

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659517

研究課題名(和文) 乾癬の上流遺伝子同定と試験管内表皮-血球細胞間クロストークによる乾癬表皮形成

研究課題名(英文) Identification of upstream gene of psoriasis and the architecture of psoriatic epidermis by crosstalk between epidermal keratinocytes and blood cells in vitro

研究代表者

辻 ひとみ (Tsuji, Hitomi)

旭川医科大学・医学部・研究生

研究者番号：50400106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性乾癬は、皮膚の慢性炎症性角化疾患で、その病因は未だ明らかになっていない。SLURP-2 (secreted Ly-6/uPAR related protein 2) は、尋常性乾癬皮疹部で発現亢進している分泌蛋白である。SLURP-2 を正常ヒト表皮角化細胞で強制発現させたところ、乾癬で発現亢進している炎症性サイトカインや抗菌ペプチドの発現亢進を認めた。SLURP-2 強制発現細胞と、健康人から採取した血球細胞を共培養し、その上清を用いて表皮角化細胞の3次元培養を施行したところ、表皮の肥厚が認められた。SLURP-2 は、乾癬の病態に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Psoriasis vulgaris is one of chronic inflammatory skin diseases. Its pathogenesis remains to be completely elucidated. SLURP-2, a secreted Ly-6/uPAR related protein-2 is a secretory protein, which is significantly upregulated in the psoriatic lesion. SLURP-2/FLAG expression vector was constructed, followed by the transfection into normal human epidermal keratinocytes. The transfected keratinocytes showed the overexpression of the proinflammatory cytokines or antimicrobial peptides that are upregulated in psoriasis. Those cells were co-cultured with blood cells from healthy subjects. The epidermal keratinocytes in three-dimensional culture system, which were cultivated with the supernatant of co-culture, resulted in acanthotic epidermal architecture. These findings suggest that SLURP-2 may be involved in the pathophysiology of psoriasis.

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 共培養 3次元培養表皮角化細胞 クロストーク SLURP-2

## 1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は、欧米では2%、本邦では0.1%の罹患率をもつ慢性の炎症性角化症疾患である。乾癬発症には、表皮角化細胞と免疫担当細胞とのクロストークが重要と考えられている。Kruger JG が提唱した TIP-DC (TNF- $\alpha$ , iNOS-producing dendritic cell) -Th17 細胞学説 (Lowes MA, et al Nature 2007) が乾癬の病態論の主流で、TIP-DC から産生される IL-23 は Th17 細胞への分化を誘導すると共に Th17 細胞を増殖させ、Th17 細胞は IL-17, IL-22 を分泌することにより、STAT3 依存性に表皮角化細胞の増殖を引き起こすというものである。IL-23 は、樹状細胞だけではなく表皮角化細胞からも産生されており、表皮角化細胞は IL-1 $\beta$  や IL-6 を産生し、Th17 細胞分化や TIP-DC の活性化に働く。

SLURP-2 (secreted Ly-6/uPAR related protein-2) は、 $\alpha$ 3 ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のリガンドで、尋常性乾癬皮膚部で有意に発現亢進している分泌蛋白である。SLURP-2 は、表皮角化細胞の増殖促進とアポトーシス抑制作用をもつ。nAChR は、CD4<sup>+</sup>T 細胞やマクロファージ、単核白血球、骨髄由来樹状細胞で発現していることが明らかになっており、SLURP-2 が nAChR を発現している免疫担当細胞の機能調節に関連している可能性も示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SLURP-2 の表皮角化細胞における機能解析を通して、

SLURP-2 が乾癬の病態形成において果たす役割について解明すると共に、SLURP-2 が上流遺伝子として位置するかどうか検討する

ヒトの細胞を用いた *in vitro* での表皮-血球細胞間クロストークによる3次元培養系を構築し、この系を介した SLURP-2 誘導による乾癬表皮(表皮肥厚)が形成されるかどうか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) SLURP-2 発現ベクターの作製と表皮角化細胞への遺伝子導入

SLURP-2 cDNA を、市販の FLAG プラスミドベクターに組み込み、SLURP-2/FLAG 融合タンパク発現ベクターを作製する。

市販の正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を培養し、発現ベクターをリポフェクション法によって遺伝子導入する。SLURP-2/FLAG 融合タンパクの発現について、SLURP-2 が分泌タンパクであることが

ら、培養上清を用いてウエスタンブロットで確認する。

## (2) RNA 抽出と RT-PCR

SLURP-2/FLAG 融合タンパク発現表皮角化細胞と NHEK から、ISOGEN (Nippon gene) を用いて tRNA を抽出後、DNase I でゲノム DNA を処理し、RNeasy mini kit (QIAGEN) で clean up する。Thermoscript RT system (Invitrogen) を用いて cDNA を作製し、乾癬で発現亢進している炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチドの mRNA レベルでの発現について RT-PCR で比較する。

共培養で得られた血球細胞および表皮角化細胞についても、同様の方法で RT-PCR を行ない、各サイトカイン、ケモカインの mRNA の発現を比較する。

## (3) cytokine array と dot blot

炎症性サイトカインおよびケモカインのタンパク発現を検討するため、市販の cytokine array (RayBio) を用いて、NHEK および SLURP-2/FLAG 発現表皮角化細胞の培養上清中の分泌量を比較検討する。J-Image (NIH) を用いて、半定量的に解析する。

また、単独培養および共培養上清をアセトン濃縮し、ニトロセルロースメンブレンにプロット後、前者の上清では IL-23p19 および IL-37 について、後者の上清では IL-17 について、各抗体を用いて dot blot で上清中の分泌の有無および分泌量について比較検討する。

## (4) 表皮角化細胞と血球細胞の共培養

健常人から採取した末梢血を、市販の分離溶液および赤血球溶解液を用いて、リンパ球、顆粒球、単球を分離回収し、RPIM1600 で懸濁する。NHEK および SLURP-2/FLAG 発現表皮角化細胞の培養液にこれらの血球を加え、37<sup>o</sup>C 5% インキュベーター中で 24~72 時間培養する。

## (5) FACS

共培養した血球を、蛍光標識抗 CD4 および抗 CCR6 抗体で蛍光二重染色し、FACS で蛍光強度を測定後、ヒストグラムにより解析を行なう。

## (6) ELISA

ELISA kit (Affimetrix) を用いて、上清中の IFN $\alpha$  の分泌量を測定し、統計的に解析する。

## (7) 3次元表皮角化細胞培養

市販の3次元表皮角化細胞 (J-TEC) を用い、プロトコール通りにセッティングし、培養3日目、以後、2~3日毎の培地交換時に、限外ろ過法で濃縮した共培養

上清を加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で2週間培養する。

#### (8) 表皮の厚さ測定

培養表皮3次元角化細胞を10%ホルマリンで固定後HE染色し、光学顕微鏡で重層化した細胞の基底層から角層下までの厚さを測定し、表皮の厚さについて比較検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 表皮角化細胞における SLURP-2 の機能

RT-PCRでは、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞で、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-23p19, CCL20の発現亢進が認められた。また、cytokine arrayでは、IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, Rantesの発現亢進が示された。これらの炎症性サイトカイン、ケモカインは乾癬でも亢進しており、特に、IL-23p19については、乾癬皮疹部での発現亢進が報告されており、乾癬皮疹部でのIL-23p19の発現亢進にSLURP-2が関与している可能性が示唆された。IL-8, GM-CSFは好中球の遊走因子であることから、SLURP-2はこれらの因子の発現亢進を介して、乾癬の特徴であるMunro's microabscessの形成に関与している可能性も示唆された。

RT-PCRやdot blotの結果では、乾癬皮疹部で発現増強しているCAMP/LL-37, human  $\beta$ -defensin-2(hBD-2)といった抗菌ペプチドの発現亢進がSLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞で認められた。

CCL20は、chemokine (C-C motif) receptor 6(CCR6)のリガンドで、CCR6を発現するTh17細胞を表皮内に誘導する走化性因子であるが、乾癬皮疹部でのCCR6陽性Th17細胞の真皮から表皮内への遊走は同部でのCCL20発現亢進によると考えられており、SLURP-2はCCL20の発現を亢進させることによってTh17細胞の表皮内遊走を誘導しうる可能性が示唆された。

#### (2) SLURP-2/FLAG 融合タンパク発現表皮角化細胞と血球細胞との共培養

共培養後FACSを用いてTh17細胞について、NHEK共培養血球細胞とSLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞共培養血球細胞とで比較検討した。CCR6はIL-17産生Th17細胞に高発現することから、蛍光標識抗CCR6抗体を用いて測定したところ、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞と共培養した血球細胞は、正常表皮角化細胞と共培養した血球細胞に比べ、CCR6陽性細胞の増加が認められた。CCR6陽性細胞にはTh17細胞の他にTregがあるが、血球細胞のtRNAを用いたRT-PCRで、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞との共培

養血球細胞でIL-17, IL-22の発現亢進を、また、共培養上清を用いたdot blotで、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞の共培養上清がNHEKの共培養上清よりIL-17の分泌増強が認められたことから、増加したCCR6陽性細胞はTh17細胞である可能性が示唆された。

更に、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞/血球細胞共培養上清では、正常表皮角化細胞/血球細胞共培養上清と比べて有意にINF $\alpha$ の発現亢進が認められた。抗TNF $\alpha$ 抗体療法を施行した際、乾癬の増悪や乾癬様皮疹が出現することが報告されているが、このadverse effectの機序として、抗TNF $\alpha$ 抗体によってそれまで保たれていたTNF $\alpha$ とINF $\alpha$ のバランスが崩れ、INF $\alpha$ が増加するためと考えられている。増加したINF $\alpha$ はmyeloid dendritic cell(mDC)を活性化させ、mDCからIL-12やIL-23を分泌させ、Th0をTh1やTh17細胞に分化させることから、乾癬の発症機序にINF $\alpha$ が大きく関与する事が明らかにされている。INF $\alpha$ の発現は、表皮角化細胞から産生されたLL-37がplasmacytoid DCにあるTLR7やTLR9に作用して産生されることから、SLURP-2が表皮角化細胞でLL-37の発現を亢進させpDCからのINF $\alpha$ 産生を誘導する可能性が示唆された。

#### (3) 3次元培養

市販のヒト正常表皮3次元培養表皮を用いて、共培養の上清を培地に加えて2週間培養した。

ア)培地のみ、イ)培地+正常表皮角化細胞/血球細胞共培養上清、ウ)培地+SLURP-2/FLAG発現角化細胞/血球細胞共培養上清で培養された3次元表皮のHE染色像における基底層から角層下までの表皮の厚さについて光学顕微鏡で測定し比較した結果、SLURP-2/FLAG発現表皮角化細胞/血球細胞共培養上清を用いた3次元表皮が最も肥厚しており、培地のみと比べて約2倍肥厚していた。

この研究では、ヒトの細胞を用いて、できるだけ生体に近いin vitroの系での解析を行なうために、血球細胞はT細胞のみでなく好中球を含む顆粒細胞や樹状細胞も含めて共培養を行なった。乾癬マウスモデルとして様々なトランスジェニックマウスが作製され、その解析によって乾癬の病態が急速に解明されてきているが、マウスとヒトとの相違点はある。よって、今回提示したような、ヒトの細胞を用いた表皮-血球細胞間クロストークを介した3次元培養表皮系は、乾癬の病態を解明する上で必要な方法であり、今回用いた分離系は有効な一つの方法と考えられる。また、分離系ではなく、3次元培養表皮と血球細胞を同じ場で共培養

する方法についても今後検討する必要があると考える。

また、今回の結果から、SLURP-2は乾癬の病態生理で大きな役割を果たしている可能性が示唆された。乾癬の病態形成において重要な役割を果たす多くの因子の発現をSLURP-2が誘導し、最終的に表皮肥厚に達したことから、SLURP-2は乾癬の病態形成では上流に位置する遺伝子と考えるかもしれない。

更なる乾癬発症機序の解明を進めるために、SLURP-2の発現を亢進させる因子を明らかにする必要があると考える。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 ひとみ(Tsuji Hitomi)

旭川医科大学 医学部 研究生

研究者番号：50400106

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし