

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16562

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎におけるp63/p73依存性の偏倚状態ケラチノサイトの一元的理解

研究課題名（英文）Comprehensive understanding of p63/p73-dependent deviated state keratinocytes in atopic dermatitis.

研究代表者

久保 輝文（KUBO, Terufumi）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90580019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ケラチノサイトにおいて、Np63が制御するアトピー性皮膚炎関連分子に対するいわゆる2型炎症環境の影響について検討することを目的とした。皮膚組織では、Np63とバリア関連タンパク質との間に逆転した発現パターンが観察され、Np63はこれらの発現を制御していた。さらに、いくつかの炎症性サイトカインもまたNp63によって調節された。IL-13はケラチノサイトの分化過程におけるNp63の発現低下を阻害していた。我々は、IL-13-Np63軸が、アトピー性皮膚炎発症の2つの主要な因子である表皮バリアの異常とケラチノサイトのサイトカイン産生増加状態を統合しようと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎をはじめとするアトピー・アレルギー性疾患はこの数十年で罹患者数が激増した疾患であり、遺伝的要因に比して生活習慣や環境因子が病態の形成に強く関わっていることは確実である。アトピー性皮膚炎の患者数は非常に多い一方で、抗体医薬が極めて高価であることから、医療経済的にも病態メカニズムの最も上流にあるケラチノサイトの機能を追求し、病態形成の本質に迫ることで予防的方策を確立することが求められている。本研究では、その一端を明らかとすることができたと思う。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to investigate the influence of type 2 inflammatory environment on Np63 expression and AD associated molecules regulated by Np63 in keratinocyte. In healthy skin tissue, we observed inverted expression pattern between Np63 and some barrier related proteins including filaggrin, caspase-14, claudin-1 and claudin-4. Np63 regulated expression of these genes and proteins. In addition, production of IL-1 and IL-33, pro-inflammatory cytokines, were also modulated by Np63. IL-13 interfered Np63 down-regulation during calcium induced keratinocyte differentiation. IL-13 modulated some barrier and inflammation related molecules, which were under regulation of Np63. We propose the IL-13-Np63 axis would integrate two major factors of AD pathogenesis, epidermal barrier dysregulation and increased cytokine production of keratinocyte.

研究分野：免疫病理学

キーワード：アトピー性皮膚炎 サイトカイン 上皮バリア機能 p53ファミリー転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の患者数は本邦においても、世界的にもいまだに増加の一途をたどっており、罹患者の生活の質を著しく低下させている。アトピー性皮膚炎や気管支喘息をはじめとするアトピー・アレルギー性疾患はこの数十年で罹患者数が激増した疾患であり、遺伝的要因に比して生活習慣や環境因子が病態の形成に強く関わっていることは確実である。興味深いことに、疫学的にも免疫病理学的にも気管支喘息や食物アレルギーなどの多彩なアレルギー疾患はアトピー性皮膚炎を元にして発展することが知られるようになってきた。したがって、アトピー性皮膚炎の病態解明は解決すべき全世界的課題であるといえる。

2. 研究の目的

表皮ケラチノサイトは生体と外界とのインターフェイスとして物理的および免疫学的な生体バリアを形成している(図1)。アトピー性皮膚炎の病態形成に中心的役割を果たす2型自然リンパ球やヘルパーT細胞を活性化するサイトカインは表皮ケラチノサイトから産生される。一方で、これらの免疫細胞が産生するサイトカインはケラチノサイトの分化や機能に影響を与えている。また、アトピー性皮膚炎ではケラチノサイトのバリア機能の低下が指摘されており、過剰な免疫反応の原因となっていると考えられている。従って、アトピー性皮膚炎において、ケラチノサイトは過剰なサイトカイン産生と物理的バリアの破綻によるインテグリティの崩壊した偏倚状態にあり、発症と慢性化の根幹をなしているといえる。しかし、この偏倚状態がどのように形成・維持されているのかについて、転写因子の観点から統合的に理解しようとする試みはこれまでになされていなかった。

転写因子は上流シグナルを受け、その発現量や活性が変化することで、細胞の振る舞いをダイナミックに制御している。これまでの研究で、p63/p73は様々な侵襲、ストレスに対して上皮細胞の分化・増殖を決定するのみならず、免疫反応の制御やバリア機能に関わることでアレルギー疾患における炎症環境形成に重要な役割を果たしうることが部分的に示してきた。従って、本研究の中心となる目的はp63/p73を軸としたケラチノサイトの偏倚状態を網羅的に明らかにすることで、アトピー性皮膚炎の慢性病態の形成維持に関わる新規メカニズムを探索し、これらを従来知られていることと併せて一元的に理解することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト組織の入手

札幌医科大学附属病院にて、炎症のない正常皮膚組織3例を解析に供した。すべての組織は、ヘルシンキ宣言のガイドラインに従った文書によるインフォームドコンセントを経ており、本学IRBの認可のもとで解析を行った。

(2) 細胞培養と刺激

本研究における *in vitro* 解析は正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) を用いて行った。培養には 5 ng/ml のヒト組換え上皮成長因子 1-53 と 50 µg/ml の牛下垂体抽出物 (Gibco, Carlsbad, CA) を添加したケラチノサイト用無血清培地 (keratinocyte-SFM) を用いた。NHEK は 3 回または 4 回の継代で実験に供した。低カルシウム条件で培養した単層 NHEK のセミコンフルエントな状態を分化前期と定義した。また、高カルシウム条件下で 3 日間培養した NHEK を分化中期、7 日間培養した NHEK を分化後期とした。NHEK の 3 次元培養は、直径 12 mm、孔径 0.4 µm のポリエステル膜 (Corning Costar, Corning, NY) に 5.0×10^5 cells の密度で播種し、keratinocyte-SFM: DMEM = 1:1 とした培養液を用いた。NHEK 刺激は、apical 側の培地が除去された時点で開始した。細胞への刺激のために、培養液にはポリイノシン-ポリシチジル酸 (poly I:C; Novus biologicals, Littleton, CO)、IL-4 (PeproTech, London, United Kingdom)、IL-13 (PeproTech) および IL-22 (PeproTech) を使用した。

(3) siRNA トランスフェクション

ヒト Np63 特異的 siRNA は Invitrogen (Carlsbad, CA; センス: 5'-ACAAUGCCCAGACUCAAU-3'; アンチセンス: 5'-AAUUGAGUCUGGCAUUG-3') から入手した。陰性対照のためのスクランブル配列 siRNA は、Invitrogen から購入した。トランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて、Opti-MEM (GIBCO) 中で 40nmol/L でメーカーの説明書に従って実施した。siRNA トランスフェクション後、6 時間で培養液を交換した。

cDNA マイクロアレイ解析

トランスフェクション後 72 時間で、Np63 特異的またはスクランブル配列 siRNA をトランスフェクションした NHEK から mRNA を抽出した。マイクロアレイスライドは、3D-GENE human 25k

(TORAY, Tokyo, Japan) でスキャンし、マイクロアレイ画像は AROSTM, version 4.0 (Operon Biotechnologies, Tokyo, Japan) にて解析した。

(4) 抗体

使用した抗体は、p63 を検出するマウスモノクローナル抗体 (クローン: 4A4; Abcam) マウス抗 Np63 モノクローナル抗体 (クローン: BC28; biocare medical, Pacheco, CA) マウス抗 -アクチン mAb (クローン: AC-15; Sigma-Aldrich) マウス抗 Claudin-4 mAb (クローン: 3E2C1; Invitronics) である。3E2C1; Invitrogen) マウス抗 Filaggrin mAb (クローン: AKH1; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) マウス抗 Caspase-14 mAb (クローン: EPR12927; Abcam) ウサギ抗 Claudin-1 mAb (クローン: EPRR18871; Abcam) およびウサギ抗 IL-33 (クローン: EPR20417; Abcam) であった。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスおよび抗ウサギ IgG 抗体は、KPL (Gaithersburg, MD) から購入した。

(5) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

NHEK の total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen) と RNase-free DNase (Qiagen) を用いて製造者のプロトコルにしたがって精製した。抽出したトータル RNA は、ランダムヘキサマープライマー (Thermo Fisher Scientific, Woburn, MA) を含む RevertAid RT キットを用いて、cDNA に逆転写した。QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、標的遺伝子特異的プライマー (Invitrogen) と SYBR green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) により、製造者の説明書に従って定量的 PCR を実施した。この時 EF1 の mRNA の量を用いて、各転写物の量を標準化した。遺伝子発現量の相対値を算出するために、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を採用した。

(6) 免疫組織化学的解析

免疫組織化学的解析はホルマリン固定パラフィン包埋皮膚組織または3次元培養NHEKの切片を、Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO, Glostrup, Denmark) によるエピトープ回収後に mAb を用いて免疫染色を行った。Np63, filaggrin, caspase-14, claudin-1、および claudin-4 タンパク質の検出には、各メーカーの製品添付書に記載された濃度で使用した。

(7) ウェスタンブロット解析

培養 NHEK をプロテアーゼ阻害剤 (Roche, Basel, Switzerland) 入り RIPA バッファーで氷上 30 分間溶解した。還元条件下での上清のアリコートに SDS-5-20% ポリアクリルアミドゲル (SuperSep™; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) にアプライし、ポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore, Bedford, MA) にトランスファーした。1次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と45分間反応させた。シグナルは、化学発光検出システム (Amersham Life Science, Arlington Height, IL) を用いて可視化した。イムノブロットで検出されたシグナルの強度レベルは、NIH Image-J ソフトウェアを用いて定量化した。各分子の発現強度レベルは、 α -アクチンの発現量から標準化した。

(8) 統計解析

データ解析は、Prism Version 6 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, Calif) を用いて行った。統計的解析はスチューデントの t 検定を用いて評価した。図中のグラフバーは平均値 \pm SD を示す。P 値 < 0.05 を有意と統計学的判断した。

4. 研究成果

健常ヒト表皮における Δ Np63 およびアトピー性皮膚炎 (AD) 関連バリアタンパク質の分布の発現プロファイルを調べるために、AD を含む炎症性皮膚疾患に罹患していない皮膚組織の病理組織を調べた (図 1A)。 Δ Np63 は基底層から有棘層に発現し、顆粒層では発現が消失していた。一方、claudin-4 と filaggrin の発現は顆粒層に限定されていた。クローディン-1 とカスパーゼ-14 は表皮全体で検出されたが、基底層よりも表層側でやや高い発現を示した。

そこで、単層培養した初代 NHEK におけるこれらのタンパク質の発現を検討した。材料と方法の部分で述べたように、NHEK は 2 つの特徴的な条件で培養された。「分化前」と「分化後」は、それぞれ基底層と表層側のケラチノサイトのモデルである。ウェスタンブロット解析の結果、分化前ケラチノサイトでは、分化後ケラチノサイトに比べ Δ Np63 の発現量が多かった。一方、バリア関連蛋白であるクローディン-1、クローディン-4、フィラグリ、カスパーゼ-14 は、 Δ Np63 と逆の傾向を示した (図 1B)。これらの結果は mRNA の発現レベルでも確認された。

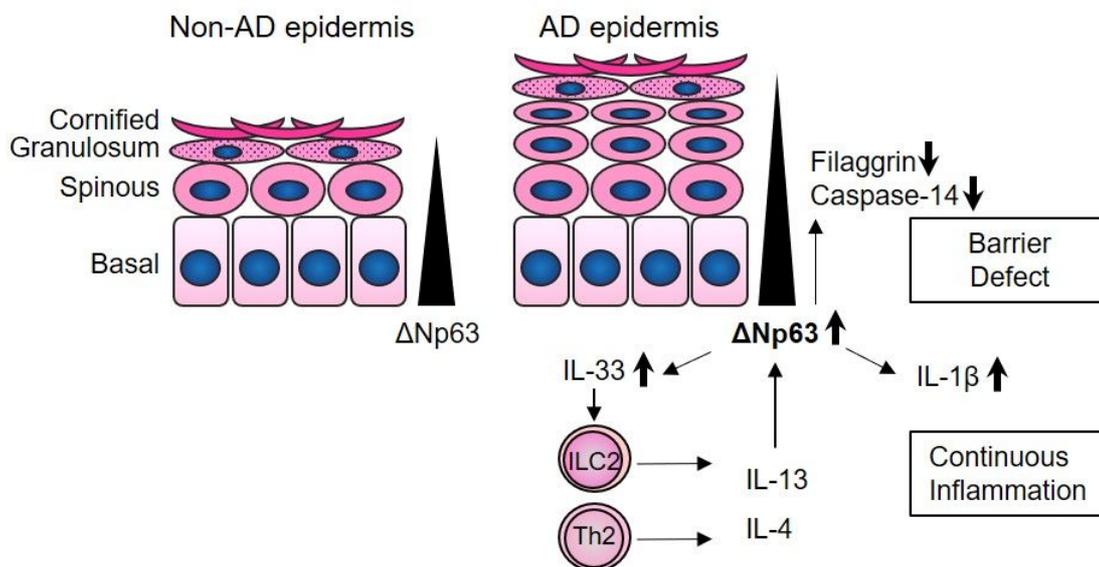
Δ Np63 といくつかのバリア関連蛋白の発現パターンが逆転していることから、 Δ Np63 は AD 関連蛋白の発現に影響を与えていると推測された。本研究では、Np63 を豊富に発現する NHEK に Np63 特異的な siRNA を導入し、転写およびタンパク質レベルで Np63 の発現を抑制することに成功した。NHEK における Np63 の転写標的を調べるために、Np63 またはコントロール siRNA をトランスフェクトした NHEK を cDNA マイクロアレイ発現解析に供した。Np63 は約 1200 の転写遺伝子発現レベルを 2 倍以上調節した。興味深いことに、Np63 は、カスパーゼ 14、クローディン 1、クローディン 4 をそれぞれコードする CASP14、CLDN1、CLDN4 の遺伝子発現を負

に制御していた。バリア関連分子に加え、Np63 は、炎症性サイトカインである IL-1 をコードする IL1B を正に制御していることがわかった。次に、これらの遺伝子の発現を定量的 PCR で確認した。フィラグリンと IL-33 をそれぞれコードする FLG と IL33 の遺伝子発現も Np63 によって調節されていた。タンパク質レベルでは、フィラグリン、カスパーゼ 14、クローディン-1、クローディン-4 の発現は Np63 によって負に調節されたが、ウェスタンブロット解析では Np63 は IL-33 に正の調節を与えていた。Np63 ノックダウン NHEK はポリ (I:C) 刺激によってより少ない IL-1 を放出した。

IL-13 は、タイプ 2 炎症環境を構成する代表的なサイトカインである。一方、AD ではケラチノサイトの分化が阻害されることが明らかにされている。そこで、IL-13 がケラチノサイトの分化にどのように影響するかを調べた。NHEK の様々な分化段階において、IL-13 に対する Np63 遺伝子の発現を調査した。Np63 の遺伝子発現は、どの分化段階でもわずかではあるが、有意に上昇した。分化段階における 7 日間における IL-13 の暴露は、Np63 の発現の減衰を抑制することが、ウェスタンブロット分析によって確認された。IL-4R を共有する別の 2 型サイトカインである IL-4 も、同様に Np63 レベルのダウンレギュレーションを抑制した。しかし、分化前あるいは分化段階での一過性の IL-13 刺激では、Np63 のタンパク質発現を増加させることはできなかった。

さらに IL-13 の曝露が、ケラチノサイトの分化の過程で、 Δ Np63 の制御するバリアおよび炎症関連分子にどのような影響を与えるかを調べた。予想通りウェスタンブロット解析では、IL-13 刺激群ではコントロール群に比べフィラグリン、カスパーゼ 14 の発現が低い一方で、IL-33 の発現が高かった。次に、IL-13 曝露により発現が低下したフィラグリンとカスパーゼ-14 の発現を 3 次元培養 NHEK で確認した。コントロール群におけるフィラグリンとカスパーゼ-14 の発現パターンは、ヒト表皮と同様であった。これらのタンパク質は、IL-13 曝露後のケラチノサイトで減少していた。

この研究で得られた結果の概念図を以下に示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terufumi Kubo, Sayuri Sato, Tokimasa Hida, Tomoyuki Minowa, Yoshihiko Hirohashi, Tomohide Tsukahara, Takayuki Kanaseki, Kenji Murata, Hisashi Uhara, Toshihiko Torigoe	4. 巻 -
2. 論文標題 IL-13 modulates Np63 levels causing altered expression of barrier and inflammation related molecules in human keratinocytes: A possible explanation for chronicity of atopic dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.427.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保 輝文
2. 発表標題 腫瘍免疫の基礎
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 輝文
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬によるがん免疫療法の光と影
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保 輝文、佐藤 さゆり、肥田 時征、箕輪 智幸、廣橋 良彦、塚原 智英、金関 貴幸、村田 憲治、宇原 久、鳥越 俊彦1
2. 発表標題 IL-13はケラチノサイトにおける Np63の発現を調節し、バリアおよび炎症関連分子の発現の変化を引き起こす：アトピー性皮膚炎の慢性化メカニズムとの関連
3. 学会等名 第54回北海道病理談話会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------