

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670496

研究課題名(和文)肥満における難治性乾癬形成機序の解明と難治性乾癬治療薬開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Involvement of SLURP-2 in refractory psoriasis associated with obesity

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性乾癬皮膚部で発現亢進しているSLURP-2 (secreted Ly-6/uPar related protein-2)をヒト皮下脂肪細胞で過剰発現させると、脂肪細胞の分化、肥大化および成熟脂肪細胞の増殖を促進させ、抗炎症性サイトカインであるアディポネクチンの発現を低下させ、炎症性サイトカインであるIL-6やvisfatinの発現を亢進させた。また、血球とSLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞との共培養では、IL-17、IL-1 の発現亢進を認めた。以上の結果から、SLURP-2は脂肪細胞の肥大化による炎症を誘導し、肥満による乾癬の難治化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of SLURP-2 (secreted Ly-6/uPar related protein-2), which is up-regulated in psoriatic lesion, enhanced the differentiation, enlargement and proliferation of mature adipocytes. In addition, it down-regulated the expression of adiponectin and up-regulated that of IL-6 and visfatin. The result of co-culture of SLURP-2-transfected-adipocytes with immunocytes showed the increase of IL-17 and IL-1. These findings suggest that SLURP-2 may involve in refractory psoriasis associated with obesity.

研究分野：尋常性乾癬

キーワード：尋常性乾癬 脂肪細胞 肥満 アディポサイトカイン 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。近年、乾癬とメタボリック症候群との関連性が報告され[1]、乾癬は全身性の疾患として認識されつつある。乾癬の重症度と肥満との間に正の相関性があり[2]、肥満は乾癬治療の効果を減弱させる負の要因となっている。脂肪細胞がTNF- α やIL-6といった炎症性サイトカインやアディポネクチンのような抗炎症性サイトカインを産生し、肥大化した脂肪細胞は慢性炎症を誘発することが明らかにされている[3]。現在、乾癬は、皮膚を場とするTh17/IL-23を軸とした、表皮と免疫担当細胞とのクロストークによって発症する[4]と考えられているが、メタボリック症候群との関連性が明らかになったことから、乾癬の病態形成で脂肪細胞が果たす役割について解明することは、肥満が乾癬に及ぼす難治化の機序を明らかにする上で重要と考えられる。

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のリガンド[5]で、尋常性乾癬皮疹部で有意に発現亢進している分泌蛋白である[6]。SLURP-2は、表皮角化細胞でIL-23p19やIL-1 β など乾癬で発現上昇している炎症性サイトカインやLL-37などの抗菌ペプチドの発現を亢進させることから、乾癬の病態形成で重要な役割を果たしていると考えられる[7]。SLURP-2は脂肪細胞においても発現していることから、肥満による乾癬の難治化において何らかの働きをしている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、SLURP-2の脂肪細胞における機能解析を通して、肥満に伴う乾癬の難治化の機序を解明する事を目的とする。以下の3点について明らかにする。

(1) 脂肪細胞の増殖、分化、肥大化や、アディポサイトカインの発現について、SLURP-2の脂肪細胞における生理作用を明らかにし、肥満形成および脂肪細胞からの慢性炎症への関与の有無について検討する。

(2) 脂肪細胞と免疫担当細胞とのクロストークによる、アディポサイトカインを含むサイトカインの発現の変化について検討する。

(3) 3次元培養表皮角化細胞を用いて、SLURP-2誘導による脂肪細胞を起点とした炎症が乾癬様表皮を構築するかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の培養

市販のヒト皮下前駆脂肪細胞を、増殖培地を用いて7日間培養した後、分化誘導培地に変更し培養を継続する。

(2) SLURP-2発現ベクターの作製と脂肪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。

市販のヒト皮下前駆脂肪細胞の培養7日目に発現ベクターをリポフェクション法で遺伝子導入し、培地を分化誘導培地に変更し培養する。

(3) 脂肪染色と脂肪滴のサイズ測定

脂肪細胞の分化誘導後7日目に、AdipoRedTMアッセイ試薬を用いて脂肪細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いて前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化したことを確認する。染色された脂肪滴のサイズを、Image J (NIH)を用いて面積測定し、SLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞と正常脂肪細胞を比較する。

(4) 脂肪細胞の増殖測定

分化誘導後7日目、14日目、26日目に、MTT法を用いて生細胞数を測定し、脂肪細胞の増殖について、SLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞と正常脂肪細胞を比較する。

(5) 共培養

遺伝子導入12時間後に、健常人から採取した血液から抽出した単球、顆粒球をSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞と正常脂肪細胞に加え、24~48時間共培養する。

(6) 定量的RT-PCR

分化誘導後7日目のSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞と正常ヒト脂肪細胞からtRNAを抽出し、DNase IでゲノムDNAを処理後、精製キットを用いてclean upする。アディポネクチン、レプチン、visfatinなどのアディポサイトカインやIL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの発現について、定量的RT-PCR (TaqMan法)を用いて各細胞からの発現量を比較検討する。共培養24時間後の血球および脂肪細胞についても、同様の方法で抽出したtRNAを用いて定量的RT-PCRを施行し、各サイトカインの発現量を比較検討する。

(7) cytokine membrane array

脂肪細胞培養7日後および血球との共培養24時間後の上清と市販のアディポサイトカインメンブレンアレイを用いて、アディポサイトカインの発現についてSLURP-2/FLAG融合蛋白発現脂肪細胞と正常脂肪細胞を比較検討する。また、共培養の上清を用いて、市販のTh1/Th2/Th17サイトカ

インメンブレンアレイで、発現するサイトカインの変化について比較検討する。

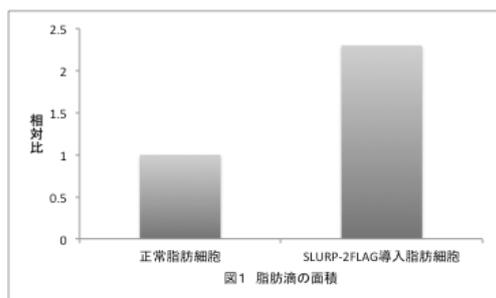
(8) 3次元培養表皮角化細胞

市販の3次元培養表皮角化細胞を用い、培養3日目、以後2～3日毎に培地を交換し、交換時に共培養上清を添加し2週間培養する。10%ホルマリンで固定した後、HE染色を施行し、組織学的に表皮肥厚の有無について検討する。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞の分化と肥大化

AdipoRed™で染色された分化誘導後7日目の脂肪細胞内の脂肪滴の面積を測定し比較検討した結果、SLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞では正常脂肪細胞より約2.3倍脂肪滴が増大していることが示された(図1)。蛍光顕微鏡像では、SLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞で1細胞内の脂肪滴数の減少が認められたことから、脂肪滴の増大は、脂肪滴の融合により形成されていることが本実験でも示された。これらの結果から、SLURP-2は、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化を促進させる機能を有する事が明らかになり、更に、脂肪細胞の肥大化を誘導しうる事が示唆された。



(2) 脂肪細胞の増殖

MTT法を用いて、正常脂肪細胞とSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞の生細胞数を分化誘導後7日目、14日目、26日目で比較検討した結果、7および14日目では約1.1倍、26日目では約1.6倍、正常脂肪細胞に比べてSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞数の増加が認められた。また、経時的な生細胞数の変化について比較検討したところ、正常脂肪細胞では7日目と26日目の細胞数の変化は認められなかったが、SLURP-2/FLAG導入脂肪細胞では26日目の脂肪細胞数は7日目より約1.2倍細胞数の増加が認められた。これらの結果から、SLURP-2は、脂肪細胞の増殖を誘導する可能性が示唆された。26日目と脂肪細胞の分化が進行し成熟脂肪細胞が増加する中で脂肪細胞の増加が示されたことは、SLURP-2が成熟脂肪細胞の細胞分裂を促進する可能性を示唆するものと考えられる。

(3) アディポサイトカインの発現

脂肪細胞からのアディポサイトカインの発現について、正常脂肪細胞およびSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞の分化誘導後培養7日目のtRNAと培養上清を用いて、定量的RT-PCR法およびcytokine membrane assayを施行し比較検討した。

定量的RT-PCRでは、SLURP-2/FLAG導入脂肪細胞でのアディポネクチンの発現低下およびIL-6の発現亢進が示された。

cytokine membrane assayでは、レジスチンの発現低下とvisfatinの発現亢進が認められた。

(4) 共培養におけるアディポサイトカインの発現

共培養24時間後の正常脂肪細胞およびSLURP-2/FLAG遺伝子導入脂肪細胞のアディポサイトカインの発現について、定量的RT-PCRの結果を比較検討したところ、アディポネクチンの発現低下およびvisfatin、レジスチン、IL-6の発現亢進が認められた。

また、共培養24時間後の上清を用いたcytokine membrane assayでは、アディポネクチンの発現低下、visfatin、IL-6の発現亢進が認められた。

(5) 共培養による免疫担当細胞から産生されるサイトカイン発現

共培養24時間後の上清を用いて、Th1/Th2/Th17が産生するcytokineの発現について正常脂肪細胞とSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞を比較検討したところ、SLURP-2/FLAG導入脂肪細胞ではIL-17およびIL-1βの発現亢進が認められた。

(6) 3次元培養表皮角化細胞

脂肪細胞からの炎症惹起によって表皮肥厚が構築されるかどうか、3次元培養表皮角化細胞にそれぞれの共培養上清を添加して2週間培養し、組織学的に検討した。正常脂肪細胞共培養上清を添加した3次元培養表皮角化細胞とSLURP-2/FLAG導入脂肪細胞共培養上清を添加した3次元培養表皮角化細胞のいずれも表皮の肥厚は認められなかった。

以上の結果から、SLURP-2は、脂肪細胞の分化、肥大化および増殖を促進させ、脂肪細胞が産生する抗炎症性および炎症性アディポサイトカインの発現を調節し、炎症を誘導することが明らかになった。肥満は、脂肪細胞の肥大と増殖から生じることから、SLURP-2は炎症メディエーターとしての機能をもつだけでなく、肥満の誘因因子としての機能も有することが推察された。乾癬患者に肥満が多くみられるのは、乾癬皮膚部で発現亢進しているSLURP-2が、脂肪細胞の肥大化、増殖を促進させ肥満化を導く因子として働いている可能性が考えられることから、乾癬

と肥満との関連には、SLURP-2 が大きな役割を果たしていることが示唆された。肥満が乾癬を難治化させる機序として、肥大化した脂肪細胞から発現される SLURP-2 が、Th17 を含む IL-17 産生細胞から IL-17 の発現を亢進させることによると推察される。

また、3次元表皮角化細胞の培養で表皮肥厚の構築が認められなかったことから、脂肪細胞からの炎症惹起では乾癬は発症されないと考えられ、脂肪細胞からの炎症は、乾癬の病態を増悪させる要因として重要であることが示された。

本研究の結果から、SLURP-2 は、乾癬治療の新たなターゲットとなりうる可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Takahashi H et al. J Dermatol Sci 57:143, 2010
- ② Takahashi H et al. J Dermatol Sci 55:74, 2009
- ③ Weisberg SP et al. J Clin Invest 112:1796, 2003
- ④ Di Cesare A et al. J Invest Dermatol 129:1339, 2009
- ⑤ Arredondo J, et al. J Cell Physiol 208:238, 2006
- ⑥ Tsuji H, et al. Genomics 81:26, 2003
- ⑦ Tsuji H, et al. Exp Dermatol 23 suppl2: 8, 2014

5. 主な発表論文等

〔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)

〔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