

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390323

研究課題名（和文） 乾癬表皮における細胞内情報伝達機構を介する増殖と分化制御の研究

研究課題名（英文） Cellular signaling system in Psoriatic epidermis

研究代表者

飯塚 一 (IIZUKA HAJIME)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90113513

研究成果の概要（和文）：3次元培養系を用いて表皮細胞における podoplanin の誘導が IL-22 により STAT3 依存性に引き起こされ、これが表皮細胞増殖と連動していることを示した。この培養系では顆粒層の消失と錯角化も認められ、乾癬表皮と類似の表現型を示している。Podoplanin は、創傷治癒表皮および乾癬表皮で、その発現が認められた。さらに表皮細胞の STAT3 依存性 podoplanin 発現は、乾癬表皮でも、顆粒層陰性のより細胞密度の上昇した表皮で陽性所見が得られること、また発現が表皮稜の下端に合致することも見出した。これは表皮幹細胞マーカーである $\beta 1$ インテグリン発現とちょうど逆パターンになっており、想定される transit amplifying cell (TA 細胞) の存在部位に合致している。

研究成果の概要（英文）：Podoplanin expression of keratinocytes was induced by IL-22 in a STAT-3-dependent manner. The podoplanin expression was highly upregulated in basal cells of granular layer-negative psoriatic epidermis compared with that of granular layer positive less hyperproliferative epidermis. Furthermore, podoplanin expression was more marked on basal cells of psoriatic rete ridges where stem cell-derived transit amplifying cells are assumed to be located. The finite proliferative potential of transit amplifying cells was confirmed in keratinocyte following podoplanin induction. These results indicate that podoplanin might be a novel marker of transit amplifying cells of epidermis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,500,000	1050000	4,550,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：乾癬、表皮細胞、細胞内情報伝達、ポドプラニン。IL-22

1. 研究開始当初の背景
乾癬の病因論は大きく2つの振り子の間を

行き来してきた。1つは表皮に（潜在的な）

異常があるとする表皮原発説、もう1つは、T細胞を中心とする免疫異常が本体であるとする説である。後者については、過去10年の間に新しい細胞系としてTh17細胞が検出され、これを誘導する細胞としてTIP-DCが発見され、IL-22をはじめとする各種サイトカインにより、乾癬の表皮細胞増殖が説明されるようになった。これは、乾癬における抗TNF α 製剤や抗IL-23p40抗体の驚くべき治療上の有効性とあいまって、TIP-DC—Th17細胞学説、さらにはIL-23-T17軸の概念へと進化し、リンパ球学説自体、大きな変動期を迎えている。

一方、われわれは表皮について主に検索を進め、細胞内情報伝達系の異常をいくつか見出し、さらにリモデリングの概念で乾癬組織構築が解釈可能であることを証明している。これは端的に言えば増殖亢進のみで乾癬の表皮構築と角化異常は説明できるということであるが、これが前述のTIP-DC学説とどのような関連を持つかについては不明のままであった。特にリモデリングモデルについては、幹細胞、transit amplifying細胞(TA細胞)の同定が不可欠であるが、TA細胞の適切なマーカーが存在しないことが大きな問題点となってきた。

2. 研究の目的

本研究では、以上の点につき、表皮細胞増殖に関与する細胞内シグナルの異常との関連のもとに検討を加え考察した。

3. 研究の方法

表皮細胞の3次元培養系を用いて、IL-22を含む各種サイトカインによるポドプランンの発現を検討した。siRNAやアデノウイルスshRNA、また特異的阻害薬を用いて発現制御の検討を行った。正常表皮、乾癬表皮におけるポドプランンの発現を免疫組織化学的に検討し、細胞増殖との関連もあわせて調べた。

4. 研究成果

本研究においては、乾癬における細胞増殖亢進と角層剥離機構を含む角化異常について、近年、注目されているTIP-DC-Th17細胞学説との関連のもとに検討を加えた。

(1) 表皮細胞においてpodoplaninの誘導がIL-22によりSTAT3依存性に引き起こされ、これが表皮細胞増殖と連動していることを、3次元培養系を用いて示した(Honma et al: J Dermatol Sci 65: 134, 2012)。興味深いことに、この培養系では顆粒層の消失と錯角化も認められ、乾癬表皮と類似の表現型を示している。Podoplaninは、通常、リンパ管で発現し、正常表皮では陰性であるが、創傷治癒表皮および乾癬表皮では、その発現が認められ、これは従来からいわれている乾癬表皮と創傷治癒表皮の類似性を支持する所見である。さらに表皮細胞のSTAT3依存性podoplanin発現は、乾癬表皮でも、顆粒層陰性のより細胞密度の上昇した表皮で陽性所見が得られること、また発現が表皮稜の下端に合致することも見出した。これは表皮幹細胞マーカーである β 1インテグリン発現とちょうど逆パターンになっており、想定されるtransit amplifying cell (TA細胞)の存在部位に合致している。このことは、podoplaninが、TA細胞の新しいマーカーとなりうることを示す所見と考えられる(Honma et al: J Dermatol 40: 296-7, 2013)。またpodoplanin誘導におけるこれらの所見は、EGF受容体のリン酸化と連動しており、増殖亢進に伴う強い細胞接着が、おそらくjuxtacrine機構により、EGF受容体を介するSTAT3リン酸化を介したシグナルをもたらし、podoplaninが誘導されることを示唆している(Fujii et al: Cellular Signal (in press))。

(2) 表皮細胞の終末角化と角層剥離機構は、極めて秩序だったシステムであることが、lamellar granule分泌(Ishida-Yamamoto et al. PLoSOne 7: 1, 2012)やkallikrein-protease system (Kishibe et al: J Invest Dermatol 132: 1717-24, 2012, Igawa et al: Exp Dermatol 20:53-57, 2012)により示され、乾癬表皮の分化異常の新しい解析法となりうることが示された。角質剥離機構の異常は、われわれの過去の検討も含め、いくつかの角化異常性皮膚疾患で

示されており、乾癬においても、proteaseの活性化のタイミング異常など同様な不完全な剥離機構が予想される。

(3) 表皮細胞における95KD B-Rafのノックダウンによる表皮細胞の増殖低下は、EGF受容体の下流に位置するMAP kinase経路を介して、角化マーカーであるinvolucrin, loricrinの発現上昇と連動していることを示した。この所見は、正常な表皮細胞培養系におけるconfluent状態に対応した所見とみなされる。乾癬では、細胞密度的にはconfluent状態が予想されるにもかかわらず、表皮細胞は、増殖、角化マーカーの発現のいずれも、あたかもsubconfluentであるかのようにふるまっており、さらにこれは表皮細胞内分子EPACを介してcyclic AMP経路とつながっている。このことは、乾癬表皮のcyclic AMPシグナル伝達の低下とあわせ、乾癬において同シグナルの増幅が、治療的意味を有する可能性を示唆するものである。なお本研究の過程で、95kD B-Rafの乾癬における発現増強は、表皮異常増殖に伴うおそらく2次的な現象であることも示された。

以上の結果は、乾癬表皮ではTA細胞領域の大幅な増加が起こっている過去の報告とあわせpodoplaninが、表皮におけるTA細胞の有力な新規マーカーになりうること、また、この現象が、乾癬表皮でみられるEGF受容体の活性化と連動していることを示している。また同時に、乾癬の全体的な組織構築が、増殖と剥離機構を含む分化の異常により、制御されていることを示すものである。我々の結果は、乾癬においては、EGF受容体系を含めた増殖と分化のシグナルが、正常表皮とは全く異なるものの、極めて秩序だった整合性のあるシステムであり、また増殖後、基底細胞層から切り離された乾癬表皮細胞の運命が、早期に決定づけられていることを示唆している。

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 10 件)

① Honma M, Fujii M, Iinuma S, Minami-Hori M, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, lizuka H: *Podoplanin expression is inversely correlated with granular layer/filaggrin formation in psoriatic epidermis.*J Dermatol

40: 296-7, 2013

② Honma M, Minami-Hori M, Takahashi H, lizuka H: *Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: Regulation by TGF-beta and STAT-3 activating cytokines, IFN-gamma, IL-6, and IL22.*J Dermatol Sci 65: 134-140, 2012

③ Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Takahashi H, lizuka H: *Lamellar granule secretion starts before the establishment of tight junction barrier for paracellular tracers in mammalian epidermis.* PloS One 7: 1-7, 2012

④ Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, lizuka H, Yoshida S: *Kallikrein-Related Peptidase 8-Dependent Skin Wound Healing Is Associated with Upregulation of Kallikrein-Related Peptidase 6 and PAR2.* J Invest Dermatol 132: 1717-24, 2012

⑤ Takahashi H, Nakamura K, Kaneko F, Nakagawa H, lizuka H: *Analysis of psoriasis patients registered in Japanese Society for Psoriasis Research from 2002 to 2008.* J Dermatol 38: 1125-9, 2011

⑥ lizuka H: *Management of patients with psoriasis in Japan.* Adv Psoriasis & Inflammatory skin diseases. : 126-132, 2011

⑦ Takahashi H, Tsuji H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, lizuka H: *Serum cytokines and growth factor levels in Japanese patients with psoriasis.* Clin Exp Dermatol 35: 645-9, 2010

- ⑧ Mizukoshi K, Matsumoto K, Hirose R, Fujita T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Effects of serine palmitoyltransferase inhibitor ISP-1 on the stratum corneum of intact mouse skin. *Biol Pharm Bull* 34: 1383-9, 2011
- ⑨ Igawa S, Kishibe M, Murakami M Honma M, Takahashi H, Iizuka H, Ishida-Yamamoto A: Tight junctions in the stratum corneum explain spacial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol* 20: 53-57, 2010
- ⑩ Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Adiponectin and leptin modulate cell proliferation and cytokine secretion of normal human keratinocytes and T lymphocytes. *J Dermatol Sci* 59: 143-145, 2010

[学会発表] (計 10 件)

- ① Honma M, Fujii M, Takahashi H, Iizuka H: Podoplanin alters beta1-integrin-mediated cell adhesion and initiates terminal differentiation in human epidermal keratinocytes. The 37th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2012
- ② Igawa S, Iizuka H, Kishibe M, Minami-Hori M, Honma M, Murakami M, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: A desquamation paradox of atopic dermatitis: markedly remaining corneodesmosomes despite the increased serine protease activity in vitro. The 37th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2012
- ③ Fujii M, Honma M, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Cell density-dependent induction of podoplanin

through EGFR-STAT3 signaling pathway contributes to increased cell invasion of SCC cells. The 37th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2012

④ Kishibe M, Igawa S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Kallikrein-related peptidase 8 is involved in skin wound healing the rough upregulation of KLK6 and protease activated receptor 2. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011

⑤ Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Murakami M, Iizuka H: Epidermal lamellar granule secretion starts before establishment of paracellular permeability barrier. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011

⑥ Fujii M, Honma M, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Podoplanin induces upregulated cell mortality through activation of cofilin and matrix metalloproteinase-9 in HaCat cells. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011

⑦ Iizuka H: A new era of the pathophysiology of psoriasis: anti-TNF- α agents as a smart bomb with multiple targets. The 35th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010

⑧ Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M, Murakami M, Honma M, Iizuka H: Tight junctions in the stratum corneum explain special differences in corneodesmosome degradation. The 35th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010

⑨ Honma M, Fujii M, Iizuka H: Podoplanin upregulates cell mortality through the activation of cofilin and matrix metalloproteinase in immortalized epidermal keratinocytes. The 35th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010

⑩ Takahashi H, Tsuji H, Iizuka H: Adiponectin and leptin modulate cell proliferation and cytokine expressions of normal human keratinocytes and T lymphocytes. The 35th annual meeting of the Japanese Society for Investigative

Dermatology 2010

(3)連携研究者
()

〔図書〕(計1件)

Iizuka H: Psoriasis. In Therapy of Skin Diseases. Eds: Krieg, Bickers, Miyachi; Springer 2010. pp193-211

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯塚 一 (IIZUKA HAJIME)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90113513

(2)研究分担者

山本 明美 (YAMAMOTO AKEMI)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30241441

高橋 英俊 (TAKAHASHI HISWTOSHI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：00216748

本間 大 (HONMA MASARU)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：50344578