

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24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390325

研究課題名（和文） 乾癬発症機序におけるNFκB抑制因子Bcl-3, IκBNSシグナル伝達経路の役割

研究課題名（英文） Role of signal transduction pathway of Bcl-3 and IκBNA in the pathogenesis of psoriasis

研究代表者

橋本 公二 (HASHIMOTO KOJI)

愛媛大学・先端研究・学術推進機構学術企画室・特命教授

研究者番号：00110784

研究成果の概要（和文）：

乾癬発症機序における NF-κB の役割を明らかにするために IκBNS 欠損マウスを作製し乾癬病変が誘発できるか検討し、培養表皮細胞を用いて Bcl-3 の機能を明らかにした。IκBNS 欠損マウスは乾癬病変を自然発症することはなかったが、創傷刺激や TPA 刺激により乾癬病変が誘発された。角化細胞を用いた検討では IL-22 の刺激により誘導される乾癬関連遺伝子が Bcl-3 の機能をあらかじめ抑制しておくことで誘導は抑制され、逆に Bcl-3 を強制発現させておくことで乾癬関連遺伝子誘導は増強された。さらに乾癬の病変部においては Bcl-3 が明らかに発現増強していた。以上より乾癬の病態においては NFκB, Bcl-3 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the role of NF-κB in the pathogenesis of psoriasis, we examined whether pathological change of psoriasis was induced in IκBNS deficient mice. We also clarified the function of Bcl-3 in cultured epidermal keratinocytes. Although the IκBNS deficient mice did not spontaneously generate psoriatic skin phenotype, the psoriasis pathological change was induced by the wound stimulus and the TPA treatment.

IL-22-induced psoriasis-related genes were suppressed by the pretreatment of Bcl-3 suppression. On the other hand, overexpression of Bcl-3 induced psoriasis-related gene expression. Furthermore, Bcl-3 was strongly detected psoriatic skin. In conclusion, NFκB and Bcl-3 play important roles in the pathogenesis of psoriasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：尋常性乾癬、シグナル伝達、培養角化細胞、NFκB、Bcl-3、IκBNS

1. 研究開始当初の背景

| 乾癬は皮膚科領域を代表する疾患で

あり、表皮の過増殖、血管内皮の過剰増殖、炎症性細胞浸潤を特徴とし、炎症性角化症に分類される。NF- κ Bは、TNF受容体、IL-1受容体、Toll-like receptor (TLR)、紫外線照射などの下流に存在し、抗アポトーシス作用に加えて、種々の免疫反応、炎症反応において重要な働きを持つことが知られている。乾癬病変部に大量のTNF- α が存在すること、TNFシグナル伝達経路を阻害する生物学的製剤が乾癬の治療に有効であること、TNFシグナル伝達系におけるNF- κ Bの重要な役割を考えれば、乾癬の発生機序に、NF- κ Bが関与していることが予想される。

2. 研究の目的

乾癬発生機序におけるNF- κ Bの役割を、NF- κ Bのnegative regulatorであるI κ BNS欠損マウスを用いて乾癬モデルマウスを作製し、また培養表皮細胞を用いてBcl-3の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

NF- κ Bのnegative regulatorであるI κ BNS欠損マウスを作製し、乾癬病変が誘導できるかについて検討する。過去の乾癬モデルマウスを作成した実験結果より、乾癬様病変が自然発生する場合、創傷により誘導される場合、TPA塗布により誘導される場合が報告されているため、これら3条件下で乾癬様皮膚病変の発現を検討する。具体的な皮膚病変としては、紅斑、鱗屑、皮膚肥厚を示標とする。自然発生モデル：特に、マウスの尾部、後背側足部に注目して観察する。これらの部位は機械的外傷を受けやすく、病変が誘発されやすいと考えられることに基づく。創傷誘発モデル：創傷としては、皮膚全層創傷による創傷を用いる。生後6~8週令のマウスに麻酔を行った後、背部にパンチバイオプシーに準じて直径8mmの創傷を作成する。TPA誘発モデル：マウス背部の脱毛を行った後、3.4nmolのTPAを1週間に2回塗布する。皮膚病変の組織学的検討：乾癬病変の特徴である表皮肥厚、rete ridgeの延長、顆粒層の消失、錯角化、表皮への好中球の浸潤、真皮上層の網細血管の増生などの有無を検討する。これらのパラメーターの測定に際しては、画像撮影装置を使用し、デジタルファイルを基に画像解析を行う。免疫染色：乾癬モデルマウス、乾癬病変部においてシグナル伝達分子であるSTAT3、Bcl-3などについて免疫組織学的に検討する。

表皮細胞におけるBcl-3およびI κ BNSの役割を明らかにするために、角化細胞を無血清

培養にて培養しシグナル伝達について比較検討する。培養表皮細胞にBcl-3およびI κ BNSを強制発現する方法として、レンチウイルスベクターを用いる。また、Bcl-3およびI κ BNSの発現を抑制する方法として、siRNAを用いる。Bcl-3およびI κ BNSを発現するレンチウイルスベクターの作製は、invitrogen社レンチウイルス発現システムキットを使用する。Bcl-3およびI κ BNSの発現を抑制するsiRNAの作製は、アルゴニズム解析ソフトウェアを用いて、off-target効果、配列によるsequence確認の難易度、ヘアピン形成時の安定性などを考慮し、効率が高いと思われる配列をそれぞれ3種類決定する。コントロールにはそれぞれのスクランブル配列を用いる。sh-RNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖の間にリンカー配列を挟んで一本鎖として発現させリンカーによりループを作り、ヘアピン状の二本鎖を形成するように設計しオリゴヌクレオチド合成装置により合成する。これらの細胞、レンチウイルスベクター、siRNAを用いて、IL-22刺激により誘導される乾癬関連遺伝子におけるBcl-2、NF κ Bの役割について検討する。

4. 研究成果

I κ BNS欠損マウスを用いて乾癬モデルマウスの作成とその解析を行った。I κ BNS欠損マウスを交配にて増殖させることができた。まず乾癬が自然発症するかどうかについて、50週まで経過観察したが、明かな皮膚病変は発現しなかった。次にI κ BNS欠損マウスを交配にて増殖させ、欠損マウスを40匹以上得た。これらのマウスの背部を剃毛し、8mmパンチにて全層皮膚欠損を作製した。コントロールと比較して創傷治癒遅延と創周囲の紅斑が認められた。TPA誘発モデルについては背部を剃毛後、TPAを週に2回背部に塗布し、合計3週間塗布した。塗布終了後1日目、7日目、14日目、21日目に背部の皮膚を採取し組織学的に検索した。TPA塗布終了時には皮膚の肥厚、紅斑、鱗屑と過角化がみられた。組織学的検索では過角化、錯角化、表皮の肥厚と真皮内炎症性細胞浸潤が認められ、尋常性乾癬の病変と類似していた。21日目には正常皮膚に回復していた。

培養マウス表皮細胞および培養ヒト表皮細胞を中心にin vitro実験を行い、その結果をマウスモデルの結果と比較し、NF- κ Bの乾癬皮膚における役割を明らかにするためにI κ BNS欠

損マウスから角化細胞を培養し、増殖させた後凍結保存した。さらに、ヒト角化細胞を用いる実験のために Bcl-3, IkbNS を強制発現するレンチウイルスベクターを作成し、力価を測定した。培養マウス表皮細胞および培養ヒト表皮細胞を行いて細胞内シグナル伝達についての解析を行った。IL-22 の刺激により STAT3 のリン酸化が誘導され、その後 S100, IL-8, HB-EGF などの乾癬関連遺伝子が誘導されることを確認し、その際に Bcl-3 が誘導されることを明かにした。Bcl-3 の機能を、ドミナントネガティブ効果を有するレンチウイルスベクターや siRNA にてあらかじめ抑制しておくことと IL-22 依存性乾癬関連遺伝子の誘導は抑制され、逆に Bcl-3 を強制発現させておくと IL-22 による乾癬関連遺伝子誘導は増強された。さらに乾癬の病変部における Bcl-3 の発現を免疫組織学的に解析したところ、正常皮膚と比較して明らかに発現が増強していた。以上より乾癬の病態においては NFkB, Bcl-3 が重要な役割を果たしていることが推測される。

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 23 件) 全て査読有り

1. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K.: Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol.* 39:366-74. 2012
2. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y.: Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 2012 65:50-7
3. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y.: Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. *J Dermatol Sci.* 2012 65:224-226.
4. Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S.: Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell.* 2012 in press
5. Soma T, Fujiwara S, Shirakata Y, Hashimoto K, Kishimoto J.: Hair-inducing ability of human dermal papilla cells cultured under Wnt/ β -catenin signalling activation. *Exp Dermatol.* 21:307-9. 2012
6. Saleh MA, Ishii K, Yamagami J, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: Pathogenic Anti-Desmoglein 3 mAbs Cloned from a Paraneoplastic Pemphigus Patient by Phage Display. *J Invest Dermatol.* 132:1141-8. 2012
7. Tohyama M, Watanabe H, Murakami S, Shirakata Y, Sayama K, Iijima M, Hashimoto K: Possible involvement of CD14+ CD16+ monocyte lineage cells in the epidermal damage of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol.* 166:322-30. 2012
8. Saleh MA, Ishii K, Kim Y, Murakami A, Ishii N, Hashimoto T, Schmidt E, Zillikens D, Shirakata Y, Hashimoto K, Kitajima Y, Amagai M.: Development of NC1 and NC2 domains of Type VII collagen ELISA for the diagnosis and analysis of time course of epidermolysis bullosa acquisita patients *J Dermatol Sci.* 62:169-75, 2011
9. Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, Ikezawa Z, Iijima M, Shiohara T, Hashimoto K, Kamatani N, Nakamura Y.: Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. *Hum Mol Genet.* 20:1034-41, 2011

10. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. : Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 127:806-814, 2011
11. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shiraishi K, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, Sayama K. : Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced lymphatic endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 412:441-5. 2011
12. Shirakata Y, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. : Auto- and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 58(2):162-4, 2010
13. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. : Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS One.* 5:e11275, 2010
14. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. : E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem.* 285:30042-9, 2010
15. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. : PPAR γ mediates innate immunity by regulating the $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 60:179-86, 2010
16. Watanabe H, Tohyama M, Komijima M, Nakajima T, Yohida T, Hashimoto K, and Iijima M Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome with human herpesvirus-6 and cytomegalovirus reactivation *Dermatology* 221:408-410, 2010
17. Sugita K, Tohyama M, Watanabe H, Otsuka A, Nakajima S, Iijima M, Hashimoto K, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K. Fluctuation of blood and skin plasmacytoid dendritic cells in drug-induced hypersensitivity syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 126:408-410, 2010
18. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S. : Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology.* 116:685-90, 2009
19. Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K. : The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes. *J Allergy Clin Immunol.* 123:971-2, 2009
20. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y. : Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. *Mol Vis.* 15:937-48, 2009
21. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K. : IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol.* 39:2279-88, 2009
22. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K: Living Skin Equivalents Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J Dermatol Sci.*

- 56:188-95, 2009
23. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.: Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis: Role of Tumor-Induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. *Am J Pathol.* 175:2235-48, 2009

[学会発表] (計 10 件)

1. Shirakata Y, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K.: Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research 9/8-11, 2010 Helsinki, Finland
2. Tohyama M, Yang L, Tsuda T, Miyawaki S, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.: Interferon alpha enhances IL-22 receptor expression on epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
3. Shirakata Y, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K.: Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
4. Sayama K, Dai X, Shirakata Y, Tohyama M, Miyawaki S, Hirakawa S, Hashimoto K.: Mite allergen is a danger signal for the skin. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland, 9/8-11, 2010.
5. Hashimoto K.: Overlap between the Drug-induced hypersensitivity syndrome and the Stevens Johnson Syndrome. 4th International Drug Hypersensitivity Meeting 6/10, 2010, Rome, Italy
6. Shirakata Y, Ishikawa M, Murakami S, Hashimoto K.: Successful treatment of severe pemphigus vulgaris with high-dose intravenous immunoglobulin. 9th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology 6/9-12, 2010 Weimar, Germany
7. Shirakata Y, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K.: Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research 9/10-12, 2009 Budapest, Hungary
8. Shirakata Y and Hashimoto K.: Development of a new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists 7/10-12, 2009 Sapporo, Japan
9. Hirakawa S, and Hashimoto K.: Lymph node lymphangiogenesis—a new concept in cancer metastasis. Symposium in 7th World Congress on Melanoma and 5th Congress of the European Association of Dermato-Oncology (EADO) 5/12-16, 2009 Vienna, Austria
10. Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology 5/6-9, 2009 Montreal, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 公二 (HASHIMOTO KOJI)

愛媛大学・先端研究・学術推進機構学術企画室・特命教授

研究者番号: 00110784

(2)研究分担者

村上 信司(MURAKAMI SHINJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50175626