

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（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591433  
 研究課題名（和文） 表皮特異的及び表皮とT細胞特異的なKOマウスによるSOCS1の乾癬病態関与の解析

研究課題名（英文） Pathophysiology of psoriasis: analysis via SOCS1 KO mice in epidermis and T cell.

研究代表者  
 花川 靖 (HANAKAWA YASUSHI)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：90284398

研究成果の概要（和文）：難治性の疾患である乾癬の病態形成におけるSOCS1の役割を解明することを目的とした。STAT familyのnegative regulatorであるSOCS1の乾癬の病態形成への関与を解析するためSOCS1-flox/floxマウスとK5-Creマウスを交配した。表皮特異的にSOCS1を欠損したマウスには創傷治癒遅延を認めた。病理組織、免疫組織染色法の結果より過剰な炎症反応により創傷治癒遅延を生じていることが推測された。

研究成果の概要（英文）：To investigate pathophysiology of chronic skin disease of psoriasis, the functional involvement of SOCS1 was analyzed. SOCS1 is the negative regulator of STATs, and epidermis-specific SOCS1 KO mice were investigated. KO mice showed delayed wound healing because of hyper-inflammation by cross talk between keratinocytes and immune cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：皮膚病理学・乾癬

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬の疾患概念、発症機序の仮説  
 乾癬は皮膚科領域を代表する疾患であり、表皮の過増殖、炎症性細胞浸潤を特徴とし、

さらには血管内皮の過剰増殖も報告されている。炎症性角化症とも呼ばれる。一度発症すると増悪と寛解を繰り返しながら、長期間続き、時に関節症状も伴い、患者にとって大きな負担を強いる疾患である。世界

的には白人種を中心にその発症率は2%を超えると報告され、本邦においても、その患者数は徐々に増加し10万人を超えると推測される。乾癬の発症機序に関しては大別して二つの考え方に分類される。1番目の説は、表皮細胞の異常に原因とする考え方(表皮説)であり、もう2番目の説は、免疫異常により惹起されるとの考え方(免疫説)である。一番目の説は乾癬では表皮の過増殖を起こす異常がその発症に関係するとの考え方である。治療で、シクロスポリンの有効性が明らかになり、T細胞を中心とした免疫系の是正で乾癬の改善がみられることから、10年ほど前から2番目の免疫説が有力視されるようになっていた。しかしながら表皮と免疫細胞、特にT cellの双方に異常があり互いのcross talkにより慢性の表皮の炎症性疾患が発症する可能性もあると考えた。

(2) 乾癬発症機序におけるSTATの関与  
Wattらはinvolucrinプロモーター下流にINF- $\gamma$ を発現するマウスを作成しその表皮が乾癬様になることを報告している。INF- $\gamma$ のシグナルを伝達する分子としてはSignal transducers and activators of transcription 1(STAT1)が知られていることから乾癬の病態へのSTAT1の関与が推測される。またSanoらは、STAT3の表皮細胞における異常が乾癬の発症に関連することを報告した。これらの報告は、乾癬病変発症における表皮内シグナル伝達機構の重要性を示唆している。

(3) SOCSファミリー  
Suppressor of cytokine signaling (SOCS)は、IL-6、IFN- $\gamma$ などのサイトカインのnegative-feedback機構を担う物質として分離された。SOCSファミリーの中で代表的なものがSOCS3とSOCS1である。その作用機序であるが、サイトカイン受容体は細胞内ドメインに会合したJAK型チロシンキナーゼを介してシグナルを送り、JAKによりSTATがリン酸化され2量体化し核へ移行して直接遺伝子の発現を制御する。その結果、STATによりSOCSが誘導され、たとえば、SOCS3は受容体とJAKの両者に結合することにより、また、SOCS1はJAKに結合することにより、STATのリン酸化を制御するという

negative-feedback機構が働く。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は乾癬の発症機序におけるSTAT familyの抑制因子であるSOCS1の関与を解析することにある。乾癬の病態にSOCS1が関与することが明らかとなればその発現を表皮あるいは免疫細胞で制御できる分子、あるいはSOCS1の分解を制御する分子の同定の研究へと発展する。分子量、毒性など精査が必要となるが将来的に乾癬の治療薬の開発へとつながる可能性を持っている。開発されれば多くの乾癬で苦しんでいる患者にとって大きな利益をもたらすと考えた。この目的のため2種類の組織特異的SOCS1ノックアウトマウスを作成し解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 表皮特異的SOCS1欠損マウスの作成  
乾癬病変部ではインターフェロン- $\gamma$ を分泌するT細胞が増加している事が知られている。インターフェロン- $\gamma$ はSTAT1のみならずSTAT3もリン酸化することが報告されており、また、SOCS1もSTAT1のみならずSTAT3も抑制することが報告されている。これらの事より、表皮特異的なSOCS1の欠損が乾癬病変の形成に関与する可能性が考えられた。具体的にはCre-loxPシステムを用いて作成する。ケラチン5(K5)プロモーターでCre-recombinaseを発現するトランスジェニックマウス(K5-Creマウス)とloxPでSOCS1はさんだマウス(SOCS1-flox/floxマウス)を交配し、さらに交配を繰り返し、表皮特異的SOCS1欠損マウス(K5.SOCS1-/-マウス)を作成した。

(2) 表皮及びT cell特異的SOCS1欠損マウスの作成  
上記マウスに加えて表皮とT cellの乾癬の形成に関与する2種類の細胞においてSOCS1のノックアウトマウスの作成を試みる。STAT1の上流にあるサイトカインが表皮とT cellに作用しその抑制がかからない場合、互いの細胞のcross talkによりより強く、持続的な乾癬様皮疹が認められる可能性がある。こちらのマウスは、表皮特異的SOCS1欠損マウス(K5.SOCS1-/-マウス)にT cell特異的にCre recombinaseを発現するLck-Creマウスを交配することにより作成した。

これらのマウスをまず通常の状態では尾部など機械的刺激がかかりやすい部位で紅斑、

鱗屑、肥厚を指標として乾癬様皮疹の有無を観察した。変化があれば病理組織を作成し、乾癬特異的な変化の有無を観察する。また組織染色を行い皮疹形成に関与すると考えられる蛋白の発現を確認する。通常の状態では皮疹の出現が認められない場合、創傷作成などの刺激を背部皮膚に加えて実験を行う予定とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 表皮特異的 SOCS1 欠損マウス

表皮特異的 SOCS1 欠損マウスは正常に生まれ、1年以上 SPF においてはコントロールマウスと比べて明らかな尾部などで紅斑、鱗屑、肥厚を認めなかった。

##### (2) 創傷治癒モデルの作成

上記の結果をふまえ、刺激を加えることにより KO マウスとコントロールマウスの差を観察した。生後約 3 ヶ月のマウスの背部を毛刈り後に 8mm パンチ器械を用いて full thick wound を作成した。作成後、1 週間・2 週間後に創傷部位の大きさを測定した。

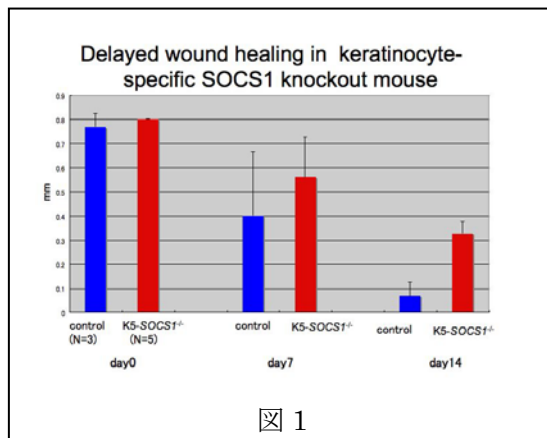
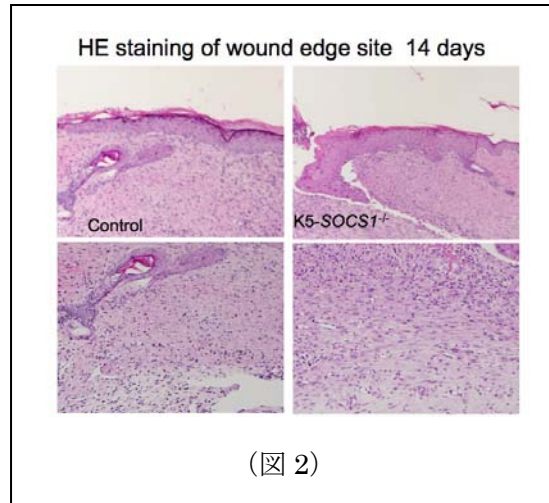


図 1

図 1 のごとく KO マウスの創傷治癒は遅延し 2 週間後においても多くの KO マウスでは創が残存した。

2 週間後の創傷部位より病理標本を作製し、コントロールマウスとの比較を行った。すると KO マウスの創傷部位辺縁の表皮では過増殖、肥厚を認めその下の真皮上層では好中球、組織球、リンパ球を中心とした著明な炎症細胞の浸潤を認めた (図 2)



(図 2)

加えて辺縁の表皮の染色を行ったところ増殖した表皮角化細胞の核に活性化 STAT3 の強い染色が認められた。

これらの結果から K5.SOCS1KO マウス表皮角化細胞の増殖には大きな異常はないが過剰な表皮細胞と免疫細胞との cross talk により炎症が惹起されるため創傷治癒の遅延が引き起こされると推測された。

現在採取した RNA, 蛋白を用いてこの反応において中心的な役割を担う分子の同定を行っている。

また表皮及び T cell 特異的 SOCS1 欠損マウスは交配に時間がかかり十分な数の解析には至らなかった。今後、交配を継続し臨床的な異常の有無に付き解析を行う予定である。

#### 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 9 件)

1. 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*. 査読有 65, 2012, 50-7.

2. 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.* 査読有, 412, 2011, 441-5.
3. 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.* 2011,127, 査読有 806-14.
4. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. PPAR  $\gamma$  mediates innate immunity by regulating the  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 査読有 60 2010 179-86.
5. 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.* 2010. 285. 査読有, 30042-9.
6. 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.* 2010, 5, 査読有, 11275-9.
7. 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.* 査読有 39, 2009 2779-88.
8. 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.* 査読有 56, 2009 188-95..
9. 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 査読有 2009 2235-48.
- [学会発表] (計 4 件)
1. Dai X, dsRNA activates inflammasome in epidermal keratinocytes resulting in the release of active IL-1 beta and IL-18. 36<sup>th</sup> JSID, Kyoto, Dec, 9, 2011
2. Tohyama M, Nuclear translocation of Bcl3 and p50 triggers the expression of IL-22 inducible

genes in keratinocytes of psoriasis 36<sup>th</sup> JSID ,  
Kyoto, Dec, 9 2011

3. Hanakawa Y. Delsyed wound healing in  
keratinocytes-specific conditional knockout mice  
of SOCS1 35<sup>th</sup> JSID Wakayama ,Dec ,5, 2010

6. 研究組織

(1)研究代表者

花川 靖 (HANAKAWA YASUSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90284398

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし