

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08662

研究課題名(和文)表皮のNotchシグナルは皮膚免疫を調節するのか？

研究課題名(英文)Roles of Notch signaling in the regulation of skin immune system

研究代表者

森山 麻里子(Moriyama, Mariko)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：40595295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表皮特異的Hes1コンディショナルノックアウト(Hes1ck0epi)マウスを作成し、イミキモドによる乾癬の誘発を行ったところ、当該マウスでは乾癬の特徴的病態の悪化が観察された。さらに、表皮に発現する遺伝子の網羅的解析により、Hes1ck0epiマウスでは表皮ケラチノサイトからの炎症系サイトカイン遺伝子群の発現が増加していることが明らかとなった。以上の結果は、Hes1が表皮における免疫調節遺伝子発現に関与し、免疫細胞の遊走や活性化を抑制することで過剰な皮膚免疫を抑え、正常な皮膚の恒常性の維持に寄与している可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の最も外側に位置する表皮はバリア機能を有しており、外界のストレスからからだを守る重要な働きをしている。ゆえに、表皮のバリア機能の損傷を伴う創傷や疾患は、命をも脅かす事象である。加えて、皮膚疾患は外見の変化を伴うため、患者のQOLを著しく低下させる。本研究では、Hes1が表皮ケラチノサイトからの炎症性サイトカインを抑制させることで、免疫疾患である乾癬様症状の悪化を防ぐことを明らかとした。この研究成果は、皮膚免疫疾患の発症メカニズム解明や、皮膚免疫疾患の新たな治療法開発などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that Hes1 expression in interfollicular epidermis was significantly increased in Imiquimod (IMQ)-induced, psoriasis-like regional epidermis. By analyzing tamoxifen-inducible, epidermal-specific Hes1 knockout (Hes1^{epi}) mice, deletion of Hes1 resulted in the exacerbation of psoriasis when treated with IMQ. Transcriptome analysis revealed that the expression of inflammatory cytokine genes were significantly upregulated in Hes1^{epi} epidermal keratinocytes.

These results indicate that epidermal expression of Hes1 is involved in immunomodulatory gene expression in the epidermal keratinocytes and may contribute to the maintenance of skin homeostasis by suppressing excessive skin immunity through suppressing immune cell migration or activation.

研究分野：皮膚科学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：Notchシグナル 表皮 乾癬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最も外側に位置する表皮はバリア機能を有しており、外界のストレスからからだを守る重要な働きをしている。ゆえに、表皮のバリア機能の損傷を伴う創傷や疾患は、命をも脅かす事象である。加えて、皮膚疾患は外見の変化を伴うため、患者の QOL を著しく低下させる。また、表皮の恒常性が破綻し、バリア機能が低下することでも、乾癬やアトピー性皮膚炎などの疾患につながる事が知られている。さらに、表皮ケラチノサイトはさまざまなサイトカインを産生することで、隣接する細胞、例えば色素細胞、真皮線維芽細胞、免疫細胞などを制御している。すなわち、表皮の恒常性維持機構を多面的に理解することによって、皮膚免疫疾患の発症メカニズム解明や、慢性創傷・褥瘡の新たな治療法開発などにつながる事が期待されている。

一方、Notch シグナルは、多細胞生物において進化的に保存された経路であり、細胞の分化や運命決定など、多彩な機能をもつシグナル伝達経路である。さまざまなヒト疾病においてもその関与が報告されており、治療のターゲットとしてもっとも注目されているシグナルのひとつである。申請者は、Notch シグナルの下流の転写抑制因子である Hes1 がマウス胎児期の表皮発生に重要な役割を果たしていること (Moriyama et al. Dev Cell 2008) また、オートファジーを介した分化誘導 (Moriyama et al. J Invest Dermatol. 2014) や、UV ストレス誘導性細胞死制御 (Moriyama et al. Cell Death Dis. 2017) など、表皮恒常性維持にも重要な役割を果たしていることを見いだしてきた。しかし、Hes1 の成体表皮における働きは未解明のままであった。

申請者は、Notch シグナル下流因子である Hes1 の発現が初期の乾癬様症状発症時、初期の創傷治癒時の表皮内で上昇していることを見いだした。さらに、表皮特異的 Hes1 ノックアウトにより、これら疾患の悪化が見られたことから、表皮内の Hes1 が、過剰な炎症抑制に寄与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これらの知見をもとに、表皮における Notch-Hes1 経路の新しい機能として、皮膚免疫を調節する可能性を証明することを目的とした。そのために、

- (1) 創傷治癒、乾癬発症時において、皮膚に浸潤する免疫細胞の同定と局在を明らかにする
- (2) 表皮ケラチノサイトに発現する遺伝子の網羅的発現解析を行い、タモキシフェン誘導型表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウス (Hes1^{epic}KO) における創傷治癒遅延、乾癬悪化のメカニズムを分子レベルで明らかにする
- (3) Hes1^{epic}KO マウスにおける炎症性サイトカイン発現の上昇が直接的なものか、バリア機能破綻による二次的要因であるか確かめることを試みた。

これまでの研究では、表皮角化細胞における細胞内シグナルの異常を調べる際、表皮角化細胞のみに着目することが多かった。本研究課題では、表皮-免疫相互作用に着目し、皮膚免疫疾患を「表皮の異常」と捉える視点により、新しい治療法の確立につながることを考える。

3. 研究の方法

3-1. マウス

K14-CreER^{T2} マウスは Professeur Pierre Chambon (I.G.B.M.C./U.S.I.A.S. France) と MTA を交わした後、神戸理化学研究所 藤原裕展博士より提供された。Hes1 floxed マウスは、京都大学 影山龍一朗博士、今吉格博士より提供を受けた。表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスは、K14-CreER^{T2} : Hes1^{flox} マウスに 100 µg の 4-hydroxytamoxifen を 5 日間連続腹腔内注射して作成した。遺伝子改変マウスの飼育は、近畿大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受け、適切に行った。

3-2. 創傷治癒

マウスはイソフルランによる麻酔下のもと、背部皮膚に直径 5 mm の生検トレパンで全損欠損創を作成し、シリコンリングを創の周辺に縫い付けた。創はテガダームTMトランスペアレントフィルム (3M) と包帯で保護し、5 日ごとに創を撮影した。創傷治癒率は Image J で傷の大きさを測定し、算出した。

3-3. 乾癬モデルマウスの作成

マウスの背部を脱毛し、1 日あたり 62.5 mg のベセルナクリーム 5% を、連続して 1 日から 5 日間程度連続塗布した。

3-4. 定量的 PCR

マウス背部皮膚を直径 6 mm の生検トレパンで切り抜き、3.8% チオシアン酸アンモニウム/PBS 溶液に室温 20 分間浮かべ、表皮と真皮をピンセットで分けた。表皮は Trizol で溶解させ、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して total RNA を精製した。Total RNA 1 µg より Verso cDNA Synthesis Kit で cDNA を合成し、定量的 PCR を行った。内部コントロールは、GeNorm ソフトウェアを用いて決定した。

3-5. 細胞

初代ヒト表皮ケラチノサイトは CELLnTec 社より購入し、CnT-PR(CELLnTec 社)で培養した。初代マウス表皮ケラチノサイトは、生直後マウスの背部皮膚を 5000 units/mL Dispase I/ HBSS 溶液へ浮かべ、4 時間でオーバーナイト静置した後、表皮と真皮に分けた。表皮を accutase 溶液に浮かべ、37 °C で 10 分処理した後、セルストレイナーに通して遠心し、 4×10^4 cells/cm² となるように CnT-PR 培地で播種した。

3-6. 免疫染色

マウス皮膚は 4% PFA/PBS で固定した後、20% ショ糖/PBS 溶液に一晩つけてから OCT compound で包埋した。10 µm 厚で凍結切片を作成した後、PBSMT (2% スキムミルク, 0.1% TritonX-100 含有 PBS) でブロッキングし、1 次抗体としてラット免疫抗 Hes1 抗体、ニワトリ免疫抗ケラチン 14 抗体、ウサギ免疫抗ケラチン 10 抗体を使用した。2 次抗体として Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体、Alexa555 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。封入には Prolong Gold Antifade Kit with DAPI (Life Technologies 社) を用いた。撮影は LSM800 共焦点顕微鏡 (Zeiss) で行った。

3-7. フローサイトメトリー

マウス皮膚は Dispase I/PBS で 4 時間でオーバーナイト処理した後、表皮と真皮に分けた。表皮はアキュターゼで 37 °C にて処理し、分散させた。真皮は Liberase TL Enzyme Cocktail で 37 °C、2 時間振盪し、分散させた。分散した細胞はセルストレイナーを通した後遠心し、FACS staining buffer で洗浄した。TruStain FcX (Biolegend) でブロッキングした後、PE 標識抗 CD45 抗体、APC 標識抗 F4/80 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD11b 抗体、FITC 標識抗 Ly-6G 抗体で染色した。死細胞は Cytotox Blue もしくは Live/Dead Fixable dead cell stain Near-IR で染色した。細胞内染色は 4% PFA で固定した後、Permeabilization buffer で透過処理を行い、FITC 標識抗 CD207 抗体で染色を行った。解析には EC800 (SONY) を用いた。

3-7. 検定

検定は GraphPad Prism ソフトウェアを用い、2-way ANOVA の後 Sidak 検定で行った。P<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

4-1. 成体マウス表皮での Hes1 の働き

タモキシフェン誘導型表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、6 週齢以降にタモキシフェンを投与し、成体表皮での Hes1 をノックアウトした。しかし、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスに目立ったフェノタイプは観察されなかった。皮膚の切片を作成し、HE 染色や免疫染色を行ったが、表皮の構造、免疫細胞の局在等に変化は見られなかった。また、経皮水分蒸散量を測定しても、コントロールと表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスには差はなく、バリア機能も正常であることが分かった。

4-2. 創傷治癒における Hes1 の働き

そこで in vivo でのストレス応答時における Hes1 の発現を解析した。マウスに全損欠損創を作成した 2 日目に皮膚を回収し、Hes1 に対する免疫染色を行った。すると、創傷部位では非創傷領域と比べ、表皮での Hes1 の発現が上昇していることを見出した。表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスに全層欠損創を作成し、創傷治癒率を算出したところ、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは傷の治りが有意に遅くなることが明らかとなった。また、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、傷口の化膿が見られた。このことから、Hes1 は皮膚免疫に関与し、創傷治癒を遅らせている可能性が示唆された。

4-3. 乾癬モデルでの Hes1 の働き

創傷治癒時に傷口の化膿が見られたことから、Hes1 は皮膚免疫に関与している可能性が考えられた。実際、乾癬モデルマウスでは Hes1 の発現が上昇していることを見出した。そこで、乾癬モデルマウスで検証を行った。乾癬は、皮膚にベセルナクリーム (5% イミキモド含有) を 5 日

間連続塗布することで誘起させた。その結果、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、表皮肥厚、異常角化を伴う乾癬の増悪が観察された。また水分蒸散量を測定したところ、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは経皮水分蒸散量の上昇が確認され、バリア機能の著しい低下が起こっていることも確認された。また、表皮ランゲルハンス細胞の増加や、真皮でのマクロファージの増加なども認められた。このことから、表皮に発現している Hes1 は、初期の乾癬症状を抑制する働きがあることが示された。

4-4. 創傷治癒、乾癬モデルにおける Hes1 の分子機構

そこで、どのような分子機構で Hes1 が皮膚免疫に関与しているかを調べる目的で、創傷治癒時、ならびに乾癬様症状発症時におけるマウス背部皮膚表皮より RNA を抽出し、RNA-seq を行った。すると、皮膚免疫に関与すると考えられる遺伝子群に違いが見られることが示唆された。そこで、実際に定量的 PCR を行い、それら遺伝子群の発現に対する検証を行った。すると、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、イミキモド塗布して1日目の表皮で皮膚免疫に関与すると考えられる遺伝子の発現が有意に上昇していることを見出した。また、マウス新生児より初代ケラチノサイトを樹立し、ベセルナクリームやイミキモドを添加したところ、同様の遺伝子群が表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウス由来の初代ケラチノサイトで上昇していることを確認した。

4-5. 皮膚免疫細胞の局在解析

イミキモドによる刺激により、表皮ケラチノサイトから皮膚免疫に関する遺伝子群の発現が誘起され、その発現強度は表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでより大きくなることが判明した。そこで、この炎症系サイトカインが皮膚免疫細胞を誘導しているのではないかと考え、イミキモド塗布後1日目、2日目の初期状態の免疫細胞をフローサイトメトリー法により解析した。すると、イミキモド塗布2日目には、表皮ランゲルハンス細胞と真皮マクロファージの量が増え、その数は表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでより顕著に上昇していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 DJ Klionsky, M Moriyama et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)¹	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2020.1797280	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 Okumura Nobuaki, Ito Takashi, Degawa Tomomi, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Royal Jelly Protects against Epidermal Stress through Upregulation of the NQO1 Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12973~12973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312973	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 Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Toshiyuki Ozawa, Daisuke Tsuruta, Takao Hayakawa	4. 巻 24
2. 論文標題 Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells into Insulin-Producing Cells with A Single Tet-Off Lentiviral Vector System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Journal	6. 最初と最後の頁 705-714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22074/cellj.2022.557533.1063	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森山麻里子
2. 発表標題 Hes1の皮膚における新たな役割
3. 学会等名 皮膚の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayumu Morioka, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 Epidermal Expression of Hes1 Plays Crucial Role of Immune Response
3. 学会等名 44 th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田 大輔、森山 麻里子、尾崎 紀文、和田 晃拡、大野 友豊、桐山 大輝、入江 美穂、瀬川 晴菜、早川 堯夫、森山 博由
2. 発表標題 Hes1の皮膚における新たな役割
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷 優音、森山 麻里子、三宅 佑有子、 森山 博由
2. 発表標題 表皮におけるHes1は免疫応答に重要な役割を担う
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三宅 佑有子、森山 麻里子、岩谷 優音、八木 正敏、谷口 義隆、森山 博由
2. 発表標題 成体マウス表皮でのHes1の働きについて
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mariko Moriyama, Yuko Miyake, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 Epidermal expression of Hes1 regulates immune response
3. 学会等名 第47回日本研究皮膚科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mana Wakatake, Mariko Moriyama, Yuko Miyake, Saya Goto, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 Epidermal expression of Hes1 controls immune response
3. 学会等名 International Society of Investigative Dermatology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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

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