

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461697

研究課題名(和文) IL-22によるヒト表皮角化細胞の分化の制御についての検討

研究課題名(英文) Keratinocyte differentiation mediated by IL-22

研究代表者

藤山 幹子 (Tohyama, Mikiko)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60263935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IL-22は、炎症性皮膚疾患のアトピー性皮膚炎と尋常性乾癬の両者において重要であると考えられている。IL-22は表皮角化細胞に分化異常を誘導するサイトカインであるが、両疾患で見られる表皮角化細胞の分化異常のパターンは異なっている。同じサイトカインが、このような結果の相違を引き起こす理由のひとつに、IL-22に対する表皮角化細胞の反応性の相違が想定される。IL-22レセプターは、IL-22R1とIL-10R2の複合体であるが、IL-22R1の発現量は種々の状態で変化する。そこで、IL-22R1の発現量が表皮角化細胞の分化マーカーの発現に影響を与えるかどうか注目して検討した。

研究成果の概要(英文)：IL-22 plays important roles in the pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. IL-22 affects the differentiation of epidermal keratinocytes. The receptor for IL-22 is a complex of the IL-22R1 and IL-10R2. Expression levels of IL-22R1 increase in the epidermis of psoriasis, which induces strong STAT3 phosphorylation, but not in that of atopic dermatitis. We examined the influence of IL-22R1 expression levels on the regulation of differentiation marker expressions in keratinocytes treated with IL-22.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮角化細胞分化 IL-22 フィラグリン k10 IL-22R1 アトピー性皮膚炎 乾癬

1. 研究開始当初の背景

皮膚の代表的な慢性炎症性疾患に、尋常性乾癬とアトピー性皮膚炎がある。乾癬では、表皮の肥厚と多量の抗菌物質産生が認められ、外界からの刺激に対し過剰な防衛状態、つまり皮膚バリア機能の異常な増強状態となっている。一方、アトピー性皮膚炎は、アレルギーを生じやすい遺伝的素因とともに皮膚のバリア機能の低下を背景に生じる疾患である。

尋常性乾癬は、Th1 サイトカインが本質的な役割を果たすと考えられてきたが、近年では Th17 サイトカインがより重要であることが判明している。Th17 サイトカインの一つである IL-22 は、表皮の肥厚や顆粒層の消失といった乾癬特有の表皮の変化を生じ、病態形成に本質的な役割を果たしている。

アトピー性皮膚炎では、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインが重要と考えられているが、IL-22 を単独で産生する Th22 リンパ球が乾癬病変部に比べてもより多く浸潤していることが近年見いだされた (Nograles KE, J Allergy Clin Immunol, 2009)。IL-22 は、フィラグリンやインボルクリンの発現を抑制することで皮膚のバリア機能を低下させ、病態形成に関わると考えられている (Gittler JK, et al. J Allergy Clin Immunol 2012)。しかし、アトピー性皮膚炎の表皮の形態的变化は乾癬とは異なる。

2. 研究の目的

同じサイトカインにより異なった変化が誘導される理由として、IL-22 に対する表皮角化細胞の反応性の相違が想定される。ひとつの理由は IL-22 レセプターの発現量の違いかもしれない。IL-22 レセプターは、IL-22R1 と IL-10R2 の複合体であり、IL-10R2 は多くの細胞種に普遍的に発現しているが、IL-22R1 は外界に接する細胞に限って発現しており、また、その発現はサイトカインなどの刺激により変化する。申請者はこれまでに、乾癬において IL-22R1 の発現が増強しており、乾癬の本質的な役割を果たす STAT3 の活性化が強く誘導されていること (Eur J Immunol, 2009)、インターフェロン が IL-22R1 の発現を増強し IL-22 の作用増強をきたしていることを明らかとしてきた (J Invest Dermatol, 2012)。

また、別の理由として、Th1 サイトカイン環境、Th2 サイトカイン環境が、IL-22 のシグナル自体にも影響を与える可能性が考えられる。IL-22 刺激により表皮角化細胞に発現が誘導される遺伝子は、他のサイトカインにより発現量が変化する。同様のことが、分化マーカーの発現にも影響を与える可能性がある。

本研究は、以上を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 表皮角化細胞の分化マーカー発現と IL-22 による発現抑制の検討

IL-22 刺激により、表皮角化細胞では K1、K10、フィラグリンの発現が強く抑制され、インボルクリンの発現も抑制傾向となる。申請者のグループは、これら早期分化マーカーの表皮角化細胞における発現抑制に、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の活性化が関わることを報告している (Sayama K, et al. J Biol Chem, 2002)。また、IL-22 が PI3K の活性化を生じることを示唆する報告がある (Brand S, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007; Mitra A, et al. Cytokine, 2012)。IL-22 による分化マーカーの発現と PI3K の活性化との関係を検討する。

分化刺激と分化マーカー発現の時期についての検討

ヒト表皮角化細胞において、K1、K10、インボルクリン、フィラグリンなどの分化マーカーの発現は、分化の早期から認められる。本研究では、細胞がコンフルエントになることにより生じる分化誘導の系を検討に用いる。

IL-22 による表皮角化細胞分化マーカーの発現制御についての検討

コンフルエント分化を増殖期 (未分化状態)、分化マーカー誘導期、誘導後の3つの時期にわけ、それぞれの時期で IL-22 刺激を行い、K10、インボルクリン、フィラグリンにつき mRNA レベル、蛋白レベルで検討して、それぞれの発現抑制が認められる時期を確認し、実験の至適時期を決定する。

PI3K の関与についての検討

PI3K の活性化の指標となる AKT のリン酸化を指標とし、活性化の有無、時期を検討する。そのうえで、PI3K のインヒビター、また dominant-negative form の PI3K を発現するアデノウイルスベクターを用い、IL-22 刺激による分化マーカー抑制が解除されるかどうかを確認する。さらに、アデノウイルスベクターを用いて IL-22R1 の発現を増強、あるいは siRNA を用いて IL-22R1、IL-10R2 の発現を低下させた培養細胞を用い、IL-22 による PI3K 活性化の変化を検討する。

(2) IL-22R1 発現量と分化マーカー発現制御についての検討

申請者のグループは、STAT5 の活性化が PPAR 産生を介してインボルクリンの発現を誘導することを見いだしている (Dai X, et al. J Invest Dermatol, 2007)。IL-22R1 の発現を増強したときには IL-22 による STAT5 の活性化が増強するため、乾癬で認められるようなインボルクリンの発現亢進を誘導する可能性がある。以下の方法を用い、IL-22R1 の

発現増強状態では、IL-22 により STAT5 の活性化と PPAR を介してインボルクリンの発現が亢進することを明らかとする。

IL-22R1 発現増強細胞における分化マーカーの発現制御

IL-22R1 の発現を増強させた培養表皮角化細胞において、特にインボルクリンの発現の増強の有無を確認する。

STAT5 の活性化とインボルクリンの発現制御についての検討

IL-22R1 の発現を増強させ、STAT5 のリン酸化の亢進により PPAR の産生が増強することを mRNA レベル、蛋白レベルで確認する。dominant-negative form の STAT5 や PPAR を発現するアデノウイルスベクターを用いて、IL-22 で誘導されるインボルクリンの発現誘導が抑制されるかどうかを検討する。

(3) IL-20 ファミリーについて検討

IL-22 は、表皮角化細胞から IL-22 と似た機能を有する IL-20、IL-24 の産生を誘導することを申請者は明らかにしている (Eur J Immunol, 2009)。IL-22 による皮膚の増殖、分化の制御においても、IL-20、IL-24 が関与する可能性があり、検討する。

(4) 他のサイトカインの関与についての検討

他のサイトカインが IL-22 の分化マーカー発現制御に与える影響を検討する。

4. 研究成果

培養ヒト表皮角化細胞は、コンフルエントにより分化マーカーの発現が増強する。しかし、細胞株により分化マーカーの発現が異なっていることが明らかとなった。特に、増殖の遅い細胞株では、増殖期からすでにインボルクリンの発現が亢進している。従って、分化マーカーの発現制御を検討する場合には、細胞株や刺激の時期を慎重に検討する必要がある。本研究では、細胞株に関係なくコンフルエントで発現が増強するフィラグリンと K10 について検討を行った。

コンフルエントの培養ヒト表皮角化細胞では、IL-22 刺激により K10 とフィラグリンの発現が顕著に抑制された。IL-22 レセプターは、IL-22R1 と IL-10R2 の複合体であり、IL-22 刺激により生じる STAT3 のリン酸化は、IL-22R1 の発現量に依存して増強することが知られている。表皮角化細胞において siRNA を用いて IL-22R1 あるいは IL-10R2 をノックダウンすると、IL-22 刺激による STAT3 のリン酸化はほぼ消失する。ところが、K10 とフィラグリンの発現抑制は、IL-10R2 のノックダウンではほぼ抑制が解除されるが、IL-22R1 のノックダウンでは抑制が解除されないことがわかった。また、アデノウイルスベクターを用いて IL-22R1 の発現を増強した

系では、STAT3 のリン酸化が増強するが、K10 とフィラグリンの発現抑制が増強されることはなかった。以上の結果から、K10 とフィラグリンの発現抑制には IL-22R1 の発現量は影響されないことを示唆している。

次に、K10、フィラグリンの発現を制御する細胞内シグナルについて検討した。表皮角化細胞の分化においては種々のシグナルが関与するが、PI3K に注目して検討を行った。PI3K の活性化を抑制する、あるいは活性化させる蛋白をアデノウイルスベクターを用いて培養ヒト表皮角化細胞に強発現させ、K10 とフィラグリンの発現の変動を観察した。その結果、PI3K の活性化は K10 の発現には影響を与えないがフィラグリンの発現を強く抑制することが示された。そこで、IL-22 により PI3K の活性化が生じるか、AKT のリン酸化を検討した。その結果、IL-22 刺激は遅発性ではあるが AKT のリン酸化を誘導し、PI3K の活性化を生じる可能性を示唆した。続いて、PI3K の活性化を inhibitor により抑制しフィラグリンの発現の変化を検討したが、IL-22 によるフィラグリンの発現抑制は解除されなかった。

以上のように、IL-22 によるフィラグリンの産生抑制は、IL-22R1 の発現量には影響されないこと、IL-22 により誘導される細胞内シグナルのうち PI3K 以外の経路によることが明らかとなった。フィラグリンは、アトピー性皮膚炎と乾癬の両方で発現が抑制されている分化マーカーである。今後、両疾患では発現の異なるインボルクリンについて、さらなる検討が必要である。

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 2 件)

1. 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 査読あり 9, 2014, e110677
2. 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 査読あり 8, 2013, e67666.

[学会発表](計 1 件)

1. 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, 8-11/5/2013, Edinburgh
(Scotland).

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし