

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 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790290

研究課題名（和文） T細胞が関与する炎症応答のホスホリパーゼ Cεによる制御機構の解析

研究課題名（英文） Study of the mechanism by which phospholipase Cε regulates T-cell-mediated inflammation

研究代表者

枝松 裕紀（EDAMATSU HIRONORI）

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70335438

研究成果の概要（和文）：ホスホリパーゼ Cε（PLCε）は炎症性サイトカイン産生に関わる細胞内シグナル伝達分子である。本研究で、T細胞由来サイトカインの一つである腫瘍壊死因子・刺激による角化細胞でのサイトカインの発現誘導に、PLCεがNF-κB経路と協調して関与することを見出した。また PLCεを表皮特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスでは、インターロイキン 23 の表皮角化細胞での発現上昇が皮膚炎発症に必須であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Phospholipase Cε (PLCε) is an intracellular signal transmitter involved in regulation of inflammatory cytokine production. In this study, it was shown that PLCε cooperates with the NF-κB pathway to upregulate inflammatory cytokine production in epidermal keratinocytes. In the transgenic mice overexpressing PLCε in the epidermal keratinocytes, the development of dermatitis requires the increased production of interleukin 23 by the keratinocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：シグナル伝達、免疫、アレルギー、炎症、モデル動物、癌

1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ C (PLC) εは、低分子量 GTP 結合蛋白質であり *ras* 癌遺伝子産物でもある Ras 蛋白質、およびそのファミリーに属する Rap 蛋白質の下流の標的蛋白質（エフェクター）として、研究代表者の所属する研究室で同定されたホスホイノシチド特異的 PLC である。これは、他の PLC と同様にイノシトール 3 リン酸 (IP₃)、ジアシルグリセロール (DAG) の二つのセカンドメッセンジャーの産生を介して、前者は細胞内カルシウム動員

に、後者はプロテインキナーゼ C (PKC) や Ras/Rap の活性化因子である RasGRP など DAG の標的分子の活性化に関与する。PLCε の発現は、表皮角化細胞や真皮線維芽細胞などの非免疫細胞で見られるのに対して、顆粒球や T 細胞などの免疫細胞では認められない。研究代表者は、PLCεノックアウト (KO) マウスを作成し、それが、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) をプロモーターに用いた二段階皮膚化学発癌に耐性を示すこと、TPA が誘発する炎症性サイトカ

イン産生が低下していること、癌抑制遺伝子 Apc のナンセンス変異により腸管腺腫を自然発症する ApcMin マウスにおける腫瘍形成と悪性化の抑制が腫瘍周囲の炎症の抑制を伴っていることなどを示し、PLCεの炎症への関与を明らかにした。さらに、PLCεは、ジニトロフルオロオベンゼン (DNFB) をハプテンとする接触性皮膚炎へも関与する。ここでは、PLCεは、皮膚炎発症に関わる CD4 陽性ヘルパー T (Th) 細胞の制御には関与せず、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞での Th1、あるいは Th17 細胞に由来する炎症性サイトカイン (インターロイキン(IL)-17、腫瘍壊死因子 (TNF)α、インターフェロン (IFN)γ、IL-4) の刺激による炎症性サイトカインの産生制御に関わることを明らかにしていた。また、これらの Th サイトカインは直接には PLCεを活性化せず、Th サイトカイン刺激により真皮線維芽細胞が産生した液性因子が、おそらく、PLCεの活性化を引き起こしていると思われる。また、角化細胞特異的に PLCεを過剰発現するトランスジェニックマウス (PLCεTG マウス) を作成したところ、CD4 陽性細胞や好中球の浸潤を伴うヒト尋常性乾癬に酷似した慢性皮膚炎を示すことを発見した。このように、PLCεは、T 細胞には発現していないにもかかわらず、個体においては T 細胞が関与する炎症に関与することが示された。しかし、その機構については不明であり、詳細な解析によりこれを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

これまで述べたように、個体レベルでは、PLCεは T 細胞が関与する炎症に関与することが分かっていた。しかし、PLCεは T 細胞には発現していない。本研究課題では、T 細胞が関与する炎症における PLCεの役割について明らかにするために、分子レベルでの解析が必要であった。そこで、特に、(1) Th サイトカイン刺激による真皮線維芽細胞/表皮角化細胞での PLCε依存的サイトカイン産生機構、(2) PLCεを表皮角化細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスの乾癬様皮膚炎の表現型の発現への Th サイトカインの関与とその産生機構について、解明をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Th サイトカイン刺激による真皮線維芽細胞/表皮角化細胞での PLCε依存的サイトカイン産生機構の解析:

①真皮線維芽細胞でのサイトカイン産生機構の解析は、PLCεKO マウス新生児から調製した培養細胞を用いた。PLCε野生型、および PLCεKO の線維芽細胞を Th サイトカインである IL-17 で刺激し、それにより発現が上昇

する炎症性サイトカインを定量的 RT-PCR 法により定量し、PLCε依存的に発現が誘導されるサイトカインを確認した。また、IL-17 で刺激した PLCε野生型の線維芽細胞から得た培養上清で、PLCε野生型、および PLCεKO の線維芽細胞を刺激し、PLCε依存的に発現が誘導されるサイトカインを同定した。また、IL-17 で刺激した PLCε野生型の線維芽細胞から得た培養上清中のサイトカインについて、抗サイトカイン抗体メンブレンアレイを用いて同定し、同定されたサイトカインの PLCε活性化への関与について、検討した。

②表皮角化細胞で PLCε依存的サイトカイン産生の機構については、ヒト不死化角化細胞株である PHK16-0b 細胞を用いた。PHK16-0b 細胞に PLCε特異的 siRNA をトランスフェクトし PLCεの発現を低下 (ノックダウン; KD) させた。この細胞を Th サイトカインの一つである TNFαで刺激し、発現誘導される種々の炎症性サイトカインをコードする mRNA の量を、定量的 RT-PCR 法を用いて定量し、PLCεKD により発現誘導の阻害がみられるサイトカインを同定した。さらに、同定されたサイトカインの発現に関わりうるシグナル伝達系の活性化状態を、活性型特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法と免疫染色法により検討した。また、サイトカイン誘導に関わる転写因子の活性化については、ルンフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイにより検討した。

(2) PLCεを表皮角化細胞で過剰発現する PLCεTG マウスの乾癬様皮膚炎の表現型の発現への Th サイトカインの関与とその産生機構の解析:

①PLCεTG マウスの皮膚で発現が上昇している炎症性サイトカイン類を定量的 RT-PCR 法と抗サイトカイン抗体を用いた免疫染色により同定した。

②PLCεTG マウス由来の表皮角化細胞を初代培養し、それらが過剰産生しているサイトカイン類を定量的 RT-PCR 法と ELISA 法により同定・定量した。

③PLCεTG マウス表皮角化細胞で過剰産生されているサイトカインの内、特に PLCεTG マウスの表現型の発現に重要であると考えられたサイトカインについては、その中和抗体をトランスジェニックマウスの皮下に注射し、その影響を検討した。

④PLCεTG マウス表皮角化細胞でのサイトカイン過剰産生の機構について、初代培養角化細胞を用いて解析した。

(3) Th1 や Th17 以外の Th 細胞が関与する炎症への PLCεの関与: 卵白アルブミンを抗原とした気管支喘息モデル (Th2 細胞が関与) を用いた解析を行い、DNFB をハプテンに用いた接触皮膚炎 (Th1) や PLCε過剰発現による皮膚炎との差異について、比較・検討を行

った。

4. 研究成果

(1) Th サイトカイン刺激による真皮線維芽細胞/表皮角化細胞での PLC ϵ 依存的サイトカイン産生機構の解析:

① PLC ϵ 野生型マウス、および PLC ϵ KO マウスから調製した真皮線維芽細胞を培養し、IL-17 で刺激した。その結果、IL-1 α 、CXCL2 (別名 MIP-2) などの発現誘導に PLC ϵ 依存性があることが確認できた。また、その PLC ϵ 依存的発現誘導は、時間的にゆっくりとしたものであった。次に、IL-17 で刺激した PLC ϵ 野生型の線維芽細胞から得た培養上清で、PLC ϵ 野生型、および PLC ϵ KO の線維芽細胞を刺激し、やはり、IL-1 α 、CXCL2 などの発現誘導に、PLC ϵ 依存性が認められ、しかも、IL-17 刺激とは対照的に、PLC ϵ 依存的発現誘導は、時間的に早く生じた。これらのことから、IL-17 で刺激した PLC ϵ 野生型の線維芽細胞の培養上清中の何らかの因子が PLC ϵ 依存的サイトカイン発現誘導の本体になると予想された。そこで、その因子の候補を培養上清中から同定することを目的とし、抗サイトカイン抗体メンブレンアレイを用いて検索した。その結果、IL-6 などが IL-17 刺激細胞の培養上清中に存在することが分かったが、これらの PLC ϵ 活性化への関与については、現在のところはっきりしていない。

② ヒト不死化角化細胞株 PHK16-0b 細胞を TNF α で刺激したところ、CXCL8 (別名 IL-8) を含む複数のサイトカインの発現誘導を mRNA レベルで確認した。そこで、PLC ϵ の発現を siRNA により KD したところ、サイトカイン CCL2 (別名 MCP-1) の発現誘導が顕著に抑制されることが分かった。一方、他の CXCL8 などについては、特に PLC ϵ KD の影響は認められなかった。PHK16-0b 細胞での TNF α 刺激による CCL2 の誘導に、炎症性サイトカイン発現に関与する転写因子の一つである NF- κ B の活性化が必須であることが、NF- κ B の上流因子である IKK に対する阻害剤やプロテアソーム阻害剤に対する感受性から確認できた。しかし、PLC ϵ KD は TNF α による NF- κ B の細胞核への移行や IKK などによるリン酸化、あるいは NF- κ B-ルシフェラーゼ・レポーターの活性化に、何ら影響を与えなかった。これらのことから PLC ϵ が NF- κ B 経路とは別の経路で NF- κ B 経路と共に CCL2 の発現誘導に関わることが示唆された。また、本細胞における CCL2 遺伝子のプロモーター領域の活性化機構の解明が、PLC ϵ によるサイトカイン産生制御機構の解明につながる可能性が示唆された。

(2) PLC ϵ を表皮角化細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスの乾癬様皮膚炎の表現型の発現への Th サイトカインの関与と

その産生機構の解析:

① トランスジェニックマウス皮膚で発現が上昇しているサイトカインとして、IL-1 に加えて IL-22、IFN γ 、IL-17 などが、定量的 RT-PCR 法と抗サイトカイン抗体による免疫染色で確認された。また、IL-22、IFN γ 、IL-17 が主に PLC ϵ TG マウスの皮膚に浸潤している CD4 陽性細胞で産生されていることを明らかにした (図 1)。また、角化細胞での IL-23 の産生上昇を *in vivo* で認めた。

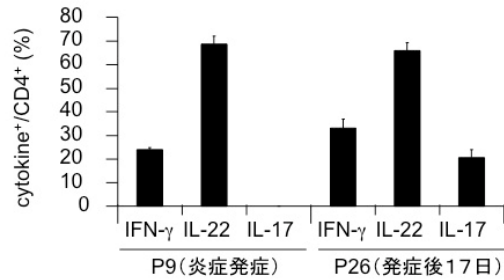


図1. PLC ϵ TG マウス皮膚でのサイトカイン陽性 CD4 $^{+}$ 細胞細胞の割合

② トランスジェニックマウス由来角化細胞の初代培養において、IL-23 の mRNA レベルの上昇を認めた。さらに ELISA により培養上清への IL-23 の分泌量の上昇を確認した。

③ IL-22 産生 CD4 陽性細胞の分化や安定性に関わる IL-23 の必要性を検討した。皮膚炎を発症している PLC ϵ TG マウスの皮下に抗 IL-23 中和抗体を注射すると、皮膚炎が解消された。また、皮膚炎の解消とともに、皮膚に浸潤している CD4 陽性細胞の数が減少した。特に、IL-23 依存性が高いと考えられている IL-22 産生細胞数が著しく減少した。以

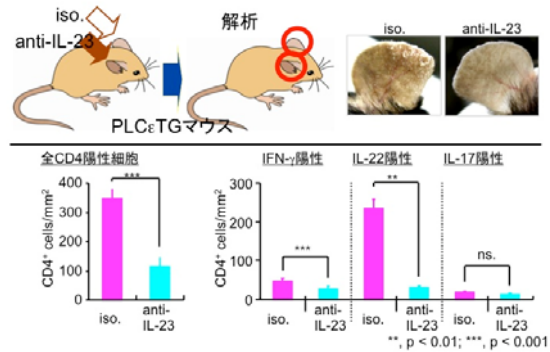


図2. PLC ϵ TG マウスでの皮膚炎発症における IL-23 の必要性

上のことから、PLC ϵ TG マウスでの皮膚炎発症に、IL-23 が必須であることが分かった (図 2)。

④ IL-23 産生機構を検討した。データベースに登録されている IL-23 遺伝子のプロモーター領域の配列を確認したが、PLC ϵ 過剰産生による IL-23 発現亢進に関わりうる配列に、目ぼしいものは見つからなかった。PLC ϵ が過剰産生することによって生じた液性因子が、PLC ϵ の発現量の大小とは無関係に IL-23 の発現を上昇させると考えた。そこで、PLC ϵ TG

マウス由来角化細胞の培養上清を回収し、それを用いて PLCε野生型マウス由来の培養角化細胞を刺激した。その結果、野生型マウス由来細胞でも、PLCεTG マウス由来細胞に匹敵するレベルの IL-23 mRNA を検出した。このことは、PLCεの過剰産生によって生じた液性因子の IL-23 産生への関与を示唆するものである (図3)。

これらの結果から、PLCε過剰発現により角化細胞で IL-23 の産生が上昇し、それが皮膚

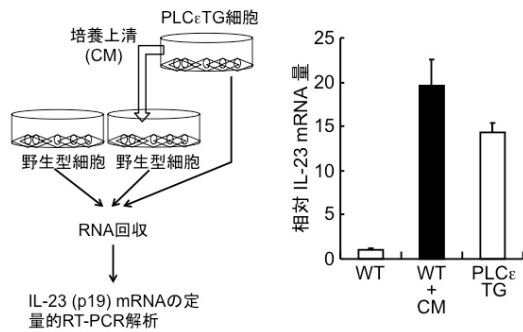


図3. PLCεTGマウス角化細胞培養上清によるIL-23産生誘導

炎発症に繋がることが明らかとなった。

(3) 卵白アルブミンを抗原とした気管支喘息モデルを用いた解析では、以下の結果を得た。PLCεKO マウスでは、感作成立後のアルブミン吸入による気管支炎が抑制され、さらに野生型マウスで見られたメサコリン吸入に対する気道過敏性の亢進が、PLCεKO マウスにおいて顕著に抑制されていた。また、気管支肺胞洗浄液の解析から、PLCεKO マウスでは、各種炎症細胞 (特に、好酸球と T リンパ球) の浸潤が抑制されていた。気管支肺胞洗浄液中のサイトカインの定量結果から、IL-4 など Th2 サイトカインの上昇が PLCεKO マウスで抑制されていた。以上の結果は、PLCεの気管支喘息へ関与を示すものである。さらに、PLCεが、気管支喘息に代表される Th2 反応を伴う炎症応答においても、重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

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 5 件)

- ① Edamatsu, H., Takenaka, N., Hu, L., and Kataoka, T. (2011). Phospholipase C • as a potential molecular target for anti-inflammatory therapy and cancer prevention. *Inflamm. Regen.*, **31**, 370-374. (査読有)
- ② Harada, Y., Edamatsu, H., and Kataoka, T. (2011). PLC • cooperates with the NF- • B pathway to augment

TNF • -stimulated CCL2/MCP1 expression in human keratinocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 106-111. (査読有)

- ③ Oka, M., Edamatsu, H., Kunisada, M., Hu, L., Takenaka, N., Sakaguchi, M., Kataoka, T., and Nishigori, C. (2011). Phospholipase C • has a crucial role in ultraviolet B-induced neutrophil-associated skin inflammation by regulating the expression of CXCL1/KC. *Lab. Invest.*, **91**, 711-718. (査読有)
- ④ Takenaka, N.*, Edamatsu, H.*, Suzuki, N., Saito, H., Inoue, Y., Oka, M., Hu, L., and Kataoka, T. (2011). Overexpression of phospholipase C • in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration. *Eur. J. Immunol.*, **41**, 202-213. (* co-first author) (査読有)
- ⑤ Oka, M., Edamatsu, H., Kunisada, M., Hu, L., Takenaka, N., Dien, S., Sakaguchi, M., Kitazawa, R., Norose, K., Kataoka, T., and Nishigori, C. (2010). Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in phospholipase C • knockout mice is associated with decreased cell death. *Carcinogenesis*, **31**, 1897-1902. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Nagano, T., Edamatsu, H., Kobayashi, K., Nishimura, Y., and Kataoka, T. Crucial role of phospholipase C • in the development of asthma in mice. European Respiratory Society Annual Congress (欧州呼吸器学会年会) (オランダ アムステルダム、2011年9月25日)
- ② Edamatsu, H., Takenaka, N., and Kataoka, T. Overexpression of phospholipase C • in keratinocytes results in IL-23 production leading to skin inflammation accompanied by IL-22-producing T cell infiltration. 10th World Congress on Inflammation (第10回国際炎症学会) (フランス パリ、2011年6月27日)
- ③ Edamatsu, H., Takenaka, N., Suzuki, N., Saito, H., Inoue, Y., Oka, M., Hu, L., and Kataoka, T. Acanthosis accompanied by aberrant infiltration of IL-22-producing T cells in the transgenic mice overexpressing phospholipase C • in the epidermis.

14th International Congress of Immunology (第14回国際免疫学会議) (神戸、2010年8月25日)

- ④ 枝松裕紀、竹中延之、胡立志、片岡徹.
ホスホリパーゼ C・の炎症応答・発癌における重要な役割と創薬標的としての可能性 第31回日本炎症・再生医学会 (東京、2010年8月5日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/molbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝松 裕紀 (EDAMATSU HIRONORI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70335438