様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：１１４０１
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１７３０５

研究課題名（和文）アトピー性皮膚炎と皮膚バリア機能におけるaPKCの役割と治療標的としての可能性

研究課題名（英文）Role of aPKC in atopic dermatitis and skin barrier function and its potential as a therapeutic target

研究代表者
野口　奈津子（Noguchi, Natsuko）

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：６０３４３０６８

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）：細胞極性を制御するatypical PKC（プロテインキナーゼC）-PAR経路は、炎症経路の制御の機能についても知られており、本研究では表皮特異的にaPKCλを欠損したノックアウト（ｃKO）マウスを用いて、aPKCが関わる炎症の調整がアトピー性皮膚炎（AD）の発症や増悪にどの程度影響しているかを検討した。2,4-dinitrofluorobenzene（DNFB）塗布による湿疹・皮膚炎誘発実験により、cKOマウスではそう破行動、耳介塗布部の腫脹、真皮肥満細胞数がコントロールマウスと比べて有意に増悪しており、aPKCは炎症程度の調整に深くかかわっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ADでの皮膚のバリア機能異常には、フィラグリン遺伝子変異以外の関連因子も関連する可能性があると考えられているが、更なる有力な候補因子は明らかになっていない。今回表皮特異的にaPKCλをノックアウトしたマウスの実験で湿疹・皮膚炎は増悪し、aPKCは炎症程度の調整に深くかかわっていることを明らかにした。aPKCおよびその経路の顆粒の関連蛋白がADの発症・増悪に関与している可能性があり、さらに関与の程度を進めることによって新規治療薬開発への足がかりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The atypical PKC (protein kinase C)-PAR pathway, which regulates cell polarity, is also known to function in the regulation of inflammatory pathways. Eczema and dermatitis induced by 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) application significantly exacerbated the scratching behavior, auricular swelling and dermal mast cell count in cKO mice compared to control mice, indicating that aPKC is closely involved in the regulation of inflammation. The results revealed that aPKC is deeply involved in the regulation of the degree of inflammation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：プロテインキナーゼC　皮膚バリア機能　aPKCλ　アトピー性皮膚炎

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎（AD）は、皮膚バリア機能に障害があるという遺伝的素因に、免疫異常や様々な環境要因など後天的因子が複合して発症すると考えられている。日本人 AD 患者におけるフィラグリンをコードする遺伝子、FLG 変異保有率は 3 割であり、FLG 変異のない AD 患者の存在や、FLG 変異があっても成長とともに症状が寛解する患者も多く、フィラグリン以外に皮膚バリア機能関連因子が存在する可能性がある。バリア機能異常には FLG 変異以外の関連因子も関与する可能性があると考えられているが、更なる有力な候補因子は明らかになっていない。

プロテインキナーゼ C (PKC)のうち非定型 PKC: atypical PKC(aPKC)は、Par6、Par3 と複合体を形成して哺乳類の単層上皮では頂端側のタイトジャンクションに局在して頂端基底極性を制御している細胞極性因子と知られているものである（Rosse, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010.）が、aPKC は表皮のバリア形成にも関わっているという報告がある（Helfrich, et al., J Invest Dermatol. 2007）。aPKC-PAR 系は線虫のような原始的な生物から哺乳類まで、進化的に保存された細胞の極性を制御する共通の機構であり、皮膚のバリア機能に強く関連している可能性がある。さらに aPKC が制御する Wnt や JAK/STAT などの経路は、種々の炎症に関わっており、AD の発症や増悪に関わっている可能性がある。

２．研究の目的

上述のように、細胞極性を制御する atypical PKC-PAR 経路は、(1) 皮膚のタイトジャンクションの機能、(2)炎症の経路の制御、の 2 つの機能が知られている。本研究では、aPKC が関わる①皮膚バリア機能への影響、② 炎症の調整が、AD の発症や増悪にどの程度影響しているかを検討する。aPKC と aPKC が制御する経路は皮膚バリア機能に関与しているのか、さらに aPKC で制御されているもうひとつの機能である炎症ともあわせて、aPKC が AD の発症および増悪に関与しているのかを明らかにすることで、病態解明だけでなく、今後の AD の新たな治療の標的を見つけ出せる可能性があると考えた。

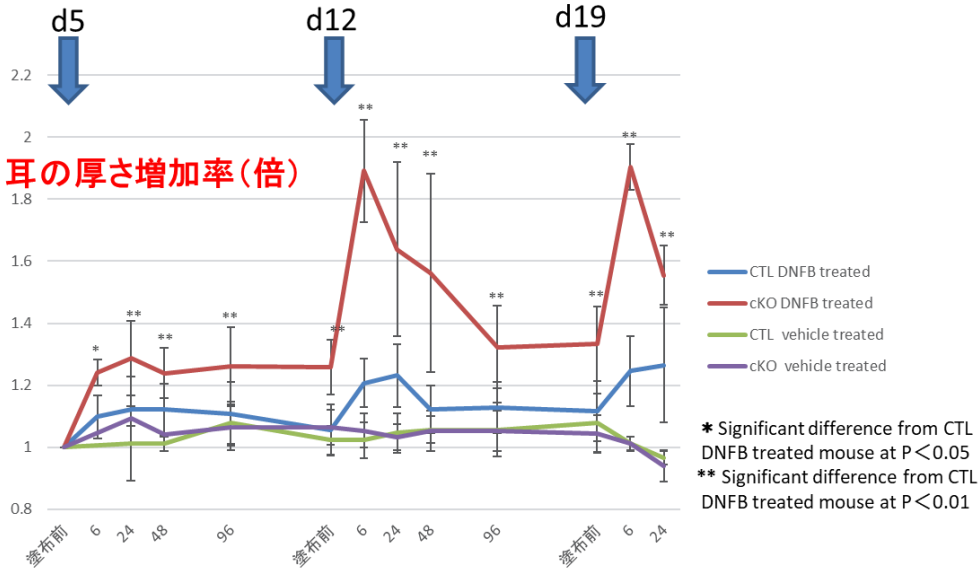
３．研究の方法

（１）表皮特異的 aPKCλノックアウトマウスによる湿疹惹起実験

表皮特異的に aPKCλを欠損したマウス（aPKCλcKO マウス）の耳介に 2,4-dinitrofluorobenzene（DNFB）を週に 1 回、3 週にわたって計 3 回、塗布することにより皮膚炎を誘発し、コントロールマウス群と比べて炎症の程度、重症度、病理組織学的所見等に違いがあるかを検討した。

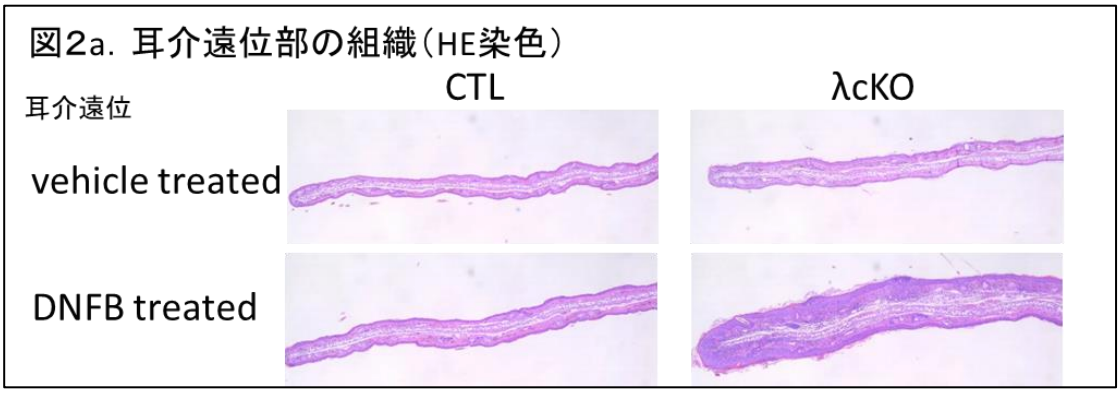
具体的には、まず day1 に腹部を剃毛後、皮膚に 0.5%の DNFB25μl を塗布して感作させ、その後 day5,day12,day19 に、週 1 回、合計 3 回耳介の皮膚に 0.15%DNFB を 20μl 塗布して皮膚炎を惹起した。①DNFB を塗布する前、day5,day12,day19 で DNFB を塗布してからそれぞれ 6 時間、24 時間、48 時間、96 時間後の、耳介の厚さをマイクロメーターにて測定した。また day20（3 回目の DNFB 塗布後 24 時間）で耳介を採取し、組織切片での耳介の厚さを計測した。②塗布前、day5,12,19 での DNFB 塗布後 1 時間、5 時間、24 時間後で、15 分間あたりのマウスの掻破行動の回数をそれぞれ計測した。③day20（DNFB を 3 回目塗布 24 時間後）で採取した耳介の重さを計測した。④day20（DNFB を 3 回目塗布 24 時間後）で採取した耳介組織での真皮肥満細胞数（トルイジンブルー染色）を計測した。

図1．マイクロメーターによる耳厚測定　経時変化（増加率）



４．研究成果

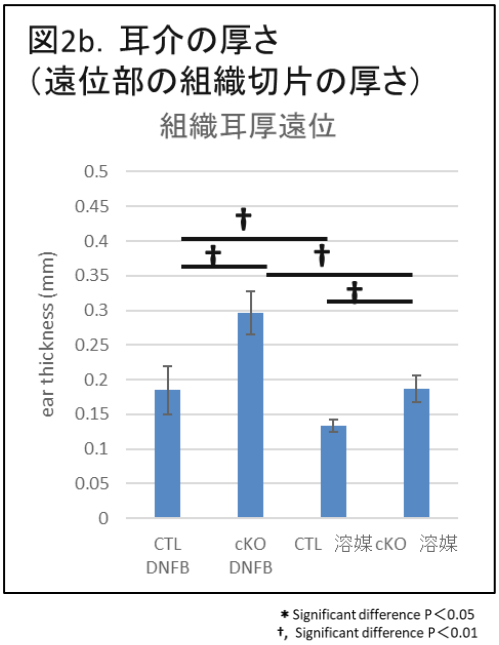
（１）表皮特異的 aPKCλノックアウトマウスによる湿疹惹起実験




①DNFB 塗布後の耳介の厚さ

aPKCλcKO マウスでは、DNFB 塗布前と比べての、DNFB 塗布 6 時間後、12 時間後、48 時間後、96 時間後のそれぞれの耳介の厚さ（マイクロメーターによる実測値）の増加率が、コントロールマウスと比べて有意に高かった（図 1）。また、2 回（day12）、3 回(day19)と DNFB 塗布の回数を重ねるごとに、塗布 6 時間後の耳介の厚さの増加率が高くなる傾向があった（図 1）。aPKCλcKO マウスではコントロールマウスと比べて DNFB 塗布により耳介の腫脹が強くなり、かつ塗布を繰り返すたびにより腫脹が強くなる傾向があった。

また、day20（DNFB3 回目の塗布後 24 時間）で耳介を採取し、その組織標本での耳介の厚さを計測したところ、aPKCλcKO マウスではコントロールマウス、および溶媒を塗布したマウスと比べて耳介の遠位部分（縁に近いところ）が有意に厚くなっていた（図 2a, 2b）。aPKCλcKO マウスでは DNFB 塗布により生じる炎症の程度が強いため、耳介の遠位で特に表皮、真皮が厚くなったと考えられた。

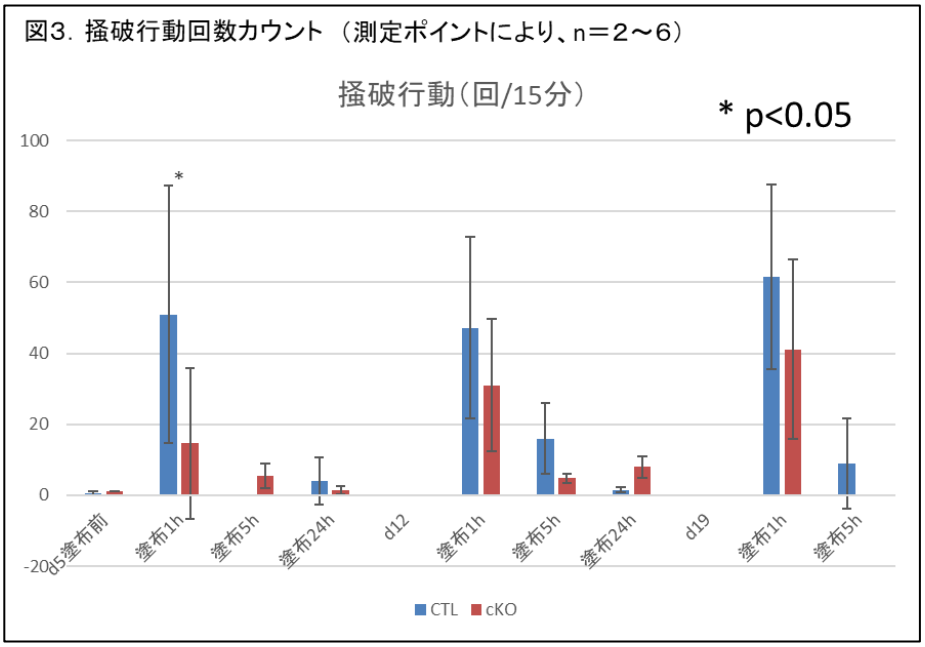



②　DNFB 塗布後のマウスの掻破行動の回数

DNFB 塗布後のマウスの掻破行動（15 分間）は、1 回目塗布（day5）1 時間後に aPKCλcKO マウスではコントロールマウスと比べて回数が有意に増えていた。その他の計測ポイントで有意差はなかったが、aPKCλcKO マウスではコントロールマウスと比べて掻破行動の回数が多い傾向があった（図 3）。aPKCλcKO マウスでは DNFB 塗布によって生じた炎症が強いため、掻破行動の回数が増えたと考えられた。

③　DNFB 塗布後の耳介の重量

Day20（3 回目の DNFB 塗布 24 時間後）に、耳介を採取して重さを計測したところ、採取した耳介の重さは aPKCλcKO マウスとコントロールマウス、また溶媒を塗布したマウスとの間に有意差はなかった（図 4）。



④　耳介組織での真皮肥満細胞数（トルイジンブルー染色）

Day20（DNFB3 回目塗布 24 時間後）に採取した耳介組織の拡大像（HE 染色）では、aPKCλcKO マウスではコントロールマウスおよび溶媒を塗布したマウスと比べて表皮が厚くなり、真皮の浮腫、腫脹と炎症細胞浸潤の程度が強いことが分かった（図 5）。

また、トルイジンブルー染色によりの真皮の肥満細胞数を計測したところ、aPKCλcKO マウスでは CTL マウスと比べて肥満細胞数が有意に増加していた（図 6a, 6b）。aPKCλcKO マウスでは DNFB 塗布により、真皮の炎症細胞、肥満細胞数浸潤が強くなることが分かった。

上記の通り、aPKCλcKO マウスを用いた DNFB 塗布による湿疹惹起実験により、cKO マウスでは掻破行動、耳介塗布部の腫脹（実測値および組織学的）、真皮肥満細胞数がコントロールマウスと比べて有意に増悪した。aPKCλは炎症程度の調整に深くかかわっていることを明らかにした。AD の発症や増悪、aPKC が関わっている可能性があると考えられる。aPKC およびその経路の顆粒の関連蛋白が AD の発症・増悪に関与している可能性があり、さらに関与の程度の検討を進めることによって新規治療薬開発への足がかりになると考えられる。

図4. 採取した耳介の重さ

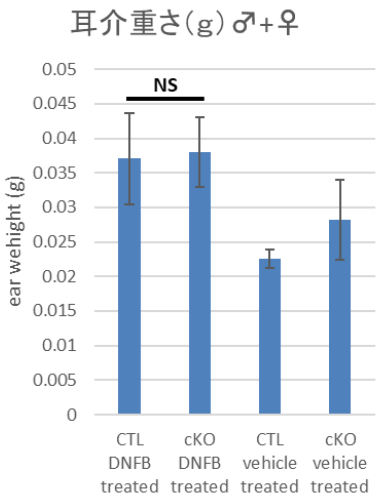



図5. 耳介組織のHE染色　×200

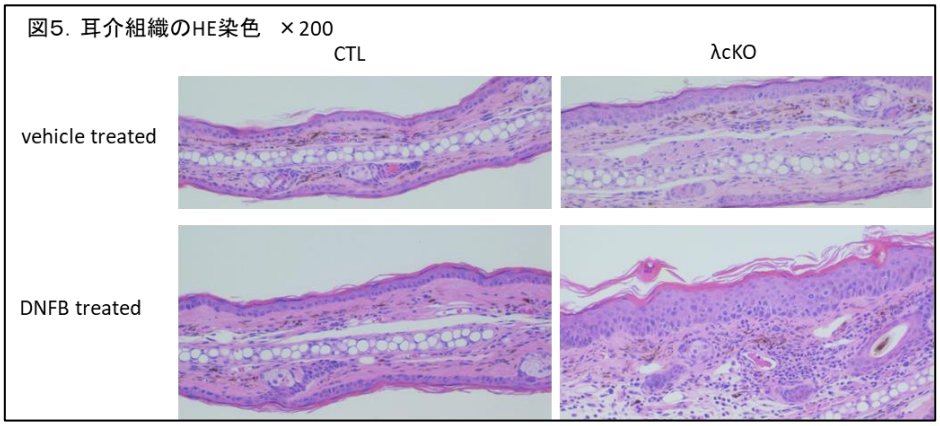



図6a. 耳介組織のトルイジンブルー染色　×400

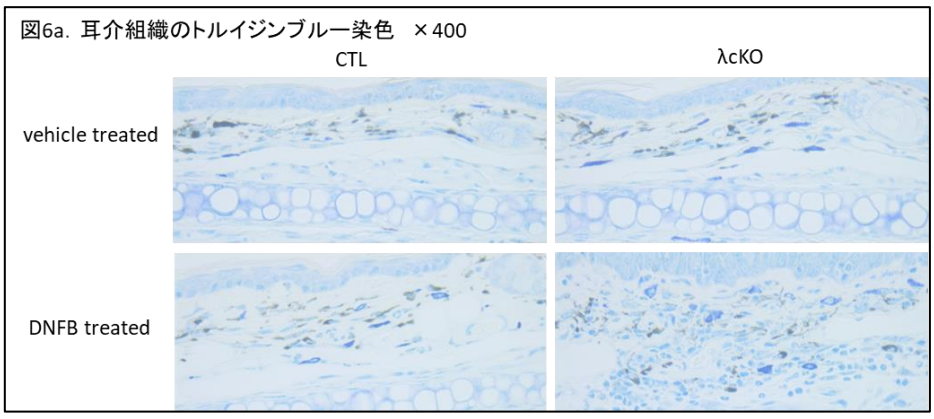
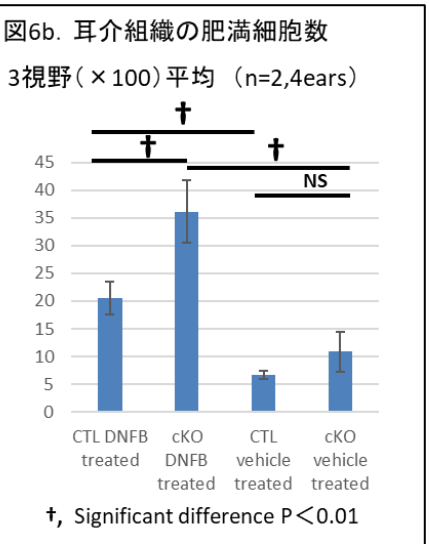



図6b. 耳介組織の肥満細胞数



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4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<br>Sato T, Chiba T, Nakahara T, Watanabe K, Sakai S, Noguchi N, Noto M, Ueki S, Kono M. | ４．巻<br>112 |
| ２．論文標題<br>Eosinophil-derived galectin-10 upregulates matrix metalloproteinase expression in bullous pemphigoid blisters | ５．発行年<br>2023年 |
| ３．雑誌名<br>Journal of Dermatological Science | ６．最初と最後の頁<br>6～14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jdermsci.2023.07.008 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>堀江 咲織、野口 奈津子、能登 舞、長井 拓哉、渡部 健、加賀 一、金澤 達郎、河野 通浩 | ４．巻<br>65 |
| ２．論文標題<br>症例 結節性紅斑をきっかけに高安動脈炎と診断し得た1例 | ５．発行年<br>2023年 |
| ３．雑誌名<br>皮膚科の臨床 | ６．最初と最後の頁<br>2019～2023 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18888/hi.0000004310 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Natsuko Noguchi　Takahiko Sato　Hiroyuki Adachi　Takuya Nagai　Yayoi Tomura　Aya Toyoshima　Tsutomu Takahashi　Motomu Manabe　Shin‐Ichi Osada | ４．巻<br>47 |
| ２．論文標題<br>Infant case of generalized pustular psoriasis preceded by interstitial lung disease | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>The journal of dermatology | ６．最初と最後の頁<br>e322-e324 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1346-8138.15465 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>林 和紀子，豊島 あや，佐藤 貴彦，戸村 八蓉生，長井 拓哉，野口 奈津子，河野 通浩 | ４．巻<br>62 |
| ２．論文標題<br>エペリゾン塩酸塩による蕁麻疹型薬疹の1例 | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>皮膚科の臨床 | ６．最初と最後の頁<br>1666-1669 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18888/hi.0000002242 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

〔学会発表〕　計12件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

1．発表者名
Toyoshima A, Noguchi N, Sasaki J, Sasaki T, Manabe M , Osada S

2．発表標題
Selective blockade of phosphatidylinositol-3 kinase γ suppresses the development of cutaneous squamous cell carcinoma.

3．学会等名
国際研究皮膚科学会（ISID2023）（国際学会）

4．発表年
2023年

1．発表者名
堀江咲織，野口奈津子，能登　舞，長井拓哉，渡部　健，加賀　一，　金澤達郎，河野通浩

2．発表標題
結節性紅斑をきっかけに大動脈炎症候群と診断し得た1例.

3．学会等名
日本皮膚科学会秋田地方会第401回例会

4．発表年
2023年

1．発表者名
赤坂有妃子，野口奈津子，伊藤　拓，鈴木長男，安澤数史，望月　隆，原田和俊，河野通浩

2．発表標題
パキスタン人小児に生じたMicrosporum ferrugineumによる頭部白癬の1例

3．学会等名
第35回東北真菌懇話会（日本医真菌学会支部会）

4．発表年
2023年

1．発表者名
小松田恵理子，野口奈津子，佐藤貴彦，　能登　舞，矢島晴美，河野通浩

2．発表標題
COVID-19オミクロン株対応2価ワクチン接種後に急性痘瘡状苔癬状粃糠疹様の皮疹を生じた1例.

3．学会等名
日本皮膚科学会秋田地方会第403回例会

4．発表年
2023年

１．発表者名
赤坂有妃子，野口奈津子，新田悠介，高橋郁子，高橋勉，河野通浩

２．発表標題
Turner症候群患者に生じた汎発型円形脱毛症にバリシチニブが奏功した１例

３．学会等名
日本皮膚科学会　秋田地方会　第405　　回例会

４．発表年
2024年

１．発表者名
石塚大，野口奈津子，能登舞，長尾貴代，高橋直人，八木英一，　河野通浩

２．発表標題
凍瘡様紅斑から診断に至った骨髄異形成症候群の1例

３．学会等名
日本皮膚科学会　秋田地方会　第399回例会

４．発表年
2022年

１．発表者名
熊谷史子，野口奈津子，水澤雄太，鈴木あけみ，　河野通浩

２．発表標題
汎発型円形脱毛症合併のアトピー性皮膚炎に対し、デュピルマブ投与後に発毛がみられた1例

３．学会等名
日本皮膚科学会　秋田地方会　第400回例会

４．発表年
2022年

１．発表者名
堀江咲織，野口奈津子，長井拓哉，渡部健，加賀　一，金澤達郎，河野通浩

２．発表標題
結節性紅斑をきっかけに大動脈炎症候群と診断し得た1例

３．学会等名
日本皮膚科学会　秋田地方会　第401回例会

４．発表年
2022年

１．発表者名
林和紀子，野口奈津子，新田悠介，堀江咲織，佐藤貴彦，東海林怜，長井拓哉，豊島あや，山田泰子，河野通浩

２．発表標題
座位姿勢補助器具を用いて尾骨部の難治性褥瘡が治癒に至った1例.

３．学会等名
第17回日本褥瘡学会東北地方会学術集会

４．発表年
2021年

１．発表者名
林和紀子， 野口奈津子， 河野通浩

２．発表標題
座位姿勢補助器具の使用により尾骨部の難治性褥瘡が治癒に至った1例

３．学会等名
日本皮膚科学会秋田地方会第391回例会

４．発表年
2020年

１．発表者名
熊谷 史子，能登 舞，野口 奈津子，長井 拓哉，山川 岳洋，河野 通浩

２．発表標題
Multicentric reticulohistiocytosisの1例

３．学会等名
第85回日本皮膚科学会東部支部学術大会

４．発表年
2021年

１．発表者名
伊藤　拓， 能登　舞， 野口奈津子，河野通浩

２．発表標題
頭部の慢性刺激により生じた後天性結節状裂毛症の1例.

３．学会等名
第86回日本皮膚科学会東部支部学術大会

４．発表年
2022年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---|---|