

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10127

研究課題名(和文)皮膚三次元モデルを用いた尋常性乾癬におけるHippo-Yes-YAP経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the Hippo-Yes-YAP pathway in psoriasis vulgaris using a three-dimensional skin model

研究代表者

古元 礼子(FURUMOTO, Hiroko)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70311818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、Hippo-Yes-YAP経路の皮膚炎症性増殖性疾患である尋常性乾癬の病態への関与と表皮角化細胞の増殖・分化における役割について研究した。その結果、Hippo経路分子と炎症性サイトカインシグナルに関係が認められた。本研究成果は皮膚角化細胞の炎症と増殖にHippo経路の関与を示唆し、尋常性乾癬の病態の一因の解明につながるという。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hippo-Yes-YAP経路は発生期において、形態形成、多分化能獲得、幹細胞らしさに関わっているが、YAPの炎症性増殖性疾患への関与も報告されていた。本研究では慢性炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬に注目し、Hippo-Yes-YAP経路の乾癬の病態への関与について研究した。乾癬は日本人の約0.1%に発症するとされ、発症頻度は低い、20代と40代の若年層に好発し、慢性に経過して増悪と軽快を繰り返すことから、青年期、壮年期の患者にとっては、日常生活や社会生活に支障をきたす重大な問題となりうる。よって、本研究成果によって、新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of the Hippo-Yes-YAP pathway in the pathogenesis of psoriasis vulgaris, a skin inflammatory proliferative disease. We also revealed the role of Hippo pathway on the epidermal keratinocyte proliferation and differentiation. As a result, a relationship was found between Hippo pathway molecules and inflammatory cytokine signals. The results of this study suggest the involvement of the Hippo pathway in the inflammation and proliferation of skin and may lead to the elucidation of the cause of the pathophysiology of psoriasis vulgaris.

研究分野：生化学

キーワード：尋常性乾癬 Hippo経路

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬(乾癬)は、被髪頭部や四肢伸側など物理的刺激を受けやすい部分に厚い鱗屑と境界明瞭な紅斑が好発する慢性炎症性皮膚疾患である。病理組織学的には表皮肥厚、錯角化、真皮の炎症性細胞浸潤と真皮乳頭層の血管拡張が認められる。原因は遺伝的要因、外的(環境的)要因、免疫学的要因など複数の発症要因が考えられている。特に、遺伝的要因としては、HLA と *CCHCR1* (coiled-coil alpha-helical rod protein 1)の遺伝子多型が報告され、人種間で発症頻度の差が認められる。日本人の約0.1%に発症するとされ、発症年齢は20代と40代にピークがある。治療は活性型ビタミンD3 やステロイド外用剤、重症例では免疫抑制剤や生物製剤(TNF- α 抗体など)が用いられるが、慢性に経過して増悪と軽快を繰り返すことから、青年期、壮年期の患者にとっては、日常生活や社会生活に支障をきたす重大な問題となりうる。

一方、Hippo-Yes-YAP 経路は発生期において、形態形成、多分化能獲得、および幹細胞らしさ(stemness)に関わっている。本経路のエフェクターであるYes-associated protein (YAP) と WW-domain transcription 1(WWTR1/TAZ)は転写因子 TEAD のコファクターとして標的遺伝子の発現を誘導し、組織の発生・再生過程において重要な役割を果たしている。YAP/TAZ は Wnt-signaling や EGF、機械的刺激などにより活性化され、転写因子 TEAD を介した遺伝子発現調節を行う(図1)。哺乳類では、Hippo タンパク質(Mst)が LATS リン化酵素を活性化し、LATS によって YAP/TAZ が不活性化される。

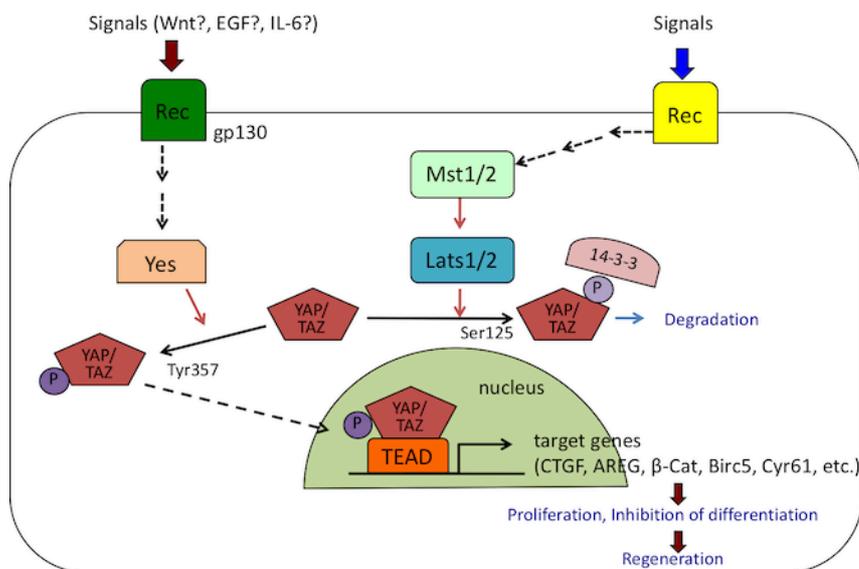


図1 Hippo シグナル経路の概略

Hippoシグナル経路により、リン酸化を受けたYAPは細胞質に留まり、分解を受ける。一方、増殖因子系のシグナルによりリン酸化を受けたYAPは核内に移行し、標的遺伝子の発現が調節される。

CTGF; connective tissue growth factor, AREG; amphiregulin,
Birc5; vacuoviral IAP repeat-containing protein 5, Cyr61; Cystein-rich protein

最近の知見として、IL-6 受容体の gp130 を介して、YAP が腸の炎症と上皮再生を促進することが報告され、Hippo 経路の炎症性増殖性疾患への関与が注目されている。よって、慢性炎症性皮膚疾患の乾癬においても、Hippo 経路が病態に関与する可能性が考えられる。

申請者らは既に、皮膚の創傷治癒過程で YAP が誘導され、創傷治癒を促進することを示しており (Lee MJ, *J Invest Dermatol*,2014)、皮膚の炎症と再生にも YAP が関与していると考えられる。また、申請者らの研究成果により、メダカの YAP 遺伝子欠損体では、頭部、体部が扁平で、垂直方向の形態形成・維持が不可能となることが明らかとなった (Porazinski S et al. *Nature*,2015)。そのメカニズムとして、YAP の標的遺伝子である GTPase 活性化タンパク質の遺伝子発現を介して、細胞骨格の形成に重要なアクチンとフィブロネクチンの相互作用を制御することが証明された。

2. 研究の目的

Hippo-Yes-YAP 経路が発見されて 10 年になるが、本研究の目的はこれまでに解明されていない、Hippo-Yes-YAP 経路の皮膚炎症性増殖性疾患である尋常性乾癬の病態への関与と表皮角化細胞の増殖・分化における役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究目的の達成のために、まず、正常皮膚と乾癬病変部を用いて免疫染色を行い、Hippo-Yes-YAP 経路の関連分子の発現を検討した。次に、皮膚培養細胞を用いて、培養条件による Hippo-Yes-YAP 経路の活性化状態の変化を検討した。さらに、皮膚培養細胞の二次元培養と三次元培養系で、乾癬の病態に関わる分子と Hippo-Yes-YAP 経路の関係について検討した。

4. 研究成果

(1) 乾癬病変部における YAP/TAZ の発現

病理組織診断の目的で採取済みの尋常性乾癬病変部のパラフィン包埋切片を用い、YAP/TAZ に対する特異抗体で免疫染色を行った。対照には良性腫瘍摘出標本のパラフィン包埋切片の末端正常組織を使用した。正常組織では基底細胞層に YAP が核に染まる細胞が散見された。一方、乾癬病変部では基底細胞層のほとんどの細胞で YAP が核に染まり、有棘層細胞では細胞質と核に YAP の局在が確認された。また、角層直下の2、3層の錯角化細胞では核に YAP の染色性が確認された。TAZ も YAP と同様の染色性が確認された。以上の結果より、乾癬病変部では YAP、TAZ の活性化によって、増殖に関わる標的遺伝子の発現が誘導されている可能性が示唆された。

(2) 各種培養細胞における3次元培養系の確立

各種培養細胞での3次元培養系を確立した。細胞の種類と実験目的に応じて、低接着プレート各種を使用して条件設定を行った。正常ヒト表皮角化細胞由来の樹立細胞 (HaCaT 細胞) は細胞接着が強く、播種後 16 時間でスフェロイドが形成され、周囲にはケラチン様の固形物が確認された (図2左)。

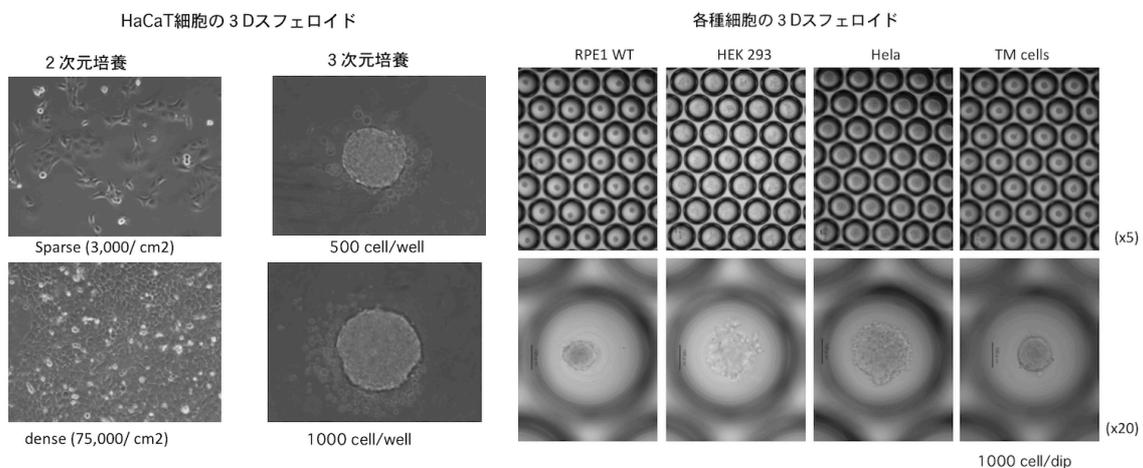


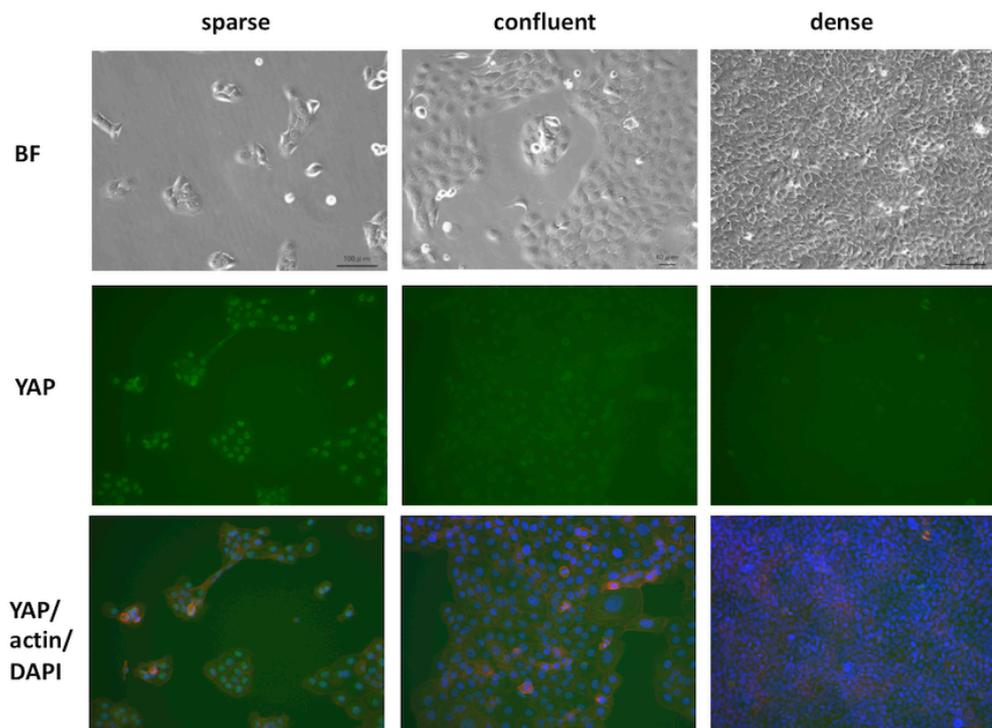
図2 HaCaT細胞と各種細胞の3次元培養

また、各種ヒト由来正常細胞を用いて3次元培養系を確立した。網膜色素上皮細胞(RPE1 細胞)、HEK293 細胞、Hela 細胞、線維柱帯網細胞 (trabecular meshwork cell: TM cell 初代培養) で形成されたスフェロイドを示す(図2右、METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, The Hippo Pathway, 14. Studying YAP- Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids. に掲載)。これら3次元培養の維持についても検討した。一度最終分化した正常細胞由来の HaCaT 細胞、RPE1 細胞、線維柱帯網細胞ではスフェロイドの長期間維持ができなかった。一方、がん細胞由来の Hela 細胞と胎児細胞由来の HEK293 細胞で作製したスフェロイドは、長期間維持することが可能で、増殖傾向も認められた。

(3) 正常皮膚表皮角化細胞における YAP/TAZ の発現と局在

成人ヒト正常表皮角化細胞由来の培養細胞 HaCaT 細胞を2次元培養し、各種細胞密度で免疫蛍光抗体法を行い、YAP/TAZ の発現と局在を検討した。HaCaT 細胞を3種類の細胞密度、sparse (3,000/cm²)、confluent (15,000/cm²)、dense (75,000/cm²)で播種し、48 時間培養した。4%パラホルムアルデヒド固定し、特異抗体による免疫蛍光抗体染色 (YAP:CST #14074, TAZ/WWTR1:Sigma HPA7415, E-Cadherin: CST #14472) と actin 染色 (Molecular Probe AlexaFluor 546-Phalloidin)を行ない、蛍光顕微鏡(キーエンス、BZ9000)で観察した。細胞密度が sparse (疎)の状態では、YAP/TAZ は強く発現し、核に局在が確認されたが、細胞密度が高くなるに従い発現が低下した。confluent では YAP/TAZ は核と細胞質に認められたが、dense (密)では発現がほとんど認められず、細胞膜に局在した。細胞接着の構成分子 E-Cadherin は細胞密度が高くなるに従い発現し、dense (密)では細胞膜に局在が確認され、細胞接着の成熟に伴い、YAP/TAZ が細胞膜に局在することが示唆された(図3)。

HaCaT 細胞の3次元培養において、同様に YAP の発現と局在を検討した。HaCaT 細胞を 96 ウェル低接着プレートに 1000/well で播種し、24 時間後に形成されたスフェロイドを回収し、免疫染色を行った。YAP は3D スフェロイドの表面で発現が認められたが、局在は細胞質と細胞膜に認められた。



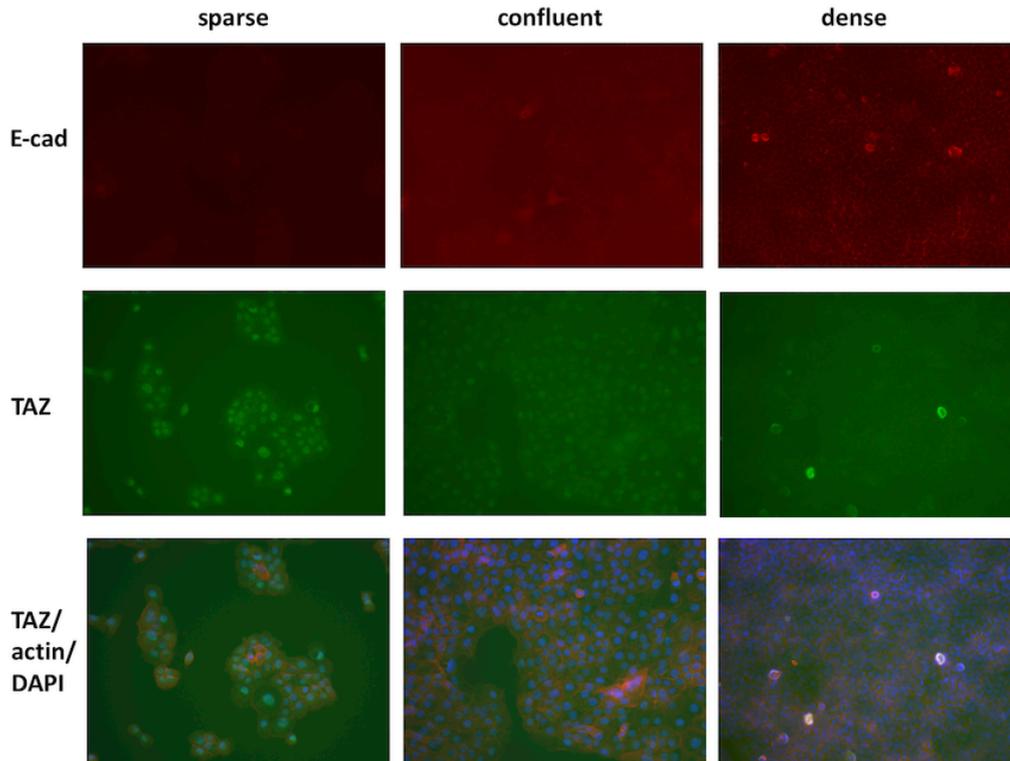


図3. 細胞密度による YAP/TAZ の発現と局在の変化

(4) 正常表皮角化細胞における Hippo 経路分子の発現

各種細胞密度で YAP/TAZ のタンパク質発現量とリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した。YAP の発現量は2次元培養では細胞密度の上昇とともに増加したが、3次元培養では減少した。リン酸化状態については、YAP は細胞密度に依存してリン酸を受け、3次元培養でリン酸化 YAP は著しく増加していた。YAP は核へ移行して転写因子のコアクチベーターとして働くが、リン酸化を受けると YAP は 14-3-3 と結合して細胞質に留まり、プロテアソーム分解系に運ばれ、核移行しない。よって、本実験の結果は YAP の免疫染色の結果と一致した。TAZ の発現量とリン酸化状態も YAP と同様に細胞密度依存性に制御されていたが、TAZ は3次元培養では発現が殆ど確認されなかった。また、細胞接着に関わる分子の E-Cadherin (接着接合を構成する) や NF2/Merlin のタンパク質発現量も細胞密度依存性に増加することが確認された。以上より、細胞密度と細胞接着の形成とともに、Hippo 経路が活性化し、YAP/TAZ が不活性化することが示唆された。

(5) YAP/TAZ の活性化と尋常性乾癬関連因子の連関

YAP/TAZ の下流の標的遺伝子の発現と乾癬に関わるサイトカインの遺伝子発現を RT-PCR で解析した。細胞密度が疎の状態では YAP の活性化による YAP 標的遺伝子の発現上昇が認められた。一方、3次元培養の 3D スフェロイドでは YAP が不活性化され、YAP 標的遺伝子の発現が低下していた。同時に炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析し、Hippo 経路と炎症性サイトカインシグナルに関係が認められた。本研究成果は皮膚角化細胞の炎症と増殖に Hippo 経路の関与を示唆し、尋常性乾癬の病態の一因の解明につながるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 Hergovich, Alexander 他 (分担) Yoichi Asaoka, Hitoshi Morita, Hiroko Furumoto, Carl-Philipp Heisenberg, and Makoto Furutani-Seiki</p>	<p>4. 発行年 2018年</p>
<p>2. 出版社 Humana Pr Inc</p>	<p>5. 総ページ数 268</p>
<p>3. 書名 The Hippo Pathway : Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) 14. Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清木 誠 (SEIKI Makoto) (50226619)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	