

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293245

研究課題名(和文) Smurf/Arkadiaによる表皮自然免疫の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of epidermal innate immunity by Smurf/Arkadia

研究代表者

佐山 浩二 (Koji, Sayama)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80187286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$  刺激におけるSmurf とArkadiaの機能を角化細胞で解析した。TGF- $\beta$  刺激によりSmad2/3のリン酸化が誘導されSmad7の発現が増強し、Smurf1,2の発現は増強したがArkadiaの発現には影響を及ぼさなかった。SmurfをshRNAを用いて抑制すると、TGF- $\beta$  で誘導されるSmad2/3のリン酸化およびSmad7の発現が著しく亢進した。逆にArkadiaを抑制すると、TGF- $\beta$  で誘導されるSmad2/3のリン酸化およびSmad7の発現が減弱した。また、TGF- $\beta$  により誘導される角化細胞の増殖能および遊走能の抑制作用がSmurfのノックダウンにより更に増強した。

研究成果の概要(英文)：Function of Smurf and Arkadia was analyzed in keratinocytes. Stimulation with TGF-beta enhanced Smad2/3 phosphorylation and Smad7 expression. While TGF-beta stimulation enhanced Smurf1/2 expression, it did not enhance the expression of Arkadia. The phosphorylation of Smad2/3 and the expression of Smad7 were significantly enhanced by reducing Smurf by using shRNA. On the other hand, suppression of Arkadia by shRNA reduced the phosphorylation of Smad2/3 and the expression of Smad7. Furthermore, suppressive effect of TGF-beta on cell growth and migration was enhanced by knockdown of Smurf.

研究分野：皮膚科

キーワード：Innate immunity keratinocyte epidermis TGF-beta Smad

## 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  は細胞増殖・分化の調節、血管新生などの広い生物活性を持ち、免疫抑制あるいは抗炎症性サイトカインとしても古くから知られている。そのシグナルは主に細胞内エフェクターである Smad 蛋白を介して核内に伝達され、標的遺伝子の転写を誘導する。その標的遺伝子の一つである I-Smad は TGF- $\beta$  のレセプターに直接結合して、これらのシグナルを負に制御している。近年、特定の Smad に結合する新規の TGF- $\beta$  シグナル制御因子として Smurf、Arkadia が同定された。Smurf、Arkadia は E3 ubiquitin ligase として標的タンパクをユビキチン化することによりプロテアソームで分解する機能を持つ。Smurf は I-Smad と結合することにより核内から細胞質内に移動し、TGF- $\beta$  レセプター、R-Smad をユビキチン化し、TGF- $\beta$  のシグナルを負に調節する。Arkadia は転写を負に調節している c-Ski/SnoN、および I-Smad をユビキチン化することにより TGF- $\beta$  のシグナルを正に調整する。しかし、Smurf、Arkadia は代表的な TGF- $\beta$  制御因子であるにもかかわらず、角化細胞における機能は全く検討されていない。

我々はこれまでに表皮角化細胞が自然免疫機能を持っていることを明らかにしてきた。最近では表皮角化細胞の自然免疫がアトピー性皮膚炎の発症増悪に関連していることを報告した。(JACI 127; 806, 2011)。すなわち、ダニ抗原や花粉は表皮角化細胞の NLRP3、ASC、Caspase-1 からなるインフラマソームを活性化し、IL-1 $\beta$ 、IL-18 を産生させることを証明した。一方、角化細胞のインフラマソーム活性化、および IL-18 産生は TGF- $\beta$  により抑制されることを我々は明らかにしている(未発表データ)。更に、Th2 反応に必須であるとされている TSLP は角化細胞から産生されるが、TGF- $\beta$  により抑制され

ることが報告されている(JACI 126; 985, 2010; JACI 123; 179, 2009)。このように、インフラマソーム制御の分子機構に関しては未だほとんど解明されていないが、表皮自然免疫の制御には TGF- $\beta$  のシグナルが重要であると考えられた。そして、そのシグナルを調節する新規ユビキチンリガーゼ Smurf-Arkadia が自然免疫制御に極めて重要な働きを持つと考えられた。

## 2. 研究の目的

このように TGF- $\beta$  のシグナルは獲得免疫系だけでなく自然免疫系に対しても抑制的に作用することが示唆されている。本研究では表皮角化細胞のインフラマソームを中心とした自然免疫系制御における Smurf、Arkadia の役割を明らかにする。そのために、まず、(1) 角化細胞のインフラマソーム活性化の TGF- $\beta$  による抑制を証明し、(2) 角化細胞における Smad シグナルの解析を行い、(3) Smurf、Arkadia が実際に培養角化細胞でも TGF- $\beta$  シグナルを制御するかどうかの機能解析を行う。更に(4) Smurf、Arkadia を角化細胞特異的に欠損させた KO マウスを作成し表皮自然免疫反応を解析する。以上により、アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚疾患における Smurf、Arkadia の意義を明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 角化細胞のインフラマソーム活性化の TGF- $\beta$ による抑制

TGF- $\beta$  刺激でインフラマソームの活性化が抑制されるかどうかを TGF- $\beta$  で前処理後に環境因子等で刺激し、IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-33 などの産生を ELISA、RT-PCR などで確認する。

### (2) Smad シグナルの解析

正常培養角化細胞を TGF- $\beta$  で刺激後に Smad シグナルを解析する。角化細胞を刺激後に細胞抽出液を作成し、抗 Smad2/3、抗リン酸化

Smad2/3 抗体を用いて Western blot を行う。また、Smad シグナルの活性化に伴い産生する Smad7 の発現を RT-PCR、Western blot で確認する。更に、刺激による Smurf、Arkadia の発現の変化を RT-PCR、Western Blot で検討する。

### (3) Smurf、Arkadia の機能解析

レンチウイルスベクターを用いて Smurf、Arkadia をノックダウンした後に、TGF- $\beta$  で刺激を加え Smad シグナルの増強・減弱を検討する。以前に報告されているように、TGF- $\beta$  による Smad シグナル活性化を Smurf が抑制させるかどうか、また、Arkadia が Smad シグナル活性化を亢進させるかどうかを調べる。

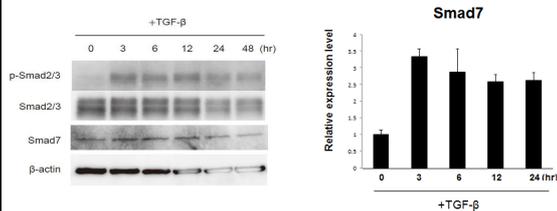
### (4) 表皮特異的 Smurf、Arkadia KO マウスの解析

Smurf、Arkadia 遺伝子を loxP 配列ではさみこんだ Smurf flox/flox マウス、Arkadia flox/flox マウスと K5 プロモーターで発現する K5-Cre マウスを交配することにより、K5-Cre/Smurf、Arkadia flox/+マウスを作成する。このマウスを再度 Smurf flox/flox マウス、Arkadia flox/flox マウスと交配することにより K5-Cre/Smurf flox/flox、Arkadia flox/flox マウスを作成する。それらの外観上の異常や環境因子で刺激後の自然免疫活性化を Smurf、Arkadia、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1、IL-18、IL-33、TSLP などの免疫染色により検討する。

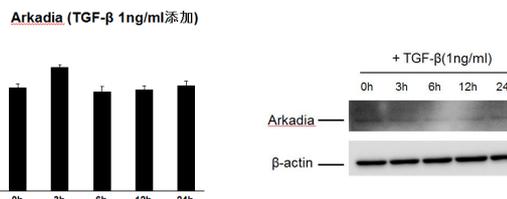
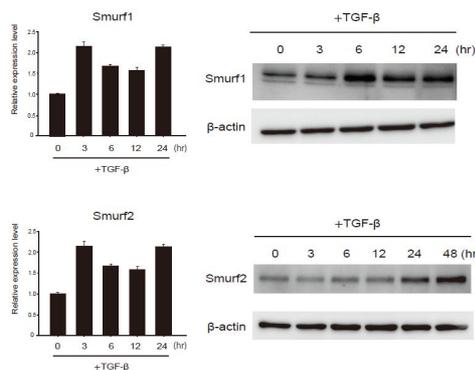
## 4. 研究成果

(1) 角化細胞におけるインフラマソームの活性化、および IL-1、IL-18 の産生が TGF- $\beta$  により抑制されることを ELISA、RT-PCR で確認した。

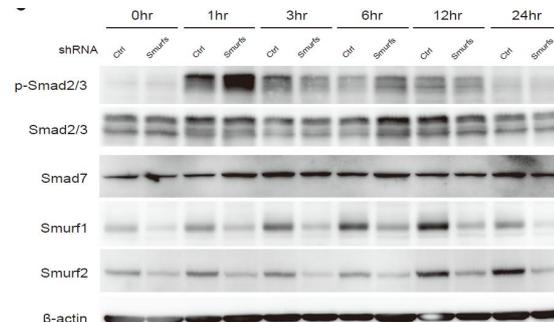
(2) TGF- $\beta$  刺激により Smad2/3 のリン酸化が誘導され Smad7 の発現が増強することを Western blot、RT-PCR で確認した。



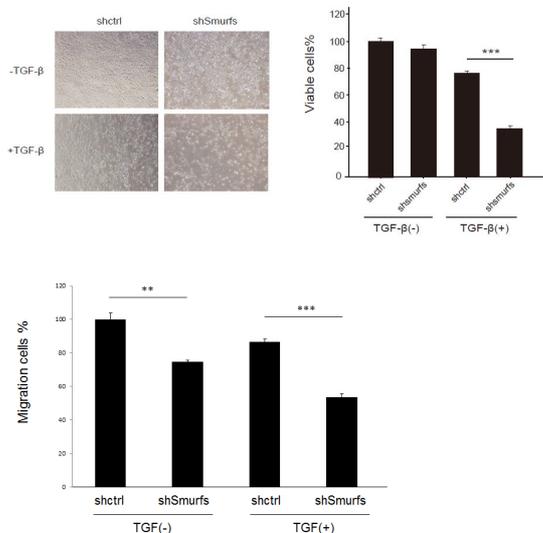
また、TGF- $\beta$  刺激で Smurf1,2 の発現は増強したが Arkadia の発現には影響を及ぼさなかった。(下図：TGF- $\beta$  で刺激後の Smurf1,2 および Arkadia の発現を示す)



(3) Smurf を shRNA を用いて抑制すると、TGF- $\beta$  で誘導される Smad2/3 のリン酸化および Smad7 の発現が著しく亢進した。(下図：TGF- $\beta$  で刺激後 1 時間のバンドに有意に差が見られている)



逆に、Arkadia を shRNA を用いて抑制すると、TGF- $\beta$  で誘導される Smad2/3 のリン酸化および Smad7 の発現が減弱した。また、TGF- $\beta$  により誘導される角化細胞の増殖能および遊走能の抑制作用が Smurf のノックダウンにより更に増強することも明らかにした。



(4) Smurf2 KO マウスを臨床的に評価したがそれらの外観上の異常は特定できなかった。また、同マウスを用いて、環境因子で刺激後の自然免疫活性化を Smurf、Arkadia、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1、IL-18、IL-33、TSLP などの免疫染色により検討したが、有意な差を明らかにすることはできなかった。

#### 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7件)

1. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Shiraishi K, Sayama K, Toki H, Higashiyama S, and Barrandon Y.

Cell motion predicts human epidermal stemness  
The Journal of Cell Biology(JCB); 209: 305-315, 2015. (査読有)

2. Murakami M, Masuda K, Utsunomiya R, Oda F, Namba C, and Sayama K.

Cefcapene pivoxil hydrochloride is a potentially new treatment for palmoplantar pustulosis with pustulotic arthro-osteitis  
Dermatology; 231: 304-311, 2015 (査読有)

3 . Murakami M, Kaneko T, Nakatsuji T, Kameda K, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Tohyama M, Ishida-Yamamoto A, and Sayama K.

Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis  
PLOS ONE; 9: e110677, 2014. (査読有)

4 .Miyawaki S, Tohyama M, Irifune K, Ito R, and Sayama K.

Pressure sore-like ulcers on acneiform papules caused by EGFR inhibitors  
Int Wound J; 11: 569-570, 2014. (査読有)

5 . Murakami M, Kaneko T, Nakatsuji T, Kameda K, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Tohyama M, Ishida-Yamamoto A, and Sayama K.

Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis  
PLOS ONE; 9: e110677, 2014. (査読有)

6. Murakami M, Ishida-Yamamoto A, Morhenn VB, and Sayama K.

The “rat bite” streptobacillosis caused the acute generalized pustular bacterid but not the palmoplantar pustulosis.

The Lancet Infect Dis; 13: 655-656, 2013. (査読有)

7. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, and Sayama K.

Eccrine sweat contains IL-1alpha, IL-1beta and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal

PLOS ONE; 8: e67666, 2013. (査読有)

[学会発表](計8件)

1 . 白石 研, 佐山浩二 「表皮角化細胞における Smurf の機能解析」  
第 67 回日本皮膚科学会西部支部大会  
2015 年 10 月 17 日、長崎県長崎市、ブリックホール

2 . Shiraishi K, Dai X, Murakami M, Tohyama M, Matsushita N, Imamura T, and Sayama K.  
Smurfs E3 ubiquitin ligases negatively

- regulate TGF-beta signaling in keratinocytes  
Society for Investigative Dermatology 2015  
Annual meeting, Atlanta GA, USA. 5/6-9,  
2015.
3. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, and Sayama K.  
Eccrine sweat contains IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal  
Society for Investigative Dermatology, New Mexico, USA. 5/6-10, 2014.
  4. Murakami M, Masuda K, Utsunomiya R, Oda F, Namba C, and Sayama K.  
The possible treatment with cefcapene pivoxil hydrochloride for palmoplantar pustulosis with pustuloarthro-osteitis  
German-Japanese Society of Dermatology, Hydelberg, Germany, 6/11-14, 2014.
  5. Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Okazaki H, Murakami M, Hashimoto K, and Sayama K.  
CISH suppresses IL-17-induced CCL20 production from epidermal keratinocytes via inhibition of the Src/MEK/ERK pathway  
International Investigative Dermatology, Edinburgh, UK. 5/8-11, 2013.
  6. Murakami M, Okazaki H, Shirakata Y, Kaneko T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Morhenn VB, Gallo RL, and Sayama K.  
Human cathelicidin (hCAP18/LL37) in pustules contributes to the pathogenesis of palmoplantar pustulosis  
International Investigative Dermatology, Edinburgh, UK. 5/8-11, 2013.
  7. Okazaki H, Dai X, Murakami M, Hanakawa Y, Tohyama M, Shirakata Y, and Sayama K.  
Eccrine sweat simulates the release of IL-8 via IL-1 from epidermal keratinocytes as danger signal  
International Investigative Dermatology, Edinburgh, UK. 5/8-11, 2013.
  8. Shirakata Y, Matsusaki M, Tohyama M, Murakami M, Okazaki H, Hirakawa S, Hashimoto K, Akashi M, and Sayama K.  
Rapid construction of a three-dimensional multilayered dermis with a vascular tube network by polymeric nanofilm coating on cell surfacees for a living skin equivalent  
International Investigative Dermatology, Edinburgh, UK. 5/8-11, 2013.
- 〔図書〕(計4件)
1. 佐山浩二  
表皮自然免疫(1) - マイクロバイオームによる皮膚恒常性の維持  
西日本皮膚科; 76: 366-371, 2014.
  2. 村上正基, 佐山浩二  
表皮自然免疫(2) - 表皮角化細胞が産生する抗菌ペプチド -  
西日本皮膚科; 76: 482-486, 2014.
  3. 佐山浩二  
表皮自然免疫(3) - アレルゲンと表皮角化細胞 -  
西日本皮膚科; 76: 588-592, 2014.
  4. 代 秀菊, 白石 研  
PAMPs への反応とアレルギー(解説)  
臨床免疫・アレルギー科; 62:668-674, 2014
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
佐山 浩二 (Sayama, Koji)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 80187286
  - (2)研究分担者  
藤山 幹子 (Toyama, Mikiko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 60263935  
白石 研 (Shiraishi, Ken)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80710863
  - (3)連携研究者  
なし