

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09787

研究課題名(和文) ストレス応答MAPキナーゼASK1による尋常性乾癬の発症の制御

研究課題名(英文) Regulation of the development of psoriasis by ASK1, a stress-responsive MAP kinase

研究代表者

大久保 ゆかり (Okubo, Yukari)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：40233530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乾癬は、Th17細胞依存性の慢性炎症性角化症と考えられている。本研究では、イミキモド誘導性乾癬のマウスモデルを用いて、ストレス応答性MAPキナーゼp38の上流に位置するMAPキナーゼ、Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)の乾癬病態形成における役割について検討を行った。その結果、ASK1は、乾癬発症に抑制的と考えられる角化細胞の正常な分化誘導の維持に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis is a helper T 17 cell-dependent chronic inflammatory skin disease characterized by thickening and redness of the skin with keratinocytes hyperproliferation, skin inflammation associated with inflammatory cell infiltration in the epidermis and dermis. Apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1) is a ubiquitously expressed serine/threonine mitogen-associated protein kinase kinase kinase (MAP3K) that activates p38 and JNK signaling pathways. In the present study, we investigated the role of ASK1 in the development of imiquimod-induced psoriasiform dermatitis by using ASK1 deficient mice. ASK1 deficient mice showed exacerbated psoriasiform dermatitis with increased expression of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-17 and proliferation of keratinocytes but decreased apoptosis of them. The present results suggest that ASK1 may play a role for supporting the normal differentiation of keratinocytes, which is presumed to be inhibitory against the development of psoriasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ASK1 乾癬 イミキモド 角化細胞 分化

## 1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は、赤い発疹とその上に白色の皮膚上皮の角質細胞が剥がれ落ちた鱗屑を伴う発疹が出現する難治性の疾患である。近年、関節リウマチなどと同様な IL-17 や IL-22 を産生する炎症性ヘルパー T (Th) 17 細胞に依存する慢性炎症性疾患の 1 つで、表皮角化細胞の最終分化阻害と増殖亢進によると考えられ、TNF- $\alpha$  や IL-12/23p40、IL-17 などの炎症性サイトカインに対する抗体医薬による治療効果が示されつつある。しかし、発症の原因は未だに不明な点が多い。

興味深いことに、近年、乾癬炎症部位では、ストレス応答性 MAP キナーゼ p38 発現が病態変化と相関し、さらに、p38 阻害剤が炎症抑制効果を示すことが明らかになってきた。特に、尋常性乾癬の発疹では p38/ERK の活性化が見られ、その病勢に p38 の活性化が関与していること (Johansen et al. *Br. J. Dermatol.* 2005) や、アダリムマブ (抗 TNF- $\alpha$  抗体) 投与で臨床的な改善に先行し p38 の活性化が抑制されること (Soegaard-Madsen et al. *Br. J. Dermatol.* 2010)、乾癬患者の皮膚移植モデルで p38 活性阻害が病変部の進行を抑制すること (Mihara et al. *Br. J. Dermatol.* 2010) などが報告された。

JNK や p38 MAP キナーゼ経路を刺激する MAP3K である ASK1 は、TNF- $\alpha$  刺激で活性化されアポトーシスを誘導する分子として同定され、様々な環境ストレスに応答して細胞の生死や分化をコントロールしている。さらに、ASK1 欠損マウスの解析より、ASK1 が酸化ストレスや小胞体ストレスによる細胞死に必要なシグナル分子であり、TLR の下流で主に p38 MAP キナーゼの活性化を選択的に担うことにより自然免疫応答に必須の働きをすることなども明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、抗ウイルス薬イミキモド (IMQ) を含むベルセナクリームの頻回塗布により誘導するマウス乾癬モデルや ASK1 欠損マウスなどを用いて、乾癬発症や病態形成における ASK1 の役割を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) IMQ 誘導性乾癬モデルの作製

既報 (Fits et al. *J. Immunol.* 2009) に従い、2 日前に背中の中毛を剃った野生型 C57BL/6 マウスおよび ASK1 欠損マウス (東京大学一條先生より供与) に、ベルセナクリーム (5%IMQ、持田製薬より供与、30 mg/マウス) およびコントロールのクリームとして、ワセリンを、除毛した背中に 6 日間連続で塗布した。既報では、ベルセナクリーム 60 mg ずつを塗布し 4 日後に PBS を静注していたが、本研究では、半分の量 30 mg を塗布し、PBS 投与は省くことにした。毎日、皮膚の紅斑、肥厚、鱗屑の程度を観察し、体重を測定した。スコアは、

0, none, 1, slight, 2, moderate, 3, marked, 4, very marked で表し、Cumulative score は、紅斑、肥厚、鱗屑の各スコアの総和で計算した。6 日後には、皮膚断片から RNA を抽出し、組織学的解析のためのサンプルも調製した。

### (2) 組織学的解析

IMQ 塗布 1 日後に、皮膚組織断片を OCT コンパウンドに入れ凍結保存し、ミクロトームで凍結切片を作製した。次に、TUNEL 法によるアポトーシス検出キット (タカラバイオ) を用いて死細胞を検出した。また、細胞増殖の指標で Ki67 発現は、抗 Ki67 抗体 (Spring Bioscience) を用いて VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector) で検出した。

IMQ 塗布 6 日後には、皮膚組織断片をホルマリン固定し、パラフィンブロックとその切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。表皮の厚さは、HE 染色画像を画像解析ソフトに取り込み測定した。

### (3) リアルタイム RT-PCR 解析

IMQ 塗布 6 日後には、皮膚組織断片から RNA 精製キット (キアゲン RNeasy Mini Kit) を用いて、トータル RNA を調製し、SuperScript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher) を用いて cDNA を調製後、KAPA STBR Fast qPCR キットとサーマルサイクラー (タカラバイオ TP800) を用いて、リアルタイム RT-PCR 解析を行った。

### (4) マウス新生児角化細胞の分化誘導

プライマリー角化細胞は、マウス新生児の皮膚を剥がし、Dispase II を含む CnT-Prime 培地 (CELLnTEC 社) で一晚処理後、表皮シートを剥がし、TrypLE Select (Thermo Fisher) で細胞をバラバラして、培養した。3 日後、カルシウムの添加により、分化を誘導した。

## 4. 研究成果

### (1) ASK1 欠損マウスでは乾癬症状が増悪化

野生型マウスでは、IMQ 塗布後 3 日目ぐらいから皮膚の紅斑が見られ始めたが、ASK1 欠損マウスでは、2 日目ぐらいからでも紅斑が見られるマウスが現れた。3、4 日後で、ASK1 欠損マウスで紅斑や肥厚で有意に強く見られ、鱗屑も 5、6 日後で有意に酷くなった。

### (2) ASK1 欠損マウスの皮膚では炎症増加

6 日後に、脾臓を取り出し重量を比較すると、野生型マウスと ASK1 欠損マウスで共に、脾腫が見られ、両者の間では、脾腫の程度には差が見られなかった。組織学的解析により HE 染色し皮膚の厚みを測定しところ、コントロールのクリームに比べ IMQ 塗布により、有意に表皮の厚みが増し、野生型マウスに比べ ASK1 欠損マウスでは、さらに厚みが増していた。次に、その皮膚断片での種々の炎症誘導に関与する遺伝子の発現をリアルタイム

Δ RT-PCR により解析すると、IMQ 塗布により野生型マウスに比べ ASK1 欠損マウスで、TNF-α や IL-17、CXCL1、S100A7 の発現が有意に増加し、IL-22 や GM-CSF の発現も増加傾向にあった。

### (3) ASK1 欠損マウスの皮膚では細胞死減少、細胞増殖亢進

ASK1 発現欠損による乾癬症状の増悪化の作用機序を調べるため、IMQ 塗布 1 日後の皮膚での細胞増殖と細胞死の程度を、抗 Ki67 抗体による免疫組織学的に解析と TUNEL 染色により、それぞれ検討した。その結果、ASK1 欠損マウスでは、基底膜付近での角化細胞の増殖の亢進と細胞死の減少傾向が見られた。

### (4) プライマリー角化細胞での ASK1 発現誘導

最後に、マウス新生児のプライマリー角化細胞をカルシウムで刺激し分化を誘導すると、トランスグルタミナーゼ I やインボルクリン、ロリクリンなどの分化マーカーの発現の増大と共に、ASK1 の mRNA 発現も増加する傾向が見られた。

### (5) 本研究成果の意義と今後の展望

本研究の結果より、ASK1 は、正常な角化細胞の増殖を制御し分化誘導を促進し、ASK1 が欠失すると、未分化な角化細胞が増えるため、乾癬症状が増悪化する可能性が示唆された。同様に、ヒトのプライマリー角化細胞を *in vitro* で C2 セラミドで刺激すると、角化細胞の分化誘導と共に ASK1 発現が誘導されることが、以前に一條先生らのグループより報告されている (Sayama et al. *J. Biol. Chem.* 2001)。即ち、ASK1 は角化細胞の分化誘導因子で、ASK1 がないと、乾癬発症時に、角化細胞の分化がより不十分で、未分化な角化細胞が増え続けるため (不全角化) 乾癬症状が増悪化したと考えられる。興味深いことに、その論文では、健康人のヒト皮膚組織での免疫組織学的解析により、ASK1 発現が表皮上方部で角化細胞の分化と平行に発現があると指摘している。ところが、ASK1 欠損マウスで、皮膚に異常があるという報告はないので、ASK1 は定常状態では必須ではなく、乾癬などの角化細胞の異常な状態時に、正常な分化誘導状態に戻す働きがあるのかも知れない。

実は、本研究を始める前に、同様な IMQ 誘導性乾癬の実験を、東京大学の一條先生の研究室で予備的にやった際には、むしろ、ASK1 欠損マウスで、乾癬症状が軽減される傾向があった。この予備的結果は、最近指摘されているマウスの飼育環境の違いによる腸内細菌叢の違いが影響している可能性が考えられる。さらに、ヒト乾癬患者 1 例の健康部と病変部の皮膚組織でのリン酸化 ASK1 の発現をウエスタンブロット解析により調

べたところ、病変部でリン酸化 p38 と ASK1 の発現が増強していた。当初、ASK1 が増殖や炎症性サイトカイン産生を増強する作用も有していることから、乾癬病変部で ASK1 発現が増強され病態を増悪化している可能性も考えられたが、この予備的結果に、さらに、本研究の結果、JBC の論文を考え合わせると、乾癬発症において、体は ASK1 発現を誘導し、未熟な角化細胞の増殖を抑制し、角化細胞の分化を促進 (不全角化を阻害) するように働いているように考えるのが、一番妥当ではないかと考えられる。ところが、これに矛盾して、前述の通り、乾癬の皮膚移植モデルで、p38 活性阻害が病変部の進行を抑制することも報告されている (Mihara et al. *Br. J. Dermatol.* 2012)。

いずれにしても、ASK1 は、乾癬を増悪化する活性のみならず、反対に抑制する活性も有しているので、その役割は、腸内細菌叢なども含めた周りの環境にも影響される可能性も高く、今後さらなる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 21 件)

1. Okubo Y, Tsuruta D, Tang AC, Inoue S, Torisu-Itakura H, Hanada T, Ohtsuki M: Analysis of treatment goal alignment between Japanese psoriasis patients and their paired treating physicians. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 32: 606-614, 2018. doi: 10.1111/jdv.14630. 査読有
2. Terui T, Kobayashi S, Okubo Y, Murakami M, Hirose K, Kubo H: Efficacy and Safety of Guselkumab, an Anti-interleukin 23 Monoclonal Antibody, for Palmoplantar Pustulosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 154: 309-316, 2018. doi: 10.1001/jamadermatol.2017.5937. 査読有
3. Ohnishi H, Kadowaki T, Mizutani Y, Nishida E, Tobita R, Abe N, Yamaguchi Y, Eto H, Honma M, Kanekura T, Okubo Y, Seishima M, Fukao T, Ikeda S: Genetic background and therapeutic response in generalized pustular psoriasis patients treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Eur J Dermatol* 28: 108-111, 2018. doi: 10.1684/ejd.2017.3174. 査読有
4. Hiruma J, Harada K, Motoyama A, Okubo Y, Maeda T, Yamamoto M, Miyai M, Hibino T, Tsuboi R: Key component of inflammasome, NLRC4, was identified in the lesional epidermis of psoriatic patients. *J Dermatol.* 2018 May 24. doi: 10.1111/1346-8138.14478. 査読有
5. Orii N, Mizoguchi I, Chiba Y, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Nagai T, Ochiai M, Mochizuki Y, Owaki T, Yoshimoto T. Protective effects against tumors and infection by IL-27 through promotion of

- expansion and differentiation of hematopoietic stem cells into myeloid progenitors. *Oncoimmunology* 2018 Jan 15;7(5):e14221892. DOI: org/10.1080/2162402X.2017.1421892 査読有
6. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, Sugahara M, Miyamoto Y, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018 Apr;75(8):1363-1376. DOI: 10.1007/s00018-017-2724-5. 査読有
  7. Chiba Y, Mizoguchi I, Furusawa J, Hasegawa H, Ohashi M, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Interleukin-27 exerts its antitumor effects by promoting differentiation of hematopoietic stem cells to M1 macrophages. *Cancer Res.* 2018 Jan 1;78(1):182-194. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0960. 査読有
  8. Reich K, Leonardi C, Lebwohl M, Kerdel F, Okubo Y, Romiti R, Goldblum O, Dennehy EB, Kerr L, Sofen H: Sustained response with ixekizumab treatment of moderate-to-severe psoriasis with scalp involvement: Results from three phase 3 trials (UNCOVER-1, UNCOVER-2, UNCOVER-3). *J Dermatolog Treat* 28: 282-287, 2017. doi: 10.1080/09546634.2016.1249820. 査読有
  9. Ohtsuki M, Okubo Y, Komine M, Imafuku S, Day RM, Chen P, Petric R, Maroli A, Nemoto O: Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in the treatment of Japanese patients with moderate to severe plaque psoriasis: Efficacy, safety and tolerability results from a phase 2b randomized controlled trial. *J Dermatol* 44: 873-884, 2017. doi: 10.1111/1346-8138.13829. 査読有
  10. Kanekura T, Seishima M, Honma M, Eto T, Eto H, Okuma K, Okubo Y, Yamaguchi Y, Kambara T, Mabuchi T, Suga Y, Morita A, Yamanishi K, Tsuruta D, Itoh K, Yamaji K, Ikeda S: Therapeutic depletion of myeloid lineage leukocytes by adsorptive apheresis for psoriatic arthritis: Efficacy of a non-drug intervention for patients refractory to pharmacologics. *J Dermatol* 44: 1353-1359, 2017. doi: 10.1111/1346-8138.13975. 査読有
  11. Menter A, Warren RB, Langley RG, Merola JF, Kerr LN, Dennehy EB, Shrom D, Amato D, Okubo Y, Reich K: Efficacy of ixekizumab compared to etanercept and placebo in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis and non-pustular palmoplantar involvement: Results from three phase 3 trials (UNCOVER-1, UNCOVER-2 and UNCOVER-3). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31:1686-1692, 2017. doi: 10.1111/jdv.14237. 査読有
  12. Usui K, Okubo Y, Hirano T, Tsuboi R: Vitamin D3 derivatives, alone or in combination with glucocorticoids, suppress streptococcal pyrogenic enterotoxin A-stimulated proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. *J Dermatol* 44: 567-572, 2017. doi: 10.1111/1346-8138.13679. 査読有
  13. Mizoguchi I, Ohashi M, Chiba Y, Hasegawa H, Xu M, Owaki T, Yoshimoto T. Prediction of chemical respiratory and contact sensitizers by OX40L expression in dendritic cells using a novel 3D co-culture system. *Front. Immunol.* 2017 Aug 4;8:929. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00929. 査読有
  14. Umemoto T, Matsuzaki Y, Shiratsuchi Y, Yoshimoto T, Nakamura-Ishizu A, Petrich B, Yamato Y, Suda T. Integrin  $\alpha\beta 3$  enhances the suppressive effect of interferon- $\gamma$  on the maintenance of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 2017 Aug 15;36(16):2390-2403. DOI: 10.15252/embj.201796771. 査読有
  15. Shimoura N, Nagai H, Fujiwara S, Jimbo H, Yoshimoto T, Nishigori C. Interleukin (IL)-18, cooperatively with IL-23, induces prominent inflammation and enhances psoriasis-like epidermal hyperplasia. *Arch. Dermatol. Res.* 2017 May;309(4):315-321. DOI: 10.1007/s00403-017-1735-2. 査読有
  16. Imafuku S, Honma M, Okubo Y, Komine M, Ohtsuki M, Morita A, Seko N, Kawashima N, Ito S, Shima T, Nakagawa H: Efficacy and safety of secukinumab in patients with generalized pustular psoriasis: A 52-week analysis from phase III open-label multicenter Japanese study. *J Dermatol* 43: 1011-1017, 2016. doi: 10.1111/1346-8138.13306. 査読有
  17. Kawakami H, Matsumoto Y, Abe N, Katori Y, Takahashi K, Tsuboi R, Okubo Y: Perioperative management of tumor necrosis factor-alpha blocker-treated psoriatic patients: Case reports and review. *J Dermatol* 43: 190-193, 2016. doi: 10.1111/1346-8138.13047. 査読有
  18. Muro M, Kawakami H, Matsumoto Y, Abe N, Tsuboi R, Okubo Y: Topical combination therapy with vitamin D3 and corticosteroid ointment for palmoplantar pustulosis: A prospective, randomized, left-right comparison study. *J Dermatolog Treat* 27: 51-53, 2016. doi: 10.3109/09546634.2015.1052036. 査読有
  19. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding

- diversity in molecular structures and functions of the IL-6/IL-12 heterodimeric cytokine family. *Front. Immunol.* 2016 Nov 4;7:479. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00479. 査読有
20. Furusawa J, Mizoguchi I, Chiba Y, Hisada M, Kobayashi F, Yoshida H, Nakae S, Tsuchida A, Matsumoto T, Ema H, Mizuguchi J, Yoshimoto T. Promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells by interleukin-27 into myeloid progenitors to control infection in emergency myelopoiesis. *PLoS Pathog.* 2016 Mar 18;12(3):e1005507. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005507. 査読有
21. Kawakami H, Maeda T, Abe N, Matsumoto Y, Mitsuhashi Y, Tsuboi R, Okubo Y: Efficacy of adalimumab and methotrexate combination therapy on generalized pustular psoriasis patients unresponsive to infliximab monotherapy due to anti-infliximab antibody development. *J Dermatol* 42: 94-95, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Mizoguchi, I., Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Orii, N., Kan, S., Xu, M., Ochiai, N., Owaki, T., and Yoshimoto, T. A novel role for EB13 to augment IL-23R $\alpha$  protein expression through a lectin chaperone calnexin. 東京医科大学記念館ポスター発表懇談会(2018)
2. Okubo Y, Ohtsuki M, Imafuku S, Komine M, Cirulli J, Petric R, Chen R, Nemoto O: Apremilast, an Oral Phosphodiesterase 4 Inhibitor, in Japanese Patients With Moderate to Severe Psoriasis: Week 16 Efficacy in Patient Subgroups. 26th EADV CONGRESS, Geneva, Switzerland (2017)
3. Kawakami H, Abe N, Matsumoto Y, Hirano H, Tsuboi R, Okubo Y: Evaluation of the efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis on skin manifestation and joint symptoms of patients with pustulotic arthro-osteitis. Psoriasis from gene to clinic, London, UK (2017.11.30-12.2)
4. 比留間淳一郎, 原田和俊, 大久保ゆかり, 山本真実, 日比野利彦, 坪井良治: 乾癬における特徴的インフラマソームの同定. 第 180 回東京医科大学医学会総会 東京 (2017.11.4)
5. Yoshimoto, T. Advances in cancer immunotherapy. Institute of Medical University 1<sup>st</sup> International Symposium on Roles of Aging and Cancer. 2017.
6. Mizoguchi, I., Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Xu, M., and Yoshimoto, T. A novel role for Epstein-Barr virus-induced gene 3 to augment IL-23 receptor  $\alpha$  protein

- expression through a lectin chaperone calnexin. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会(2017)
7. Ohtsuki M, Okubo Y, Komine M, Imafuku S, Nogales K, Day R, Chen P, Nemoto O: Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, versus placebo in Japanese patients with moderate to severe psoriasis: Results of a phase 2b randomized, controlled trial. 25th EADV CONGRESS, Vienna, Austria (2016)
  8. Yoshimoto, T, Ohashi, M., Hasegawa, H., Chiba, Y., Xu, M., and Mizoguchi, I. Establishment of a novel in vitro evaluation system for the prediction of respiratory sensitizing potential of chemicals. ICCA-LRI and NIHS Workshop. (2016)
  9. Yoshimoto, T, Furusawa, J., Chiba, Y., Xu, M., Hasegawa, H., Nakae, S., Kobayashi, F., Yoshida, H., and Mizoguchi, I. Ohashi, M., Hasegawa, H., and Mizoguchi, I. Promotion of expansion and differentiation of hematopoietic stem cells by IL-27 into myeloid progenitors to control infection in emergency myelopoiesis. Symposium, 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology, (2016)
  10. Kawakami H, Fujishiro K, Wakamatsu K, Matsumoto Y, Tsuboi R, Okubo Y: Therapeutic attempts of granulocyte/monocyte adsorption apheresis between or while suspending biological agents in three patients with generalized pustular psoriasis. 24TH EADV CONGRESS Copenhagen (2015)
  11. Okubo Y, Muro M, Kawakami H, Matsumoto Y, Abe N, Tsuboi R: Topical combination therapy with vitamin D3 and corticosteroid ointment for palmoplantar pustulosis: A prospective, randomized, left-right-comparison study. 24TH EADV CONGRESS Copenhagen (2015)
  12. Mizoguchi, I., Chiba, Y., Xu, M., and Yoshimoto, T. Binding of Epstein-Barr virus-induced gene 3 to calnexin enhances its chaperone activity and augments interleukin-23 receptor expression, leading to development of colitis. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会(2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 ゆかり (OKUBO, Yukari)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 4 0 2 3 3 5 3 0

(2) 研究分担者

善本 隆之 (YOSHIMOTO, Takayuki)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 8 0 2 0 2 4 0 6