科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号: 32620 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2014~2016 課題番号: 26860897

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患の新規治療に向けた皮膚炎症におけるオートファジー機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of autophagy in a skin inflammation aiming at new treatment

研究代表者

高木 敦 (Takagi, Atsushi)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号:40459160

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):今研究の目的は、Atg7KOマウスの皮膚移植片を用いて皮膚誘導下でのオートファジー 反応系因子の変化を観察し、オートファジー反応系から炎症に対する新しい治療薬の可能性を模索することであ る。 結果はAtg7KOマウス皮膚を移植した皮膚でフィラグリン。ロリクリン、インボルクリンの低下がみられ、ま

る。 結果はA t g 7 KOマウス皮膚を移植した皮膚でフィラグリン、ロリクリン、インボルクリンの低下がみられ、また毛髪異常もみられた。さらにリソソーム内タンパク分解酵素であるカテプシンファミリーでも免疫染色を行い、尋常性乾癬においてカテプシンD,L染色の増強が確認された。このことから、オートファジー反応系が皮膚炎症性疾患において関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): The purpose of the present study was to observe changes in autophagy reaction system factors under skin induction using skin grafts from Atg7-knockout mice and explore the possibility of new agents for treatment of inflammation from the autophagy reaction system. To that end, we observed mature skin tissue in SCID mice transplanted with skin grafts from Atg7-knockout mice. And then analyzed various skin disease tissues under special staining using autophagy-related factors.

The results showed decreases in filaggrin, loricrin, and involucrin as well as hair abnormalities in the skin into which the Atg7-knockout mouse skin was transplanted. Furthermore, the cathepsin family, which is a group of proteolytic enzymes in lysosomes, was also immunostained in psoriasis, and enhanced staining was also confirmed with cathepsinD and cathepsinL staining. These results suggest that the autophagy reaction system may be involved in inflammatory skin diseases.

研究分野: 角化症

キーワード: 皮膚角化 オートファジー Atg7

1.研究開始当初の背景

オートファジーは、哺乳類の全ての細胞に 存在する細胞内小器官等の蛋白処理機能で あることが解剖学的・分子生物学的に解明さ れており、細胞内で取り込んだ空間をまるこ と消化するため、バルク分解系と呼ばれてい る。オートファジーは自己消化にあたり消化 物を隔離する隔離膜(オートファゴソーム) の形成が不可欠であるが、オートファゴソー ムの形成に必要な幾つかのグループの一つ にユビキチン様因子 Atg8 の結合反応系があ る。LC3(Atg8)はAtg4、Atg7、Atg3、Atg12・ Atg5-Atg16L 複合体の触媒を経て基質であ るリン脂質(PE)と結合し、これはオートファ ゴソームの膜成分の一部として機能する。オ ートファゴソームは、その後リソソームと融 合しオートリソソームとなり、リソソーム内 の多種の酵素により内容物が加水分解され、 分解産物を再供給するという役割をもつ。そ のリソソーム内には 60 種類以上の加水分解 酵素が局在し、その中のプロテアーゼが一部 を除いてカテプシンファミリーとして A か らZまで分類されている。

病態とオートファジーの関わりとしては、心筋症や悪性腫瘍、神経変性疾患など多岐に渡り報告がなされている。皮膚科領域でも、最近、有棘細胞癌や悪性黒色腫(Lazova R, et al J Cutan Pathol. 2010)など悪性腫瘍との関与が報告されている。当教室でも有棘細胞癌 50 例で LC3 染色を行った結果、病期と腫瘍の大きさに比例して LC3 の染色性が高くなることを報告した(Yosihara N, et al. J Dermatol 2014)。

当教室ではまた、表皮でのLC3の発現検討を行っており(Haruna K, et al. J Dermatol Sci. 2008)、LC3の発現が顆粒層から有棘層にみられ、乾癬皮膚ではその発現が減弱していることからオートファジーが最終角化において何らかの役割を担っている可能性を報告している。しかしながら通常のAtg7欠損マウスは生後数時間で死亡するため、成熟した皮膚での長期観察が困難であった。

そのため我々は、新生児 Atg7 欠損マウス 皮膚を成熟マウスへ皮膚移植し、成熟皮膚で のオートファジーの役割の解析を行う実験 系を確立した。その結果、成熟過程において フィラグリンやロリクリン発現の減少を示 すが、代償性に他の機構が働き角化異常を抑 制する可能性を見出している(2013.国際研 究皮膚科学会 エジンバラ)。このことは、 最近 Heidemarie Rossiter らが報告(2013, J Dermatol Sci.)にある表皮細胞の分化の際に オートファジーは活性化されているが、角化 関連遺伝子の発現変化は乏しい原因の解明 にもつながる結果であった。

これらの結果から、オートファジーが皮膚疾 患に関与する可能性として、

. 乾癬やアトピー性皮膚炎などのように一見正常に見えるが、機械的刺激などにより容易に炎症を惹起され症状を来たす疾患

.遺伝性角化症の中で、haploinsufficiency や two-hit の様な発現形式の遺伝性疾患への関与が仮定される。またこの研究で我々は、胎生致死であった Atg7KO マウスの皮膚移植により、長期的な観察が可能にした。この植皮皮膚を用いて行う実験は Juanes Sらにより他の実験系でも確立された手法であり、新たなコンディショナル KO マウスなどを作成せず行える簡便な方法である。この方法をもとに我々は、炎症性皮膚疾患とオートファジーの関連を解明し、オートファジー活性化経路において新たな抗炎症を誘導する因子を調べることで新しい治療法を模索する。

2.研究の目的

本研究期間内での目的は、オートファジー 関連因子Atg7が表皮に与える影響を解明し、 皮膚疾患、特に炎症性皮膚疾患における関与 を調べ、さらにその炎症に対する治療による 変化を調べることで今後の皮膚炎症性疾患 におけるオートファジー反応系の治療応用 を模索することが目的である。具体的には 1.我々が確立した Atg7KO マウス皮膚を SCID マウスに移植して観察する実験系を用 いて Western Blot 法などの解析を加え、さ らなる Atg 7 欠損の皮膚への影響を調べる。 2 .Atg 7 KO マウス皮膚を B6 マウスに移植 し接触性皮膚炎を誘導する、UV 照射による 皮膚炎引き起こすことで、皮膚炎症性疾患に 対するオートファジー発現変化を調べる。ま た、皮膚炎に対し、ステロイド、タクロリム ス、VitD3 外用剤による治療を行いオートフ ァジーの発現変化を比較する。

3.また、実際の皮膚疾患からのアプローチとして、アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、扁平苔癬、尋常性魚鱗癬など炎症性疾患角化性疾患を中心に患者皮膚を用いてオートファジー関連因子の免疫染色や Western Blot 法を行い、その発現を評価する。

3.研究の方法

□ Atg7KO マウス皮膚移植による成熟皮膚の 観察

これまではATg7KOマウスの新生児皮膚をSCIDマウスに移植し7日後、14日後、28日後で皮膚を採取し、HE 染色や透過型電子顕微鏡、免疫染色を行い、Atg7KOマウスでのロリクリンやフィラグリンなどの皮膚角化関連因子の発現の減少と、それらがその後回復傾向を示すことを明らかにした。今回は同様にAtg7KOマウス皮膚をSCIDマウスに移植し、ウエスタンプロット法と Quantitative real time (RT)-PCR 法でロリクリン、インボルクリン、フィラグリンの変化を観察する。また毛包上皮および毛に対する評価が行われていなかったため、毛髪、毛包上皮の変化をHE 染色と電子顕微鏡で観察する。

接触性皮膚炎モデルにおけるオートファジーの発現比較実験

現在までの結果から皮膚移植後 28 日で角

化関連因子の発現変化に有意差がなくなるため、Atg7KOマウス皮膚とWild Typeマウス皮膚をB6マウスに移植後35日目以降、TNCBを用いて1日おきに5回反復刺激実験を行い、その炎症に対するオートファジー発現を観察する。

具体的に観察する因子はリンパ球マーカーや $TNF\alpha$ 、 $TGF\beta$ 、IL-4、IL-12、 $IFN\gamma$ 、IL-23R など炎症性サイトカインや T 細胞分化誘導に関わる因子、LC3 や P62、Atg7、Keap1、Nrf2 などのオートファジー関連因子、ロリクリンやインボルクリン、フィラグリンといった角化関連因子の発現を免疫染色やウエスタンプロッド法、Real-time PCR 法を用いて接触性皮膚炎誘導下での発現変化を観察し、オートファジー欠損下での違いを調べ、オートファジーの役割を解明する。また、皮膚炎に対し、ステロイド、タクロリムス、VitD3 外用を行い同様に比較する。

□ UV 刺激による皮膚炎モデルにおけるオートファジーの発現比較実験

オートファジーは酸化ストレス応答において重要な役割を果たしており、オートファジーの減弱や P62 が過剰発現すると Keaplの Nrf2 結合領域に相互作用し、Keap1のユビキチン化を阻害し、既存の酸化ストレス応答同様に抗酸化たんぱく質、解毒酵素、多剤トランスポーターの遺伝子発現を誘導する。

一方 UV 刺激は皮膚で hydrogen peroxide など様々な ROS を発生させることが知られており、酸化ストレス応答を誘導する。

このことから実際に UV を照射し皮膚炎を 誘導することで、皮膚酸化ストレス応答での オートファジーの役割を解明する。

方法としては前述のTNCBによる反復刺激 実験同様に移植後35日以降にUVBの照射を 行い(1回照射群 1日おき5回照射群)そ の変化を前述同様に炎症性サイトカインやT 細胞分化誘導に関わる因子、オートファジー 関連因子、角化関連因子の発現について調べ る。

□ 皮膚炎症性疾患とオートファジーの発 現検討

□□とは別に実際の皮膚疾患でのオートファジー関連因子発現の検討をすることで、もう一方の側面からオートファジーの関連を検討する。現在までに皮膚科領域でも皮膚腫瘍では有棘細胞癌や基底細胞癌、悪性黒色腫などでその関連を解明する研究が行われ報告されている。

これまでの報告で Atg7 は顆粒層に強く 発現していることが明らかにされており、 顆粒層に変化をもたらす疾患や、角化因子 発現に原因がある疾患にターゲットを絞り、 研究を行う。

具体的にはアトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、扁平苔癬、尋常性魚鱗癬の患者皮膚を用いてオートファジー関連因子: LC3,P62,Keap1,Atg7,Nrf2,カテプシンファミリーの免疫染色やWestern Blot 法を行い、 その発現を評価する。

4.研究成果

□ Atg7KO マウス皮膚移植による成熟皮膚 の観察

まず Atg7KO マウス移植後 7 日後の皮膚を用いて Western Blot 法での解析を行った。その結果、ロリクリン、フィラグリン、インボルクリンいずれの角化因子でも減少がみられた。 この傾向は Quantitative real time (RT)-PCR 法を用いた実験でも確認できた。この結果から今まで免疫染色で明らかにしてきた Atg7 欠損下ではロリクリン、フィラグリン、インボルクリンなどの角化関連因子の発現を減少させ、皮膚角化因子に影響を与えていることが示唆された。

次に毛包上皮と毛に対する電子顕微鏡での観察の結果は毛包上皮ではトリコヒアリン顆粒の最大径がコントロールと比べて 2/3から 3/4 に縮小し、数自体もコントロールと比べて 3/5 から 4/5 に減少した。また毛髪自体も Atg7KO マウス移植皮膚での毛髪はirregular な cuticle が観察された。このことから毛髪形成にも関与している可能性が示唆された。今後は先天性乏毛症や円形脱毛症などの毛髪疾患などとの関連を解析していく必要があると考えられた。

- □ 接触性皮膚炎モデルにおけるオートファ ジーの発現比較実験、及び
- □ UV 刺激による皮膚炎モデルにおけるオートファジーの発現比較実験

本研究内で皮膚炎条件下でのAT g 7 KOマウス皮膚の評価については移植中の皮膚脱落やマウスの継代トラブルなどの理由で具体的な成果を挙げることはできなかった。しかしながら皮膚炎でのオートファジーの関与は重要な課題であり、今後も継続して実験を行っていく。

□ 皮膚炎症性疾患とオートファジーの発現 検討

以前当教室では乾癬皮膚での LC3 の減弱 を示すこと、有棘細胞がんでは病期と腫瘍の 大きさに比例して LC3 の染色性が高くなる ことを観察しているが、今回我々は 扁平苔 尋常性魚鱗癬 皮膚B細胞リンパ 腫 悪性黒色腫 日光角化症 トピー性皮膚炎について LC3 の免疫染色を 行った(アトピー性皮膚炎については解析中 でデータなし)。正常皮膚における LC3 染色 においては基底層から有棘層にかけてだん だんと濃くなり、脱核する顆粒層において LC3 は強く染まる傾向にある。 扁平苔癬で は正常皮膚と同様に基底層、有棘層、顆粒層 と徐々に強い染色性を示している。有棘層で はわずかに染色性が正常皮膚より強く見え る。この結果は以前の乾癬での染色性と明ら かに異なり、同じ炎症性角化症でもオートフ ァジーの関与は異なることが推測された。

尋常性魚鱗癬では基底層に強い染色性を示

しており、正常皮膚と比べて有棘層は薄い染 色性で、顆粒層もやや薄く染まっている。こ の染色性の減弱は Atg7KO マウスでもフィラ グリン発現の減少を認めており、フィラグリ ンと Atg7 などオートファジー因子との関連 を示唆するものと考えられる。 皮膚 B 細胞 リンパ腫では表皮における LC3 染色は正常 皮膚と同じであった。 悪性黒色腫では基底 層、有棘層において無秩序に LC3 染色陽性部 位がみられる。これは悪性黒色腫の組織構築 が不規則で配列が乱れていることを反映し ているものと考える。 日光角化症では正常 皮膚同様に基底層から顆粒層に向かい、徐々 に染色性が増す部位がある一方で、異型ケラ チノサイトが基底層から表皮上部まで存在 し、配列の乱れがある部位においてはLC3も 不均一に強く染まる箇所がみられる。

これらの結果から顆粒層に異常を示す病態や表皮系の腫瘍病変ではオートファジーの関与が示唆された。しかしながら免疫染色だけではその発現量の差を評価できないため今後 Western Blot 法などの解析が必要である。

次にリソソーム内の加水分解酵素であるカテプシンファミリーの染色を行った。カテプシンファミリーはAからZまで多種あるが、まずカテプシンD,Lについて免疫染色を行った。対象皮膚疾患は 尋常性乾癬 アトピー性皮膚炎 扁平苔癬で行った。

尋常性乾癬はカテプシン D の免疫染色で強く染色性が増強されていた。カテプシン L でも有棘層から顆粒層にかけて染色性が強くなっているように見える。

アトピー性皮膚炎ではカテプシン D の免疫染色で顆粒層が強く染色されるが、正常と比べあまり有意ではないように見える。カテプシン L でも有棘層から顆粒層にかけて染色されるが、正常と比べて同様に見える。

扁平苔癬ではカテプシン D,L ともに染色は正常と変わらないかむしろ少し減弱しているようにも見える。

この結果から尋常性乾癬では LC3 の減弱が今まで報告されているが、今回の染色結果ではその下流のリソソーム内加水分解酵素であるカテプシン D,L は発現が増強されている可能性があり、LC3 の減弱により別の経路でカテプシンが活性化されているのか、他の理由でこのような結果になった可能性もある。今後 Western Blot 法などの解析で質量と高いた評価などが必要と考える。アトピとを使った評価などが必要と考える。アトピレー性皮膚炎と扁平苔癬は尋常性乾癬ほどはっきりした染色の増減が無く、さらに検体数を増やし、実験を行っていくとともに Western Blot 法などの解析を進めて評価していく。

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 1件)

Nagisa Yoshihara, Takashi Ueno, <u>Atsushi Takagi</u> et al. The significant role of autophagy in the granular layer in normal skin differentiation and hair growth:Arch Dermatol Res. 307(2):159-69.2015:查読有

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高木 敦 (TAKAGI, ATSUSHI) 順天堂大学・医学部・非常勤講師 研究者番号: 40459160

- (2)研究分担者なし
- (3)連携研究者 なし (4)研究協力者 なし