

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10214

研究課題名(和文) Rhoエフェクター分子は、角層バリアの恒常性維持に関与する。

研究課題名(英文) Involvement of Rho effector molecules on the homeostasis of stratum corneum barrier

研究代表者

波多野 豊 (Hatano, Yutaka)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80336263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 表皮角化細胞特異的ROCK1/2欠損マウスでは、皮膚炎が自然発症した。病理学的には、肥満細胞の増加が観察された。血清におけるIgE、TSLPやIL-6レベルの上昇も検出された。分化関連蛋白の発現分布の異常や発現量の低下を認めた。

(2) 表皮角化細胞特異的mDia1/3欠損マウスでは、物質透過性試験によって皮膚透過性バリア低下を確認した。しかし、角質細胞間脂質膜の形成において重要な脂質代謝に関連する酵素群のmRNA発現異常は認めなかった。一方、電子顕微鏡的解析では、層板顆粒の分泌低下が示唆された。また、角層セラミド量は増加傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Rhoからのシグナルは、透過性バリア機能のみでなく、表皮角化細胞における炎症関連機能にも深く関与していることを示唆している。今後、炎症性皮膚疾患における、表皮角化細胞のRhoとその下流蛋白の役割が明瞭になれば、表皮恒常性の破綻の炎症性皮膚疾患の病態における意義が明確になると期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) Spontaneous dermatitis occurred in keratinocyte-specific ROCK1/2 deficient mice. Histopathologically, epidermal thickening, inflammatory cell infiltration, and an increase in mast cells in the dermis were observed. Elevated levels of IgE, TSLP and IL-6 in serum were also detected. Immunohistochemical staining revealed abnormal distribution or reduction of expression of differentiation-related proteins.

(2) In keratinocyte-specific mDia1/3 deficient mice (K5Cre-mDia1/3KO mice), substance permeability test revealed that the skin permeability barrier was reduced. Levels of mRNA expression of enzymes involved in lipid metabolism, which are important in the formation of the intercellular lipid membrane of the stratum corneum, is not clearly different from those of wild-type mice. Electron microscopic analysis suggested decreased secretion of lamellar bodies in K5Cre-mDia1/3KO mice. Meanwhile, the amount of ceramide in the stratum corneum in K5Cre-mDia1/3KO mice tended to increase.

研究分野：皮膚科学

キーワード：Rho ROCK mDia skin barrier

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角層バリア恒常性維持機能の分子機構は十分に解明されていない。一方、LB 分泌障害や表皮分化異常などの角層バリア恒常性維持機能の低下が示唆される現象が、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患において観察されている。

生命の恒常性に深く関与するアクチン細胞骨格の再編成を担う情報伝達経路に関する研究は、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho とそのファミリータンパク質の発見によって大きく進展した。Rho の下流標的蛋白質 Rho kinase (ROCK) や mDia など系統的に単離され、それらにアクチンの核化・重合活性やアクチン線維束化活性が見出されたことによりその誘導機序が明らかとなった。

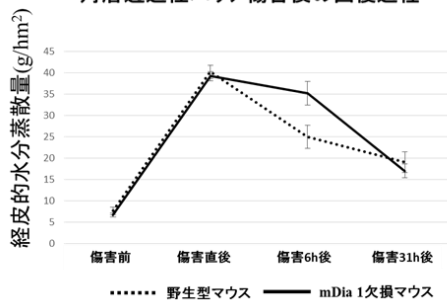
表皮角化細胞の培養系を用いた研究により、Rho が、表皮角化細胞のシート化の初期過程に重要な分子であることが報告されているが、生体の角層バリア機能、特に、角層バリア傷害時の修復過程、即ち、角層バリア機能恒常性維持における Rho の役割は不明である。一方、角層バリア破壊刺激後のバリア修復に重要な層板顆粒分泌の現場である細胞膜の直下でのアクチン細胞骨格再編成が観察され、角層バリア機能修復過程において Rho とその関連分子が関与する可能性を示唆された。

[本研究の学術的背景]

我々は、Rho の下流蛋白質である mDia の角層透過性バリア回復機能における役割を、mDia1 欠損マウスと、mDia3 欠損マウスを用いて解析した。その結果、角層透過性バリア機能の回復は、mDia1 欠損マウスでは、回復早期において、mDia3 欠損マウスでは回復早期から後期に渡ってそれぞれ遅延していた (図 1, 図 2)。即ち、mDia が、角層バリアの恒常性維持に関与している可能性が示唆された。

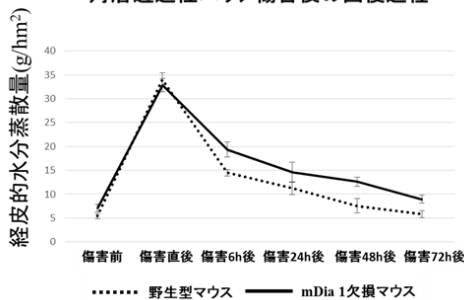
以上の学術的背景から、Rho の下流標的蛋白質である ROCK や mDia など、角層バリア恒常性維持機能に深く関与し、その異常が、角層バリア異常が報告されているアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の病態に関与している可能性が有ると考えた。

図1 mDia 1欠損マウスにおける角層透過性バリア傷害後の回復過程



..... 野生型マウス — mDia 1欠損マウス
テープストリッピングにて角層バリアを傷害。経皮的水分蒸散量が高い程、傷害の程度が大きいことを意味する。

図2 mDia 3欠損マウスにおける角層透過性バリア傷害後の回復過程



..... 野生型マウス — mDia 3欠損マウス
テープストリッピングにて角層バリアを傷害。経皮的水分蒸散量が高い程、傷害の程度が大きいことを意味する。

2. 研究の目的

Rho の代表的な標的蛋白質である、mDia と ROCK のそれぞれの表皮角化細胞特異的欠損マウスを用いて、in vivo における、それぞれの蛋白質の角層透過性バリア機能における役割を検証する。

3. 研究の方法

表皮角化細胞特異的 mDia1/3 欠損マウス (K5Cre-mDia1/3KO マウス) 及び表皮角化細胞特異的 ROCK1/2 欠損マウス (K5Cre-ROCK1/2KO マウス) における皮膚の形態的変化、透過性バリア機能や炎症状態、更にそれらに影響する因子について検討を行った。

4. 研究成果

[K5Cre-ROCK1/2KO マウスを用いた検討結果]

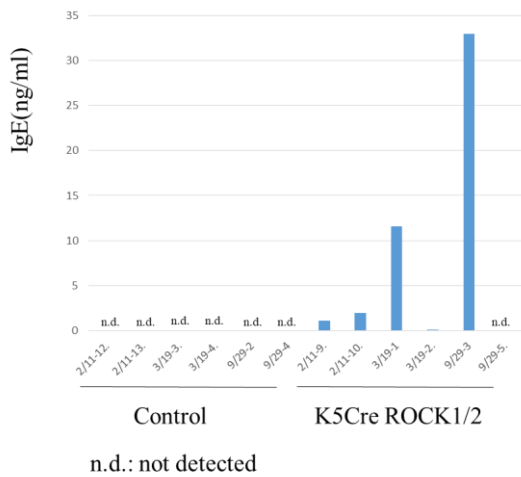


図3: K5Cre-ROCK1/2KOマウスでは皮膚炎が自然発症した。

K5Cre-ROCK1/2KO マウスでは、自然発症性の皮膚炎が生じた (図 3)。

炎症が自然発症した K5Cre-ROCK1/2KO マウスの皮膚組織では、厚い鱗屑の付着、表皮肥厚、炎症細胞浸潤、真皮における肥満細胞の増加が観察された。血清における IgE (図 4) や TSLP、

図4: K5Cre-ROCK1/2KOマウスでは血清IgEの上昇を認めた。



IL-6 レベルの上昇も検出された。分化関連蛋白 (インボルクリン、フィラグリン、ロリクリン) の発現を免疫組織染色で観察したところ、発現分布の異常 (顆粒層部分以外での発現) や顆粒層付近での発現量の低下が示唆された。

[K5Cre-mDia1/3KO マウスを用いた検討結果]

K5Cre-mDia1/3KO マウスでは、肉眼的な皮膚の異常を認めなかったものの、エバンズブルーを用いた物質透過性試験によって皮膚透過性バリアが低下していることを確認した (図 5)。角層透過性バリアを担う角質細胞間脂質膜の形成において重要な脂質代謝に関連する酵素群 (スフィンゴミエリナーゼ、グルコセレブロシダーゼ、セラミダーゼ) の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で解析・検討したところ、野生型マウスとの明確な違いは認めなかった。角層の電子顕

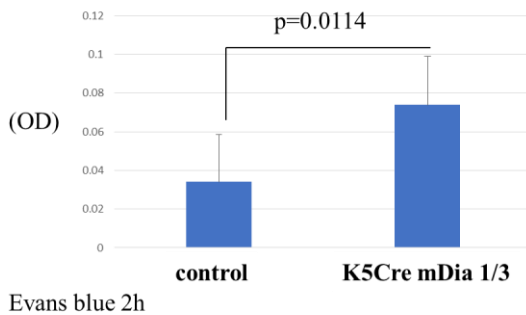


図5: K5Cre-mDia1/3KOマウスでは、皮膚の物質透過性が亢進しており、透過性バリア機能の低下が示唆された。

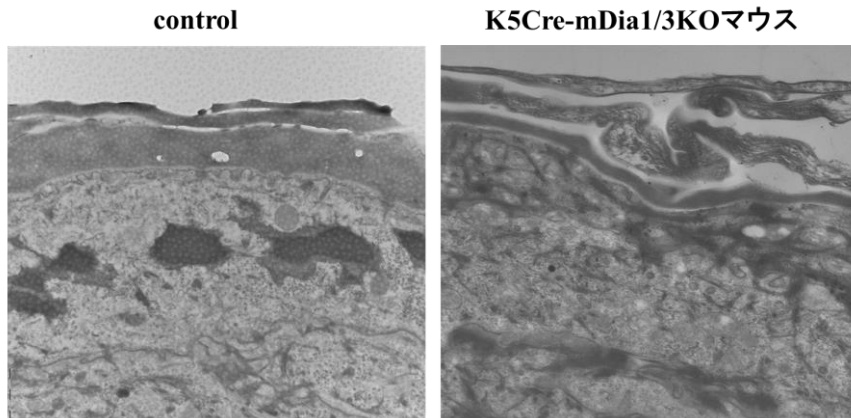


図6: K5Cre-mDia1/3KOマウスでは、角層バリア傷害後の層板顆粒分泌反応の低下が示唆された。

微鏡的解析では、K5Cre-mDia1/3KO マウスにおける層板顆粒の分泌低下が、定常状態と角層アリア傷害後の検体で示唆されたが、特に、角層バリア傷害後の検体でその傾向がより明瞭に示唆された（図 6）。採取した角層における脂質の解析を薄層クロマトグラフィー法で実施した。その結果、mDia1/3KO マウスではコントロールマウスと比較して単位面積当りのセラミド量が増加している傾向を認めた。

本研究は、表皮角化細胞における mDia1/2 と ROCK1/2 は、透過性皮膚バリア機能に関与し、更に、K5Cre-ROCK1/2KO マウスの結果からは、表皮角化細胞における Rho からのシグナルは、皮膚バリア機能のみでなく、表皮角化細胞における炎症関連機能にも深く関与していることを示唆している。今後、炎症性皮膚疾患における、表皮角化細胞の Rho とその下流蛋白の役割が明瞭になれば、表皮恒常性の破綻の炎症性皮膚疾患の病態における意義が明確になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山手朋子, 酒井貴史, 寺林健, 石崎敏理, , 波多野豊
2. 発表標題 mDiaの皮膚バリア機能における役割
3. 学会等名 第71回 日本皮膚科学会西部支部学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石崎 敏理 (Ishizaki Toshimasa) (70293876)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------