

令和 4 年 2 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17797

研究課題名（和文）皮膚恒常性維持における一次繊毛の機能解析

研究課題名（英文）Function of primary cilia in skin homeostasis

研究代表者

鳥山 真奈美（Toriyama, Manami）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30773121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞外環境を検知する細胞小器官である一次繊毛が、皮膚の恒常性維持にどのように寄与するかを解明することを目的とした。研究代表者は、一次繊毛がアトピー性皮膚炎患者由来表皮で顕著に増加していることを見出した。一次繊毛の過形成は、表皮細胞の成熟を抑制し、皮膚バリアの破綻やケモカイン産生を誘導することで、疾患の発症に関わる可能性が示唆された。本研究結果は1件の国際雑誌に発表した。また、もう1件、国際雑誌に発表中であり、リバイス提出中である。さらに、総説を国際雑誌に発表した。国内学会でもシンポジストとして口頭発表を行った。前述とは別の国内学会において、若手優秀発表賞を受賞した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の治療は、ステロイド薬等を用いた対症療法のみが存在する。その治療法は有効ではあるものの、発症原因が不確定であるため、再発を繰り返すことが多い。本研究では、アトピー性皮膚炎の発症に一次繊毛が関わる可能性を見出した。一次繊毛の研究歴史は浅く、一次繊毛をターゲットとした創薬はいまだ実現していないため、本研究は新たな作用機序を示す新規薬を開発するための礎となりうる研究である。

研究成果の概要（英文）：In this research, I found that primary cilia, working as signal sensor, were significantly increased in atopic dermatitis epidermis. Over-formation of primary cilia in epidermis increased immature epidermal cells, which led skin barrier disruption and chemokine secretion, and exacerbated the disease. We reported our results in international journal. In addition, we submitted to another international journal, and it is currently resubmitted the revision. We also reported review article in international journal. I presented our results in domestic conference as symposiast. I won 'Best young researcher award' in domestic conference.

研究分野：薬理学、細胞生物学、免疫学

キーワード：一次繊毛 アトピー性皮膚炎 炎症 ランゲルハンス細胞 ケラチノサイト

## 1. 研究開始当初の背景

免疫応答は異物や自己の死細胞を排除し、からだの恒常性を維持するのに必要不可欠な生体防御反応であり、その破綻は様々な疾患を引き起こす。免疫応答制御機構を理解することは、からだの恒常性維持機構を理解する上で必須であり、また、様々な感染症やアレルギー疾患、自己免疫疾患の発症メカニズムの理解とその治療薬開発に必須である。免疫細胞は細胞外環境の変化やシグナルを検知し、細胞内応答を変化させることで免疫反応を制御していると考えられているが、その詳細機構は不明な点が多く残されている。そこで研究代表者は、一次繊毛に着目した。一次繊毛は細胞外シグナルを受容する細胞小器官である。ほぼすべての細胞が形成することができると考えられており、免疫細胞におけるその存在も2015年に初めて発見された。しかし、その発見以来、機能を報告した例はなく、免疫細胞における一次繊毛の生理学的機能は全く不明であった。また、ヒトのからだの中で最大体積を占める免疫器官である、皮膚における一次繊毛の発現パターンや発現細胞のサブタイプは不明であった。そこで研究代表者は、一次繊毛におけるシグナルの受容が免疫細胞の機能を変化させ、免疫反応を制御しているのではないかと仮説を立て、研究をスタートさせた。特に、表皮免疫細胞における一次繊毛の役割解明を目指し、研究を行った。

## 2. 研究の目的

皮膚はヒトのからだの中で最大の免疫組織であり、多数の免疫細胞を含む。マウス胎児皮膚においては一次繊毛の存在が確認されていたものの、ヒト、特に成人皮膚における報告は皆無であった。そこで成人皮膚における一次繊毛の発現パターンや、一次繊毛をもつ免疫細胞の同定、さらに皮膚恒常性維持における一次繊毛の生理的役割、また皮膚免疫破綻時(疾患皮膚)における一次繊毛の役割を解明することを目的とした。一次繊毛は様々な受容体を数多く含むが、中でも細胞増殖を促進するチロシンキナーゼ受容体を数種類含むことが知られている。そこで、多岐にわたると考えられる一次繊毛の生理的役割の中でも、免疫細胞の増殖にどのようにかわるのかを調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

成人皮膚、特に表皮における一次繊毛を可視化するために、健常ヒト由来、あるいはアトピー性皮膚炎患者由来の皮膚切片を用いて免疫染色を行った。一次繊毛特異的のマーカであるアセチル化チューブリンと、表皮に存在する細胞であるケラチノサイトや、表皮に存在する免疫細胞であるCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、ランゲルハンス細胞を識別するためのマーカを認識する抗体を用いてこれらを可視化した。また、表皮に存在する細胞の特性を調べるために、細胞増殖マーカKi67、樹状細胞成熟マーカCCR7を用いて免疫染色を行った。

さらに、免疫細胞における一次繊毛の役割を解明するために、ヒト末梢血を入手し、これに含まれる免疫細胞を単離し、一次繊毛と細胞増殖・成熟の関わりを、セルソーターや免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

ヒト健常表皮およびアトピー性皮膚炎由来表皮切片において、アセチル化チューブリン陽性で染色される一次繊毛を可視化することができた。これら表皮における一次繊毛をもつ細胞の割合を比較すると、アトピー性皮膚炎由来表皮においては、一次繊毛をもつ細胞の割合が有意に増加していた。また、表皮に存在する樹状細胞の一種であるランゲルハンス細胞の一次繊毛の数も、アトピー性皮膚炎組織で増加する傾向が見られた。アトピー性皮膚炎では、表皮の肥厚及び免疫細胞の増加が観察される。そこで、アトピー性皮膚炎表皮における一次繊毛の増加と細胞増殖能の関連性を調べるために、一次繊毛と細胞増殖マーカであるKi67の発現解析を行った。免疫染色の結果、アトピー性皮膚炎表皮では、Ki67陽性の一次繊毛をもつ細胞が検出された。健常表皮では、アセチル化チューブリン陽性かつKi67陽性の特徴を示す細胞は検出されなかった。一般的に、一次繊毛は増殖期(M期)には形成が阻害されることから、Ki67陽性細胞では一次繊毛形成は抑制されていると予想され、アトピー性皮膚炎表皮で観察された現象は、疾患特異的であることが考えられた。

さらに、樹状細胞における一次繊毛の生理的役割を解明するために、ヒト末梢血由来樹状細胞を用いて実験を行った。細胞の成熟と一次繊毛形成の関連を調べるために、末梢血由来樹状細胞をサイトカイン処理によって成熟させた。未成熟樹状細胞と成熟樹状細胞間での一次繊毛形成の割合を調べたところ、成熟樹状細胞では一次繊毛形成率が有意に減少していた。また、未成熟の樹状細胞をGM-CSFで刺激したところ、一次繊毛の形成が有意に増加した。GM-CSF刺激時の細胞増殖能を測定したところ、GM-CSF未刺激時と比較して、有意に増殖能が増加していた。

樹状細胞において、GM-CSF刺激が一次繊毛形成を促進すること、また一次繊毛が増殖を制御する可能性が示唆されたので、具体的にどのシグナル伝達経路が増殖を促進させるのかを検討した。一次繊毛に局在するとされるPDGFRαは皮膚にも発現しており、そのリガンドであるPDGF-

AA はアトピー性表皮炎症患者で発現が上昇していることが報告されている。そこで、樹状細胞に PDGF-AA 刺激した際の細胞増殖能を測定した。興味深いことに、PDGF-AA 単独刺激は樹状細胞の増殖を促進しなかったものの、GM-CSF との共刺激は細胞増殖を促進した。また、一次繊毛形成に必須である一次繊毛構成分子である IFT88 を siRNA を用いてノックダウンし、一次繊毛形成を抑制した際の細胞増殖能も検討した。IFT88 ノックダウン時は、GM-CSF と PDGF-AA が誘導する細胞増殖の亢進がキャンセルされたことから、PDGFRa を介した細胞増殖シグナルは一次繊毛を介して伝達される可能性が示唆された。また、IFT88 をノックダウンした細胞で、細胞成熟マーカーである CCR7 の発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。IFT88 をターゲットとする siRNA を導入した細胞では、コントロールの siRNA 導入細胞に比べて C C R 7high の細胞数が増加した。

以上のことから、一次繊毛はおそらく P D G F R a のシグナルを介して樹状細胞の増殖を制御すること、またアトピー性皮膚炎では一次繊毛形成とランゲルハンス細胞の増殖に破綻が生じ、結果、疾患が発症する可能性が考えられた。

本研究成果は国際論文に発表済み（1件）、国際論文に発表中（1件）、国際論文に総説を発表済み（1件）、国内学会にシンポジストとして発表した。また、国内学会の若手優秀発表賞を1件受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toriyama Manami, Rizaldy Defri, Nakamura Motoki, Fujita Fumitaka, Okada Fumihiro, Morita Akimichi, Ishii Ken J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunological role of primary cilia of dendritic cells in human skin disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	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） 10.1101/2020.02.04.933333	査読の有無 無
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 Rizaldy Defri, Toriyama Manami, Kato Hiroko, Fukui Runa, Fujita Fumitaka, Nakamura Motoki, Okada Fumihiro, Morita Akimichi, Ishii Ken J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Increase in primary cilia in the epidermis of patients with atopic dermatitis and psoriasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	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） 10.1111/exd.14285	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 Toriyama Manami, Ishii Ken J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Primary Cilia in the Skin: Functions in Immunity and Therapeutic Potential	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 621318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.621318	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥山真奈美
2. 発表標題 ヒトアトピー性皮膚炎中における樹状細胞がもつ一次繊毛の免疫学的役割
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥山真奈美
2. 発表標題 皮膚免疫疾患における、一次繊毛の病態生理解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第72回日本細胞生物学会 若手優秀発表賞受賞
------------------------

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