

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10219

研究課題名(和文) 警告因子活性化による皮膚疾患の機能ゲノム解析

研究課題名(英文) Functional genomic analysis of skin disorders with alarmin activation

研究代表者

山西 清文 (Yamanishi, Kiyofumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

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)：スタート魚鱗癬5例、掌蹠角化症14例、炎症性角化症2例について遺伝子を解析し、16例で変異を同定した。NFKB2変異では表皮におけるNFKB2の核移行障害を示し、ABCA12、NIPALおよびSLURP1変異の表皮で警告因子カルプロテクチンの発現増強を明らかにした。RNA Seqにより、Tgm1欠損マウスにおいて警告因子として新たにフェチュインの発現誘導を見いだした。また、警告因子IL-33の発現増加で誘導されるアトピー性皮膚炎の免疫病態には2型自然リンパ球が不可欠であること、好塩基球を介して皮膚炎が増強されることを実験的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外界からのさまざまな侵襲や皮膚のバリア障害によって表皮がストレスに曝されると、角化細胞から複数の警告因子(アラミン)が放出され、生理的な修復反応や自然免疫系の炎症反応が誘導される。本研究では角化症およびアトピー性皮膚炎等を研究対象として、皮膚におけるアラミンの発現と病態についてRNA-seq等を用いて機能ゲノム学的に解析した。その結果、皮膚におけるカルプロテクチン、フェチュイン、インターロイキン33等のアラミンの活性化が持続すると皮膚の恒常性維持が困難になり、表皮の肥厚、角層増生、皮膚炎等の病的状態を誘導し、難治性皮膚疾患の病態形成に至ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Causative mutations were identified in 16 cases of patients with ichthyosis (5 cases), palmoplantar keratoderma (14 cases) and inflammatory keratinization disorder (2 cases). Defects in nuclear localization of NFKB2 in the epidermal keratinocytes were found in a case with NFKB2 mutation, and the up-regulated calprotectin in the epidermis was observed in cases with ABCA12, NIPAL4 or SLURP1 mutation. RNA Seq revealed the expression of the fetuin genes, a novel alarmin, in the epidermis of Tgm1 knockout mice. Furthermore, atopic dermatitis induced by IL-33 overexpression in the skin is demonstrated to be dependent on type 2 innate lymphoid cells and is also mediated by basophils. Thus, alarmins in the epidermis are possibly involved in various pathological conditions of the skin.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アラミン 角化症 アトピー性皮膚炎 遺伝子変異 病態モデルマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外界からのさまざまな侵襲や皮膚のバリア障害によって表皮がストレスに曝されると、角化細胞から複数の警告因子(アラミン)が放出され、生理的な修復反応や自然免疫系の炎症反応が誘導される。これらの反応の持続は、皮膚の自律的な制御機構を越えて難治性皮膚疾患の病態に深く関与すると推測される。これまでに、研究代表者らはトランスグルタミナーゼ1欠損マウス(Tgm1K0)、トランスグルタミナーゼ1に変異を持つ常染色体劣性魚鱗癬の皮膚において、S100A8/S100A9コンプレックス(カルプロテクチン)をはじめ、複数の警告因子の発現が強く誘導されることを見いだしてきた(文献 )。また、表皮に存在する警告因子であるインターロイキン33の発現増強によりアトピー性皮膚炎の免疫病態が誘導されることを明らかにしてきた(文献 、 )。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究実績に基づいて、皮膚における警告因子によって活性化される分子システムの探索を通じ、角化異常症およびアトピー性皮膚炎等の皮膚疾患の病態を理解するための新たなパラダイムを提唱することを目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 兵庫医科大学遺伝子組換え実験安全委員会(課題番号23012;29007;214012;217015)および動物実験委員会の承認(承認番号B09-251;13-001;15-067;18-002)のもとに、IL-33を皮膚特異的に発現するマウスhK14mIL33tg(IL33tg)、Tgm1遺伝子を欠損するTgm1K0を作成し、実験に用いた。

(2) マウス皮膚あるいは表皮のRNASeqはBGI Japanに委託した。RNASeqのfastqデータはGeneSpring(Agilent社)を使用して解析した。

(3) マウス皮膚の免疫組織化学にはウサギ抗マウスFetuin-A抗体(Sino Biological 50093-R022)および抗マウスFetuin-B抗体(Thermo Fisher Sci. PA5-29468)、VECTASTAIN Universal Quick Kit(Vector社)を用いた。

(4) 角化症等における原因遺伝子、遺伝子発現の解析は、兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認(倫比第32号、34号)のもとに、対象者の文書同意を得て実施した。疾患遺伝子解析は、患者DNAをサンガー法によるダイレクトシーケンシングあるいは次世代シーケンシング(NGS)により実施した。DNAライブラリーの作成とNGS機器によるfastqデータの作成はBGI Japanに委託した。データはSureCallあるいはStrandNGSによりヒト参照配列hg19にアラインメントし、変異候補の選択を行った。

(5) IL33tgの免疫学的解析は(文献 、 )に準じて実施した。

(6) ヒト凍結皮膚組織あるいはパラフィン切片からの RNA の抽出は NucleoSpin TotalRNA FFPE XS (TAKARA) で行い、cDNA の調製には Primescript II RT-PCR kit を用いた。Multiplex PCR には、Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (TAKARA) と、プライマー GACTCCTCCGAACACAGAGC、TTGTAGGACTCAGGGTTACCA 等を使用し、Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent) で増幅産物のサイズを同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 角化症における疾患遺伝子変異の同定と変異の特性解析

研究期間中に、魚鱗癬 5 例、掌蹠角化症 14 例、炎症性角化症 2 例を対象に、exome 解析を含め、遺伝子変異の解析を実施した。そのうち、16 例について疾患の原因となる変異を同定した。内訳は、SERPINB7 10 例、ABCA12、ALOX12B、CERS3、KRT1、NFKB2、SLURP1 各 1 例であった。

NFKB2 遺伝子の変異については、NFKB2 抗体を用いた免疫組織化学によって患者表皮における NFKB2 の核移行障害を証明した。この疾患に伴う皮膚炎の病態については、NFKB2 の活性化不全によって警告因子を含む遺伝子発現調節が障害され、皮膚における自己炎症性反応が誘導されて乾癬様の皮膚炎を発症すると考えた。

##### (2) 角化症における警告因子の発現

研究代表者らは、これまでトランスグルタミナーゼ 1 欠損マウス表皮およびトランスグルタミナーゼ 1 変異が同定された魚鱗癬の病変部において警告因子であるカルプロテクチン等の発現が増加することを報告したが、上記および過去に原因遺伝子の変異を同定できた魚鱗癬と掌蹠角化症を対象に、カルプロテクチンの発現を免疫組織化学で検討した。その結果、ABCA12 変異、NIPAL4 変異をもつ先天性魚鱗癬の表皮、SLURP1 変異を持つ掌蹠角化症の表皮でカルプロテクチンの発現が増強することを見いだした。今回の研究によって、原因遺伝子が異なる他の角化症の表皮においても警告因子であるカルプロテクチンの発現が誘導されることが明らかになった。このことは、遺伝子変異による表皮の持続的な機能不全が警告因子の発現増加を招来し、それによって自律的な表皮肥厚、角層増生という角化症特有の病態に繋がることを示唆された。今後、警告因子の発現誘導に関わるシグナル伝達機構の解明により、角化症の新たな治療薬開発につながると期待される。

##### (3) RNA Seq による新規表皮機能分子の探索

角化症モデルであるトランスグルタミナーゼ 1 (Tgm1) 欠損マウスおよび対照野生型マウスの表皮を対象に RNA Seq を実施し、表皮で発現する遺伝子のトランスクリプトームを比較した。その結果、Tgm1 欠損に伴って発現が誘導される新たな遺伝子ファミリーとして Fetuin 遺伝子群を検出した。免疫組織化学では、表皮の顆粒層最上層と角層における発現増加が観察された(図 1)。この遺伝子ファミリーの表皮における機能については国際的にも報告がないが、他の臓器では

TLR4 の内因性リガンドとして作用することが知られており、TLR4 は炎症性シグナル経路を活性化することから、警告因子としての fetuin の機能が示唆される。

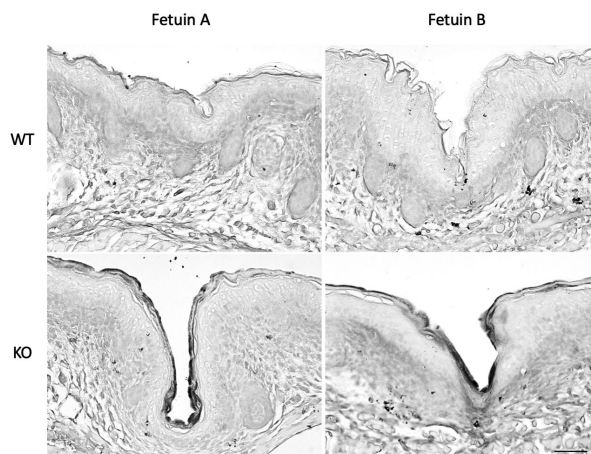


図1. Tgm1 KO表皮におけるfetuin A、fetuin Bの局在。  
野生型マウス (WT)、Tgm1 KO (KO)。Bar = 50  $\mu$ m

表皮における fetuin A、B の発現誘導は、表皮の恒常性維持や皮膚疾患の病態に関わる新たなシステム解明の手がかりになると期待される。

#### ( 4 ) 警告因子 IL-33 の活性化による免疫病態の特性

IL-33 は Th2 型免疫反応を誘導するサイトカインである。表皮で発現が増加すると、アトピー性皮膚炎に酷似した皮膚炎の発症を誘導する(文献 )。IL-33 で誘導される免疫反応において 2 型自然リンパ球が誘導されるが、Th2 細胞も IL-33 受容体を発現することから、皮膚炎の病態に Th2 細胞が関与することも考えられる。そこで、T 細胞を欠損する Rag2 ノックアウトマウスと IL-33Tg を交配し、IL-33Tg Rag2KO マウスを作出した。このマウスでは、IL-33Tg と同様にアトピー性皮膚炎の症状を発症することから、IL-33 で誘導される皮膚炎には Th2 細胞が不要と考えられる。一方、ILC2 を欠損する Staggerer マウスの骨髄を IL-33Tg に移植すると、皮膚炎の発症は抑制された。このことから、IL-33 によって誘導されるアトピー性皮膚炎には ILC2 が中心的な役割を果たすことが示唆された。好塩基球も IL-33 受容体を発現することから、好塩基球を抑制する抗 Fc  $\epsilon$  RI 抗体を投与すると、皮膚炎の発症が抑制された。以上より、表皮の IL-33 は ILC2 と好塩基球の活性化を誘導する警告因子として作用し、アトピー性皮膚炎の病態に関わることが示唆された。国内でも IL-4、IL-13 サイトカイン受容体抗体であるデュピルマブがアトピー性皮膚炎の治療に臨床応用されているが、今後、国際的にも IL-33 を治療標的とするアトピー性皮膚炎の新規治療薬の開発が期待される。

#### ( 5 ) アトピー性皮膚炎における IL-33 バリエーションの解析

ヒト皮膚組織 IL-33 cDNA の multiplex PCR を行い、アトピー性皮膚炎患者と健常人における IL-33 のスプライシングバリエーションを比較した。その結果、健常者では IL-33 mRNA var. 1 に相当する増幅産物が検出されるが、アトピー性皮膚炎の組織には症例によっては var. 1 ではなく、

主として var. 6 に相当するバンドが優位に検出された。このバリエーション var. 6 は、var.1 に比較して exon 5 からの転写産物の 5' 端が短い特徴がある。喘息の患者では、exon 3 と 4 を欠くバリエーションが病態と関連することが示唆されており、アトピー性皮膚炎における variant の機能的な差違と病態の関連については今後さらに研究を進めたい。

<引用文献>

Haneda Takashi, Imai Yasutomo, Uchiyama Ryosuke, Jitsukawa Ori, Yamanishi Kiyofumi. Activation of molecular signatures for antimicrobial and innate defense responses in skin with transglutaminase 1 deficiency, PLoS One, 11, 2016, e0159673.

Imai Yasutomo, Yasuda Koubun, Sakaguchi Yoshiko, Haneda Takashi, Mizutani Hitoshi, Yoshimoto Tomohiro, Nakanishi Kenji, Yamanishi Kiyofumi. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice, Proc Natl Acad Sci USA, 110, 2013, 13921-6.

Imai Yasutomo, Hosotani Yuka, Ishikawa Hiroto, Yasuda Koubun, Nagai Makoto, Jitsukawa Ori, Gomi Fumi, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro, Nakamura Takahiro, Yamanishi Kiyofumi. Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice, Sci Rep, 7, 2017, 10053.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai Yasutomo, Yasuda Koubun, Nagai Makoto, Kusakabe Minoru, Kubo Masato, Nakanishi Kenji, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 139
2. 論文標題 IL-33 Induced Atopic Dermatitis-Like Inflammation in Mice Is Mediated by Group 2 Innate Lymphoid Cells in Concert with Basophils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2185 ~ 2194.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kunisada Makoto, Yamanishi Kiyofumi, Nishigori Chikako	4. 巻 46
2. 論文標題 Japanese case of Mal de Meleda with a novel missense mutation of p.Thr52Ala in the second protruding finger of secreted Ly 6/uPAR related protein 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e235-e237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wada Yoshihiro, Kusakabe Minoru, Nagai Makoto, Imai Yasutomo, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Japanese case of Bothnian-type palmoplantar keratoderma with a novel missense mutation of p.Trp35Ser in extracellular loop A of aquaporin-5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e104 ~ e106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagai Makoto, Imai Yasutomo, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Psoriasisiform dermatitis associated with common variable immunodeficiency 10 due to an Arg853* mutation in the NFKB2 gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e24 ~ e26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryu Woo-In, Lee Hana, Bae Hyun Cheol, Jeon Jiehyun, Ryu Hwa Jung, Kim Jaehyung, Kim Ji Hyun, Son Ji Won, Kim JaeYoung, Imai Yasutomo, Yamanishi Kiyofumi, Jeong Sang Hoon, Son Sang Wook	4. 巻 90
2. 論文標題 IL-33 down-regulates CLDN1 expression through the ERK/STAT3 pathway in keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 313 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.02.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wada Y, Kusakabe M, Nagai M, Yamamoto M, Imai Y, Ide YH, Hirota S, Yamanishi K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Mild case of congenital ichthyosiform erythroderma with periodic exacerbation: Novel mutations in ABCA12 and upregulation of calprotectin in the epidermis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e282-e283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13976.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Washio K, Sumi M, Nakata K, Fukunaga A, Yamana K, Koda T, Morioka I, Nishigori C, Yamanishi K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Case of harlequin ichthyosis with a favorable outcome: Early treatment and novel, differentially expressed, alternatively spliced transcripts of the ATP-binding cassette subfamily A member 12 gene.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 950-953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13823.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Imai Yasutomo, Nagai Makoto, Yamamoto Masaaki, Yasuda Koubun, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro, Yamanishi Kiyofumi
2. 発表標題 Depletion of basophils alleviates ILC2-dependent atopic dermatitis-like inflammation in mice overexpressing interleukin-33 in the skin
3. 学会等名 The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和田 吉弘、草壁 みのり、永井 諒、山本 雅章、今井 康友、山西 清文
2. 発表標題 表皮カルプロテクチンの発現誘導を伴う新規ABCA12変異による軽症型魚鱗癬様紅皮症
3. 学会等名 第116回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Imai Yasutomo, Nagai Makoto, Kusakabe Minoru, Yasuda Koubun, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro, Yamanishi Kiyohumi
2. 発表標題 Ablation of basophils reduces ILC2-dependent atopic dermatitis-like inflammation in mice overexpressing interleukin-33 in the skin
3. 学会等名 IID2018国際研究皮膚科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imai Yasutomo, Yasuda Koubun, Kusakabe Minoru, Nagai Makoto, Nakanishi Kenji, Yamanishi Kiyofumi
2. 発表標題 Basophil-derived IL-4 aggravates ILC2-dependent atopic dermatitis-like inflammation in mice overexpressing IL-33 in the skin.
3. 学会等名 The 3rd international Conference on Innate Lymphoid Cells
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山西 清文
2. 発表標題 Bothnia型と考えた非表皮融解性掌蹠角化症の1例
3. 学会等名 第466回日本皮膚科学会大阪地方会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 永井諒、今井康友、山西清文
2. 発表標題 乾癬様皮疹を伴ったNFKB2遺伝子変異による分類不能型免疫不全症の1例
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山西清文
2. 発表標題 新生児の紅皮症
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹瀬玲奈，国定充，山西清文，錦織千佳子
2. 発表標題 SLURP1 遺伝子に新規ミスセンス変異を検出したMal de Meledaの1例
3. 学会等名 第83回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	今井 康友  (Imai Yasutomo)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永井 諒  (Nagai Makoto)		
研究協力者	坂口 祥子  (SAKAGUCHI YOSHIKO)		
研究協力者	實川 織江  (Jitsukawa Oriie)		
研究協力者	神山 狭織  (Kamiyama Saori)		