

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19669

研究課題名(和文)3D培養表皮モデルを用いたRIP1の機能解析 - '角化' はネクロプトーシスか? -

研究課題名(英文)Functional analysis of RIP1 using 3D cultured epidermal model - Is 'keratosis' a necroptosis? -

研究代表者

齋藤 奈央 (SAITO, Nao)

旭川医科大学・医学部・研究生

研究者番号：90736670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (以下RIP1)は、TNF- $\alpha$ 、TRAIL、TLRs刺激下で恒常性維持に深く関与しているが、ヒト表皮細胞における機能は解明されていない。本研究では尋常性乾癬病変部でRIP1の発現が低下しTRAIL刺激への感受性が増強していることを解明した。更にイミキモド誘発マウス乾癬様皮膚炎モデルでは、TRAIL中和抗体が乾癬様皮膚炎を改善し、マウス皮膚におけるTNF- $\alpha$ の発現を低下させた。以上より、TRAIL-RIP1シグナルが尋常性乾癬の増悪に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1) regulate inflammatory signaling in response to stimuli, such as TNF- $\alpha$ , TRAIL, and TLRs, resulting in apoptosis, necroptosis and NF- $\kappa$ B activation. However, the physiological relevance in human epidermis remains elusive. In this study, we examined whether RIP1 is involved in the pathogenesis of psoriasis. In lesional psoriatic epidermis, RIP1-expression was decreased compared with normal epidermis. In addition, RIP1-knockdown enhanced TRAIL-mediated expression of psoriasis-related cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , in HEK. Moreover, TRAIL-neutralization in an imiquimod-induced murine psoriasis model remarkably improved skin phenotype, such as ear thickness, and TNF- $\alpha$  expression in lesional skin. Collecting these results, we conclude that TRAIL-mediated downregulation of RIP1 plays a critical role in the pathogenesis of psoriasis vulgaris via positive regulation of psoriasis-related cytokine-expression.

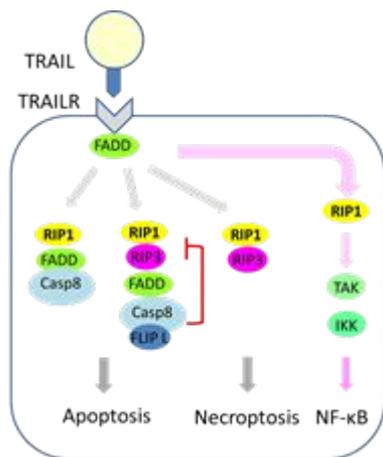
研究分野：皮膚科学

キーワード：RIP1 尋常性乾癬

1. 研究開始当初の背景

(1)RIP1 の学術的背景

Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (以下 RIP1)は TNF-、TRAIL、LPS 刺激におけるアダプタープロテインとして炎症、細胞死を制御している。RIP1 が関与する細胞死は、Caspase に依存したアポトーシスと、カスパーゼ非依存性で RIP1/RIP3 から MLKL のリン酸化をおこすネクロプトーシスがあり、炎症においては NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する。申請者は、重症薬疹における表皮細胞死が RIP1 シグナルによって誘導されるネクロプトーシスであることを報告した (Saito N., Sci Transl Med 2014)。しかしこれ以外のヒト表皮における RIP1 の機能は全く解明されていない。更に上皮細胞に発現している RIP1 が細胞死を制御し上皮の恒常性を維持していることが報告された (Dannappel M et al., Nature 2014,)。すなわち、腸上皮細胞での RIP1 ホモ欠損マウス (以下 KO マウス) は、腸上皮細胞のアポトーシス、絨毛の減少、杯細胞の減少を認め生後 4 週以内に致死となる。一方、表皮細胞での RIP1KO マウスでは、生後 1 週間で激しい皮膚炎を生じ表皮細胞のアポトーシスとネクロプトーシスを認め広範囲に脱毛をきたす。申請者は、preliminary なデータとしてヒト培養表皮細胞を用いた RIP1、RIP3 の検討において RIP1、RIP3 が種々の程度に発現していることを確認した。



(2) 尋常性乾癬と RIP1

尋常性乾癬は、慢性に経過し鱗屑を伴う紅色局面が多発する疾患である (右図)。日本における尋常性乾癬の患者総数は 10 万~20 万人、人口の 0.1~0.2%と推定される。尋常性乾癬の発症要因には肥満やメタボリックシンドロームが関与しており患者総数は徐々に増加傾向を示している。尋常



性乾癬の病態は、pDC や TIP-DC などの免疫学的機序が解明されつつあるが、表皮における乾癬のメカニズムについては不明な点がある。また、尋常性乾癬病変部で TRAIL の発現が亢進していることが報告されているがその病態形成における意義については解明されていない (Zaba LC., JACI 2010)。申請者は、予備実験で尋常性乾癬病変部に TRAIL 陽性細胞が浸潤し、尋常性乾癬病変部表皮で TRAIL receptor の発現が亢進し RIP1 の発現が低下していることを確認した。

以上の結果より RIP1 が上皮細胞の恒常性維持に深く関与していることが示唆されるが、ヒト表皮細胞における RIP1 の機能の検討は未だ報告がない。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではヒト表皮角化細胞を用いた 3D 培養表皮モデルを用い表皮の恒常性維持における RIP1 の機能を解明し、更に外的刺激時に RIP1 欠損が引き起こす免疫反応の機序を明らかにし、表皮の恒常性維持や尋常性乾癬の病態形成における RIP1 の機能を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)患者サンプル

尋常性乾癬患者のサンプルを採取した。サンプル採取は、旭川医科大学倫理委員会の承認のもと、旭川医科大学病院に通院中で尋常性乾癬と診断された患者を対象とし本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、自由意思により文書同意が得られた患者を対象とした。

(2)ケラチノサイトの培養と刺激実験

ケラチノサイト (以下 NHK) は CELLnTEC から購入し、CnT-PR 培地で培養した 4 継代以内の細胞を用いた。刺激実験では、recombinant human TRAIL, recombinant human IL-1, recombinant human IL-17A, recombinant human IL-22, recombinant human IFN-, recombinant human TNF-, recombinant LL37 を使用した。

(3)siRNA transfection

NHK に Nucleofection™ (Lonza) を用いて RIP1 と si-control (*Silencer<sup>R</sup>* Select Negative Control No.1 siRNA, Ambion, Austin, TX) の si-RNA を導入し 72 時間後に細胞を回し実験を行った。

(4)Quantitative real-time PCR

Total RNA は、RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応には LightCycler 480 Instrument (Roche, Basel Schweiz) または TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を用いた。

(5)イミキモド誘発マウス乾癬モデルの作成  
6週齢のC57BL/6J female miceをオリエンタル酵母より購入し旭川医科大学動物実験委員会の承認のもと実験を行った。マウスの背部、耳に0.5%イミキモドクリーム(背部:62.5 mg、耳:31.25 mg)を7日間連日外用した。コントロールはワセリンを使用した。また、治療実験では mouse of anti-TRAIL (clone N2B2) or control rat IgG2a (Biolegend, San Diego, CA) を250 µgずつ day0,2,4,6に腹腔内投与した。

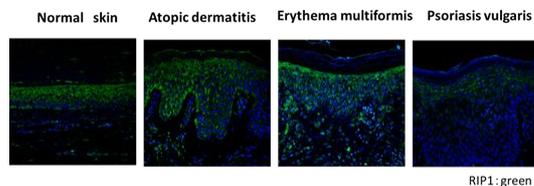
#### (6)3D 培養表皮モデル

NHK4 × 10<sup>5</sup> cells/well をミリセルインサートに加え、インサート内外をCNT-PRで充満し、インサートがコンフルエントになった時点でインサート内外の培地をCNT-PR 3Dに変更し、16時間後にインサート内の培養液を除去し、インサート外のみをCNT-PR 3D培地を加えその後12日間培養した。

### 4. 研究成果

(1) 尋常性乾癬病変部ではRIP1の発現が低下している

表皮におけるRIP1の機能解析をするため、正常皮膚、アトピー性皮膚炎、多形紅斑、尋常性乾癬の病理組織で免疫染色を施行したところ、正常皮膚、アトピー性皮膚炎、多形紅斑では表皮全層にRIP1の発現を認めたと、尋常性乾癬ではRIP1の発現が有意に低下していた(下図)。更に、尋常性乾癬病変部と非病変部のサンプルを用いたwestern blottingでは、健常コントロールに比較してRIP1の発現が有意に低下していた。RIP1の発現低下は、イミキモド誘発マウス乾癬モデルにおいてもqRT-PCRでコントロールに比較して80%低下していた。そこで、NHKに乾癬関連サイトカインを加えRIP1の発現をqRT-PCRで測定すると、IL-1, IL-17A, IL-22, TRAIL, IL-17A+IL-22をNHKに添加するとRIP1の発現低下が誘導された。以上より、RIP1の発現低下が尋常性乾癬の病態に関連していることが示唆されTRAILとRIP1の機能解析を開始した。



(2) 尋常性乾癬における表皮RIP1の発現低下はTRAILへの感受性を増強する

RIP1は、TNF, TRAIL, TLRs刺激のもとNF- $\kappa$ B, apoptosis, necroptosisへのシグナル伝達を制御している。RIP1の発現をコントロールに比較して15%程度にノックダウンしたNHK

(以下RIP1-KD-NHK)にTRAIL刺激を加えサイトカインの発現レベルをqRT-PCRで測定すると、コントロールに比較してRIP1-KD-NHKでIL-1, IL-6, IL-8, IL-20, IL-33, TNF- $\alpha$ が3-8倍上昇していた。更に、TRAIL刺激下で培養上清中のサイトカイン濃度を測定するとTNF- $\alpha$ , IL-1の発現が上昇していた。TRAIL刺激下でNF- $\kappa$ B阻害剤を使用すると、RIP1-KD-NHKでIL-6, TNF- $\alpha$ の発現が有意に低下した。これより、RIP1の発現が低下した表皮細胞は、TRAIL刺激への感受性が増しNF- $\kappa$ Bを活性化しIL-1, IL-6, IL-8, IL-20, IL-33, TNF- $\alpha$ を誘導することが判明した。これらサイトカインは、尋常性乾癬の病態形成において、dermal DCの活性化や表皮におけるSTAT3の活性化、好中球の浸潤に関わる重要な因子であり、表皮におけるRIP1の発現低下とTRAIL刺激が病態の増悪に関与していることが示唆された。

(3) TRAIL中和抗体はイミキモド誘発マウス乾癬様皮膚炎を阻害する

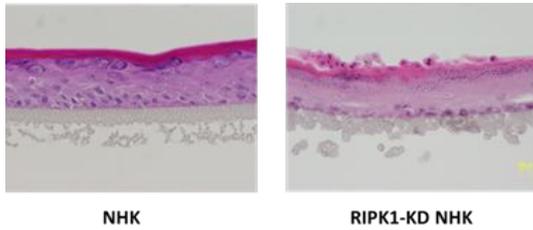
イミキモド誘発マウス乾癬モデルにおけるTRAILシグナルを解明するため、TRAIL中和抗体を用いた治療実験を行った。イミキモド誘発マウス乾癬モデルにTRAIL中和抗体およびコントロールIgGを投与すると、紅斑、浸潤、鱗屑が著明に軽快し(下図)病理組織では表皮のacanthosis, hyperkeratosis, parakeratosisが改善された。更に、TRAIL中和抗体を投与したマウス皮膚ではRIP1の発現が回復しており、マウスの耳の肥厚も改善していた。これらの症状改善は、TRAIL中和抗体によるTNF- $\alpha$ 発現低下が寄与していると考え

IMQ+ control Ab IMQ+ mTRAIL Ab



(4) RIP1KD表皮細胞を用いた3D培養表皮モデル

NHKにNucleofection™(Lonza)を用いてsi-RNAを導入しRIP1の発現を15%まで抑制し、RIP1-KD-NHKとcontrol-NHKを用いてair-liquid interface methodで3D培養表皮を作成することに成功した。RIP1-KD-NHKを用いた培養表皮モデルは、コントロールと比較して角層が肥厚し、顆粒層の肥厚が認められた(下図)。



以上の結果より、RIP1 が表皮の恒常性維持に深く関与し、更に TRAIL-RIP1 シグナルが尋常性乾癬の増悪に関与していることを明らかにした。本研究は、尋常性乾癬の更なる病態の解明、新規治療法の開発につながると考える。

#### <引用文献>

Saito N, Qiao H, Yanagi T, Shinkuma S, Nishimura K, Suto A, Fujita Y, Suzuki S, Nomura T, Nakamura H, Nagao K, Obuse C, Shimizu H, Abe R

An annexin A1-FPR1 interaction contributes to necroptosis of keratinocytes in severe cutaneous adverse drug reactions

Sci Transl Med 6: 245ra95, 2014. doi: 10.1126/scitranslmed.3008227.

Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L, Eftychi C, Lin J, Corona T, Hermance N, Zelic M, Kirsch P, Basic M, Bleich A, Kelliher M, Pasparakis M.

RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis.

Nature. 2014 Sep 4;513(7516):90-4. doi: 10.1038/nature13608.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Johnson-Huang LM, Nograles KE, White TR, Pierson KC, Lentini T, Suárez-Fariñas M, Lowes MA, Krueger JG. Identification of TNF-related apoptosis-inducing ligand and other molecules that distinguish inflammatory from resident dendritic cells in patients with psoriasis.

J Allergy Clin Immunol. 2010 Jun;125(6):1261-1268.e9.

doi: 10.1016/j.jaci.2010.03.018.

#### 5 . 主な発表論文等 (全ての年度のもの)

##### [雑誌論文](計7件)

Iinuma S, Kishibe M, Saito N, Igawa S, Honma M, Bando Y, Yoshida S, Ishida-Yamamoto A.

Kallikrein-related peptidase 6 promotes psoriasiform skin inflammation through protease-activated receptor

2-independent mechanism.

Exp Dermatol. 2017 Mar;26(3):289-291. (査読あり) doi: 10.1111/exd.13204.

Takashima S, Fujita Y, Suzuki S, Saito N, Shinkuma S, Nomura T, Shimizu H. RNA recognition motif of LEMD3 as a key player in the pathogenesis of Buschke-Ollendorff syndrome.

J Dermatol Sci. 2016 Mar;81(3):205-8. (査読あり) doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.12.002.

Sato H, Fujita Y, Hamade Y, Muramatsu K, Nakazato S, Kikuchi K, Haga N, Saito N, Shimizu H.

Localized pemphigus vulgaris clinically masquerading as lichen planus and actinic keratosis.

J Dermatol. 2015 Dec;42(12):1204-5. (査読あり) doi: 10.1111/1346-8138.13099.

Iinuma S, Kishibe M, Saito N, Igawa S, Honma M, Takahashi H, Bando Y, Yoshida S, Iizuka H, Ishida-Yamamoto A.

Klk8 is required for microabscess formation in a mouse imiquimod model of psoriasis.

Exp Dermatol. 2015 Nov;24(11):887-9. (査読あり) doi: 10.1111/exd.12794.

Watanabe M, Ujiie H, Saito N, Abe R, Shimizu H.

Kimura disease associated with severe visual dysfunction due to remarkable periorbital involvement.

J Dermatol. 2015 Sep;42(9):924-5. (査読あり) doi: 10.1111/1346-8138.12954.

Miyauchi T, Abe R, Morita Y, Adachi M, Shiba K, Hamade Y, Saito N, Nishimura M, Ibata M, Okada K, Shigematsu A, Endo T, Kawai K, Teshima T, Shimizu H.

CD4/CD8 double-negative T-cell lymphoma: a variant of primary cutaneous CD8+ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma?

Acta Derm Venereol. 2015 Nov;95(8):1024-5. (査読あり) doi: 10.2340/00015555-2102.

Miyauchi T, Fujita Y, Takashima S, Morita Y, Suzuki S, Mizuno O, Saito N, Nomura T, Shimizu H.

Pruritic Papules Following Lumbar Corset Use: A Quiz. Grover's disease.

Acta Derm Venereol. 2015 Jul;95(6):762-3. (査読あり) doi: 10.2340/00015555-2071.

##### [学会発表](計2件)

齋藤奈央、堀仁子、野崎尋意、斉藤剛史、

岩崎剛志、井川哲子、岸部麻里、山本明美、  
金澤伸雄  
PASH 症候群の 1 例  
第 405 回日本皮膚科学会北海道地方会、2016  
年 3 月 19 日、札幌

Saito N., Honma M, Shibuya T, Igawa S,  
Kishibe M, Ishida-Yamamoto A  
A novel RIPK1 function in human epidermal  
inflammation and keratinization  
第 40 回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総  
会、2015 年 12 月 11 日、岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 奈央 (SAITO, Nao)  
旭川医科大学・医学部・研究生  
研究者番号：90736670