

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19686

研究課題名(和文) 尋常性乾癬における角層バリア機能異常の解明とその制御

研究課題名(英文) Abnormality of stratum corneum barrier function and control mechanism in psoriasis

研究代表者

藤澤 智美 (Fujisawa, Tomomi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20585583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：尋常性乾癬の病態に大きく関わるTNF- α とadiponectinについて角層バリア機能に対する作用を検討した。培養表皮細胞に対するTNF- α 刺激では、表皮に特徴的な極長鎖脂肪酸のセラミド合成が減少し、また角化マーカーも減少することにより角層バリア機能が障害されると考えられた。また、adiponectin刺激では、ELOVL7が増加しており、これはC18～C20に伸長する酵素であることから、それより下流の長鎖脂肪酸も増加させ全体として、総セラミド量が増える可能性があり角層バリア機能に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of TNF- α and adiponectin on stratum corneum barrier function and control mechanism. TNF- α reduced total amount of ceramide and expression of ceramide synthase (CerS) 3, 4, and 6 in cultured keratinocytes. In addition, TNF- α also reduced expression of filaggrin and keratin 1. On the other hand, adiponectin increased total amount of ceramide, expression of elongase of long-chain fatty acid (ELOVL) 7 and CerS 6 and reduced expression of CerS 1 and 2. Expression of filaggrin was reduced by TNF- α , and keratin 1 was reduced by TNF- α and adiponectin. Thus, TNF- α and adiponectin may affect stratum corneum barrier function via ceramide abnormality of ceramide synthesis in keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 adiponectin TNF

1. 研究開始当初の背景

申請者らは乾癬患者、AD 患者および健常者の角層セラミドについて matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)を用いて化学構造を解析し、乾癬患者の角層セラミドでは特に脂肪酸側鎖が短鎖化していることを見いだした (Tawada C *et al.* J Invest Dermatol, 2014)。

さらに長鎖脂肪酸のセラミド合成に重要な二つの酵素、elongase of long-chain fatty acid (ELOVL)と ceramide synthase (CerS) に着目し、その発現制御に関してこれらの疾患の病態形成にかかわるさまざまなサイトカインの影響を培養ヒト正常表皮細胞を用いて *in vitro* で検討したところ、IFN- γ のみが2つの酵素の mRNA 発現量を低下させた。

3次元培養皮膚による検討で ELOVL1 と CerS3 が特に重要であること、IFN- γ 処理により長鎖脂肪酸セラミドが実際に減少することも確認した。

2. 研究の目的

IFN- γ 以外に、乾癬の病態に関与する因子として adipokine があるが、その中で adiponectin は乾癬患者血清で有意に低下し、TNF- α 阻害薬投与後に正常化することが知られている。そこで、adiponectin および TNF- α の角層バリア機能に対する作用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乾癬および健常人血清中 adipokine 濃度を ELISA 法を用いて測定した。

(2) adiponectin および TNF- α を HaCaT (ヒト表皮角化細胞) に添加し、細胞から Bligh-Dyer 法 (クロロホルム:メタノール:水=1:1:1) を用いて脂質抽出を行ない、ESI-MS (Electrospray ionization-Mass spectrometry) を用いてセラミド量を比較した。

(3) 上記処理した細胞より 48 時間後に RNA を抽出し、RT-qPCR によりセラミド合成に関わる酵素アイソザイムの分布、mRNA 発現量、角化マーカーを定量した。

(4) これらのデータは Student's *t*-test を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 健常人および乾癬患者の血清中 adiponectin 濃度の比較

乾癬患者血清では健常人と比較して有意に

adiponectin 濃度が高い (図 1)。

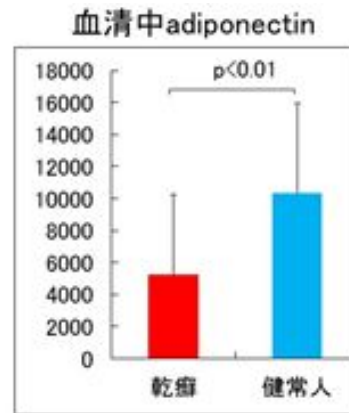
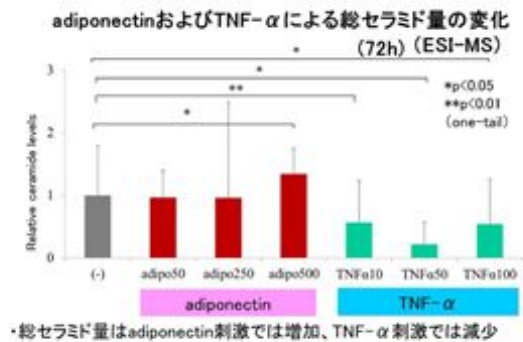


図 1 : 健常人および乾癬患者の血清中 adiponectin 濃度

(2) ヒト表皮角化細胞における adiponectin および TNF- α のセラミド合成に対する影響

総セラミド量は adiponectin 刺激では増加、TNF- α 刺激では減少した (図 2)。

図 2



(3) ヒト表皮角化細胞における adiponectin および TNF- α のセラミド合成酵素などに対する影響 (RT-qPCR)

ELOVL には 7 種類、CerS には 6 種類あり脂肪酸の長さ及び飽和の種類によって基質特異性がある。HaCaT 細胞では ELOVL1, ELOVL5、CerS2, CerS6 が多いことを既に報告している。今回の検討で adiponectin 刺激により ELOVL7 が増加し (図 3) と CerS1, CerS2 が減少した (図 4)。

図 3

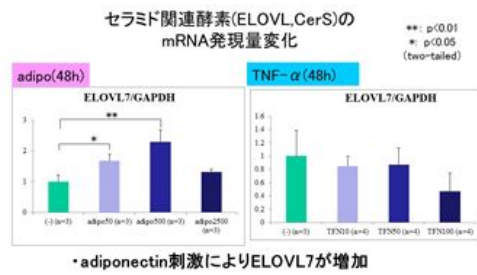
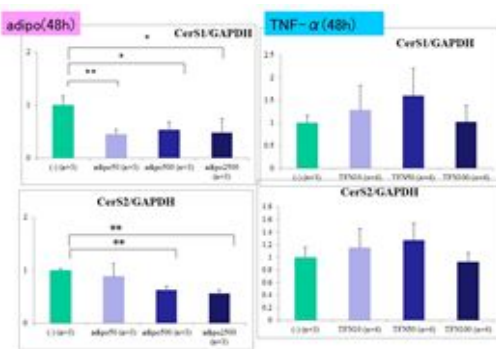


図 4



TNF- 刺激では CerS3, CerS4 が減少した(図 5)。 CerS6 では、 adiponectin 刺激で増加、 TNF- 刺激で減少した(図 6)。

図 5

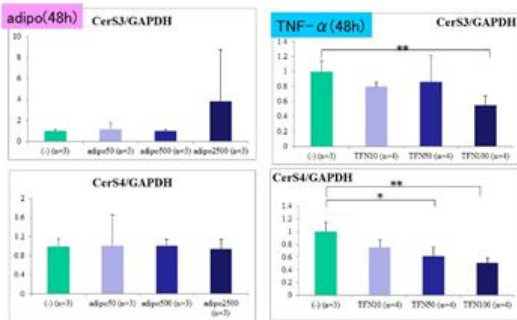
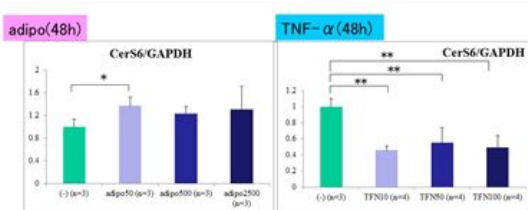


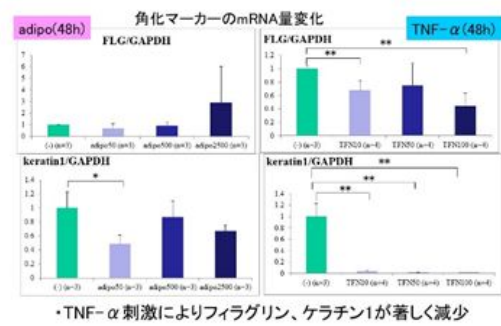
図 6



(4) 角化マーカーの変化

filaggrin は TNF- 刺激で減少し、ケラチン 1 は adiponectin、 TNF- 刺激とも減少した(図 7)。

図 7



以上の結果から TNF- 刺激では、極長鎖のセラミド合成および角化マーカーが減少することにより表皮バリアが障害される可能性が考えられた。一方、 adiponectin についてもセラミド代謝および角化マーカーの変化を惹起することが明らかになった。

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 4 件)

Mizutani Y, Okano T, Takahashi T, Ohnishi H, Ohara O, Sano A, Seishima M. Pyoderma gangrenosum, acne and suppurative hidradenitis syndrome treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Acta Derm Venereol*, 2017, 97 : 275-276. doi: 10.2340/00015555-2507. (査読有)

Adachi Y, Moriya C, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Nakayama A, Yonetamari J, Seishima M. Recurrent superficial cellulitis-like erythema associated with *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *J Dermatol*, 2016, 43:844-846.

doi: 10.1111/1346-8138.13282. (査読有)

Fujisawa T, Suzuki S, Mizutani Y, Doi T, Yoshida S, Ogura S, Seishima M. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis for generalized pustular psoriasis: therapeutic outcomes in three refractory patients. *Ther Apher Dial*, 2015, 19:336-341. doi: 10.1111/1744-9987.12342. (査読有)

Tokuzumi M, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Saigo C, Miyazaki T, Hamaguchi Y, Seishima M. Anti-SRP Antibody-positive myopathy with universal alopecia and multiple vitiligo. *Acta Derm Venereol*, 2015, 15: 497-498. doi: 10.2340/00015555-1985. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤澤 智美 (TOMOMI FUJISAWA)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講
師

研究者番号：20585583