

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390297

研究課題名（和文）自然免疫の新たな制御因子 Ubc13 による表皮の分化・自然免疫制御機構の研究

研究課題名（英文）Regulation of keratinocyte differentiation and innate immunity by innate immune regulator Ubc13

研究代表者

佐山 浩二（SAYAMA KOJI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80187286

研究成果の概要（和文）：

角化細胞特異的な Ubc13 ノックアウト（以下 Ubc13 KO と略）マウスを作成し、その表現型を解析した。マウスは生後 2 日で死亡した。マウスの皮膚はコントロールに比し光沢を有し、薄かった。組織学的検討では、アポトーシスが見られ、免疫染色では角化細胞の増殖が低下し、分化マーカーの異常な発現が見られた。細胞内シグナルの解析では、Ubc13 KO 角化細胞では JNK, p38, NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されていた。Ubc13 は表皮角化細胞の増殖、分化、アポトーシス、免疫反応を制御していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The E2 polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a mediator of innate immune reactions. We generated keratinocyte-specific Ubc13-deficient mice (*Ubc13<sup>fllox/fllox</sup>K5-Cre*). At birth, the skin of the *Ubc13<sup>fllox/fllox</sup>K5-Cre* mice was abnormally shiny and smooth; in addition, the mice did not grow and died by postnatal day P2. Histological analysis showed atrophy of the epidermis with keratinocyte apoptosis. Immunohistochemical analyses revealed reduced proliferation, abnormal differentiation, and apoptosis of keratinocytes in the *Ubc13<sup>fllox/fllox</sup>K5-Cre* mouse epidermis. In culture, *Ubc13<sup>fllox/fllox</sup>K5-Cre* keratinocyte growth was impaired and spontaneous cell death occurred. Therefore, Ubc13 is essential for keratinocyte growth, differentiation, and survival.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚感染症・自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン (ubiquitin) は 76 個のアミノ酸からなるタンパク質で、タンパク質の代謝回転や機能変換を仲介する(図)。ユビキチンは活性化酵素 (E1)、結合/転換酵素 (E2; Ubc)、連結酵素 (E3) から構成された複合酵素系 (ユビキチンシステム) によって標的タンパク質に共有結合する。ユビキチン分子内の 48 番目のリジン残基 (K48) にポリユビキチン鎖が形成された場合は、26S プロテアソームの分解シグナルとなり、標的タンパク質は分解される。しかし K63 を介して形成されたポリユビキチン鎖は 26S プロテアソームへの標的シグナルにはならず、タンパク質の活性化など多彩な機能を持つ (K63 型)。E1 は単一分子であるが、E2, E3 には分子多様性があり、IL-1 receptor (IL-1R), Toll-like receptor (TLR) のシグナリングでは、Ubc13 および TRAF2, 6 がそれぞれ E2, E3 として機能する。

細胞内シグナル伝達因子である NF- $\kappa$ B は活性化されると細胞から種々のサイカイン、ケモカインを産生させる。表皮角化細胞においては、NF- $\kappa$ B は増殖、分化、アポトーシスを制御している。I- $\kappa$ B kinase (IKK)-complex は I- $\kappa$ B を介して NF- $\kappa$ B の活性化を制御している (図 2)。角化細胞においては色素失調症患者における IKK- $\gamma$  の遺伝子変異が報告されており (Nature 2000; 405: 466-472; Mol Cell 2000; 5: 969-979; Mol Cell 2000; 5: 981-992)。また、IKK- $\gamma$  のノックアウトマウスでも表皮の異常分化を来す (Science 1999, 284: 313-315)。しかし、何が角化細胞の IKK complex-NF- $\kappa$ B を活性化するかに関しては未だ不明である。そこで、我々はユビキチン転換酵素 Ubc13 に着目した。Ubc13 ノックアウトマウスは胎生致死であり、免疫細胞以外には他組織でも Ubc13 の機能解析はほとんど行われていない。さらに、角化細胞における Ubc13 の機能は国内、海外とも全く検討されていなかった。

TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase-1) はさまざまなストレス、toll-like receptor (TLR) や IL1 receptor によって MyD88, TRAF6 を介して活性化される。活性化された TAK1 は IKK complex を活性化し、I- $\kappa$ B リン酸化を介して NF- $\kappa$ B が核内に移行しシグナルを伝達する。

我々は、角化細胞の NF- $\kappa$ B 活性化において TAK1 が中心的な役割を果たしているのではないかと考えに基づき、角化細胞特異的な TAK1 ノックアウトマウスを作成した。その結果、TAK1 が角化細胞の分化・アポトーシスを制御することを明かにした。

TAK1 の活性化機構は明かではなかったが、近年 Ubc13 が TAK1 を介して免疫反応を制御

することが明かにされた (Nat Immunol. 2006;7:962-70)。そこで、我々は Ubc13 が TAK1 を介して角化細胞の分化・アポトーシスを制御するのではないかと考えた。

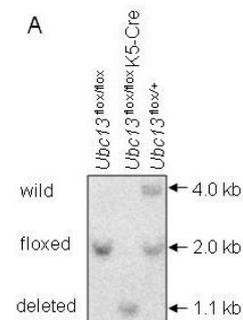
## 2. 研究の目的

本研究では Ubc13 が表皮の分化と自然免疫を制御していることを明かにする。そのために表皮角化細胞特異的な Ubc13 ノックアウトマウスを作成し、表皮の分化・自然免疫が破綻するかどうか明かにする。

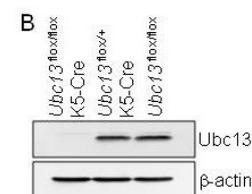
## 3. 研究の方法

Ubc13 遺伝子を loxP 配列ではさみこんだ *Ubc13<sup>lox/lox</sup>* マウスと K5 プロモーターで発現する *K5-Cre* マウスを交配することにより、*K5-Cre/Ubc13<sup>lox/+</sup>* マウスを得る。このマウスを再度 *Ubc13<sup>lox/lox</sup>* マウスと交配することにより *K5-Cre/Ubc13<sup>lox/lox</sup>* マウスを作成する。このマウスでは、K5 が発現している組織に cre-recombinase が発現しているため、loxP 配列ではさまれた Ubc13 がこの酵素により切断され、結果的にケラチン 5 発現組織で Ubc13 が発現しなくなり、表皮角化細胞特異的 Ubc13 KO マウスを作成することができる。Geno-typing はマウスの尾を切断し、genomic DNA を精製し、これをテンプレートとして、各々特異的プライマーを用いた PCR 法を行うことにより確認する。特異的プライマーはすでに準備できており、この操作によりノックアウトされているかどうかを確認できる。また、大量のマウスから DNA を同時に抽出することが必要となるが、自動 DNA 抽出装置を用いる。最終的な geno-typing は Southern blot 法、Western blot 法にて確認する。

## A



## B



## 4. 研究成果

(1) 角化細胞特異的な Ubc13 ノックアウト (Ubc13 KO) マウスの作成。

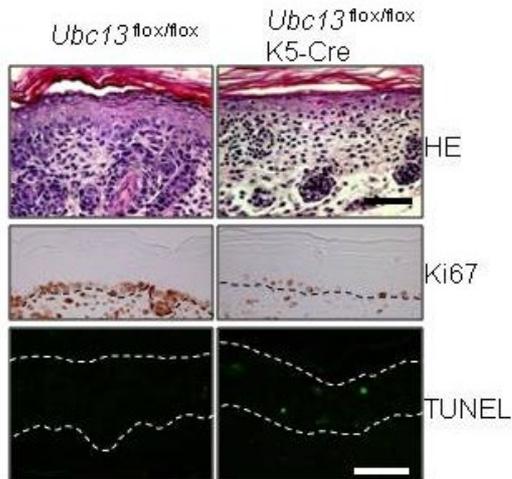
上述のごとく、マウスを作成し、Geno-typing は Southern blot 法 (A) で遺伝子を、Western blot 法 (B) にてタンパク発現を確認した。マウスは生後 2 日後に体重が増加することなく死亡した。マウスの皮膚はコン

トロールに比し光沢を有し、薄かった。  
バリアー機能を検討する目的で  
Trans-epidermal water loss (TEWL)を測定したが、コントロールと差がなかった。



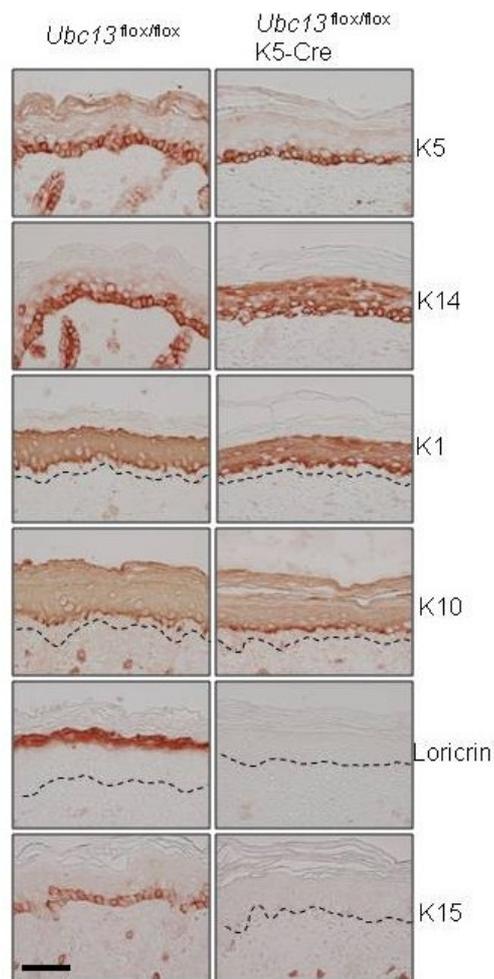
### (2) 組織学的検討

病理組織学的検討を行った。HE では *Ubc13* ノックアウトマウスで、表皮の萎縮が見られた。さらにアポトーシスもみられ、TUNEL 陽性であった。増殖能を検討するために、Ki67 染色を行った。その結果、*Ubc13* ノックアウトマウスの表皮では陽性細胞が激減しており、著しい増殖能の低下があった。



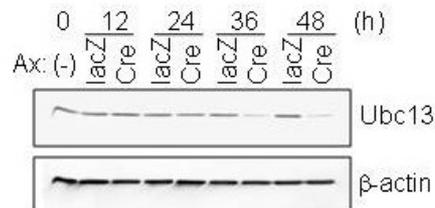
### (3) 免疫組織学的検討

さらに分化状態を検討するために、分化マーカーの免疫組織染色を行った。その結果、ケラチン (K) 14 が表皮の上層まで発現する異常パターンが見られた。さらに、後期の分化マーカーである Loricrin は *Ubc13* ノックアウトマウスでは発現が見られなかった。また、新生児期に発現が見られる K15 の発現も見られなかった。以上の免疫組織染色の結果から、*Ubc13* ノックアウトマウスの表皮では分化異常があると考えられる。



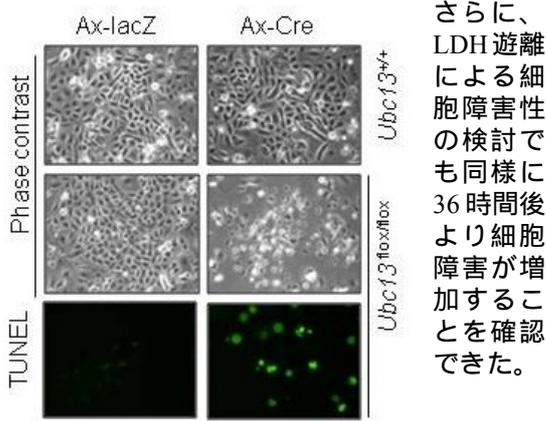
### (4) アデノウイルスベクターを用いた培養角化細胞からの *Ubc13* ノックアウト

次に *Ubc13*<sup>flox/flox</sup> マウス新生児マウスより表皮角化細胞を分離・培養し *Ubc13* の機能を検討した。*Ubc13* は Ax-Cre をトランスフェクションすることにより、ノックアウトした。*Ubc13* の発現は、Western blot 法にて検討した。その結果、トランスフェクション後 36 時間後から発現が現象した。

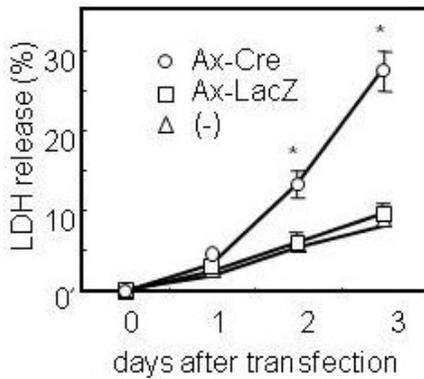


### (5) *Ubc13* ノックアウトによるアポトーシス誘導

Ax-Cre による *Ubc13* ノックアウト時の細胞の形態を観察したところ、アポトーシスが誘導されていた。アポトーシスは TUNEL にて確認した。

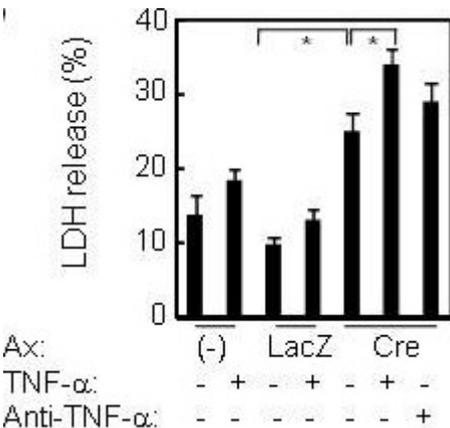


さらに、LDH遊離による細胞障害性の検討でも同様に36時間後より細胞障害が増加することを確認できた。



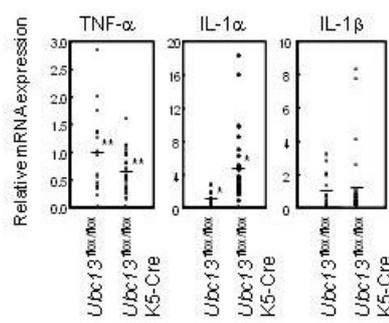
(6) アポトーシスにおよぼす TNF- $\alpha$  の影響

Ubc13 ノックアウトによるアポトーシスに TNF- $\alpha$  が関与しているかどうか検討した。その結果、TNF- $\alpha$  単独投与ではアポトーシスを誘導しなかった。また、Ubc13 ノックアウト時に TNF- $\alpha$  を投与するとわずかにアポトーシスを促進した。しかしながら、抗 TNF- $\alpha$  抗体投与では Ubc13 ノックアウトによるアポトーシスは抑制しなかった。培養細胞における Ubc13 ノックアウトによるアポトーシスには TNF- $\alpha$  の影響は少ないと考えられる。



(7) In vivo 表皮における TNF- $\alpha$  の発現

新生児表皮における TNF- $\alpha$  mRNA の発現を Real-time PCR 法にて検討した。



その結果、Ubc13 ノックアウトマウス表皮において、TNF- $\alpha$  の発現はコントロールと比べてむしろ減弱していた。

一方、IL-1 $\alpha$  mRNA の発現は増強し、IL-1 $\beta$  mRNA の発現は変化なかった。

(8) 細胞内シグナル伝達経路の解析

JNK, p38 の経路は Western blot 法にて、NF- $\kappa$ B の経路は Western blot 法、EMSA 法、TAK1 の活性化は Western blot 法、IKK- $\gamma$  のコピキチネーションは免疫沈降・Western blot 法にて解析した。その結果、Ubc13 ノックアウト角化細胞では JNK, p38, NF- $\kappa$ B の活性化が抑制されていた。

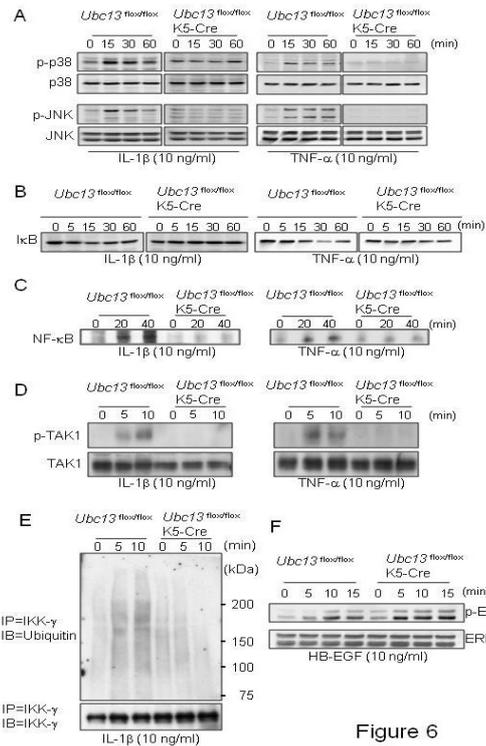


Figure 6

(9) 結論

Ubc13 は表皮角化細胞の増殖、分化、アポトーシス、免疫反応を制御していると考えられる。

(10) 得られた成果の位置づけとインパクト

本研究により、Ubc13 の表皮角化細胞における機能が世界で初めて明らかにされた。角

化細胞の分化と炎症反応に Ubc13 が必須であることが明らかとなったことはきわめて意義が大きい。

(11) 今後の展望

表皮における炎症反応および分化異常を呈する疾患は数多くあり、Ubc13 の異常を明らかにすることにより、その病態解明につなげたい。

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 12 件)

(すべて査読あり)

- 1 Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, and Hashimoto K. The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes J Allergy Clin Immunol; 123: 971-972, 2009.
- 2 Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, and Hashimoto K. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression Eur J Immunol; 39: 1-10, 2009.
- 3 Hida Y, Kubo Y, Nishio Y, Murakami S, Fukumoto D, Sayama K, Hashimoto K, and Arase S. Malignant acanthosis nigricans with enhanced expression of fibroblast growth factor receptor 3 Acta Derm Venereol; 89: 435-437, 2009.
- 4 Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, and Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix J Dermatol Sci;56: 188-195, 2009.
- 5 Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, and Hashimoto K. Nodal lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease Am J Pathol; 2009;175:2235-48.
- 6 Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, and Hashimoto K. PPARgamma is an important transcription factor in 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. J Dermatol Sci; 50: 53-60, 2008 .
- 7 Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, and Hashimoto K. The NF-kappaB, P38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. Int Immunology; 20: 901-909, 2008.
- 8 Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K, and Hashimoto K. A marked increase in serum soluble Fas ligand in drug-induced hypersensitivity syndrome. Br J Dermatol; 159: 981-984, 2008.
- 9 Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Nishi H, Fujiwara T, Fujiue Y, Kuwabara M, Sayama K, Hashimoto K, and Sugai M. Increased resistance to cationic antimicrobial peptide LL-37 in methicillin-resistant strains of staphylococcus aureus J Antimicrob Chemother; 61: 1266-1269, 2008.
- 10 Dai, X. Sayama K, Shirakata, Y. Hanakawa Y, Yamasaki, K. Tokumaru, S. Yang, L. Wang, X. Hirakawa S. Tohyama, M. Yamauchi, T. Takashi, K. Kagechika, H. and Hashimoto, K. STAT5a/PPAR gamma pathway regulates involucrin expression in keratinocyte differentiation J Invest Dermatol; 127:1728-1735, 2007 .
- 11 Nagai, H. Tokumaru, S. Sayama K. Shirakata, Y. Hanakawa Y. Hirakawa S. Dai, X. Tohyama, M. Yang, L. and Hashimoto, K. Suppressor of cytokine signaling 3 negative regulation of signal transducer and activator of transcription 3 in platelet-derived growth factor-induced fibroblast migration J Dermatol; 34: 523-530, 2007 .
- 12 Tohyama, M. Sayama K. Komatsuzawa, H. Hanakawa Y. Shirakata, Y. Dai, X. Yang, L. Tokumaru, S. Nagai, H. Hirakawa, S. Sugai, M. and Hashimoto, K. CXCL 16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes Int Immunol;19:1095-1102, 2007 .

[学会発表](計 5 件)

- 1 Sayama K, Shirakata Y, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K. Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling The 69<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, Montreal, CANADA, 5/6-9, 2009.
- 2 Sayama K, Yamamoto, M. Hanakawa Y. Shirakata, Y. Akira, S. and Hashimoto, K. Conditional ablation of Ubc 13, a mediator of innate immunity, in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased

- proliferation, and apoptosis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.
- 3 Sayama, K. The innate immunity mediator Ubc13-TAK1 is a master regulator of epidermal structure and apoptosis. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.
- 4 Sayama, K. Kajiya, K. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Hirakawa, S. Dai, X. Nagai, H. Akira, S. Kishimoto, J. and Hashimoto, K. Ablation of TAK1 in mouse keratinocytes disturbed hair follicle development 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Los Angeles, May 9-12, 2007 .
- 5 Sayama, K. Kajiya, K. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Hirakawa, S. Akira, S. Kishimoto, J. and Hashimoto, K. TAK1 regulates hair follicle development in EDA receptor signaling 37<sup>th</sup> Annual European Society for Dermatological Research(ESDR)Meeting, Zurich, Switzerland, September 5-8, 2007.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

佐山 浩二 (SAYAMA KOJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80187286

### (2)研究分担者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419511

花川 靖 (HANAKAWA YASUSHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90284398

### (3)連携研究者

なし