

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02833

研究課題名(和文)皮膚炎症と発癌：表皮Regnase-1の関与についての研究

研究課題名(英文) Study on the role for epidermal Regnase-1 in regulation of skin inflammation and carcinogenesis.

研究代表者

佐野 栄紀 (Sano, Shigetoshi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：80273621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：表皮特異的Regnase-1欠損マウス(Reg1cK0)においては、紫外線照射で表皮異型細胞が出現、有棘細胞癌の発症が認められた。化学物質発癌の系においても、多くの皮膚腫瘍が出現した。炎症や発癌にアラキドン酸-プロスタグランジン(AR/PG)系の関与が知られており、最近Regnase-1がCOX2を標的とすることが報告された。我々は、COX2阻害薬が発癌プロモータTPA外用後のReg1-cK0マウス表皮の肥厚を抑制することを発見した。以上、表皮Regnase-1は炎症のみならず発癌も制御し、その破綻による皮膚炎症-発癌プロセスはAR/PG系を介することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では急速な高齢化とともに、癌の発症頻度は増加傾向にある。化学物質や紫外線などに曝されている皮膚においては、高齢化とともに炎症が皮膚癌に移行する例を日常診療で経験する。しかし、皮膚慢性炎症から発癌にいたる分子機構は解明されていなかった。我々の研究は、炎症の制御に関わるRegnase-1の表皮特異的ノックアウトマウスを用いて、炎症-発癌プロセスを解明できた。この知見をもとに、皮膚癌治療の創薬のために新たなヒントが得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored the carcinogenesis of epidermal specific Regnase-1 knockout mice (Reg1-cK0) after UVB irradiation or chemical-induced protocol with DMBA/TPA. Strikingly, they developed skin tumors and squamous carcinoma at much earlier time points than controls. It has been recognized that the arachidonic acid/prostaglandin (AR/PG) pathway was involved in inflammation and carcinogenesis. Recent study revealed that Regnase-1 targeted COX2, which is a critical enzyme for the AR/PG pathway. Finally, topical treatment with COX2 inhibitor specifically suppressed the tumor promoter TPA-induced thickening of epidermis in Reg1-cK0. Taken together, Regnase-1 plays inhibitory roles not only for epidermal inflammation but also carcinogenesis. Also, its ablation leads to skin carcinogenesis via the AR/PG pathway.

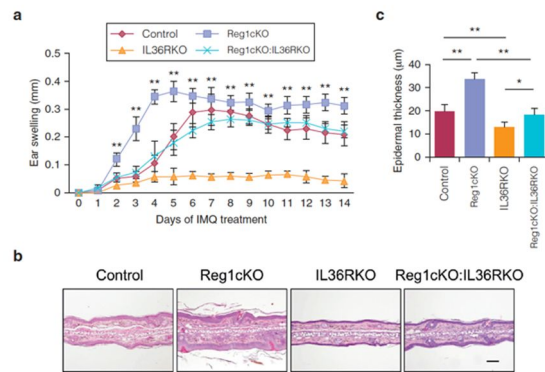
研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚炎症 皮膚癌 細胞内シグナル 2段階発癌モデル 紫外線誘発発癌モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症により癌化にいたる臨床知見は、ピロリ菌による慢性胃炎から胃癌への進行、熱傷癒痕による慢性皮膚炎から有棘細胞癌への進行など、多彩で数が多い。しかし、炎症から発癌プロセスの分子機構は必ずしも明らかではない。皮膚は常に化学物質、病原体、紫外線などに曝されているため炎症は生体反応のひとつとして考えられる。換言すれば、炎症は広義の皮膚ホメオスタシス維持機構でもある。しかしその破綻の結果、発癌にいたると考える。我々は最近、炎症を負に制御する RNase である Regnase-1 の表皮における働きを明らかにし、報告した¹⁾(Takaishi, et al. J Invest Dermatol, 2018;138(6):1439-1442.)。ここで明らかにしたことは 1) 表皮において Regnase-1 は炎症性サイトカイン刺激により発現誘導される。2) 誘導された Regnase-1 はその炎症性サイトカイン mRNA の分解し、負に制御する。3) Cre-loxP システムにより表皮角化細胞特異的に Regnase-1 遺伝子欠損マウス (Reg1cKO) において、イミキモド外用による皮膚炎症が遷延する。4) その炎症遷延は IL-36RKO でキャンセルされる。5) 同様に、DNFB による接触過敏モデルや発癌プロモータ TPA 外用による炎症も Reg1cKO では遷延化した。以上より、表皮 Regnase-1 は種々の刺激下で起こる皮膚炎症を負に制御していることを明らかにした。(図は J Invest Dermatol, 2018;138(6):1439-1442)



2. 研究の目的

表皮 Regnase-1 が皮膚炎症のみならず発癌の制御にも関わっているかを検討することを目的とした。そのために、

- 1) Reg1cKO マウスが反復性紫外線照射により、表皮異型や発癌を来しやすいか検討する。
- 2) 同じく、DMBA/TPA プロトコールによる 2 段階発癌においても検討する。
- 3) 下流の分子機構の解析
- 4) in vivo による検証実験での確認を行った。

3. 研究の方法

マウス

C57/BL6 マウス由来の Reg1cKO(Cre-K5:regnase-1flox/flox)および対照として regnase-1flox/flox マウスあるいは野生型マウス

紫外線発癌プロトコール

背部剃毛後、週 3 回紫外線 B(UVB, 200mJ/cm²)を照射する。正常マウスにおいて皮膚腫瘍が認められるまでの期間はおよそ 30 週以上である。

DMBA/TPA 化学発癌 2 段階プロトコール

tumor initiator の 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)25nmole を剃毛後背部に塗布、2 週間後より tumor promoter である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)3.4nmole を週 2 回剃毛後背部に外用することで行う。正常マウスにおいて皮膚腫瘍が認められるまでの期間は TPA 外用後およそ 15-20 週以上である。

RT-PCR による遺伝子発現解析

マウス皮膚から RNAeasy plus kit (QIAGEN)により RNA 分離後、逆転移酵素 (SuperScript, Thermo Fisher) キットにより cDNA を合成、特異的プライマーを用いて PCR を行った (Power syber StepOne plusk Thermo Fischer)。

ELISA

マウス皮膚を lysis buffer で homogenize 後、キットを用いてプロスタグランジンを測定した (ELISA kit for PGE2 quantification, R&D system)。

COX2 阻害薬による TPA 依存性表皮肥厚抑制実験

Reg1cKO の背部皮膚に週 2 回 TPA を外用、同時に連日 Celecoxib(5mg/mL in acetone, 100µL/day)を外用することで行った。対照をアセトン外用とした。12 日目にサンプル採取

した。

4. 研究成果

1) UVB による皮膚発癌実験

Reg1cKO すべてのマウス (n=8) において、UVB 照射後約 8 週頃より背部や耳介の紅斑びらんが著明となり(図 1)、表皮には著明な肥厚、異型細胞が認められた(図 2)。一方、対照マウスには変化が認められなかった。

図 1

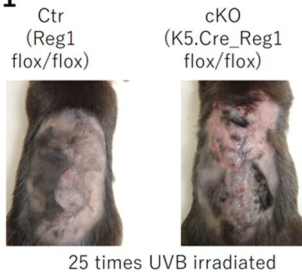
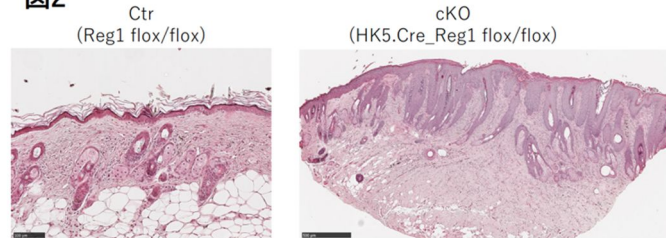


図 2



2) DMBA/TPA 2 段階プロトコル発癌実験

Reg1cKO すべてのマウス (n=8) において TPA 外用 8 週後より皮膚腫瘍が認められ、増数してきた(図 3)。その一部に有棘細胞癌に進展しているものも認められた(図 4、5)。しかし一方対照マウスでは 30 週において、一部のマウスに 1 個程度のパピローマが認められたに過ぎない。

図 3

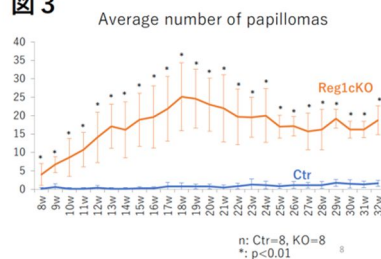


図 4

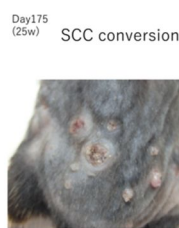
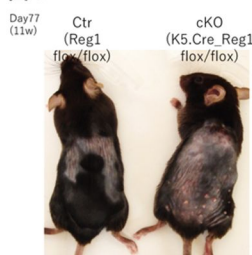
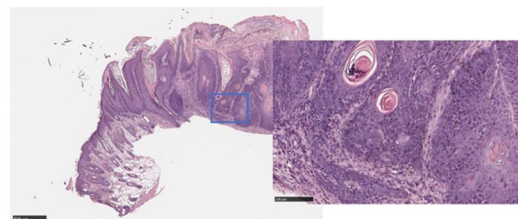


図 5



3) TPA 外用による刺激後アラキドン酸-プロスタグランジン系の解析

我々は、Reg1cKO は TPA 外用によって対照に較べて、より早期から表皮肥厚を来し遷延することを報告した (J Invest Dermatol, 2018;138(6):1439-1442)。また、Regnase-1 は COX2 を標的とすることが報告されている²⁾。TPA を外用後 24 時間の皮膚サンプルでの COX1 および 2 遺伝子 (それぞれ Ptgs1, 2) の発現結果を図 6 に示す。Reg1cKO マウスにおいては対照と比較して明らかに、TPA 外用後 Ptgs2 遺伝子発現上昇が認められた (図 6)。おなじくプロスタグランジン E2 の発現量も Reg1cKO マウス皮膚において TPA 刺激後に上昇することが明らかになった (図 7)。

図6

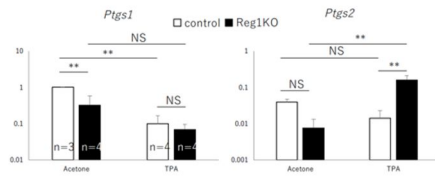
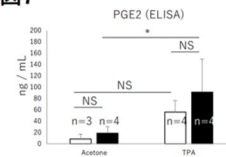
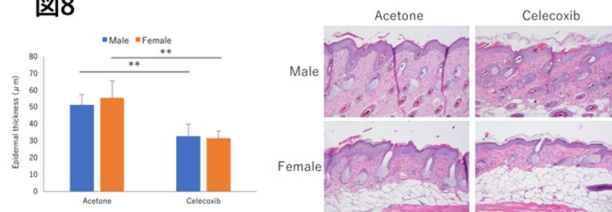


図7



4) COX2 阻害薬セレコキシブ外用による TPA 外用後表皮肥厚減弱
 Reg1cKO マウスの TPA 外用後表皮肥厚はセレコキシブにより有意に減弱した。この効果は性別に関係ないことを確認した(図 8)。

図8



以上、表皮の Regnase-1 は、アラキドン酸-プロスタグランジン系を介する炎症および発癌をいずれも負に制御していることが明らかになった。

引用文献

- [1] M. Takaishi, T. Satoh, S. Akira, S. Sano, Regnase-1, an Immunomodulator, Limits the IL-36/IL-36R Autostimulatory Loop in Keratinocytes to Suppress Skin Inflammation, The Journal of investigative dermatology 138(6) (2018) 1439-1442.
- [2] T. Mino, Y. Murakawa, A. Fukao, A. Vandenbon, H.H. Wessels, D. Ori, T. Uehata, S. Tartey, S. Akira, Y. Suzuki, C.G. Vinuesa, U. Ohler, D.M. Standley, M. Landthaler, T. Fujiwara, O. Takeuchi, Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms, Cell 161(5) (2015) 1058-1073.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Morisaka H, Takaishi M, Akira S and Sano S
2. 発表標題 Keratinocyte Regnase-1, a down-modulator of skin inflammation,
3. 学会等名 The44nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (JSID) (国際学会)
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
研究分担者	高石 樹朗 (Takaishi Mikiro) (10303223)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	山本 真有子 (Yamamoto Mayuko) (20423478)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	森坂 広行 (Morisaka Hiroyuki) (60826840)	高知大学・医学部附属病院・医員 (16401)	
研究分担者	石元 達士 (Ishimoto Tatsushi) (40750039)	高知大学・医学部附属病院・医員 (16401)	削除：2018年9月18日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------