

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10135

研究課題名(和文) 表皮角化細胞の分裂・増殖に対するIL-33の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of IL-33 function for cell division and proliferation in normal human epidermal keratinocytes

研究代表者

津田 英利 (Tduda, Hidetoshi)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：30414923

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)：細胞内のIL-33を、siRNAを用いて表皮角化細胞(NHEKs)においてノックダウン(KD)させると、2核の細胞が増え、細胞増殖が悪くなることが解った。これは細胞質分裂時に必要な細胞収縮環の機能が低下し、細胞分裂が正常に行われなことが原因であることが、タイムラプス撮影により明らかとなった。一方IL-33を強制発現させて細胞増殖やUVBに対する耐性を検討してみたが、明らかな違いは認められなかった。乾癬病態に対するIL-33の役割を検討するためにイミキモド誘導性モデルマウスを用いて検討を行った。そうするとIL-33ノックアウトマウスでは炎症が有意に減少することが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、喘息の悪性因子としてTh2やILC2を活性化するサイトカインとしての報告が多く、皮膚科学領域においてもアトピー性皮膚炎や乾癬の重症度血中濃度が相関するという報告が見られる。これまでも核内転写因子として働くとする報告はいくつか見られたが、細胞機能の変化まで見た報告はこれまでは無い。今回新たにIL-33の機能を見つけたことは、学術的には非常に意義があることであり、疾患治療のターゲットとしてマルチな効果を発揮するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： IL-33 is expressed in nucleus of epithelial and endothelial cells, and knockdown of IL-33 increased binucleated cells and decreased cell proliferation in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs). This cause was to attenuate function of contractile ring for cytokinesis. Time laps observation revealed that cell division failed to cytokinesis. In the other hand, IL-33 expression plasmids which expressed various length of IL-33 were transfected to NHEKs, and it was irradiated UVB. IL-33 transfected NHEKs did not gain the tolerance for UVB. And addition, IL-33 transfected cells did not obtain cell proliferation. In order to examine the function of IL-33 against to psoriasis, it was investigated imiquimod induced mouse model. Imiquimod induced inflammation was significantly reduced in IL-33KO mice.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ケラチノサイト IL-33 細胞分裂 細胞増殖 乾癬 siRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-33はIL-1ファミリーに属するTh2タイプのサイトカインである。主に上皮系、内皮系の細胞の核内に発現しており、最初の報告では内皮細胞の核内タンパク質として報告され、そのアミノ酸配列の相同性より、後にST2Lを受容体とするサイトカインIL-33と同定されたタンパク質である。シグナル配列を有していないため、能動的に細胞外へ分泌されることは無く、ネクローシス等の細胞破壊が起こることによって細胞外へ放出されるため、「アラミン」としても分類されている。サイトカインとしての働きとしては、喘息の増悪因子として報告が最初であり、その他肺疾患や心臓疾患との関連についても報告されている。炎症性皮膚疾患においても、アトピー性皮膚炎や乾癬の皮疹部の表皮細胞で発現が増加しており、同時に重症度と相関して血中濃度も上昇する、という報告がある。一方細胞内では、核内に存在しクロマチンに結合することが報告されている。転写因子NF κ Bと相互作用することにより、転写調節に関わっているという報告もある。しかしこの報告も、NF κ Bを阻害するという報告と、促進するという、相反する報告がなされている。現時点では細胞内でのIL-33の機能についての報告は少数であり、IL-33の核内での詳細な機能は不明である。

2. 研究の目的

IL-33はIL-1ファミリーに属するTh2タイプのサイトカインである。上皮系、内皮系の細胞の核内に発現しており、最初の報告では内皮細胞の核内タンパク質として報告され、後にサイトカインIL-33と同一のものであると確認された。サイトカインとしては喘息の増悪因子としての報告が多く、その他肺疾患や心臓疾患との関連についても報告されている。炎症性皮膚疾患においても、アトピー性皮膚炎や乾癬の皮疹部の表皮細胞で発現が増加しており、同時に重症度と相関して血中濃度も上昇する、という報告がある。一方細胞内では、核内に存在しクロマチンに結合することが報告されている。転写因子NF κ Bと相互作用することにより、転写調節に関わっているという報告もある。しかし、まだ限られた報告しかされていないため、IL-33の核内での詳細な機能は不明である。

申請者はこれまでに、主に培養表皮角化細胞を用いてIL-33の発現動態や局在、細胞内機能について明らかにしてきた。1)IFN γ 及びOncostatinMによりSTAT1並びにSTAT3のパスウェイを介して発現が誘導されること、2)IL-33には様々なスプライスバリエーションが存在し、核だけではなく細胞質にも存在する可能性があること、3)IL-33をsiRNAによってノックダウンすると、細胞質分裂に異常が起こり、2核の細胞が増えること、等を明らかにし、学会報告を行った。しかし、発現誘導されたIL-33の細胞増殖への影響や、IL-33欠損による細胞質分裂障害のメカニズムの詳細はまだ明らかではない。そこで、本研究ではIL-33の表皮角化細胞における機能評価をすると共に皮膚疾患の病態との関わりについて明らかにすることを目的とする。

初めに、表皮角化細胞において、IL-33が発現誘導される意義について、さらに検討を行う。申請者は以前にサイトカイン以外の刺激であるUVBの刺激によって発現誘導されることを明らかにした。また表皮に創傷を受けた時にも誘導されることが報告されている。アトピー性皮膚炎や乾癬の表皮肥厚部に発現が多く見られることを臨床検体サンプルによって確認した。これらのことから申請者は、IL-33が表皮角化細胞の増殖や分化に関与しているのではないかと予想している。そこで、IL-33を強制発現させた細胞を用いて細胞の増殖能や、UVBに対する耐性が上がるか否かについて、MTTアッセイやいくつかのcell proliferationアッセイを組み合わせて検討を行う。その際には、全長のIL-33の他に、これまで申請者がその存在を明らかにした、スプライスバリエーションを用いて、核内での発現が重要なのか、細胞質に存在する必要があるのか、細胞内局在と合わせて比較検討していく予定である。

また、IL-33をノックダウンした表皮角化細胞の2核化の詳細について検討を行う。これまでに、IL-33ノックダウン細胞では、アクチン重合とミオシンのリン酸化に必須である、Ect2と活性型RhoAが減少していることを明らかにした。この為細胞収縮環の形成不備が起こり、細胞質分裂が正常に行われないと予想される。しかし、実際に細胞分裂の様子を観察していないため、完全な分裂が出来ずに2核になるのか、それとも別々の細胞が「融合」して2核になるのか、いずれの可能性も考えられる。そこで、IL-33をノックダウンした表皮角化細胞を顕微鏡による長時間のタイムラプス観察をすることにより、どの様な経緯を辿って2核になるのか検討を行う。細胞収縮環形成にはアクチン重合と、アクチンを動かすモーターであるリン酸化ミオシンが必須である。リン酸化ミオシンが減少していることは明らかにしたが、アクチンの重合についてはまだ詳細に検討が出来ていない。そこで免疫染色や、アクチン重合度の測定キット等を用いて、ノックダウンにより重合度に変化があるか否か検討を行う。また細胞収縮環の形成がIL-33のノックダウンによってどの様に異常になるのか、構成因子の蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に検討を行う。その際、細胞収縮環だけではなく、Ect2、RhoA等の関連因子の細胞内局在の変化についても、同様に観察する。

3番目に、動物を用いた炎症性皮膚疾患モデルにおける、IL-33の病態への関連について検討を行う。アトピー性皮膚炎や乾癬の皮疹部では、正常部と比べてIL-33の発現が亢

進していることを確認している。この過剰発現した IL-33 が、細胞外へ出てサイトカインとして働くことが重要なのか、細胞内にて細胞に機能変化をさせることが重要なのか、もしくは両方が関与しているのか、明らかではない。申請者の所属する研究室では、IL-33 のノックアウトマウスと、IL-33 の可溶性デコイレセプターである ST2 を過剰発現させた、ST2 トランスジェニックマウスを繁殖、飼育している。そこで、これらの 2 系統の遺伝子改変マウスを用いて、イミキモドクリームを用いた乾癬モデルを作成し、表皮肥厚の度合いを比較し、乾癬病態への IL-33 の細胞内外の役割を解明し、新たな乾癬治療法の開発の為の知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) IL-33 強制発現によるケラチノサイトへの影響の評価

IL-33 の完全長 (IL-33F)、核移行シグナル及びクロマチン結合モチーフを持たない IL-33 Δ 3、IL-33 Δ 34、核移行シグナルは持っているが、IL-1 ドメインが欠如している IL-33 Δ 78 を、それぞれ EF1 α プロモーターを持つ発現ベクターへクローニングし、NHEKs へトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に 300mJ の UVB に曝露し、細胞の形態や IL-33 の局在の変化、cell proliferation について検討を行った。細胞の形態は顕微鏡にて目視にて観察し、IL-33 の局在は固定後に免疫染色して蛍光顕微鏡にて観察を行った。cell proliferation については MTT アッセイにて評価を行った。

2) IL-33 をノックダウンしたときの NHEKs の分裂の様子を観察するために、タイムラプス撮影を行った。コントロールもしくは IL-33 に対する siRNA をケラチノサイトにトランスフェクションし、十分に効果が出ていると思われる 24 時間後に顕微鏡にセットし、8-12 時間撮影を行った。撮影したデータをつなげて動画データとして、コントロール細胞と IL-33 ノックダウン細胞の分裂の違いについて比較を行った。

3) BALBc バックボーン of IL-33 ノックアウトマウス (IL-33KO マウス) 及び ST2 トランスジェニックマウス (ST2Tg マウス) のそれぞれの背中の毛をバリカンと除毛クリームを用いて除毛した後、62.5mg/匹のイミキモド (IMQ) 含有クリーム (ベセルナクリーム、持田製薬) を毎日背中と耳に塗布した。Vehicle としては白色ワセリンを同量用いた。連日塗布前に耳介厚を測定し、炎症度の目安とした。処置後 7 日目に IMQ 処置した耳及び背中の皮膚並びに全血を回収した。全血からは血清を回収し、IL-17A 及び IL-22 を測定した。耳及び背中の皮膚は病理切片用にホルマリン固定したものと、RNA 抽出用に RNAlater に入れたものを作成した。後日 RNAlater 保存しておいた試料から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によって各遺伝子の発現量を比較した。

4. 研究成果

1) IL-33 強制発現による細胞保護効果の検討

完全長の IL-33 (IL-33F) をはじめ、核移行シグナルやクロマチン結合モチーフを持たないバリエーション (IL-33 Δ 3、IL-33 Δ 34)、IL-1 モチーフを持たないが核内には存在するバリエーション (IL-33 Δ 78) をそれぞれ発現するプラスミドを NHEKs にトランスフェクトした。トランスフェクション効率はだいたい 50-60%程度であった。トランスフェクション 24 時間後に UVB を 300mJ 照射し、その後の細胞形態、cell proliferation、IL-33 の局在の変化などを観察した。そうしたところ、いずれの IL-33 のトランスフェクションした細胞でも empty vector をトランスフェクションした細胞と、形態や cell proliferation 共に有意な差はなかった。また UV 照射後の各トランスフェクションした IL-33 については局在の変化は認められなかった。

2) IL-33 をノックダウン後、タイムラプス観察にて NHEKs の細胞分裂の様子を観察した。その結果、コントロール siRNA をトランスフェクションしたコントロール細胞では、約 35 分後には細胞収縮環によってくびれが出来、その後 2 つの細胞に分裂していったが、IL-33KD 細胞では細胞収縮環の出現がコントロール細胞よりも遅くまた 2 つの細胞に分かれるのも不十分であった。その後 2 細胞に分裂しようとするものも細胞質が完全に分かれることはなく、最終的には一つの細胞へと戻っていく様子が観察できた。この事により、IL-33 が不在になることによってアクチン-ミオシンのレギュレーションが不完全となり、細胞収縮環の機能異常が起こり、細胞分裂が正常に行われないことが実際に確認出来た。

3) マウスに連日 62.5mg/匹の IMQ を塗布することによって乾癬様皮疹を誘導した。処置開始日を Day0 として最終日を Day6 とした。このとき野生型及び IL-33KO マウスの耳介厚を比較すると、その厚みは塗布開始から Day5 まではほぼ同じ厚みで推移した。しかし最終の Day6 では IL-33KO マウスの方が有意に減少した。そこで、Day5 と Day6 の血清と皮膚組織を採取した。血清中の乾癬で重要なサイトカインの一つである IL-17A を測定したところ、Day5 では野生型と IL-33KO マウスの間では有意な差はなかったが、Day6 では IL-33KO マウスの方が有意に低く、vehicle とほぼ同じ程度であった。そこで炎症メディエーターの一つであるマスト細胞について、トルイジンブルー染色を行い、野生型と IL-33KO マウスとの間でその数を比較した。そうすると Day5 と Day6 で大きな違いはなかったが、Day6 において IL-33KO マウスでは有意に野生型マウスと比べてマスト細胞の数が減少することが解った。一方、ST2Tg マウスにおいても同様に比較したが、ST2Tg

マウスでは Day6 にて野生型と比較すると耳介厚は低くなる傾向は見られたが、有意な差では無かった。またマスト細胞の数も野生型と比較して優位な差は見られなかった。また血清中の IL-17A の濃度も野生型と比べて差は見られなかった。これらのことから乾癬病態においては、サイトカインとしての IL-33 の機能より、細胞内の IL-33 の機能の方が重要では無いかと考えられる。今後さらに詳細な検討を行い、どの組織、細胞の IL-33 の発現が重要なのか明らかにしたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 1) Adachi A., Komine M., Murata S., **Tsuda H.**, Kawahara Y., Morimoto A., Ohtsuki M. (2016) Pediatric case of microscopic polyangitis with skin manifestations resembling vesiculobullous type erythema elevatum diutinum with immunoglobulin A antineutrophil cytoplasmic antibody. *J Dermatol* 43 (11) 1377-1378 DOI: 10.1111/1346-8138.13394 査読あり
- 2) Oshio T., Komine M., **Tsuda H.**, Tominaga S., Saito H., Nakae S., Ohtsuki M. (2017) Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice. *J Dermatol Sci* 85 (2) 106-114, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.008 査読あり
- 3) **Tsuda H.**, Komine M., Tominaga S., Ohtsuki M. (2017) Identification of promoter region of human IL-33 responsive to induction by IFN . *J Dermatol Sci* 85 (2) 137-140, DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.11.002 査読あり
- 4) Maki N., Komine M., **Tsuda H.**, Fujita Y., Fujita E., Murata S., Demitsu T., Utani A., Ohtsuki M. (2018) Diagnosis of pseudoxanthoma elasticum in a 4-year-old boy. *J Dermatol* 45 (2) 244-246 DOI: 10.1111/1346-8138.13805 査読あり
- 5) Ueda Y., Komine M., Kamiya K., **Tsuda H.**, Maekawa T., Murata S., Ohtsuki M. (2018) Generalized pustular psoriasis in a 92-year-old man with homozygous nonsense mutation in IL36RN. *J Dermatol* 45(3) 326-328, DOI: 10.1111/1346-8138.14132 査読あり
- 6) Adachi A., Komine M., **Tsuda H.**, Nakajima S., Kabashima K., Ohtsuki M., (2018) Differential expression of alarmins: IL-33 as a candidate marker for early diagnosis of toxic epidermal necrolysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* Jun; 7 (1): 325-327 doi: 10.1016/j.jaip.2018.05.037 査読あり
- 7) Jin M., Komine M., **Tsuda H.**, Oshio T., Ohtsuki M. (2018) Interleukin-33 is expressed in the lesional epidermis in herpes virus infection but not in verruca vulgaris. *J Dermatol* 45 (7) 855-857, Apr 25. doi: 10.1111/1346-8138.14334 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki; The loss of nuclear IL-33 affects cell division of normal human keratinocyte, 46th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 7-10 September 2016, Munich, Germany
- 2) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Meijuan Jin, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki; IL-33 is essential in cell division of normal human epidermal keratinocytes in transient knock-down experiment, 第 39 回日本分子生物学会年会、11 月 30 日-12 月 2 日, 2016 横浜、神奈川
- 3) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Meijuan Jin, Naomi Nakano, Shin-ichi Tominaga, Mikio Masuzawa, Mamitaro Ohtsuki ; Analysis of Oncostatin M signaling in hemangiosarcoma cell line and regulation of IL-33 expression, 第 41 回日本研究皮膚科学会年次学術大会、12 月 6 日-12 月 9 日、2016、仙台、宮城
- 4) Hidetoshi Tsuda, Tomoyuki Oshio, Mayumi Komine, Shin-ichi Tominaga, Mamitaro Ohtsuki; Nuclear IL-33 promotes wound healing by sustaining cell division and motility through regulating actin filament re-construction, 76th Annual Meeting, Society for Investigative Dermatology, 26-29 April, 2017, Portland
- 5) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Mamitaro Ohtsuki; STAT3 activation causes IL-33 expression in normal human epidermal keratinocyte, 47th Annual European

Society for Dermatological Research Meeting, 27-30 September, 2017, Salzburg, Austria

6) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Mamitaro Ohtsuki; Temporal disappearance of nuclear IL-33 suppresses cell division in normal human epidermal keratinocyte, 生命科学系学会合同年次大会, 第40回日本分子生物学会, 12月6日-12月9日, 2017, 神戸、兵庫

7) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Susumu Nakae, Mamitaro Ohtsuki; Characterization of imiquimod induced psoriasis for IL-33 knockout mouse, 第42回日本研究皮膚科学会年次学術大会, 12月15日-12月17日, 2017, 高知、高知、

8) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Mamitaro Ohtsuki; TNF α suppressed IL-33 expression induced by STAT1 and STAT3 dependent signal, International Investigative Dermatology 2018, 16-19 May, 2018, Orland Florida

9) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Mamitaro Ohtsuki; TNF α suppresses IL-33 expression in normal human epidermal keratinocyte through induction of Fli1, 第41回日本分子生物学会年会, 11月28日-11月30日, 2018, 横浜、神奈川

10) Hidetoshi Tsuda, Mayumi Komine, Tomoyuki Hioki, Susumu Nakae, Mamitaro Ohtsuki; IL-33 determines the type of inflammation in psoriasis mice model, 3rd Inflammatory Skin Disease Summit, 12-15 December, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。