

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 5 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591436

研究課題名（和文） バリア破綻による皮膚炎発症の機序：表皮セラミド欠損マウスを用いた解析

研究課題名（英文） Study on mechanism of dermatitis due to epidermal barrier disruption : analysis of model mouse with epidermis devoid of ceramide

研究代表者

佐野 栄紀 (SANO SHIGETOSHI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：80273621

研究成果の概要（和文）：表皮セラミド合成酵素欠損マウス（K5-SPT-K0）は表皮バリア機能の破綻を生じ、同時にランゲルハンス細胞の活性化、および真皮に多数の $\gamma\delta$ -17細胞を認め、発症した皮疹は乾癬様であった。IL-23/IL-17軸の活性化があり、抗IL-12/23p40抗体の処理によって $\gamma\delta$ -17細胞の減少および皮疹の軽減が認められた。以上の結果、表皮バリア破壊が $\gamma\delta$ -17細胞を含む皮膚免疫系を活性化し乾癬様の皮膚症状を誘導することを示す。

研究成果の概要（英文）：Here, we generated Spt1c2 targeted mice under control of the keratin 5 promoter (referred to as K5-SPT-K0 mice), by which their keratinocytes were devoid of SPT. These mice demonstrated lower water-holding capacity and barrier dysfunction. From 2 weeks of age, they developed skin inflammation, showing psoriasis-like histopathologic changes. K5-SPT-K0 mice showed increased numbers of $\gamma\delta$ -T cells that produced IL-17 ($\gamma\delta$ -17) in the skin lesion and lymph nodes and most of them also produced IL-22, similar to Th17 cells. In vivo administration of anti-IL-12/23p40 antibody ameliorated the skin lesions and reduced $\gamma\delta$ -17 cells in K5-SPT-K0 mice. Therefore, we conclude that ceramide deficiency in the epidermis results in the development of psoriasis-like lesions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎(AD)や乾癬などの慢性皮膚炎症に表皮バリア破綻が認められる。逆に、フィラグリン遺伝子変異がアトピー性皮膚炎の原因になりうると明らかになったように、表皮バリアの破綻によって外来性ハ

プテン抗原の侵入を許しアレルギー性皮膚炎が誘導されやすい事実も知られている。しかし、1次性表皮バリア破綻が如何にして皮膚の免疫系を活性化させるか不明であった。そこで、我々は表皮バリア破綻マウスモデルとして表皮セラミド合成酵素欠損マウス

(K5. SPT-KO)を利用した。

(2) セラミドを含むスフィンゴ脂質生合成の律速酵素である serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) の遺伝子を Cre-loxP システムによって表皮角化細胞特異的に破壊したノックアウトマウス(K5. SPTKO)を作成し報告してきた(日本研究皮膚科学会 2001 年、2002 年、2006 年、2007 年；米国研究皮膚科学会 2002 年、2007 年；欧州研究皮膚科学会 2006 年)。このマウスは顆粒層表皮細胞の lamellar body(LB)に層板構造の異常が認められ、2週齢以降 LB の数は低下し同時期よりバリア破綻、表皮肥厚、脱毛、そして皮膚炎を自然発症した。

2. 研究の目的

(1) このセラミドノックアウトマウスの表皮細胞とランゲルハンス細胞のクロストーク、およびランゲルハンス細胞の所属リンパ節への遊走、その結果惹起される T 細胞性免疫応答を検討することにより皮膚炎発症の機序を明らかにする。

(2) バリア破綻をきたす表皮の遺伝的要因に引き続いて AD のみならず気管支喘息などアトピー体質が惹起される可能性がある。AD ではセラミドが減少していることよりこのノックアウトマウスが AD の動物モデルとなり得、その皮膚症状を解析することによってバリア破綻による全身性免疫変調に帰結する動物モデルを構築できる。すなわち、本研究において T 細胞免疫変調に関わる表皮バリア破綻からの樹状細胞への異常シグナル導入の可能性を明らかに出来る。これは AD 研究の分野では国内外に例を見ないものであり、明らか出来る知見は世界中で希求されている AD の新たな治療法への道筋をつけるものである。

3. 研究の方法

(1) K5. SPT-KO マウスの作製

sptlc2 遺伝子をクローニングし 3、4 番目イントロンに loxP を挿入した遺伝子を ES に transfect しホモログ組み替えによる常法にしたがって sptlc2-flox アレルをもつマウスを作製した。このマウスと K5-Cre トランスジェニックマウスと交配し、角化細胞特異的に sptlc2 遺伝子 exon4 を欠損したマウスを作製した(K5. SPT-KO)。このマウス角化細胞には SPT 遺伝子発現および蛋白の発現が欠損していることをそれぞれ RT-PCR および免疫染色法により確認した。

(2) 皮膚保水量、バリア機能の測定
それぞれ skicon および tevameter を用いて測定した。

(3) 皮膚病理組織、免疫組織化学法
マウスの皮膚病理組織はヘマトキシリンエオジン染色、および各種抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

(4) real-time RT-PCR
マウス皮膚、およびリンパ節を用いて各種遺伝子発現を real-time RT-PCR 法により検討した。

(5) FACS 解析
マウス皮膚およびリンパ節より調製した細胞の細胞表面抗原および細胞内サイトカインの多重染色を施行、FACS 解析を行った。

(6) in vivo 抗体処理
抗マウス IL-12/23p40 モノクロナル抗体(セントコア社より供与)を 500 μ g 腹腔内に投与した。

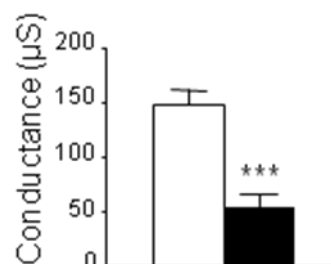
4. 研究成果

(1) 新生仔 K5. SPT-KO マウスの皮膚症状
セラミド生合成の律速段階酵素 SPT を表皮角化細胞特異的に欠損させたマウスはメンデル則に従って誕生するが、皮膚は全体的に乾燥している(図 1)。保水量は対照に比べて有意に減少している(図 2)。

図 1



図 2



(2) 表皮バリアの破綻と皮膚症状の顕在化
transepidermal water loss (TEWL) は生後約 10 日より上昇し表皮バリア機能が破綻してくることが明らかになった(図 3)。この頃より、表皮の角化、炎症など乾癬に類似する皮疹を呈してくる。やがて脱毛もきたし、鱗屑をともなう角化性紅斑が顕在化する(図 4)。病理組織では過角化、表皮肥厚、炎症細胞浸潤、血管増生など、乾癬様を呈する(図 5)。

図 3

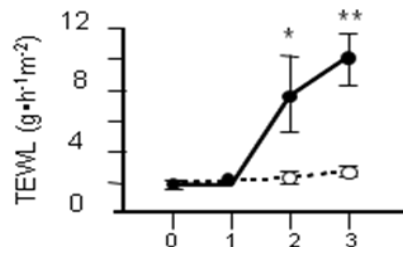


図 4

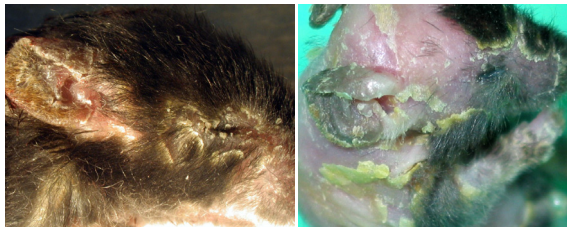
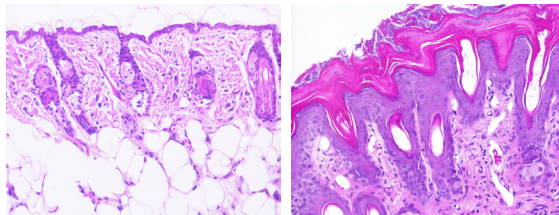
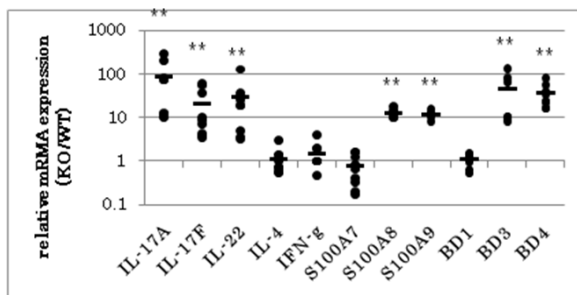


図 5



(3) K5. SPT-KO マウス皮膚の遺伝子発現
生後 15 日の皮膚部より real-time RT-PCR を施行、Th17 サイトカインおよび S100A8, 9 や beta-defensin のレベルが高いことが示された(図 6)。一方、IL-4 遺伝子は上昇していないことより、AD のような Th2 シフトは認められない。以上の結果は、乾癬の遺伝子発現と類似するものである。

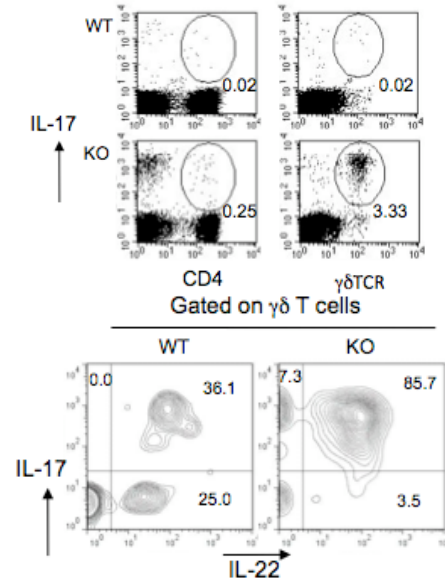
図 6



(4) IL-17 を産生する $\gamma \delta$ T 細胞 ($\gamma \delta$ -17) の増加

このマウスは皮疹出現とともに皮膚所属リンパ節において $\gamma \delta$ -17 細胞が増加することが FACS 解析により明らかになった(図 7)。一方 Th17 (CD4+, IL-17+) 細胞も対照にくらべ増加している。また、これらの細胞は多くが IL-22 も共発現している。

図 7



(5) 真皮樹状細胞に発現する IL-23 および抗 IL-12/23p40 の皮疹発症におよぼす効果

K5. SPT-KO マウスの皮疹において、IL-23p19, IL-12/23p40 の遺伝子発現は高いが IL-12p35 は上昇していなかった(図 8)。免疫組織学的検討により真皮 CD11c+ 細胞が IL-23 を分泌することが確認された(図 8)。皮疹形成における IL-23 の働きを確認するために抗マウス IL-12/23p40 抗体を腹腔内に注射して、効果を検討した。抗体処理により皮疹の程度は著明に軽減する(図 9)と共に皮疹部の $\gamma \delta$ -17 細胞数も有意に減少した(図 10)。以上の結果より、 $\gamma \delta$ -17 細胞は IL-23 により活性化をうけ増殖し皮疹形成に寄与していることが示唆され、これは乾癬における Th17 細胞の役割と類似する。

図 8

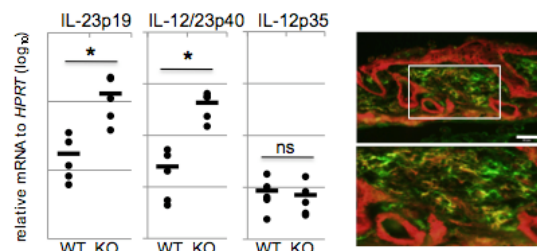


図 9

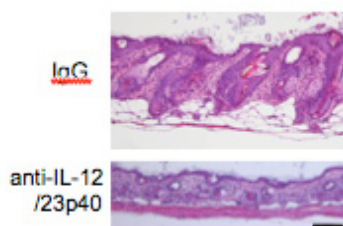
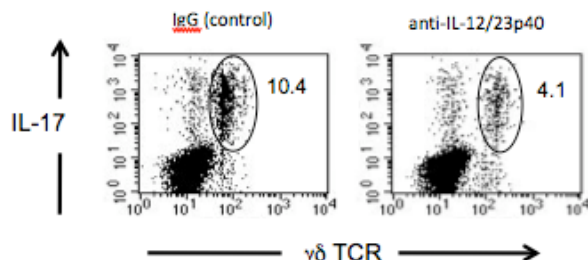


図 10



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 36 件)

- ① Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Shiga T, Miyoshi K, Nakajima H, Kamijima R, Tarutani M, Benson JM, Elloso MM, Gutshall LL, Naso MF, Iwakura Y, DiGiovanni J, Sano S: Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J Immunol*, 186:4481-4489, 2011, 査読有
- ② Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Morishige R, Sano S: Kinetics of circulating Th17 cytokines and adipokines in psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*, 303: 451-455, 2011, 査読有
- ③ Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Kanda T, Tarutani M, Iiyama T, Asao N, DiGiovanni J, Sano S: Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. A clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 Inhibitor. *J Invest Dermatol*, 131: 108-117, 2011, 査読有
- ④ 佐野栄紀: 炎症性角化症 尋常性乾癬病態と治療の進歩. *日皮会誌*, 121: 839-844, 2011, 査読有
- ⑤ 佐野栄紀: Th17細胞と乾癬. *アレルギーの臨*, 31:197-201, 2011, 査読有
- ⑥ 佐野栄紀: 序 乾癬: 新たなパラダイム. *アレルギー免疫*, 18: 9-11, 2011, 査読有
- ⑦ 中島喜美子, 佐野栄紀: Th17と乾癬. *アレルギー免疫*, 18: 33-38, 2011, 査読有
- ⑧ 佐野栄紀: 乾癬の発症機序. *綜合臨*, 60: 2325-2326, 2011, 査読有

- ⑨ 佐野栄紀: 表皮と Stat3 もろ刃の剣としてのマスターシグナル. *医のあゆみ*, 234: 578-583, 2010, 査読有
- ⑩ 佐野栄紀: 表皮角化細胞の Stat3 シグナル (前編). *西日皮膚*, 72: 54-59, 2010, 査読有
- ⑪ 佐野栄紀: 表皮角化細胞の Stat3 シグナル (中編). *西日皮膚*, 72: 145-151, 2010, 査読有
- ⑫ 佐野栄紀: 表皮角化細胞の Stat3 シグナル (後編) *西日皮膚*, 72: 229-234, 2010, 査読有
- ⑬ 佐野栄紀: 乾癬発症のメカニズム. *皮膚科*, 8: 800-804, 2009, 査読有
- ⑭ 佐野栄紀, 横川真紀, 三好研: 新しい治療法 Stat3 阻害剤の臨床応用. *日皮会誌*, 19: 2883-2885, 2009, 査読有
- ⑮ Kim DJ, Angel JM, Sano S, DiGiovanni J: Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis. *Oncogene*, 28: 950-960, 2009, 査読有

[学会発表] (計 41 件)

- ① Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Morishige R, Sano S. A novel link between Th 17 cutokines and adipokines in psoriasis. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9-10, 京都
- ② Yokogawa M, Shiga T, Nakajima K, Takaishi M, Tarutani M, DiGiovanni J, Sano S: Anti-tumor effect of imiquimod on UVB-induced SCC is mediated through Th1/Th17 cells. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9-10, 京都
- ③ Takaishi M, Nakajima K, Ouyang W, Sano S: Development of psoriasis-like lesions in a mouse model by IL-23-dependent but IL-22-independent signaling. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9, 京都
- ④ Hirai T, Kanda T, Nakajima K, Yamamoto M, Sano S: Inhibitory effect of a cathepsin K inhibitor on the development of psoriasis-like lesions. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9, 京都

- ⑤ Sano S, Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kataoka S: Epicutaneous treatment with TLR7 agonist leads to lupus glomerulonephritis in wild-type mice. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9, 京都
- ⑥ 佐野栄紀: 乾癬・関節症性乾癬の病態・治療の最新話題. 日本脊椎関節炎学会第21回学術集会ランチョンセミナー, 2011.9.17, 岡山
- ⑦ 佐野栄紀: 乾癬発症のためのサイトカインヒエラルキー. 第26回日本乾癬学会学術大会ランチョンセミナー, 2011.9.9, 大阪
- ⑧ 中島喜美子, 佐野栄紀: 表皮特異的セラミドノックアウトマウスの皮膚バリア異常のイメージング. 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術大会, 2011.9.9, 大阪
- ⑨ Sano S: Mouse Model for Psoriatic Arthritis. 22nd World Congress of Dermatology KDA Seminar, 2011.5.24-29, Seoul
- ⑩ Yamamoto M, Sano S: Cytokine aberrations in a mouse model of psoriatic arthritis. The 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2011.5.4-7, Phenix, U.S.A
- ⑪ Tarutani M, Miyoshi K, Takaishi M, Sano S: Psoriasis-like skin lesion induced by Raf-MAPK signaling requires Stat3 activation. The 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2011.5.4-7, Phenix, U.S.A
- ⑫ Nakajima K, Terao M, Azukizawa H, Katayama I, Takeda J, Sano S: Primary ceramide deficiency in keratinocytes leads to gene alterations linked to dermatitis. The 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology., 2011.5.4-7, Phenix, U.S.A
- ⑬ Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J, Xing X, Nair R P, Voorhees J J, Elder JT, Wang X-J, Sano S, Prens EP, DiGiovanni J, Pittelkow MR, Ward NL, Gudjonsson JE: Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. The 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2011.5.4-7, Phenix, U.S.A
- ⑭ 佐野栄紀: 乾癬研究・治療の新たな展開. 日本皮膚科学会第121回山陰・第17回島根合同地方会ランチョンセミナー, 2011.3.13, 出雲
- ⑮ 佐野栄紀: 乾癬の発症に関わるリンフォカインネットワーク. 第74回日本皮膚科学会東部支部学術大会ランチョンセミナー, 2010.11.21, 仙台
- ⑯ 中島喜美子, 佐野栄紀: 乾癬モデルマウス(K5.Stat3C transgenic mice)におけるIL23/Th17 axis について. 第25回日本乾癬学会学術大会, 2010.9.3, 宇部
- ⑰ 佐野栄紀: マウスモデルで明らかになった乾癬におけるIL23/Th17 径路の役割. 第109回日本皮膚科学会総会ランチョンセミナー, 2010.4.17, 大阪
- ⑱ 佐野栄紀, 堀江恭二, 竹田潤二: 皮膚疾患モデル動物の未来. 第109回日本皮膚科学会総会特別企画「未来皮膚科学」, 2010.4.16, 大阪
- ⑲ Sano S: Recent progress in psoriasis research on mechanistic interaction between cytokines and keratinocytes: A distinct role of the IL-23/Th17 axis. The 20th academic meeting of Korean Society for Investigative Dermatology, 2010.4.2, Seoul, Korea
- ⑳ 佐野栄紀: 乾癬と Th17. 第24回日本乾癬学会, 2009.9.4, 東京
- (21) Sano S: Recent progress in psoriasis research on mechanistic interaction between cytokines and keratinocytes. 第34回日本研究皮膚科学会学術大会・総会ランチョンセミナー, 2009.12.5, 福岡
- (22) 佐野栄紀: 活性型ビタミン D3 が持つ乾癬以外の多様な疾患に対する効果. 第61回日本皮膚科学会東部支部学術大会モーニングセミナー, 2009.9.27, 甲府
- (23) Sano S, Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Azukizawa H, Katayama I, Takeda J: Ceramide deficiency in epidermis results in development of dermatitis through Langerhans cell maturation and expansion of IL-17-producing gd T cells. 39th Annual ESDR Meeting, 2009.9.9-12, Budapest, Hungary
- (24) Sano S: Impact of Stat3 on Skin Biology. 2009 Gordon Conference on Epithelial Differentiation & Keratinization, 2009.6.21-26, Les Diablerets, Switzerland
- (25) 佐野栄紀: 近未来の乾癬治療. 第25回日本臨床皮膚科医会総会, 2009.5.10, 高知

- (26) 佐野栄紀：Stat3 阻害剤の臨床応用. 第108 回日本皮膚科学会総会, 2009. 4. 24, 福岡

[図書] (計 1 件)

- ① 佐野栄紀：魚鱗癬. 飯塚 一編, 今日の治療指針 2010 年版 (Vol. 52). 医学書院, 東京. 2010, 967.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 栄紀 (SANO SHIGETOSHI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：80273621

(2) 研究分担者

中島 喜美子 (NAKAJIMA KIMIKO)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：20403892

山本 真有子 (YAMAMOTO MAYUKO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20423478