で、非常に注目をされているのは、膜貫通型のタンパク質をコードする *TMEM79* 遺伝子である［2］。興味深いことに、Tmem79 を欠損させた（Tmem79-KO）マウスでは、ヒトの AD に似た症状が誘導される［3］。本研究では、Tmem-KO マウスを AD の動物モデルとして使用した。AD 病態発症に伴い、炎症部位でどのような分子変化が起きているのか、その全貌を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析（RNA-seq）に加え、DNA メチル化などのエピゲノム修飾を解析した。このような遺伝子発現情報とエピゲノム情報を重ね合わせた「統合オミクス」手法を用い、AD 病態発症を制御する新たな分子経路及び新規分子マーカーの発見を目指した。

方　法

1.　AD 病態発症に伴う遺伝子発現変化（RNA-seq）の解析

AD 病態を模倣する Tmem79-KO マウスでは、生後 9 週齢で、顎下の皮膚部位に顕著な炎症や痒みが観察される。本研究では、AD に伴う遺伝子発現変化を解析するため、control 及び Tmem79-KO マウスから炎症部位の皮膚を採取し、total RNA を抽出した。さらに、poly-A RNA を濃縮し、NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit を用い、RNA-seq ライブラリーを作製した（♂、n＝5）。次世代シーケンサー（NovaSeq 6000）により配列を決定し、Bowtie2 により配列データをゲノム（mm9）にアラインした。Salmon により遺伝子発現レベル（TPM）を決定し、GO（gene ontology）解析を行い、Tmem79-KO で変化を示した遺伝子の生物学的な機能を予測した。

2. RRBS（reduced representation bisulfite sequencing）による DNA メチル化解析

DNA メチル化によるエピゲノム調節は、遺伝子発現制御に重要な役割を持つ。著者はこれまで、哺乳類の DNA メチル化の維持機構やその際に中間体として発生するヘミメチル DNA の生物学的な機能を明らかにして来た［4，5］。興味深いことに、ヒト疾患における DNA メチル化の変化は、病態の分子マーカーとして利用できる可能性がある。ピロリ菌感染による異時性多発胃がんでは、DNA メチル化状態の変化が、病態診断の分子マーカーとして既に用いられている［6］。すなわち、AD 病態発症と DNA メチル化の変化を結びつけることができれば、新規分子マーカーの発見が期待される。そこで、著者は、Tmem79-KO マウスの炎症部位の皮膚サンプルからゲノム DNA を抽出し、DNA メチル化を網羅的に解析するための手法である RRBS（reduced representation bisulfite sequencing）［7］を行なった。RRBS ライブラリーを用い、次世代シーケンサーにより配列を決定した（♂、n = 5）。Bismark 及び Bowtie2 を用い、配列データをマウスゲノム（mm9）にアラインした。次に、Seqmonk を利用し、CpG アイランド（CGI）における DNA メチル化の平均値を計算した。

結果及び考察

1. Tmem79-KO では代謝関連遺伝子及び転写関連遺伝子の発現が堅調に変化する

Tmem79-KO では、control と比べ、遺伝子の発現が低下する傾向が見られた（図 1A）。GO 解析の結果、発現が抑制された遺伝子は、代謝や転写などの生物学的な経路に関与することが示唆された（図 1B）。興味深いことに、Tmem79-KO では、Jarid2 や Cdk8 などのエピゲノム制御に関わる遺伝子の発現が低下することを発見した。Jarid2 と Cdk8 のどちらも、ポリコム複合体の構成因子である。ポリコム複合体は、H3K27me3 修飾を媒介することにより、プロモーター部位に CpG アイランド（CGI）を持つ遺伝子の発現を抑制する。Jarid2 などの発現の低下は、ポリコム複合体の機能（H3K27me3 媒介の）低下につながる可能性がある。今後、control 及び Tmem79-KO マウスを用い、CGI における H3K27me3 のレベルを解析したい。

AD 病態発症皮膚では、代謝関連遺伝子が低下していることが、非常に興味深い。実際に、AD で観察される炎症や痒みの要因として、皮膚の角質などに含まれるセラミドなどの脂肪性の代謝産物の低下が挙げられている。しかし、なぜ AD ではセラミドなどの量が低下するのか、明らかになっていない。本研究の解析結果は、代謝関連遺伝子の（転写レベルでの）低下が、結果的にその下流の代謝産物合成の低下につながる可能性を示す。

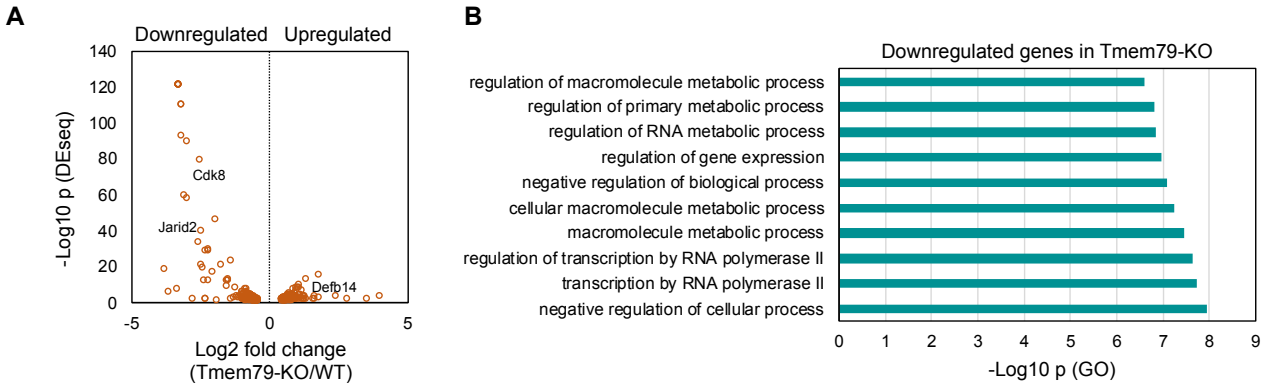


図 1. Tmem79-KO マウスにおける遺伝子発現解析

（A） DeSeq2 法による遺伝子発現変化の検出。縦軸は、調整済み p 値（adjusted p-value）の−log10 を示し、横軸は、control と比べて KO での遺伝子発現の変化（Log2 fold change）を表している。（n = 5）

（B） Gene ontology（GO）解析の結果。横軸は、−log10 p を表している。

2. Tmem79-KO による CGI での DNA メチル化レベルの変化

前述した CGI 配列は、ポリコム複合体の標的になると同時に、DNA メチル化の制御も受ける。本研究では、RRBS-seq を行い、CGI における DNA メチル化のレベルを明らかにした結果（♂、n = 5）、Tmem79-KO マウスでは、中間レベル（20%～80%）の DNA メチル化を持つ CGI で、DNA メチル化が変化する傾向が見られた（図 2A）。これらの CGI における DNA メチル化変化は、将来的に AD の分子マーカーになる可能性がある。さらに、Tmem79-KO では、*Tspyl2* 遺伝子のプローモータ部位にある CGI で DNA メチル化が上昇することが示唆された（図 2A、2B）。*Tspyl2* は、ヌクレオソーム構築を促進する機能を持つことが既に報告されている。同遺伝子の発現が低下すると、ヌクレオソーム状態が緩くなり、クロマチン構造の変化が起きる可能性がある。今後さらに研究を進め、*Tspyl2* における DNA メチル化増加の生物学的な意義を追求して行きたい。

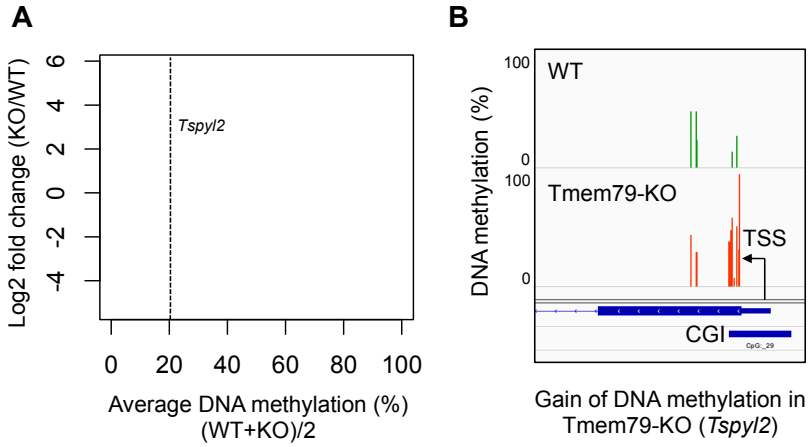


図 2. RRBS-seq による DNA メチル化解析

(A) 縦軸は DNA メチル化変化（log2 fold change）、横軸は平均 DNA メチル化（%）を示す。DNA メチル化の増加は「赤」低下は「緑」で示している。縦の点線は、平均メチル化が 20%以上の遺伝子を表す。

(B) IGV browser を用い、*Tspyl2* 遺伝子の転写開始点付近の DNA メチル化を可視化したもの。上のパネルは WT で、下は Tmem79-KO を示す。転写開始点（TSS）や CGI の位置は図に示している。

文　献

1) Otsuka A, Nomura T, Rerknimitr P, Seidel JA, Honda T & Kabashima K. The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Rev. 2017 Jul;278(1):246-262. PMID: 28658541 doi: 10.1111/imr.12545.

2) Saunders SP, Goh CS, Brown SJ, Palmer CN, Porter RM et al. Tmem79/Matt is the matted mouse gene and is a predisposing gene for atopic dermatitis in human subjects. J Allergy Clin Immunol. 2013 Nov;132(5):1121-9. PMID: 24084074 doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.046.

3) Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J & Amagai M. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2013 Nov;132(5):1111-1120.e4. PMID: 24060273 doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.027.

4) Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M & Koseki H. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. Nature. 2007 Dec 6;450(7171):908-12. PMID: 17994007

5) Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M et al. Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1(-/-) ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA. Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):81-94. PMID: 27151458 doi: 10.1016/j.stem.2016.03.013.
6) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K et al. High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. Clin Cancer Res. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):989-95. PMID: 16467114
7) Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES & Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2005 Oct 13;33(18):5868-77. PMID: 16224102