

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591312
 研究課題名（和文） 表皮特異的 T G マウスによる乾癬病態への新規血管新生因子 ANGPT 16 の関与の研究
 研究課題名（英文） Investigation of the role of novel angiogenic factor-ANGPT16-in pathogenesis of psoriasis
 研究代表者
 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

研究成果の概要：表皮特異的に angiopoietin-related factor (AGF) をケラチン 14 プロモーター下流に発現するトランスジェニックマウスを用いて慢性の皮膚の炎症性疾患である乾癬の病態形成への AGF の関与について研究を行った。AGF は表皮細胞の過増殖を引き起こすことおよび真皮上層の毛細血管の増生をもちこすことなどより乾癬の病態形成への関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：皮膚病理学、乾癬、モデルマウス、AGF、血管新生、K14 プロモーター

1. 研究開始当初の背景

乾癬は皮膚科領域を代表する疾患であり、表皮の過増殖、炎症性細胞浸潤を特徴とし、さらには血管内皮の過剰増殖も報告されている。炎症性角化症とも呼ばれる。一度発症すると増悪と寛解を繰り返しながら、生涯続き、時に関節症状も伴い、患者にとって大きな負担を強いる疾患である。世界的には白人種を中心にその発症率は2%を超えると報告され、本邦においても、その患者数は徐々に増加し10万人を超えると推測される。

治療法としては、ステロイド外用療法、ビタミン D 外用療法を中心に、重症患者ではシクロスポリン内服療法、メトトレキサート内服療法などが必要となるが、根治療法は知られていない。

乾癬の発症機序に関しては大別して二つの考え方に分類される。1 番目の説は、表皮細胞の異常に原因とする考え方（表皮説）であり、もう 2 番目の説は、免疫異常により惹起されるとの考え方（免疫説）である。

一番目の説は乾癬では表皮の過増殖を

起こす異常がその発症に関係するとの考え方である。表皮はその最下層である基底細胞層一方、乾癬病変部では、活性化T細胞の浸潤、好中球の表皮への浸潤などがみられることより、これらの免疫異常がまず起こり、これに伴って表皮の過増殖が引き起こされるのではないかとの考え、即ち二番目の説が提唱されるようになった。さらに、新たな考えとして、乾癬病変部の真皮上層では、血管網の過剰増殖がみられることから、上記の表皮細胞あるいは免疫系の異常に加えて、皮膚脈管系の異常が、乾癬の発症機序に関与するのではないかとの説が提唱されるようになった。尋常性乾癬においては、増殖した表皮細胞からvascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)をはじめ、血管を誘導する液性因子が強力に分泌される。この結果、病的に変化した表皮に接する真皮にも、極めて豊富な血管網が構築されることが、本疾患の特徴である。そして、近年、尋常性乾癬では血管だけではなくリンパ管も誘導され、病変には確固たる脈管系ネットワークが構築されることが明らかとなった。これらの事実から、尋常性乾癬では皮膚脈管系を基盤とした病態メカニズムが、治癒困難な本疾患の根幹を成すことが示唆される。

2. 研究の目的

血管内皮細胞に特異的に発現し、血管系の発生と維持に重要な役割を果たす受容体には、2つのシステムがある。一つはVascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)であり、もう一つはTieシステムである。Tieに結合する因子にアンジオポエチンファミリーが知られる。アンジオポエチン-1はTie2に作用し、血管の正常な発生と成熟化に大変重要な役割を果たす。近年、アンジオポエチンファミリーに相同性を持つ遺伝子群として、さらにアンジオポエチン様因子群(Angptl)がOikeらにより新たに同定された。Angptlファミリーは6つの新規遺伝子から成り、アンジオポエチンと同様、構造的にcoiled-coil domainとfibrinogen-like domainを持つ。しかし、現在までAngptl

の特異的受容体は同定されていない。Angptl6はAGFとして同定され、生体において強力な血管新生作用を持ち、また血管透過性を亢進する。

本研究の目的は新規血管新生因子Angptl6(AGF)の乾癬の病態への関与を明らかにすることである。まずAGFが乾癬の病態に対する関与を臨床的に明らかにするために、乾癬患者の血清中のAGF濃度の測定を行い、臨床症状との関与を検討する。続いて表皮特異的ケラチン14プロモーターを用いて作製されたAGFトランスジェニックマウス(慶応大学医学部尾池雄一教授より供与)の解析を行い乾癬との関連を調べる。

3. 研究の方法

(1) 乾癬患者の血清中のAGF濃度の測定

愛媛大学医学部倫理委員会の承認後乾癬患者及び他の疾患コントロール患者、正常人より採血し血清を-80℃にて保存した。保存した血清を用いてELISA法にてAGF濃度の測定を行った。

(2) 表皮特異的ケラチン14プロモーターを用いて作製されたAGFトランスジェニックマウスを用いた解析

トランスジェニックマウスにおける乾癬皮膚病変の発現検討を行った。自然発生モデルとして機械的外傷を受けやすく、病変が誘発されやすいと考えられるマウスの尾部、後背側足部に注目して観察した。また創傷誘発モデルとしてマウスの耳介をパンチバイオプシーに準じて直径5mmの創傷を作成しコントロールマウスと比較して臨床的に乾癬様の皮疹が起こるかどうか、また創傷治癒の早さ、新生血管の違い、血管透過性の違いについて検討した。

4. 研究成果

(1) 乾癬患者の血清中の AGF 濃度の測定

乾癬患者の血清中の AGF を ELISA 法にて測定したが健常人と比べて明らかな上昇は認めず乾癬との関連ははっきりしなかった。今後乾癬の重症度及び症例数を増やすことにより再検し乾癬と血清 AGF の関連を調べたい。

(2) 表皮特異的ケラチン 14 プロモーターを用いて作製された AGF トランスジェニックマウスを用いた解析

まず、供与されたマウスの交配を繰り返すことにより十分な数の K14-AGF TG mouse を得た。臨床像として TG (+) mouse において両眼瞼、両耳介の発赤、腫脹が確認されたがコントロールの TG (-) mouse においては認めなかった。次に蛍光色素標識 lectin を静脈投与することにより in vivo imaging を行った。蛍光実態顕微鏡で観察したところコントロールの TG (-) mouse においては認めなかった耳介皮膚血管網の増生が TG (+) mouse においては描出された。また Mile's assay では TG (+) mouse において静脈投与したエバンスブルー色素の漏出が認められ血管透過性の亢進があらかとなった。以上の結果より AGF は表皮ケラチノサイトにより分泌され皮膚において強力な血管新生因子として働くことが可能であることが明らかとなった。また背部より生検を行ったところ正常マウスと比較して真皮上層に明らかな毛細血管の増生、及び表皮の肥厚を認めた。しかしマンローの微小膿瘍と言われる好中球の表皮への浸潤は認めず、表皮の増殖、真皮上層の血管像性は尋常性乾癬の病理組織に合致するが、特徴の一つである好中球の浸潤は認めず、AGF のみでは乾癬の病態を完全に再現できないと考えた。また新生仔マウスより表皮ケラチノサイトを分離して培養を行ったところ TG (+) mouse 由来のケラチノサイトにおいて明らかな増殖の促進が認められた。培養条件下においても増殖能が高いと考えられる。以上の結果より AGF は表皮ケラチノサイトにより分泌され皮膚において強力な血管新生因子として働くことが可能であることが明らかとなり乾癬の病態形成に関与している可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Zhu P, Hata R, Cao F, Gu F, Hanakawa Y, Hashimoto K, Sakanaka M. Ramified microglial cells promote astroglial cells and maintenance of neural stem cells through activation of Stat3 function. *FASEB J.* Nov;22(11):3866-77. 2008 査読あり
2. Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K. PPAR gamma is an important transcription factor in 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci.* Apr;50(1):53-60. 2008 査読あり
3. Tohyama M, Sayama K, Komatsuzawa H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tokumaru S, Nagai H, Hirakawa S, Sugai M, Hashimoto K. CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* Sep;19(9):1095-102 2007 査読あり
4. Nagai H, Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Yang L, 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.* Aug;34(8):523-30 2007 査読あり
5. 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, Hashimoto K. STAT5a/PPARgamma pathway regulates involucrin expression in keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* Jul;127(7):1728-35 2007 査読あり
6. Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K. Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci.* Jan;45(1):69-72. 2007 査読あり
7. Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth

suppression. Oncogene. Jan 18;26(3):339-48
2007査読あり

〔学会発表〕(計 7件)

1. Keratinocyte-specific SOCS3 knockout mice show clinical phenotype of human psoriasis 第22回 表皮細胞研究会 2008年 12月3日白方 裕司、花川 靖、徳丸 晶、平川 聡史、藤山 幹子、佐山 浩二、橋本 公二. 東京

2. 乾癬の表皮角化細胞における IL22R の発現増強と IL-20Subfamily の産生について 藤山 幹子、花川 靖、白方 裕司、平川 聡史、佐山 浩二、橋本 公二 第15回 分子皮膚科学フォーラム 2008年 11月 5日 京都

3. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for lymphatic endothelial cell migration induced by VEGF-A International Investigative Dermatology 2008年 05月 18日 徳丸 晶、白方 裕司、花川 靖、平川 聡史、藤山 幹子、佐山 浩二、橋本 公二 Kyoto

4. Conditional ablation of Ubc 13, a mediator of innate immunity, in keratinocytes induces abnormal differentiation, decreased proliferation, and apoptosis. 佐山 浩二、花川 靖、白方 裕司、橋本 公二. International Investigative Dermatology 2008年 05月 17日 Kyoto

5. Angiopoietin-related growth factor: 新規血管増殖因子の多面的生物活性 第14回分子皮膚科フォーラム 2007年 09月 30日 平川 聡史、佐山 浩二、白方 裕司、藤山 幹子、花川 靖、橋本 公二. 東京

6. Keratinocyte specific ablation of TAK1 in mouse induces abnormal hair development 第32回日本研究皮膚科学会 2007年 04月 20

日 佐山 浩二、白方 裕司、花川 靖、平川 聡史、橋本 公二. 横浜

7. Involvement of STAT3/SOCS signaling pathway in PDGF-induced fibroblast migration 第32回日本研究皮膚科学会 2007年 4月 19日 徳丸 晶、佐山 浩二、白方 裕司、花川 靖、平川 聡史、藤山 幹子、橋本 公二. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者
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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし