

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790229
 研究課題名 (和文) ホスホリパーゼ C ϵ による炎症性サイトカイン産生制御の機構の解明
 研究課題名 (英文) Study of the mechanism by which phospholipase C \cdot regulates proinflammatory cytokine production
 研究代表者
 枝松 裕紀 (EDAMATSU HIRONORI)
 神戸大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：70335438

研究成果の概要 (和文)：細胞内情報伝達を制御する因子の 1 つであるホスホリパーゼ C ϵ による炎症応答の制御の機構とその意義について、特にサイトカイン産生に着目して解析した。その結果、ホスホリパーゼ C ϵ が接触性皮膚炎や腫瘍における炎症に、サイトカイン産生制御を介して係ることが明らかとなった。また、表皮角化細胞でのホスホリパーゼ C ϵ の過剰産生は、サイトカインの産生の亢進と、T 細胞浸潤や鱗屑の発生など乾癬に酷似した特徴を持つ皮膚炎に繋がることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Phospholipase C \cdot (PLC \cdot), an intracellular signaling molecule, was implicated in inflammation and tumorigenesis by our study of an experimental skin carcinogenesis model. The aim of this research was to investigate the mechanism of inflammatory reactions mediated by PLC \cdot . This study showed that PLC \cdot plays an important role in regulation of cytokine production by non-immune cells, such as epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts, thereby augmenting inflammation. In addition, keratinocyte-restricted overproduction of PLC \cdot in mice results in the development of dermatitis accompanied by the characteristic features seen in human psoriasis, such as helper T cell infiltration and the development of silvery adherent scales.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：シグナル伝達、免疫、アレルギー、炎症、モデル動物、皮膚炎、癌

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ C \cdot (PLC \cdot) は、低分子量 GTP 結合蛋白質であり ras 癌遺伝子産物であ

る Ras 蛋白質、およびそのファミリーに属する Rap 蛋白質の下流の標的蛋白質 (エフェクター) として、研究代表者の所属する研究室

で同定されたホスホイノシチド特異的 PLC である。これは、イノシトール 3 リン酸 (IP3)、ジアシルグリセロール (DAG) の二種のセカンドメッセンジャーの産生を介して、細胞内カルシウム動員、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化などに関与する。研究代表者らは、遺伝子ターゲティング法を用いて、PLC の PLC 活性を欠損したマウス (以下、ノックアウトマウス) を作成し、その生理的な機能の解析を進めた。その結果、12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (TPA) をプロモーターに用いた二段階皮膚化学発癌においては、腫瘍の発生とその悪性進展が PLC・ホモノックアウト (KO) マウスで著しく抑制される事が分かり、発癌への PLC の強い関与が示唆された。解析を進めた結果、PLC・KO マウスでは、TPA により誘導される炎症性サイトカインの発現誘導 (特にインターロイキン (IL)1-... の mRNA レベルでの調節) が抑制されることにより皮膚炎が抑制されることが分かった。このことから、PLC が炎症促進とそれによる発癌プロモーションを介して癌化の促進に深く関わると予想され、その機構の解明が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

PLC は、研究代表者らの研究により、以上のように、炎症応答に関与する可能性、さらには発癌プロモーションにおいて重要な役割を果たす可能性を示した。このことから、炎症応答における PLC の機能を明らかにすることは、炎症応答の理解にとどまらず、腫瘍生成と悪性化の機構の理解にも繋がると考えられた。本研究では、炎症応答の制御に関わる PLC の機能について、個体レベルでの解析 (特に腫瘍悪性化に関わる炎症性の微小環境形成)、および遺伝子改変マウス由来の培養細胞や精製蛋白質等を用いた分子機構の解析を行い、PLC によるサイトカイン産生制御機構と炎症における役割を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍悪性化に関わる炎症への PLC の関与について解析する為に、新たに ApcMin 小腸腺腫モデルを導入した。このモデルマウスでは、癌抑制遺伝子 Apc にナンセンス変異があり ras 癌遺伝子の変異非依存的に小腸と大腸に腺腫が自然に発生するので、ヒトの大腸癌のモデルとして汎く用いられている。また炎症と発癌との関係についても、このモデルマウスではこれまでの研究の蓄積があるので、PLC の炎症を介した発癌への関与の機構を解析するには、好都合である。そこで、ApcMin マウスと PLC ノックアウトマウスとの交配を繰り返すことで、異なる PLC 遺伝

子型を持つ ApcMin マウスを作出した。それらを用いて、PLC 欠損の腫瘍形成への影響について、以下の方法により検討した。

① PLC 欠損による癌死の抑制の有無について解析した。

② ApcMin マウスの大腸と小腸に形成する腺腫の数を解析した。

③ 小腸に形成した腺腫については、生後 5、8、13 週の各時期で回収し、それらの悪性度により 3 つのグレード (低異型度良性腫瘍、高異型度良性腫瘍、悪性腫瘍 (アデノカルシノーマ)) に分類し、それぞれのグレードに属する腫瘍数を検討した。

④ 低異型度、高異型度の良性腫瘍における、炎症の程度、癌細胞の増殖と細胞死について、組織切片をそれらのマーカーで染色することで解析した (炎症については、好中球マーカーである Gr-1 を、細胞増殖については PCNA の免疫染色を、細胞死については TUNEL 法による解析を実施)。

⑤ 低異型度、高異型度の良性腫瘍における炎症性サイトカインや血管新生因子の発現への PLC 遺伝子型の影響を、組織切片の免疫染色法と、組織から得られた RNA 標品を用いた定量 RT-PCR 法による検討を行った。

(2) 皮膚炎における PLC の役割について明らかにする目的で、TPA 誘発性以外の皮膚炎モデルとしてアレルギー性接触皮膚炎モデルを導入した。実験的接触性皮膚炎は、ハプテンとして 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を用いて誘導した。PLC・WT および PLC・KO マウスの背中に DNFB を塗布することでマウスを感作し、その 5 日後に DNFB を耳介に塗布することで皮膚炎を惹起させ、以下の方法で解析した。

① 炎症応答の経時変化について、耳介の肥厚を非侵襲的方法で測定するとともに、異なる時間で耳介標本を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色により炎症浸潤細胞を可視化し、浸潤細胞数の計測を行った。

② 異なる時間で作成した耳介標本中のヘルパー T 細胞を、抗 CD4 抗体による免疫染色法で可視化した後、この浸潤数を計測した。

③ 惹起期の PLC・WT および PLC・KO マウスにおける炎症性サイトカインの発現を、定量 RT-PCR、および免疫染色法で検討した。

④ 炎症浸潤細胞における PLC の発現の有無について、免疫染色、および単離細胞由来細胞抽出液のウェスタンブロット法で検討した。

⑤ DNFB で感作したマウスに由来するヘルパー T 細胞を未感作のマウスへ移植し、レシピエントに DNFB を塗布して皮膚炎の惹起を行った。ドナーおよびレシピエントの PLC 遺伝子型の影響を検討した。

⑥ PLC・WT および PLC・KO マウス真皮から調

製した線維芽細胞の初代培養をT細胞由来サイトカインで刺激し、サイトカイン産生へのPLC・遺伝子型の効果を検討すると共に、線維芽細胞でのPLC・の細胞由来サイトカイン刺激による活性化の有無を検討した。

(3) PLC・を表皮角化細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスを新たに作成し、そこで生じた炎症の機構について、以下の方法で解析した。

①トランスジェニックマウスの皮膚から組織切片を作成し、その炎症浸潤細胞の数と種類の同定を、それらの特異的マーカーに対する染色により行った。

②トランスジェニックマウスの皮膚で発現している炎症性サイトカインなどを、定量RT-PCR法、および抗体染色法により同定した。

③トランスジェニックマウス由来の角化細胞を初代培養し、それらが過剰産生しているサイトカインなどを定量RT-PCR法とELISA法により同定・定量した。

④トランスジェニックマウスの皮膚を抗炎症薬で処理し、その効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍悪性化に関わる炎症へのPLC・の関与については、ApcMinマウスとPLC・ノックアウトマウスとの交配で得られた異なるPLC・遺伝子型を持つApcMinマウスの解析の結果、以下の結果を得た。

①PLC・野生型背景のApcMinマウスが生後8ヶ月以内にその80%程度が死亡するのに対して、PLC・ノックアウト背景のApcMinマウスは20%程度しか死亡しなかった。これは、腫瘍形成と悪性化の抑制によるものと考えられた。

②ついで、ApcMinマウスの大腸と小腸に形成する腺腫の数を解析した。その結果、PLC・ノックアウト背景のApcMinマウスでは、大腸腺腫、小腸腺腫、ともにPLC・野生型背景の半分以下であることが分かった。

③小腸に形成した腺腫の悪性度の解析から、PLC・ノックアウト背景のApcMinマウスでは、全てのグレードの腫瘍の数がPLC・野生型背景と比べて減少していた。また、PLC・ノックアウト背景のマウスから採取された腫瘍は主に低異型度腺腫であることが分かった。以上の事から、PLC・が低異型度腺腫の形成過程とその後の悪性化の、少なくとも一つのポイントで機能していることが示唆された。

④腫瘍における炎症を検討したところ、低異型度腺腫では、Gr-1陽性炎症細胞は、PLC・の遺伝子型に関わらず観察されなかった。一方、PLC・ノックアウト背景で腫瘍細胞の細胞死の増加と細胞増殖の低下が、PLC・野生型背景と比較した場合、認められた。そこで、

血管内皮マーカー(CD・)の免疫染色で検討したところ、腫瘍血管形成が、PLC・ノックアウト背景の腫瘍で抑制されていることが分かった。また、高異型度腺腫では、Gr-1陽性炎症細胞(好中球)がPLC・野生型背景の腫瘍で多く観察されたが、ノックアウト背景では野生型背景のそれと比べ、分の程度に抑制されていた。

⑤炎症性サイトカインや血管新生因子の発現の解析の結果、低異型度腺腫では、腫瘍血管形成に関わるVEGF-Aの発現増加が見られ、それはPLC・ノックアウト背景の腺腫では著しく抑制されていた。一方、高異型度腺腫ではVEGF-Aに加えて、COX-2、Cxcl-1とCxcl-2など炎症に関わる因子の発現増加が見られ、それはPLC・ノックアウト背景の腺腫では著しく抑制されていた。さらに、VEGFとCOX-2、およびPLC・について、腫瘍とその周辺組織での発現部位の同定の結果、PLC・は腺窩の上皮細胞には発現せず、絨毛の正常上皮細胞に強く発現していた。腫瘍の異型度の上昇に伴い、PLC・の発現の低下が見られた。低異型度腺腫でのVEGFの発現は、中等度にPLC・を発現する上皮細胞に見られた。同様の傾向は高異型度腺腫でも認められたが、VEGFとPLC・の発現部位はあまり一致しなかった。COX-2は、高異型度腺腫において、PLC・陰性と思われる間質細胞で発現していた。これらのことから、PLC・によるVEGFやCOX-2の発現制御には、間接的なものが含まれることが示された。

以上の結果から、PLC・が炎症性サイトカインや血管新生因子の産生を介して腫瘍血管形成と炎症の促進を引き起こし、腫瘍形成と悪性化に関与することが明らかとなった。また、PLC・を標的とする薬剤によって、炎症や腫瘍血管形成の抑制を介する腫瘍の予防・治療が出来る可能性が示された。

(2) 皮膚炎におけるPLC・の役割について、接触皮膚炎モデルの解析により、以下の結果を得た。

①耳介の肥厚の測定から、PLC・ノックアウトにより皮膚炎が抑制される可能性が示唆された。そこで、耳介標本を作成しヘマトキシリン・エオシン染色および抗Gr-1抗体による免疫染色を行ったところ、好中球浸潤がPLC・KOマウスで抑制されていることが分かった。

②接触性皮膚炎に関わることが知られているCD4陽性ヘルパーT細胞の浸潤数を計測した結果、ヘルパーT細胞の浸潤についてはPLC・遺伝子型の違いによる差は全く見出されなかった。耳介標本でのCD4 mRNAの定量でも、これを裏付ける結果が得られた。

③惹起期のPLC・WTおよびPLC・KOマウスに

おける炎症性サイトカインの発現を、定量 RT-PCR、および免疫染色で検討した。その結果、IL-1 \cdot 、IL-1 \cdot 、Cxc1-1、Cxc1-2、Ccl-20 などのサイトカインやケモカインの発現は、PLC \cdot ノックアウトの影響を受ける事が分かり、これらの発現に PLC \cdot が関与する可能性が示唆された。また、これらの発現は、主に、PLC \cdot が本来発現している角化細胞と線維芽細胞で認められた。一方、IL-17 など T 細胞に由来するサイトカインについては、PLC \cdot ノックアウトの影響が無かった。このことは、②の結果を裏付ける結果となった。

④炎症浸潤細胞における PLC \cdot の発現は、T 細胞や好中球、マクロファージでは認められなかったため、PLC \cdot はこれらの細胞の機能調節には直接には関与しないことが明らかとなった。

⑤DNFB 感作マウス由来ヘルパー T 細胞の移植実験により、ドナー側ではなくレシピエント側の PLC \cdot がノックアウトされた場合に皮膚炎の誘導の抑制が観察された。このことから、ハプテンによる感作の過程とハプテン塗布による T 細胞の活性化過程への PLC \cdot の関与が無い事が証明されると共に、接触皮膚炎の惹起期における PLC \cdot の重要性が示された。

⑥以上の *in vivo* の実験の結果は、PLC \cdot が表皮角化細胞、あるいは線維芽細胞で、 \cdot 細胞由来因子により活性化され、その結果、それらの細胞でのサイトカイン産生を引き起こすことを示唆するものである。そこで、PLC \cdot WT および PLC \cdot KO マウス真皮から調製した線維芽細胞の初代培養を T 細胞由来サイトカインで刺激し、サイトカイン産生への PLC \cdot 遺伝子型の効果を検討すると共に、線維芽細胞での PLC \cdot の \cdot 細胞由来サイトカイン刺激による活性化の有無を検討した。その結果、 \cdot 細胞由来サイトカインによるこれら皮膚細胞でのサイトカイン産生が、PLC \cdot をノックアウトすることにより減弱する事が示され、PLC \cdot がこれらの細胞でのサイトカイン産生制御に関わることが示唆された。しかし、これらの \cdot 細胞由来サイトカインは、線維芽細胞における PLC \cdot の活性化を誘導出来なかった。

以上の結果から、接触性皮膚炎において、ハプテン塗布部位に浸潤してくる \cdot 細胞に由来する炎症性サイトカインが真皮線維芽細胞を（そして、おそらく角化細胞をも）刺激し何らかの因子をこれらに産生させ、その因子が PLC \cdot の活性化を引き起こし、IL-1 などの炎症性サイトカインの産生に繋がるという機構が考えられた。今後、PLC \cdot の活性化に繋がる因子の同定を目指す必要がある。

(3) PLC \cdot を過剰発現するトランスジェニックマウスの作成と解析を行い、これが鱗屑

の発生を伴うヒト尋常性乾癬に酷似した皮膚炎を発症することを、以下の結果により示した。

①トランスジェニックマウスの皮膚への炎症浸潤細胞は、好中球、マクロファージ、各種樹状細胞に加え、CD4 陽性 T 細胞が認められた。

②皮膚炎を起こしているトランスジェニックマウスの皮膚で発現している炎症性サイトカインは、IL-1 などに加え、IL-23、IL-22、IL-17 などヒト乾癬との関わりが示唆されているサイトカインであることが分かった。また、病理切片の免疫染色による解析の結果、浸潤している殆どの CD4 陽性細胞は IL-22 陽性細胞であることが分かった。

③トランスジェニックマウス由来の角化細胞では、IL-1 などに加えて、IL-23 が発現していることが分かった。IL-23 については初代培養細胞を用いた解析から、PLC \cdot を過剰に発現する角化細胞からの分泌の亢進を確認した。

④皮膚炎を発症しているトランスジェニックマウスの皮膚を、ステロイド剤、あるいは FK506 で処理したところ、皮膚炎の治癒が認められた。また、皮膚炎発症前のマウスを FK506 処理することで、皮膚炎の発症を阻止することが出来た。

以上の結果から、角化細胞における PLC \cdot を介するシグナル伝達系の活性化が、角化細胞での炎症性サイトカイン（特に、IL-23）の発現上昇につながり、その結果、T 細胞の浸潤と活性化を引き起こし、乾癬によく似た皮膚炎の発症に繋がることを示唆された。今後は、角化細胞における IL-23 などのサイトカインの産生における PLC \cdot の役割を明らかにすることが必要である。

以上の (1) から (3) の結果から、PLC \cdot とそれを介するシグナル伝達系が角化細胞や線維芽細胞など非免疫細胞でのサイトカイン産生の制御を通じて炎症応答に関わることが示された。今後は、PLC \cdot の活性化に繋がる内在性の受容体とそのリガンドの同定を行うとともに、ヒト疾患と PLC \cdot とそれを介するシグナル伝達系の異常との関連性を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Hu, L.*, Edamatsu, H.*, Takenaka, N., Ikuta, S., Kataoka, T. Crucial role of phospholipase C \cdot in induction of local skin inflammatory reactions in the

elicitation stage of allergic contact hypersensitivity. *J. Immunol.* (2010) 184:993-1002. (*co-first author) (査読有)

②Li, M.*, Edamatsu, H.*, Kitazawa, R., Kitazawa, S., Kataoka, T. Phospholipase C \cdot promotes intestinal tumorigenesis of *Apc*^{Min/+} mice through augmentation of inflammation and angiogenesis. *Carcinogenesis*. (2009). 30:1424-1432. (*co-first author) (査読有)

[学会発表] (計6件)

①竹中 延之、枝松 裕紀 ほか Keratinocyte-specific overexpression of phospholipase C \cdot induces psoriasis-like chronic dermatitis through activation of IL-23/TH17 axis. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜

②胡 立志、枝松 裕紀 ほか Role of phospholipase C \cdot in T cell-derived cytokine-induced activation of dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日 横浜

③枝松 裕紀 ほか ホスホリパーゼC \cdot は炎症と血管形成の増大を通してApcMinマウスの腸腫瘍形成を促進する 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 神戸

④竹中 延之、枝松 裕紀 ほか 角化細胞特異的ホスホリパーゼC \cdot 過剰発現マウスは乾癬様慢性皮膚炎を発症する 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月10日 神戸

⑤胡 立志、枝松 裕紀 ほか 接触性皮膚炎発症におけるホスホリパーゼC \cdot の重要な機能 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月10日 神戸

⑥李 明珍、枝松 裕紀 ほか PLC \cdot による小腸腺腫における腫瘍細胞の増殖と生存の制御 第67回日本癌学会学術総会 2008年10月29日 名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/molbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝松 裕紀 (EDAMATSU HIRONORI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70335438