

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390218

研究課題名（和文） Atg5依存性オートファジーによる表皮角化細胞の自然免疫機構の解明

研究課題名（英文） Role of Atg5-dependent autophagy in innate immunity of epidermal keratinocytes

研究代表者

佐山 浩二 (Sayama Koji)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80187286

研究成果の概要（和文）：

オートファジーは細胞質内にある物質を分解するシステムであるが、細胞質内に侵入した微生物を排除する可能性もある。そこで、本研究では表皮角化細胞のオートファジーが自然免疫に関与するかどうか検討した。培養角化細胞を用いた検討では、分化、飢餓状態でオートファジーが誘導された。さらに自然免疫に関与するかどうか明らかにするために、TLR リガンドで刺激するとオートファジーを誘導できることを明らかにした。Atg5 KO マウスでは LC3 の発現に明かな異常は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy is a mechanism to degrade selective cellular components. Since autophagy is a mechanism degrading the intracellular components during starvation, autophagy may play an essential role in clearance of intracellular pathogens. The purpose of this study is to clarify the role of keratinocyte autophagy in innate immunity. Differentiation and starvation induced autophagy in cultured keratinocytes. Stimulation of Toll-like receptor ligands also induced autophagy, indicating that autophagy play an important role in epidermal innate immunity. The expression of LC3 was not altered in Atg5 KO mouse epidermis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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

- 研究開始当初の背景
- (1) オートファジーについて

オートファジーはプロテアソーム系、ファゴサイトーシス系とも全く異なる経路で、細

胞質内にある物質を分解するシステムである。オートファジーが誘導されると、隔離膜と呼ばれる脂質二重膜が細胞質内で形成され、細胞質を取り囲みながら伸長し、膜先端が融合してオートファゴゾームが形成される。その後リソゾームと融合して、膜内に含んでいた細胞質由来の物質を分解する。ファゴサイトーシスでは細胞内に外から取り込まれた異物が分解されるのに対して、オートファジーでは細胞質内にある物質を分解する点で異なる。

オートファゴゾーム形成には多くの autophagy related gene (Atg) が関与している。まず、刺激を受けると隔離膜と呼ばれる単膜が発生し、細胞質成分を取り込みながら伸長し、二重膜の小胞 (オートファゴゾーム) を形成する。その形成過程で、ユビキチン様タンパク Atg5/Atg12/Atg16 の複合体が隔離膜の外膜に特異的に結合することで外膜の伸長を助けている。また、Atg8 のホモログである LC3 は前駆体である LC3-I がオートファジー刺激により、LC3-II となり、オートファゴゾームに局在するため、オートファジーのマーカーとなる。

近年、オートファジーが癌、老化、神経変性疾患など多くの生命現象に関与していることが報告されており、表皮においてもオートファジーが恒常性維持に働いている可能が極めて高い。その中でも、我々は、表皮の自然免疫機構に着目した。

## (2) オートファジーと自然免疫

オートファジーの役割は本来自己分解であるが、外部から細胞質内に侵入した微生物などに対してもオートファジーの機構が作動することが明らかになっている。細胞質内に侵入した溶連菌、赤痢菌など病原体はオートファジーによって分解される (Science 306, 1037-1040, 2004)。

マクロファージでは TLR-4 はグラム陰性菌の LPS を認識して、p38 を介してオートファジーを誘導する (Nature 450: 1253-1257, 2007)。TLR7 は 1 本鎖 RNA を認識してオートファジーを誘導する。また、TLR2 は真菌の Zymozan を認識して LC3 の集積を誘導するが、オートファゴゾームは形成されない (Immunity 27: 135-144, 2007)。

一方、細胞内のウイルス感染に対して自然免疫は、エンドゾームに存在する TLRs と細胞質内にある RIG-I-like helicase (RLH) がウイルス由来核酸を認識しているが、その RLH による type-I IFN 産生は、Atg5/Atg12 により抑制される。すなわち、オートファジーがかならずしも自然免疫を促進するわけではなく、細胞、条件により異なった作用を持つと考えられる。

## (3) 表皮角化細胞とオートファジー

上述のごとく自然免疫におけるオートフ

ァジーの役割は解明され始めたばかりであり、角化細胞におけるオートファジー機構に関してはほとんど解明されていない。わずかに角化細胞の老化にオートファジーが関係していること (Am J Pathol 174: 423-435, 2009)、および口腔粘膜上皮に溶連菌が侵入すること (Science 306: 1037-1040, 2004) が報告されているのみであり、表皮角化細胞に関しては全く新しい分野である。

我々はこれまでに、表皮角化細胞が細菌、ウイルスを認識し、さまざまなサイトカインおよび抗菌活性を有する抗菌ペプチド hBD1-3, LL-37 を産生することを明らかにし、また自然免疫の mediator である Ubc13, TAK1 が表皮構造にも影響を与えていることを明らかにしており、独自の表皮自然免疫の領域を展開してきた。近年、上記のごとく自然免疫におけるオートファジーが着目されるようになり、本研究を着想するに至った。表皮角化細胞においても溶血連鎖球菌、黄色ブドウ球菌が細胞内に侵入することをすでに我々は確認しており、オートファジーによる病原体認識、初期免疫反応の惹起、除菌が病態形成に深く関わっている可能性が高い。

## 2. 研究の目的

オートファジーはプロテアソーム系、ファゴサイトーシス系とも全く異なる経路で、細胞質内にある物質を分解するシステムである。近年解析が始まったばかりの生命現象で、最近では自然免疫にも関わっているとして注目されている。不明な点も多く、表皮角化細胞のオートファジーはほとんど研究されていない。さらに表皮角化細胞の自然免疫にオートファジーが関連するかどうかの研究は皆無であり、本研究では、表皮角化細胞のオートファジーが表皮自然免疫に必須であるかどうか検討するものである。培養角化細胞を用いた解析、およびオートファジーに必須である Atg5 を角化細胞特異的に欠損させたマウスを作成し角化細胞におけるオートファジーの機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

概要：

角化細胞特異的な Atg5 ノックアウト (K5-Cre/Atg5<sup>fllox/fllox</sup>) マウスを作成し、マウスの表現型の観察を行う。平行して、ヒト、マウスの培養角化細胞を用いて、病原体がオートファジーを誘導するかどうか確認する。さらに、TLR リガンド、および分化刺激が病原体誘導のオートファジーに与える影響を検討する。

### (1) Atg5 KO マウスの作成

Atg5 遺伝子を loxP 配列ではさみこんだ Atg5<sup>fllox/fllox</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/*Atg5*<sup>fllox/+</sup>マウスを得る。このマウスを再度 *Atg5*<sup>fllox/fllox</sup> マウスと交配することにより K5-Cre/*Atg5*<sup>fllox/fllox</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 *Atg5* 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 *Atg5* が発現しなくなり、表皮角化細胞特異的 *Atg5* 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。最終的な geno-typing は Southern blot 法、Western blot 法にて確認する。

#### (2) ノックアウトマウスの解析

オートファジーは細胞の基本的な機能であることから、表皮構造そのものに影響を及ぼす可能性もある。そこで、まずノックアウトマウスに無刺激の状態では異常がないかどうか観察する。

皮膚びらん、潰瘍、皮膚肥厚などの外観上の異常がないかどうか確認する。新生児マウスにおいて、trans epidermal water loss (TEWL) を測定し、表皮バリアー機能を評価する。

組織学的にはパラフィン切片を用いた HE 染色で皮膚の分化異常を確認後、分化マーカーである K5, K14, K1, K10, Involucrin, Loricrin の発現を免疫組織学的に確認する。さらに、増殖に関しては、Ki67 染色にて確認し、アポトーシスは TUNEL 法にて検討する。

#### (3) 培養角化細胞における病原体のオートファジー

6 cm culture dish あるいはスライドチャンバー上に角化細胞を confluent まで培養し、刺激する。

オートファジーの確認には、①免疫染色、および②Western blot 法を用いる。①スライドチャンバー上の細胞を固定後、細胞内の細菌の局在をそれぞれに対する抗体で、またオートファゴソームは LC3 に対する抗体で二重染色する。その後、蛍光顕微鏡あるいは共焦点顕微鏡で観察する。さらに、LC3 に GFP を融合させると、オートファゴソーム形成時に GFP のスポットが形成され、容易にオートファゴソームの形成が確認できるので、角化細胞に LC-GFP をトランスフェクトし、オートファゴソーム形成時の GFP のスポットを確認する。

② 6 cm culture dish 上の細胞のタンパクを回収し、Western blot により、LC-II が誘導されるかどうか確認する。角化細胞が LC-II を発現し、分化により発現が上昇することはすでに確認済みである。

#### (4) オートファジーを促進する因子の検討

オートファジーはさまざまな TLR リガンドにより促進されるとされている。そこで、角化細胞においてもこれらリガンドによりオートファジーが促進されるかどうか検討する。

TLR3, 4, 9 リガンドとしては、それぞれ、Poly (I:C), pam3csk4/peptideglycan (PGN), CpG DNA を用いる。リガンドで刺激後オートファジーが、促進されるかどうか確認する。

また、分化刺激自体でもオートファジーがある程度誘導されることから、分化刺激後にも同様に、オートファジーがさらに、促進されるかどうか上記と同様に確認する。分化誘導には活性型 Vitamin D3 を培養液に添加、あるいは poly-HEMA coated dish を用いた suspension culture を行う。

#### 4. 研究成果

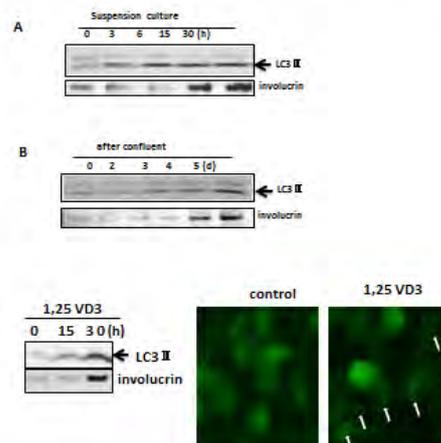
##### 1. 培養角化細胞におけるオートファジー誘導

培養ヒト角化細胞を刺激後、LC3 の免疫染色を行い蛍光顕微鏡下にオートファゴソームの形成を確認した。あるいは、Western blot にてオートファジーの誘導を確認した。

##### (1) 分化による誘導。

Suspension culture, confluent の状態、あるいは VD3 で分化を誘導した。その結果分化誘導により角化細胞ではオートファジーが誘導されることが分かった (図)。

##### Differentiation induces autophagy in keratinocytes.

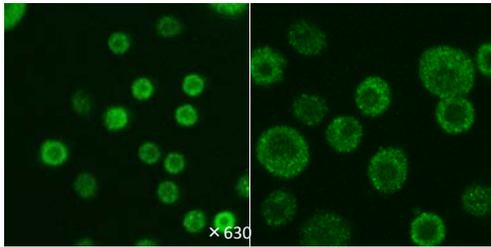


##### (2) 飢餓状態における誘導

培養液を通常の培地から PBS に変更することにより細胞を飢餓状態にし、オートファジーが誘導されるかどうか検討した。その結果、細胞内にオートファゴソームの形成が 30 分後より観察でき、飢餓状態によりオー

オートファジーが誘導されることが明らかとなった (図)。

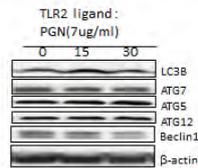
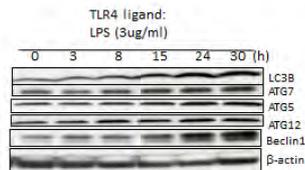
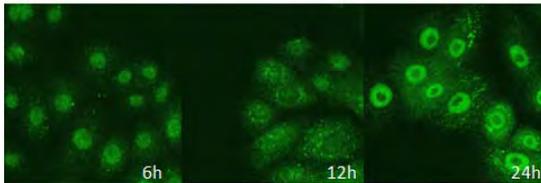
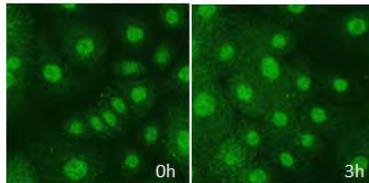
PBS添加1h後  
Ab:NB600



### (3) 病原体による誘導

病原体由来成分の CpGDNA, LPS, PGN で角化細胞を刺激後、オートファジーが誘導されるかどうか検討した。その結果、いずれの刺激でもオートファジーが誘導され、病原体刺激により角化細胞はオートファジーを誘導することが明らかとなった。

Keratinocyte  
CpG DNA control (ODN  
M362 ctrl)  
Lipofectamine2000  
Ab:NB600



### 2 Atg5 KO マウスの作成

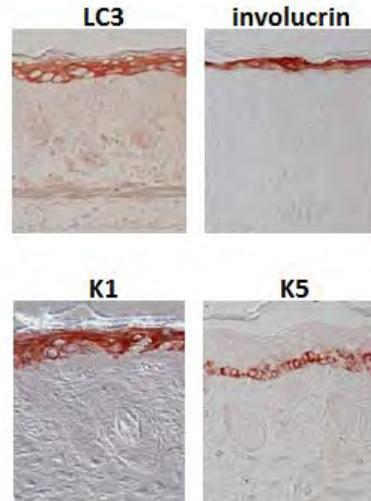
*Atg5*<sup>flox/flox</sup> マウスと K5-Cre マウスを交配することにより、K5-Cre/*Atg5*<sup>flox/+</sup> マウスを得た。このマウスを再度 *Atg5*<sup>flox/flox</sup> マウスと交配し K5-Cre/*Atg5*<sup>flox/flox</sup> マウスを作成した。Geno-type は PCR で確認した。

出生時には臨床的には大きな変化はなく、発毛も正常であった。出生後も明かな皮膚異

常はなく発育した。

免疫組織学的にオートファジーを検討した。正常マウスとほぼ同等に LC3 の発現が認められた。また、Involucrin, K1, K5 の分化マーカーの発現も正常マウスとほぼ同等に認められ、分化には明かな異常はないと考えられた (図)。

### Immunostaining of LC3 in mice skin



### まとめ

以上の結果から角化細胞においては、分化、飢餓状態でオートファジーが誘導され、さらに感染状態ではグラム陰性、グラム陽性菌によってオートファジーが誘導され、表皮の病原体防御に関わっていると考えられた。

### 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 12 件)

1. Tohyama M, Yang L, Hanakawa Y, Dai X, Shirakata Y, and Sayama K.  
INF-alpha Enhances IL-22 Receptor Expression in Keratinocytes: A Possible Role in the Development of Psoriasis.  
J Invest Dermatol; 132: 1933-1935, 2012.  
(査読有) doi:  
10.1007/s00109-009-0457-0.
2. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, and Sayama K.  
Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced

lymphatic endothelial cell migration and tube formation.

Biochem Biophys Res Commun; 412: 441-445, 2011. (査読有) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.111.

3. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes  
J Allergy Clin Immunol; 127: 806-814, 2011. (査読有) doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.006.
4. Sayama K, Kajiyama K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K. Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice  
PloS One; 5: e11275, 2010. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0011275.
5. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K. PPAR $\gamma$  mediates innate immunity by regulating the 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes  
J Dermatol Sci; 60: 179-186, 2010. (査読有) doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.09.008.
6. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, and Hashimoto K. E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity  
J Biol Chem; 285: 30042-30049, 2010. (査読有) doi: 10.1074/jbc.M110.106484.

[学会発表] (計 12 件)

1. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Murakami M, Tohyama M, and Sayama K. Autophagy is induced by differentiation in epidermal keratinocytes.  
42<sup>nd</sup> Annual ESDR Meeting, 9/19-22, Venice, Italy, 2012.
2. Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tohyama M, and Sayama K. Autophagy is an innate immune system of epidermal keratinocytes.  
SID Annual Meeting & 75<sup>th</sup> Anniversary

Celebration, 5/9-12, North Carolina, 2012.USA

3. Dai X, Shirakata T, Tohyama M, Hanakawa Y, Okazaki H, and Sayama K. Intracellular dsRNA activates inflammasome in the keratinocytes resulting in the release of IL-18.  
SID Annual Meeting & 75<sup>th</sup> Anniversary Celebration, 5/9-12, North Carolina, 2012.USA
4. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, and Hashimoto K. Mite allergen activates inflammasome in epidermal keratinocytes resulting in the production of IL-1 $\beta$  and IL-18  
22<sup>nd</sup> World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 5/24-29, 2011.
5. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Otani T, Hashimoto K, and Sayama K. Nuclear translocation of Bcl3 and p50 by IL-22 produces HB-EGF, IL-8, S100A7, and human  $\beta$ -defensin 2 in keratinocytes of psoriasis.  
The 41st Annual ESDR Meeting (Barcelona, Spain, 9/7-10, 2011)
6. Sayama K, Dai X, Shirakata Y, Tohyama M, Miyawaki S, Hirakawa S, and Hashimoto K. Mite allergen is a danger signal for the skin  
40<sup>th</sup> Annual ESDR Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, Finland 9/9-11, 2010.

## 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・教授  
研究者番号：80187286

### (3) 連携研究者

白方 裕司 (Shirakata Yuji)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：50226320

### 連携研究者

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

### 連携研究者

徳丸 晶 (Tokumaru Sho)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：50398046