

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860765

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎発症機序における結合組織の役割の解明

研究課題名(英文)Roles of connective tissue fibroblasts in the pathogenesis of atopic dermatitis

## 研究代表者

安藤 智暁 (ANDO, Tomoaki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：10724669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼC(PLC)-3を欠損した線維芽細胞におけるペリオスチン産生の亢進のメカニズムを検討し、PLC-3を用いたアトピー性皮膚炎の治療薬の基礎的検討を行った。PLC-3欠損線維芽細胞では、ペリオスチン産生を促すIL-13刺激によるStat5およびStat6の活性化レベルの上昇を認めた。PLC-3断片とSHP-1の結合蛋白を線維芽細胞に取り込ませることにより、これらStat5とStat6の活性化を抑制することに成功し、SHP-1-PLC-3-Stat5 (SPS)複合体を標的とするアトピー性皮膚炎の新たな治療法の開発に応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms underlying hyper-expression of Periostin in phospholipase C (PLC)-beta3 deficient fibroblasts. In addition, we examined the in vitro effects of PLC-beta3 supplement therapy. Stimulation by IL-13, which is known to activate Periostin production, induced hyper phosphorylation of both Stat5 and Stat6 in PLC-beta3 deficient fibroblasts. On the other hand, transfection of fibroblasts with fusion proteins of PLC-beta3 fragment and SHP-1 suppressed the activation of Stat5 and Stat6. These results would serve as a basis for developing new therapeutics for the atopic dermatitis targeting SHP-1-PLC-beta3-Stat5 (SPS) complex.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アトピー性皮膚炎 線維芽細胞 PLC-beta3 SPS複合体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎(AD)は掻痒を伴う慢性あるいは反復性の炎症性皮膚疾患である。先進国では過去三十年間で患者数が2-3倍となり、その罹患率は小児で15-30%、成人で2-10%にもものぼる。ステロイドやタクロリムス等の治療薬が多く患者で有効であるが、副作用により治療が困難な症例も多く、新規治療薬が望まれていた。

(2) ホスホリパーゼ C(PLC)-3 はホスファチジル-4,5-ニリン酸を加水分解し、イノシトール 1,4,5-三リン酸(IP3)とジアシルグリセロールを生成する酵素で、IP3 はカルシウムの細胞内濃度を上昇させ、ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼ C 等の活性化を誘導する機能を持つ。

(3) 研究代表者らの研究室では、PLC-3 がその酵素活性とは別に、C 末端部分を介して転写因子 Stat5 と脱リン酸化酵素 SHP-1 に結合して存在(SPS 複合体)し、SHP-1 による Stat5 の脱リン酸化(Tyr-694)を促進することで Stat5 の過剰な活性化を防いでいることを見出した(Xiao et al, Cancer Cell, 2009)。この Stat5 制御のメカニズムが失われた PLC-3 ノックアウト(KO)マウスでは造血幹細胞・骨髄系細胞(マスト細胞を含む)の Stat5 リン酸化レベルが亢進しており、骨髄増殖病(Myeloproliferative neoplasms, MPN)などの腫瘍や AD 様の皮膚炎症が自然発症する。また、皮膚炎症が発症する以前に上述の AD 誘導実験を行うと、PLC-3 KO マウスは対照の野生型マウスより重症の皮膚炎症をおこす。

(4) ペリオスチンは Integrin  $\alpha$ v と結合するいわゆる matricellular protein で、慢性 AD における役割が最近明らかにされた(Masuoka et al, J Clin Invest, 2012)。出原ら(佐賀大学)は、「Th2(サイトカイン)線維芽細胞(Periostin の分泌) ケラチノサイト(TSLP の分泌) 樹状細胞 Th2 細胞の分化」という悪循環があることを示唆している。PLC-3 KO マウス由来の線維芽細胞は野生型マウス由来の細胞と比較すると、ペリオスチン産生能が増加していた。この性質が上記の悪循環を増幅させ、AD の自然発症や誘導 AD モデルの重症化に関与する可能性がある。しかし、線維芽細胞において SPS 複合体が機能しているかは不明であった。また、PLC-3 欠損によるペリオスチン産生能の増加が SPS 複合体の欠損によるものであるかは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は AD の発症における線維芽細胞の SPS 複合体が果たす役割を明らかにし、治療への応用のため基礎的な検討を行うことを目的とする。

(1) 線維芽細胞における SPS 複合体形成条件を調べる

(2) 線維芽細胞における SPS 複合体の構

成分子が AD 様皮膚炎に何らかの役割を果たしているかを検討する

(3) 線維芽細胞の SPS 複合体形成を促進する方法を AD 治療に応用するための基礎検討を行う

## 3. 研究の方法

(1) PLC-3 KO マウスおよびヘテロ接合体マウスの皮膚線維芽細胞を培養し、サイトカイン刺激により Stat5 のリン酸化が認められるか、また線維芽細胞が KO マウス由来の際にリン酸化が亢進するかをウエスタンブロット法により検討した。また、特に IL-13 刺激においては Stat6 のリン酸化がペリオスチン産生に重要とされるため、Stat6 のリン酸化についても検討した。

(2) PLC-3 および Stat5 の floxed マウスと Col1a2CreERT マウスを掛け合わせ、タモキシフェンにより誘導される線維芽細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。これらのマウスにダニ抗原と黄色ブドウ球菌毒素による誘導 AD 実験を行い、重症度の変化を検討した。

(3) SPS 複合体形成を促進することが線維芽細胞のペリオスチン産生に関わるシグナル経路に及ぼす影響を検討するため、膜透過性ペプチド(TAT; Trans-Activator of Transcription Protein) GRKKRRQRRPP(Wadia et al, Nat Med, 2004)を付加した PLC-3 断片と SHP-1 の結合蛋白を作製した。結合蛋白は大腸菌に His タグ付き蛋白として発現させ、ニッケルカラムおよびゲル濾過クロマトグラフィー法で精製した。精製した蛋白を線維芽細胞に投与し、(1)で検討したサイトカイン刺激下でのリン酸化レベル等についてウエスタンブロット法により検討した。

## 4. 研究成果

(1) 同日齢の PLC-3 KO マウスおよび Het マウスから皮膚線維芽細胞を分離し、IL-13 および EGF を用いて刺激実験を行った。IL-13 刺激は Stat5, Stat6 のいずれについてもリン酸化を誘導したが、EGF シグナルは Stat5 のみをリン酸化した。IL-13, EGF いずれの刺激においても KO マウス由来線維芽細胞で Het マウス由来線維芽細胞と比して Stat5, Stat6 の両者のリン酸化の増強が認められたことから、PLC-3 が Stat5 だけでなく、Stat6 のリン酸化の制御にも関わることが示唆された。

(2) PLC-3 および Stat5 の floxed マウスと Col1a2CreERT マウスを掛け合わせ、flox/flox; Col1a2CreERT+マウスを作製した。本実験では、発生過程における Stat5 シグナル等の影響を排除するため、Col1a2CreERT マウスを選択した。Col1a2CreERT マウスは、タモキシフェンを投与したときのみ Cre が核内に移行し、Col1a2 プロモーターが働く線維芽細胞特異的に floxed (fl)の遺伝子をノック

クアウトすることができる。研究年度内には PLC- 3 fl/fl; Col1a2CreERT+ マウスのみが完成し、このマウスについて、ダニ抗原と黄色ブドウ球菌毒素の反復塗布による皮膚炎の誘導を行った。ダニ抗原と黄色ブドウ球菌毒素は1週間塗布し、1週間休ませ、また1週間塗布する反復投与であるが、最初の誘導前にタモキシフェンを経皮的に投与し、皮膚特異的に線維芽細胞での PLC- 3 ノックアウトを試みた。しかし、皮膚炎の重症度はいずれのマウスでも差が認められなかった(図1)。

ところが、研究最終年度の終了後の2016年5月に Col1a2CreERT マウスの購入元から、マウスの系統が実は Col1a1CreERT マウスであったとの報告があった。Col1a1 プロモーターは Col1a2 プロモーターと異なり真皮線維芽細胞での発現は認められないことから、上記の結果は PLC- 3 が皮膚でノックアウトされていない事によるものと考えられる。

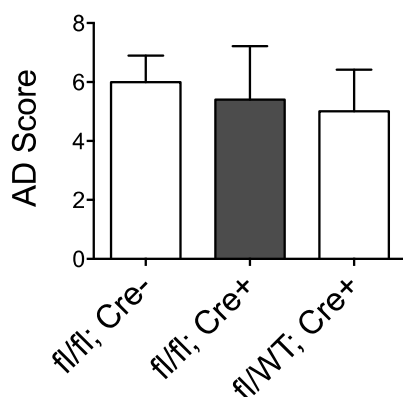


図1 PLCb3fl/fl; Col1a1CreERTマウスの誘導ADモデルにおける皮膚スコア。Col1a2 CreERTとして販売されていたマウスを購入し掛け合わせていたが、研究期間終了後に、購入元が保持していたマウスがCol1a1CreERTであったことが判明した。

(3)(1)において PLC- 3 が Stat5, Stat6 の活性化を制御していることが判明したため、SPS 複合体の形成を促進する方法が EGF, IL-13 シグナルに与える影響を検討した。膜透過性ペプチドを付加した、PLC- 3 の SPS 複合体形成領域と SHP-1 の融合蛋白を作製し、これを PLC- 3 KO またはヘテロマウス由来の線維芽細胞に投与し取り込ませた上で、さらに IL-13 または EGF で刺激を行った。

刺激した細胞を回収し、ウエスタンブロット法で解析を行ったところ、融合蛋白は細胞内に取り込まれていることが確認された。さらに、融合蛋白を投与した細胞では IL-13 刺激による Stat5, Stat6 のリン酸化レベルがいずれも低下しており、EGF 刺激においても Stat5 のリン酸化レベルが低下していたことから、本法が線維芽細胞における IL-13 シグナルの制御に役立つことが判明した。

以上の結果から、PLC- 3 は線維芽細胞の

ペリオスチン産生に関わるシグナルを SPS 複合体形成を通して制御していることが示唆される。さらに、SPS 複合体のメンバーに新たに Stat6 が加わる可能性も明らかになり、本シグナル経路を標的としたアトピー性皮膚炎の治療戦略を進める上で重要な知見と考えられる。

#### 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)

Kawakami, T., Ando, T., Kawakami Y. "Hypothetical Atopic Dermatitis-Myeloproliferative Neoplasm Syndrome" Front Immunol.,(査読あり) 24:6:434.(2015)

Yasudo H., Ando T., Hiwatari M., Oka A. "Suplatast tosilate for treating cutaneous mastocytosis.", "Pediatr Dermatol. (査読あり) 32(3):e118-9 (2015)

安藤智暁、川上敏明「アトピー性皮膚炎におけるマスト細胞の Stat5 活性化経路の関与」臨床免疫・アレルギー科、査読無し、63 巻 6 号、597-602 (2015)

[学会発表](計2件)

安藤智暁「アトピー性皮膚炎の新しいメカニズムと創薬への応用」,2015.12.21, アトピー性皮膚炎の新薬開発と理想的な治療像 (招待講演) 技術情報協会(東京)

Tomoaki Ando, Jun-ichi Kashiwakura, Yuko Kawakami, Toshiaki Kawakami "Mast cells and the Stat5 activation pathway are required for allergen-induced and spontaneous skin inflammation, 2014.12.10-12, 第43回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館(京都)

[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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 智暁 (ANDO, Tomoaki) 理化学研究所 統合生命医学研究セン

ター 研究員  
研究者番号：10724669

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当無し