

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2011

課題番号：23659546

研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎の表皮角化細胞における T S L P の産生機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of TSLP production in keratinocytes in atopic dermatitis

## 研究代表者

秋山 真志（MASASHI AKIYAMA）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60222551

研究成果の概要(和文):Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)は表皮角化細胞 KC 由来の AD の病態を形成する最も重要なケモカインの一つとして位置づけられているが、どのような刺激が TSLP を誘導するかについては未解明であった。本研究では AD の KC において小胞体ストレス応答が起こり、TSLP が産生されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）:Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is one of the most important chemokine for pathogenesis of atopic dermatitis (AD), which is secreted by keratinocytes. However, which kinds of stimuli induce TSLP is not unidentified well. In this study, we suggested the unfolded protein response in keratinocytes induce TSLP.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：TSLP、アトピー性皮膚炎、小胞体ストレス応答、フィラグリン

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)ではフィラグリンの遺伝子変異が病気の発症リスクを大いに上昇させることが報告されてから間もなく、私たちは本邦の AD においてもフィラグリンの遺伝子変異が病気の発症に関係があることを初めて報告した(Nomura T *et al*, *J Allergy Clin Immunol* 2007)。さらに、本邦では約 27% もの高頻度の AD の患者にフィラグリンの遺伝子変異が存在することを明らかにし、報告

した(Akiyama M. *Br J Dermatol* 2010, Nomura T, Akiyama M, *et al*, *J Invest Dermatol* 2009)。

フィラグリンの遺伝子変異により、AD の表皮に存在する変異フィラグリンの発現量は健常人の発現量より減少し、ケラトヒアリン顆粒は減少する。フィラグリンの遺伝子変異がなぜ AD を引き起こすかという問いに対しては 2 つの仮説がある。1) バリア機能異常により外界からのアレルゲンが侵入しやすくなり、免疫亢進が起こり、アレルギー炎症が発症する。2) バリア機能障害を補おうとし

てプロテアーゼの活性が亢進し、引き続いて表皮角化細胞 (KC) からサイトカインが分泌されて、アレルギー性炎症を引き起こす。しかし、この問題は未解明のままであった。

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)はADのKCから分泌されるサイトカインで、ランゲルハンス細胞を刺激して、Th2ケモカインであるCCL17とCCL22を放出させて、Th2細胞をリクルートさせる。このTh2細胞はIL-10を産生せずTNF- $\alpha$ を産生する炎症性Th2細胞とよばれ、ADの病態を形成する。このようにTSLPはKC由来のADの病態を形成する最も重要なサイトカインの一つとして位置づけられているが、どのような刺激がTSLPを誘導するかについては未解明であった。

## 2. 研究の目的

小胞体ストレス応答 (UPR) とは、小胞体内に折りたたみ異常蛋白質が蓄積したときに生じる小胞体から核へのシグナル伝達システムである。私たちはKCにおけるUPRの研究を行っている過程でUPRがTSLPを誘導することを発見し、フィラグリンの折りたたみ異常がUPRを介してTSLPを誘導するという仮説を持つに至った。

本研究はADのKCにおいてフィラグリンの遺伝子変異が小胞体ストレス応答 (UPR) を引き起こし、TSLPを産生することを証明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Flaky tail mouse とフィラグリンの遺伝子変異が有るAD患者それぞれのKCにおいてUPR経路でTSLPが産生されるか否かを検討した。次に、Flaky tail mouse 個体皮膚に対してUPR誘導剤や阻害剤を用いて、それぞれが、ADに対して増悪作用や治療効果があるか否

かを検討した。

### (1) Flaky tail mouse の組織を用いた研究

①Flaky tail mouse の表皮におけるフィラグリんとTSLPの発現について、コントロールのマウスと比較検討した。

- i. 免疫組織化学法にてフィラグリんとTSLPの発現を検討した。
- ii. 組織表皮のフィラグリんとTSLPをリアルタイムPCR (遺伝子レベル) とウエスタンブロット (タンパク質レベル) にて検討した。

②Flaky tail mouse の組織中のKCにおけるUPRマーカーの発現について、コントロールマウスと比較検討した。

- i. 免疫組織化学法にてUPRマーカーであるBip、CHOP、GRP94、PDI等の発現を検討した。
- ii. 組織表皮のUPRマーカー、Bip、CHOP、GRP94、PDI、XBP-1等の発現をリアルタイムPCR (遺伝子レベル) とウエスタンブロット (タンパク質レベル) にて検討した。

③Flaky tail mouse のKCを培養して、電子顕微鏡にてコントロールマウスの培養KCと比較して小胞体が膨張しているか否かを検討した。小胞体の膨張は小胞体ストレスが小胞体にかかっていることを形態学的に証明することになる。

④Flaky tail mouse のKCを培養して、フィラグリんとTSLPとUPRマーカーの発現についてコントロールマウスの培養KCと比較検討した。

- i. 無刺激下でフィラグリんとTSLP、UPRマーカーであるBip、CHOP、GRP94、PDI、XBP-1等の発現をリアルタイムPCR (遺伝子レベル) とウエスタンブロット (タンパク質レベル) にて検討した。
- ii. UPR誘導物質であるツニカマイシン、

タブシガルギン、ブレフェルディン A 等を添加したときに上記 i.) に記した分子の発現を検討した。

- iii. UPR 阻害剤である TUDCA、4PBA 添加したときに上記 i.) に記した分子の発現を検討した。

## **(2)AD 患者の組織を用いた研究**

①AD の患者のフィラグリン遺伝子変異を検査する。患者口腔内粘膜上皮の genome より、フィラグリン遺伝子変異を検査した。

②AD の皮膚組織を対象にした免疫組織化学法 フィラグリンの遺伝子変異を有する KC を培養してフィラグリン、TSLP と UPR マーカーの発現について正常培養 KC と比較検討した。

③フィラグリンの遺伝子変異を有する KC を培養して、電子顕微鏡にてコントロールマウスの培養 KC と比較して小胞体が膨張しているか否か検討した。小胞体の膨張は小胞体ストレスが小胞体にかかっていることを形態学的に証明することになった。フィラグリン遺伝子変異部位の違いにより、小胞体ストレスの強度に違いがあるか否か検討した。

④フィラグリン、TSLP および UPR マーカーである Bip、CHOP、GRP94、PDI 等の発現を検討した。フィラグリンの遺伝子変異を有する KC を培養してフィラグリン、TSLP と UPR マーカーの発現について正常培養 KC と比較検討した。フィラグリン遺伝子変異部位の違いにより UPR の強度や TSLP の発現量に違いがあるか否か検討した。

- i. 無刺激下でフィラグリン、TSLP、UPR マーカーである Bip、CHOP、GRP94、PDI、XBP-1 等の発現をリアルタイム PCR (遺伝子レベル) とウエスタンブロット (タンパク質レベル) にて検討した。
- ii. UPR 誘導物質であるツニカマイシン、タブシガルギン、ブレフェルディン A 等を

添加したときに上記 i.) に記した分子の発現を検討した。UPR 阻害剤である TUDCA、4PBA 添加したときに上記 i.) に記した分子の発現を検討した。

## **(3)Flaky tail mouse 個体を用いた研究**

①Flaky tail mouse に UPR 誘導物質を外用して、皮膚炎が悪化するか否かをコントロール外用と比較した。

i. 皮疹を NC/Nga マウスのスコアにならって、掻痒、紅斑、浮腫、びらん、とりんせつについて無し、軽症、中等症、重症の 4 段階に分けて、スコア化して、その合計を臨床スコアとしてつけた。

ii. 背部皮疹の病理組織を HE 染色にて検討する。トルイジンブルーにて肥満細胞を染色し肥満細胞の個数を計算した。

iii. フローサイトメーターにて腋窩とそ径部リンパ節のリンパ球を計測する。CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の割合を比較検討した。

iv. 血中総 IgE 抗体とダニ特異的 IgE 抗体を ELISA にて計測比較した。

v. 皮膚バリア機能について検討した。

ア) Inside to outside バリア機能の評価のために、経皮水分蒸散量測定装置にて経皮水分蒸散量を計測した。

イ) Outside to inside バリア機能の評価のために、FITC 等の蛍光色素でラベルした様々な分子量のデキストランあるいは nanoparticle をマウス皮膚に塗布した。皮膚を外から内へ通り抜けた色素標識した物質の量を、皮膚樹状細胞を介して所属リンパ節内に移動した蛍光色素陽性皮膚樹状細胞数として flow cytometry で定量的に評価した。

vi. 搔破行動について検討した。

②Flaky tail mouse に UPR 阻害物質を外用し

て、皮膚炎が悪化するか否かをコントロール外用と比較検討した。

#### 4. 研究成果

20 人の AD の患者において、フィラグリン遺伝子変異を検討し、8 人にフィラグリン遺伝子の変異を検出した。

フィラグリン遺伝子変異を有する KC は小胞体ストレス応答を引き起こし TSLP が産生されていることを示唆する所見を得た。

#### 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 24 件)

1. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H, Miyamura Y, Sakai K, Tanaka S, Shimizu H. AKT has an anti-apoptotic role in ABCA12-deficient keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131: 1942-1945, 2011. (査読有)
2. Natsuga K, Nishie W, Smith BJ, Shinkuma S, Smith TA, Parry DAD, Oiso N, Kawada A, Yoneda K, Akiyama M, Shimizu H. Consequences of two different amino acid substitutions at the same codon in *KRT14* indicate definitive roles of structural distortion in epidermolysis bullosa simplex pathogenesis. *J Invest Dermatol* 131: 1869-1876, 2011. (査読有)
3. Osawa R, Akiyama M, Shimizu H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int* 60: 1-9, 2011. (査読有)
4. Akiyama M. The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermato-Endocrinology* 3:107-112, 2011. (査読有)
5. Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses.

*Nagoya J Med Sci* 73: 79-90, 2011. (査読有)

#### 6. 秋山真志 アトピー性皮膚炎の発症因子 フィラグリン遺伝子変異の全国調査

*医薬の門* 51(1): 1-7, 2011. (査読無)

7. 秋山真志 皮膚科セミナリウム (第 71 回) 角化症 魚鱗癬と魚鱗癬症候群 *日本皮膚科学会雑誌* 124(4): 667-673, 2011. (査読無)

8. 秋山真志 アトピー性皮膚炎の病態と治療: アトピー性皮膚炎におけるフィラグリン遺伝子異常 *Derma* 175: 1-6, 2011. (査読無)

[学会発表] (計 14 件)

1. Akiyama M ABCA12 and harlequin ichthyosis ABC Protein and Diseases ABC2011 in Kyoto, ABC Proteins/Membrane Meso-domains/ES-iPS Cells 2012 年 11 月 17 日 京都
2. 秋山真志 ヒト胎生期表皮における先天性魚鱗性様紅皮症の病因蛋白、NIPAL4, CYP4F22, lipoxigenase-3 の発現パターンの検討 希少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成 23 年第 2 回総会 2011 年 12 月 16 日 東京都中央区
3. 秋山真志 新規レジストリーとコホート調査の報告 希少難治性皮膚疾患に関する調査研究班 平成 23 年第 2 回総会 2011 年 12 月 16 日 東京都中央区
4. 秋山真志 角層バリア機能異常症としての角化症とフィラグリン シンポジウム「Fillagrin とアトピー性皮膚炎」第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 11 月 11 日 東京都港区
5. 秋山真志 非免疫学因子の視点から: 皮膚バリア機能との関わりについて シンポジウム「小児のアトピー性皮膚炎」第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 11 月 10 日 東京都港区
6. 秋山真志 アトピー性皮膚炎の病態と治療: 皮膚バリア機能障害に着目して 日本アレルギー学会第 40 回教育セミナー 2011 年 8 月 28 日 東京都千代田区
7. 秋山真志 今、注目される遺伝性皮膚バリア障害 シンポジウム「遺伝性皮膚疾患」第 35 回日本小児皮膚科学会学術大会 2011 年 7 月 23 日 横浜市
8. 秋山真志 アトピー性皮膚炎の発症因子としての日本人フィラグリン遺伝子変異 第 41 回日本皮膚アレルギー・接触皮

膚炎学会総会学術大会 2011 年 7 月 17 日  
甲府市

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学医学部皮膚科ホームページ

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山真志 (AKIYAMA MASASHI)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60222551

### (2) 研究分担者なし

### (3) 連携研究者なし