

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K08776

研究課題名(和文) 抗炎症・抗アレルギー薬とは異なる新規アトピー性皮膚炎治療薬の開発基盤構築

研究課題名(英文) Investigation of skin homeostasis based on the regulation of actin cytoskeleton

研究代表者

寺林 健 (Terabayashi, Takeshi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40452429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：表皮基底細胞特異的ROCKノックアウトマウスは、TSLPなどの炎症性サイトカインの発現が亢進しておりアトピー性皮膚炎様の症状を呈する。培養ケラチノサイトにおいてもTSLPの発現亢進が見られることから、この発現制御機構の解明を試みた。RNA-seq解析とプロモーター解析を行うことにより、SWI/SNFファミリーのクロマチンリモデリング因子が炎症性サイトカインの発現調節に関与することが示された。このクロマチンリモデリング因子は炎症刺激により、その局在を変化させる。これらのことから、クロマチンリモデリング因子とその制御機構はアトピー性皮膚炎に対する新規創薬ターゲットとなり得ると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における2017年の調査では約50万人がアトピー性皮膚炎に罹患していると推定され、皮膚炎に伴う皮膚の掻痒や外見の変化は罹患者のQOLを大きく低下させる。現在、治療薬としては抗炎症を目的としてステロイド薬や炎症性サイトカインに対する生物学的製剤、また免疫抑制薬が使用されているが、これらの治療薬は対処療法的に使用されるものであり、疾患を根治、もしくは発症を予防するような治療薬の開発には至っていない。本研究成果は皮膚炎症発症、増悪化に関与する新たな因子を提示するものであり、今後、新規治療薬開発の基盤となる可能性を秘めたものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed gene expression profiles in ROCK cKO keratinocytes by RNA-seq and performed in silico analysis of regulatory sequences of gene using i-CisTarget. We found significant changes in expression of genes related with inflammation and keratinocyte differentiation in ROCK cKO keratinocytes, but not Y-27632 treated keratinocytes. According to results from in silico analysis using i-CisTarget, expression of inflammation-related genes was regulated by AP-1 transcription factors together with a SWI/SNF chromatin remodeling factor. Interestingly, this SWI/SNF chromatin remodeling factor showed enhanced nuclear accumulation in ROCK cKO mice skin basal cells. We also found that TPA- or IMQ-treatment accelerated nuclear accumulation. These findings suggest a possibility that SWI/SNF chromatin remodeling factor and its regulatory machineries play important roles in the progression of chronic inflammatory diseases such as atopic dermatitis.

研究分野：細胞生物学、皮膚科学、薬理学

キーワード：慢性炎症性皮膚疾患 アトピー性皮膚炎 ケラチノサイト アクチン細胞骨格 SWI/SNF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は国民の7~15%が罹患しており、皮膚炎に伴う皮膚の掻痒や外見の変化は罹患者のQOLを大きく低下させる。特に低年齢層に罹患者が多く、心身面での発達に大きな影響を与えることもあるため対策は急務である。皮膚バリア機能に異常が生じること(皮膚恒常性異常)でサイトカインが放出され、これらが炎症細胞の活性化を惹起することがアトピー性皮膚炎の発症メカニズムの1つとなっている。近年の研究から、サイトカインの1つであるTSLPが炎症を誘導する『マスタースイッチ』であることが示されている。このことから、ケラチノサイトにおけるTSLP産生の抑制はアトピー性皮膚炎発症・増悪化を抑える有効な手段であり、有望な創薬ターゲットとなる可能性を秘めている。現在、アトピー性皮膚炎の治療薬としては抗炎症を目的としてステロイド薬や炎症性サイトカインに対する生物学的製剤、また免疫抑制薬が使用されている。しかし、これらの治療薬は対処療法的に使用されるものであり、疾患を根治もしくは発症を予防するような治療薬の開発には至っていない。新規作用機序によるアトピー性皮膚炎疾患治療薬開発が広く望まれている。

2. 研究の目的

ノックアウトマウスを用いた先行研究により、申請者はセリン・スレオニンキナーゼ ROCK の喪失によりアトピー性皮膚炎様の症状が引き起こされることを見出していた。培養ケラチノサイトにおいてはTSLPの発現が誘導されていたことから、アトピー性皮膚炎の発症・増悪化にROCK経路の破綻が寄与するものと考えられた。このことから、本研究課題では表皮基底細胞特異的ROCKノックアウトマウスの解析を行い、ROCKによるTSLP発現制御機構を明らかにすることで、ROCK経路を標的とした抗炎症・抗アレルギー薬とは異なるアトピー性皮膚炎治療における新規創薬ターゲットを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 電子顕微鏡観察や免疫染色により表皮基底細胞特異的ROCKノックアウトマウスの皮膚の性状解析を行った。
- 2) タモキシフェン誘導性ROCKノックアウトケラチノサイトを作製し、細胞接着などのアクチン細胞骨格によって制御される細胞機能について解析を行った。
- 3) RNA-seq解析によりROCKノックアウトケラチノサイトにおける発現遺伝子の解析を行った。また、発現変動のあった遺伝子に対してプロモーター領域の解析を行うことで、これらの遺伝子群を制御する転写因子の同定を行った。

4. 研究成果

- 1) 表皮基底細胞特異的ROCKノックアウトマウスの皮膚の性状解析
走査型電子顕微鏡観察により、ROCKノックアウトマウスの皮膚表面において角化細胞の肥厚化と体毛の裂溝、ねじれ、窪みなどの変形を確認された。
続いて、生後直後、4週、8週のマウス皮膚において、各皮膚構造に対するマーカーを用いて免疫染色を行った。ROCKノックアウトマウスにおいては、Keratin5/14陽性である基底細胞の過剰増殖が確認された。これにともない、Keratin1/10やILV陽性の有棘細胞層、FLG陽性の顆粒細胞層の重層化も観察された。また、Ki67染色を行ったところ、ROCKノックアウトマウスにおいては約60%の基底細胞が増殖期にあることが明らかになった。

さらに皮膚バリア機能の検証も行った。Evans blue により皮膚透過性を検討したところ、ROCK ノックアウトマウスはコントロールマウスに比べて約 5 倍の透過性亢進を示していた。E-cadherin 染色により、基底細胞において細胞膜上の E-cadherin のシグナルが喪失していた。また、ROCK の基質である MLC のリン酸化シグナルも喪失する。さらにラミニン 332 染色により基底膜を観察したところ、ROCK ノックアウトマウスの基底膜は波打った歪な構造を形成していることが明らかになった。

- 2) 表皮基底細胞特異的 ROCK ノックアウトマウスにおいて細胞膜上の E-cadherin シグナルの喪失が観察されたことから、タモキシフェン誘導性 ROCK ノックアウトケラチノサイトにおいても E-cadherin の局在を確認した。4OHT で処理をしたケラチノサイトは、コントロールケラチノサイトに比較して、扁平な細胞形態を示した。このとき E-cadherin は細胞細胞間接着部位には存在せず細胞内に取り込まれていることが観察された。また、細胞表面の蛋白質をビオチン化しストレプトアビジンビーズを用いた pull-down を行ったところ、ビオチン化された E-cadherin が減少していることも確認できた。これらの細胞形態の変化、E-cadherin の細胞膜局在の変化は ROCK 阻害薬である Y27632 で処理したときには観察されなかった。さらに細胞 - 基質間接着についても検討を行ったところ、ROCK ノックアウトケラチノサイトはコントロールケラチノサイト、また、Y27632 処理細胞と比較して表皮基底膜を構成するラミニン 332 に対する接着力が有意に低下していた。Vinculin 染色により細胞接着斑形成を評価すると、既報にあるように Y27632 処理細胞では接着斑のサイズと数が有意に減少していたが、ROCK ノックアウトケラチノサイトでは接着斑が全く形成されていなかった。

また、興味深いことに ROCK ノックアウトケラチノサイトでは多核化、巨角化、さらに小核形成など、核構造に変化を生じていた。このことは ROCK ノックアウトケラチノサイトで染色体分配に障害が生じていることを示唆している。実際に、紡錘体軸の傾きを計測すると、X-Y 軸方向、X-Z 軸方向の双方で歪みが生じていることが明らかになった。

- 3) タモキシフェン誘導性 ROCK ノックアウトケラチノサイトを用いて RNA-seq 解析による遺伝子発現解析を行った。ROCK ノックアウトケラチノサイトでは TSLP をはじめとする炎症性サイトカインだけでなく、ケラチノサイト分化マーカーである FLG や TGM3 などの遺伝子の発現に変動が生じていた。実際に GO 解析においても、炎症関連、ケラチノサイト分化に関連する遺伝子変動が確認される(図 1)。ROCK ノックアウトケラチノサイトで発現変動のあった遺伝子に対して i-CisTarget を用いてプロモーター解析を行ったところ、c-Jun や c-Fos などの AP1 転写因子が発現調節に関わっていることが示された。また、炎症性サイトカインの発現調節に関しては、AP1 とともに SWI/SNI ファミリーのクロマチンリモデリング因子の関与も示唆された。マウス皮膚組織におけるこのクロマチンリモデリング因子の発現を確認したところ、コントロールマウスでは主に細胞質と核の両方に局在している一方、表皮基底細胞特異的 ROCK ノックアウトマウスにおいては核に強く蓄積していることも観察された。また、TPA やイミキモド塗布によっても核への蓄積が確認されることから、炎症発生との強い相関性が示唆された。このことから、クロマチンリモデリング因子とその局在制御機構がアトピー性皮膚炎などの慢性炎症に対する新規創薬ターゲットとなり得ると考えられる。

さらに、ケラチノサイト分化に関与する遺伝子についてもプロモーター解析を行ったと

ころ、これまでにケラチノサイト分化への関与が報告されていなかった ZnF 型転写因子が
 発現調節に関与していることが示唆された。実際にこの ZnF 型転写因子をノックダウンす
 ることで、タモキシフェン誘導性 ROCK ノックアウトケラチノサイトにおける分化マーカ
 ーの発現が抑制される。さらに、カルシウム刺激によるケラチノサイト分化誘導におい
 ても、ZnF 型転写因子が分化マーカーの発現に関与していることを確認した。このこと
 から、ZnF 型転写因子はケラチノサイト分化に関わる新規因子であることを強く示唆して
 おり、今後、ROCK による ZnF 型転写因子の活性制御について解析を進める予定である。

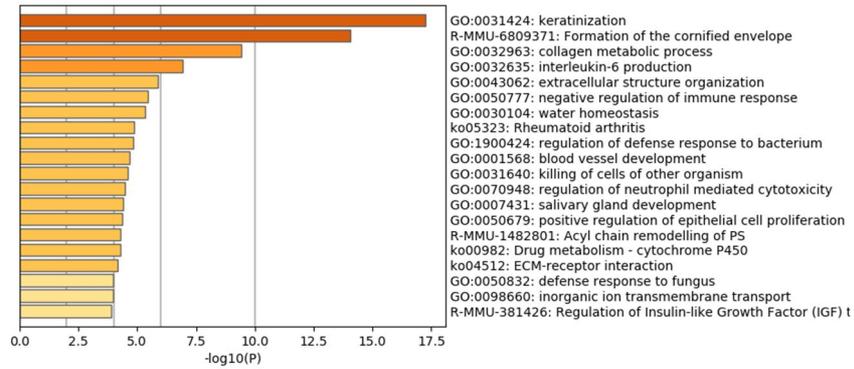


図 1. ROCK ノックアウトケラチノサイにおける GO 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Naomi, Terabayashi Takeshi, Takiguchi-Kawashima Yuri, Fujinami Daisuke, Matsuoka Shigeru, Kawano Masanori, Tanaka Kazuhiro, Tsumura Hiroshi, Ishizaki Toshimasa, Narahara Hisashi, Kohda Daisuke, Nishida Yoshihiro, Hanada Katsuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The benzyloisoquinoline alkaloids, berberine and coptisine, act against camptothecin-resistant topoisomerase I mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87344-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Ichitaro, Terabayashi Takeshi, Hanada Katsuhiko, Kondo Hidekazu, Teshima Yasushi, Ishii Yumi, Miyoshi Miho, Kira Shintaro, Saito Shotaro, Tsuchimochi Hirotsugu, Shirai Mikiyasu, Yufu Kunio, Arakane Motoki, Daa Tsutomu, Thumkeo Dean, Narumiya Shuh, Takahashi Naohiko, Ishizaki Toshimasa	4. 巻 117
2. 論文標題 Disruption of actin dynamics regulated by Rho effector mDia1 attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophic responses and exacerbates dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1103 ~ 1117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvaa206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Terabayashi Takeshi, Tokumaru Asako, Ishizaki Toshimasa, Hanada Katsuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of Chromosomal DNA Fragmentation in Apoptosis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 89 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Toshihide, Yamaoka Mami, Terabayashi Takeshi, Kaibuchi Kozo, Ishikawa Tomohisa, Ishizaki Toshimasa	4. 巻 42
2. 論文標題 GDP-Bound Rab27a Dissociates from the Endocytic Machinery in a Phosphorylation-Dependent Manner after Insulin Secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka Mami, Terabayashi Takeshi, Nishioka Tomoki, Kaibuchi Kozo, Ishikawa Tomohisa, Ishizaki Toshimasa, Kimura Toshihide	4. 巻 140
2. 論文標題 IRR is involved in glucose-induced endocytosis after insulin secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 300 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安部 一太郎、寺林 健、赤嶺孝祐、高橋 尚彦、石崎 敏理
2. 発表標題 アクチン重合促進因子mDia1は圧負荷心肥大応答を制御し心機能維持に寄与する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺林 健、花田克浩、松岡茂、赤嶺孝祐、石崎敏理
2. 発表標題 チモサポニンAIIIは乳がん細胞の形態可塑性と遊走能を阻害する
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺林健、花田克浩、赤嶺孝祐、石崎敏理
2. 発表標題 バイカレインは乳がん細胞の形態可塑性と細胞運動を抑制する
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abe I., Terabayashi T., Teshima Y., Ishii Y., Miyoshi M., Kira S., Kondo H., Saito S., Yufu K., Takahashi N., T Ishizaki T.
2. 発表標題 Role of rho-mdia1 signaling to maintain cardiac function in response to pressure overload in mice.
3. 学会等名 ESC congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Terabayashi Takeshi, Tokumaru Asako, Ishizaki Toshimasa, Hanada Katsuhiro	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Analysis of Chromosomal DNA Fragmentation in Apoptosis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis	5. 総ページ数 11
3. 書名 Methods in Mol Biol. DNA Electrophoresis	

〔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
研究分担者	橋本 悟 (Hashimoto Satoru) (60352150)	大分大学・理工学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	石崎 敏理 (Ishizaki Toshimasa) (70293876)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	花田 克浩 (Hanada Katsuhiro) (90581009)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	赤嶺 孝祐 (Akamine Takahiro) (60799435)	大分大学・医学部・助教 (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