

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860326

研究課題名(和文) S100A8およびS100A9のアトピー性皮膚炎における役割の解明

研究課題名(英文) The role of S100A8 and S100A9 in the pathogenesis of atopic dermatitis

研究代表者

中島 沙恵子(Nakajima, Saeko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70574408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：表皮角化細胞特異的S100A8およびS100A9過剰発現誘導マウスを作製した。このマウスより採取した表皮角化細胞にテトラサイクリンを添加することにより、試験管内でS100蛋白の過剰発現を誘導することに成功した。皮膚樹状細胞は、S100A8およびS100A9の機能受容体を発現し、リコンビナント蛋白の添加により炎症性サイトカインの産生が誘導された。引き続き生体での過剰発現誘導方法の検討を行い、マウスアトピー性皮膚炎モデルを用いて更なるメカニズムの検討を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to generate keratinocyte specific S100A8 and S100A9 transgenic mice to understand the roles of these S100 proteins in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD).

We have generated epidermal keratinocyte specific S100A8 and S100A9 transgenic mice. We are able to induce over expression of S100 proteins with primary cultured-keratinocytes of these mice by adding tetracycline in vitro. Skin dendritic cells and murine bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) are highly expressed functional receptors of these S100 proteins. Recombinant S100 proteins are able to induce inflammatory cytokine productions from BMDCs in vitro.

We will apply murine AD model to keratinocyte specific S100A8 and S100A9 transgenic mice and try to understand the roles of S100A8 and S100A9 in the development of AD.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 S100A8 S100A9

1. 研究開始当初の背景 乾癬やアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis; AD) といった皮膚炎症性疾患の病態を理解 する上で、従来解析されてきた免疫細胞に

加えて、病態形成の場である表皮角化細胞の関与に注目することの重要性が指摘されている。AD では、フィラグリンなどのバリア異常に関する知見は増加してきているが、表皮角化細胞の分化・増殖制御と病態形成の関係性は未だ不明である。申請者は、種々の炎症性疾患で細胞増殖や炎症の制御に関わるとされる S100A8 および S100A9 蛋白に注目し、AD の病態形成における表皮角化細胞の役割を検証していくこととした。

2. 研究の目的

AD 病変部では、搔爬行動などの刺激により表皮角化細胞での S100A8、S100A9 および S100A8/A9 複合体の発現が亢進しており、分泌されて autocrine もしくは paracrine 的に作用し、免疫細胞の皮膚局所への集簇、炎症の増悪・慢性化、角化細胞の異常増殖などに関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するためにテトラサイクリン誘導性 S100A8・S100A9 トランスジェニック (Tg) マウスを作製する。ひいては、「表皮角化細胞の皮膚免疫への関与」という観点からの AD 病態の解明、およびそれに基づく新規治療法の開発を目指すことを研究目的とする。

3. 研究の方法

平成 26 年度に、「S100A8、S100A9 の AD における役割」について、それぞれの遺伝子をターゲットとしたテトラサイクリン誘導性 Tg マウスを作製する。これに蛋白抗原反復貼付といったマウス AD モデルを適用し、S100A8 および S100A9 それぞれの AD 病態における役割を明らかにする。

平成 27 年度は、S100A8 および S100A9 トランスジェニックマウスを交配して得られた S100A8/A9 ダブル Tg マウスを用いた解析を行い、S100A8/A9 複合体の AD 病態における役割の解明を行う。また、平成 26 年度に明

らかにしたメカニズムを実際の AD 患者サンプルを用いて検討し、ヒトでの作用を検討する。

4. 研究成果

平成 26 年度 我々は、資生堂研究所・日比野利彦博士との共同研究により、テトラサイクリン誘導性 S100A8 および S100A9 トランスジェニック (Tg) マウスをそれぞれ複数系統作製した。これら Tg マウスをさらに表皮角化細胞特異的 rtTA マウス (K5-rtTA マウス) と交配することにより、表皮角化細胞特異的 S100A8 および S100A9Tg マウスを作製した。

さらに、表皮角化細胞から分泌された S100A8 および S100A9 が皮膚免疫担当細胞に及ぼす影響を検討するために、マウス骨髄から試験管内で誘導した樹状細胞 (bone marrow derived dendritic cells: BMDC) がそれぞれの受容体を発現しているか、また S100 蛋白添加により樹状細胞活性化因子が誘導されるかについて mRNA レベルでの検討を行った。定量 PCR 法により、マウス BMDC は S100A8 および S100A9 の機能受容体を発現していることが確認できた。さらに、リコンビナント S100A8 および S100A9 の BMDC への添加により、活性化を示唆するサイトカイン産生が mRNA レベルで増加した。

平成 27 年度

平成 26 年度に作製した表皮角化細胞特異的 S100A8 および S100A9 Tg マウスより採取した表皮角化細胞を試験管内で培養し、テトラサイクリンを添加することにより S100 蛋白の誘導が可能であるかどうかを検討した。複数樹立していたマウス系統の

うち、1つの系統について試験管内で S100 蛋白の過剰誘導が可能であることが確認できた。現在、生体にテトラサイクリンを投与し S100 蛋白の過剰発現を誘導するための投与方法を検討中である。生体での過剰発現誘導方法が確立した暁には、マウス AD モデルを適用し、AD における S100A8 および S100A9 の果たす役割を検討する予定である。

S100A8 および S100A9 の AD の病態において果たす役割を検討するにあたり、過剰発現マウスのみならず、欠損マウスを用いた検討も必須であるとの考えに至り、共同研究者より S100A9 欠損マウスを入手した。現在はマウス背景を C57BL/6 に戻すべくバッククロスを行っているところである。バッククロスの最中に得られたマウスを用いて、マウス AD モデルを用いて予備的に検討を行っていく予定である。

マウスを用いた検討と平行して、S100A8 および S100A9 がどの皮膚免疫担当細胞に作用し AD の病態に寄与しうるのかについての検討を行った。皮膚樹状細胞サブセット、BMDC、T 細胞における S100A8 および S100A9 の機能受容体の発現は、樹状細胞群で相対的に高く、これらの細胞群が S100A8 および S100A9 を介した免疫応答に関与している可能性を示唆した。現在、この免疫応答の誘導が、どの樹状細胞サブセットを介しておこるのか、またどういったシグナル経路を介して誘導されるのかについての検討を行っているところである。

結果のまとめと今後の展望 表皮角化細胞特異的 S100A8 および S100A9 過剰発現誘導マウスを作製した。このマウスより採取した表皮角化細胞にテトラサイクリンを添加することにより、試験管内で S100 蛋白の過剰発現を誘導することに成功した。皮膚樹状細胞は、S100A8 および

S100A9 の機能受容体を発現し、リコンビナント蛋白の添加により炎症性サイトカインの産生が誘導された。

当初の予定より、Tg マウス作製に時間がかかったが、テトラサイクリンにより試験管内で過剰発現を誘導しうるマウス系統を得ることが出来た。引き続き生体での過剰発現誘導方法の検討を行い、マウス AD モデルを用いて更なるメカニズムの検討を行っていく予定である。同時に欠損マウスを用いた検討も行い、より詳細に S100A8 および S100A9 の AD 病態における役割の検討を行っていく。

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 10 件)

1: Sasaki H, Otsuka A, Iga N, Rerknimitr P, Nakajima S, Kaku Y, Sakurai T, Dainichi T, Kabashima K. A case of rosacea fulminans staining negative for LL-37. *Eur J Dermatol.* 2015 Dec 5.

2: Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, Nakamizo S, Murata T, Ueharaguchi-Tanada Y, Ono S, Amano W, Nakajima S, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Kitoh A, Dainichi T, Ogawa N, Kobayashi Y, Yokomizo T, Arita M, Nakamura M, Miyachi Y, Kabashima K. Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. *J Exp Med.* 2015 Oct 19;212(11):1921-30.

3: Noda S, Surez-Farias M, Ungar B, Kim SJ, de Guzman Strong C, Xu H, Peng X, Estrada YD, Nakajima S, Honda T, Shin JU, Lee H, Krueger JG, Lee KH, Kabashima K, Guttman-Yassky E. The Asian atopic dermatitis phenotype combines features of atopic dermatitis and psoriasis with increased TH17 polarization. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Nov;136(5):1254-64.

4: Amano W, Nakajima S, Kunugi H, Numata Y, Kitoh A, Egawa G, Dainichi T, Honda T, Otsuka A, Kimoto Y, Yamamoto Y, Tanimoto A, Matsushita M, Miyachi Y, Kabashima K. The Janus kinase inhibitor JTE-052

improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling. J Allergy Clin Immunol. 2015 Sep;136(3):667-677.e7.

5: Nakamizo S, Egawa G, Tomura M, Sakai S, Tsuchiya S, Kitoh A, Honda T, Otsuka A, Nakajima S, Dainichi T, Tanizaki H, Mitsuyama M, Sugimoto Y, Kawai K, Yoshikai Y, Miyachi Y, Kabashima K. Dermal Vg4(+) gdT cells possess a migratory potency to the draining lymph nodes and modulate CD8(+) T-cell activity through TNF-a production. J Invest Dermatol. 2015 Apr;135(4):1007-15.

6: Nakamizo S, Egawa G, Honda T, Nakajima S, Belkaid Y, Kabashima K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. Semin Immunopathol. 2015 Jan;37(1):73-80.

7: Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. Nat Immunol. 2014 Nov;15(11):1064-9.

8: Shimizuhiro C, Otsuka A, Honda T, Kitoh A, Egawa G, Nakajima S, Nakashima C, Watarai H, Miyachi Y, Kabashima K. Natural killer T cells are essential for the development of contact hypersensitivity in BALB/c mice. J Invest Dermatol. 2014 Nov;134(11):2709-18.

9: Nakashima C, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Nakamizo S, Arita M, Kubo M, Miyachi Y, Kabashima K. Basophils regulate the recruitment of eosinophils in a murine model of irritant contact dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2014 Jul;134(1):100-7.

10: Shibuya R, Tanizaki H, Nakajima S, Koyanagi I, Kataoka TR, Miyachi Y, Kabashima K. DIHS/DRESS with remarkable eosinophilic pneumonia caused by zonisamide. Acta Derm Venereol. 2015 Feb;95(2):229-30.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称: 発明
者: 権利
者: 種類:
番号: 出願
年月日: 国
内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者: 種
類: 番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他] ホームページ
等

6. 研究組織
(1)研究代表者 中島 沙恵子
(Saeko Nakajima)
京都大学大学院医学研究科・皮膚科学・研究
員
(Department of Dermatology, Kyoto
University Graduate School of Medicine)

研究者番号: 26860326

(2)研究分担者
()

研究者番号: (3)連携

研究者
()

研究者番号: