

令和元年6月17日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10131

研究課題名(和文) 乾癬におけるカベオリン発現異常と末梢血単球の機能解析

研究課題名(英文) Aberrant expression of Caveolin-1 in psoriatic monocytes

研究代表者

山口 由衣 (Yamaguchi, Yukie)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：60585264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、乾癬患者の表皮細胞においてCav-1発現が有意に低下しており、それがJAK-STAT系シグナルの増強、更なる表皮増殖、およびケモカインの産生を有意に増強させることを見出した。本研究では、乾癬患者の末梢血免疫細胞におけるCav-1発現異常と病態への関与を検討した。乾癬患者の末梢血単球において、Cav-1発現が有意に低下しており、その結果サイトカイン産生を増強し、皮膚への遊走能が促進した。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスへのCSDペプチドによるCav-1発現制御は、マクロファージの皮膚浸潤に関与し皮膚表現型を改善した。Cav-1発現制御は乾癬治療の標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単球・マクロファージは、多くのサイトカインを産生するほか、動脈硬化や肥満においても中心的役割を果たす。メタボリック症候群と乾癬は合併しやすいが、単球・マクロファージは両者において重要な働きをする細胞として興味深い。今回、表皮細胞だけではなく、末梢血単球においてもCav-1発現異常が存在し、遊走能の亢進とサイトカイン産生を増強することで乾癬病態に寄与することを示した。Cav-1は脂質代謝や糖尿病病態にも強く関連していることから、全身性炎症としての乾癬にCav-1が大きく関与する可能性がある。本研究結果より、Cav-1発現異常の是正が、新たな治療標的になる可能性が示されたことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported CAV-1 reduction in the epidermis of patients with psoriasis. That lead to enhanced JAK/STAT signaling and cytokine production, suggesting that aberrant CAV-1 expression may contribute to psoriatic inflammation. This study aimed to investigate whether abnormal modulation of CAV-1 on immune cells is involved in the pathogenesis of psoriasis. CAV-1 level was reduced in PBMCs from psoriasis patients and it was prominent in CD14+ monocytes. CAV-1 silencing in monocytes produced elevated levels of interleukin (IL)-1 and IL-6, and those had enhanced chemotaxis activity to MCP-1. In a murine model of psoriasis-like inflammation induced by imiquimod, significant CAV-1 reduction was also observed in PBMCs. Systemic administration of CAV-1 scaffolding domain peptide significantly improved the skin phenotype with less macrophage infiltration. Taken together, aberrant CAV-1 expression in monocytes may be involved in the pathogenesis of psoriasis.

研究分野：乾癬、膠原病

キーワード：カベオリン 乾癬 単球・マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

乾癬は表皮細胞の過増殖を特徴とする慢性の炎症性皮膚疾患であり、樹状細胞(DC)や Th17 細胞を主体とした炎症細胞と表皮細胞の活性化クロストークがその慢性化病態の主眼となる。近年、乾癬患者におけるメタボリックシンドロームの有病率、および心血管イベントの増加は社会的問題となっており、乾癬の病態は、皮膚だけではなく、全身の炎症性疾患として捉えられるようになった。動脈硬化性炎症において重要な働きをする単球は、末梢血の約 5-10% を占め、多くの乾癬関連サイトカインを産生し、また、その多彩な形質から、組織に遊走・接着し、M1 もしくは M2 マクロファージへ分化することで直接的に組織炎症に関与する。乾癬患者の治療前後における末梢血免疫細胞の解析では、活性化単球の割合の変化が顕著であり、乾癬病態において、単球・マクロファージ系細胞が重要な役割を行っていることを示す。

我々はこれまで、乾癬の表皮細胞におけるカベオリン 1 (Cav-1) の発現異常について研究を行ってきた。Cav-1 は、細胞膜にフラスコ状に存在するカベオラを裏打ちする約 22kDa のタンパクであり、脂質代謝に関与するほか、各種シグナル伝達因子に直接的に作用し抑制的に制御する。乾癬患者の表皮細胞では、Cav-1 発現が有意に低下しており、それが JAK-STAT 系シグナルの増強、更なる表皮増殖、および CXCL8,9,10 などのケモカインの産生を有意に増強させることを見出した。表皮細胞の Cav-1 発現低下は、乾癬炎症そのものによって引き起こされ、ここに、乾癬の慢性炎症ループが存在する。Cav-1 の作用部位を含む Scaffolding Domain(CSD) ペプチドを用いて Cav-1 機能を調節することが乾癬の治療の標的になり得ることを報告した (Yamaguchi Y et al. J Invest Dermatol 2015)。さらに、脂肪細胞から産生されるアディポカインのレプチンは、Cav-1 発現の低下した表皮細胞に直接的に作用し MAPK などのシグナル活性を増強することで IL-6 産生を増加させることを発見した。これらの結果は、乾癬の病態において、Cav-1 発現異常が乾癬の慢性炎症において重要な維持機構となること、さらに肥満と乾癬の相互的慢性炎症に直接的に関与することを示している。これらの背景をもとに、本研究では、乾癬患者の末梢血免疫細胞における Cav-1 発現異常と病態への関与に着目した。

2. 研究の目的

乾癬患者における末梢血免疫細胞、とくに単球において Cav-1 発現異常が存在し、乾癬の慢性炎症病態および、併発する動脈硬化性炎症に何らかの影響を及ぼしているのではないかと、いう仮説をたて、末梢血細胞とくに単球における Cav-1 発現解析とその機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

末梢血免疫細胞における Cav-1 発現解析

表皮細胞と同様に、乾癬患者の末梢血免疫細胞においても Cav-1 が重要な働きを担うと仮定し、乾癬患者より採取した末梢血単核球(PBMC)および顆粒球(PMN)における Cav-1 発現を mRNA および蛋白レベルで健常人と比較した。さらに、Cav-1 発現が低い細胞を同定するため、PBMC もしくは PMN をサイトスピン法でカバーグラスに固定させ、蛍光抗体での免疫細胞染色法を用い、T 細胞、B 細胞、単球などにおける Cav-1 発現を共焦点レーザー蛍光顕微鏡による発現定量解析で検討した。その結果、健常人 Cav-1 発現量と有意に異なる細胞を、MACS 法を用いて分離し、再度、RT-PCR や免疫プロット法で Cav-1 発現異常を確認した。

Cav-1 発現低下細胞の機能解析

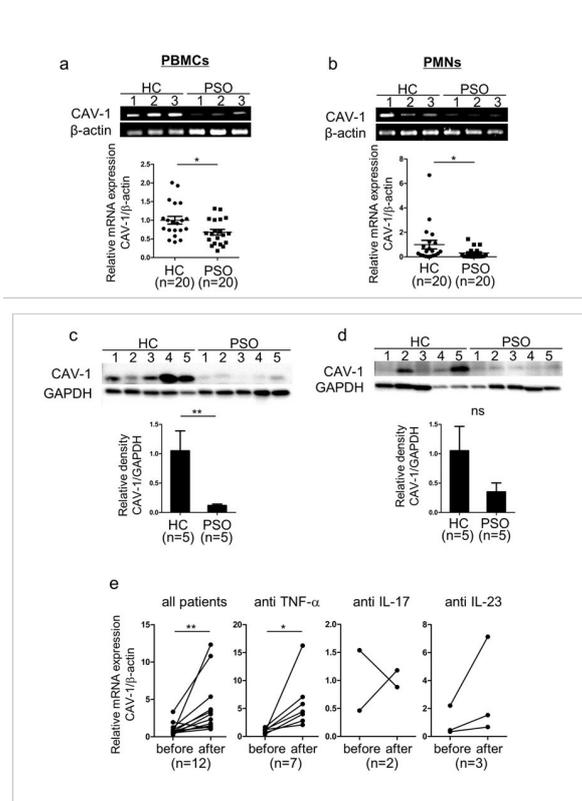
健常人より採取した免疫細胞を使用し、RNA 干渉法を用いて Cav-1 発現を低下させ、その遊走能を Migration assay を用いて検討した。また、刺激に対するサイトカイン産生量の相違を検討した。

乾癬様モデルマウスにおける Cav-1 Scaffolding Domain (CSD) ペプチド全身投与による解析

まず、TLR7 刺激薬であるイミキモド誘発性の乾癬様皮膚炎モデルマウスにおける末梢血免疫細胞において、乾癬患者と同様の Cav-1 発現異常があるか否かを解析した。また、CSD ペプチドを全身性に投与し Cav-1 機能回復を試みることで、Cav-1 調節が治療の標的となるかを確認した。その際、採取した皮膚から cDNA を抽出し、TNF- α 、IL-17 などの乾癬関連サイトカイン発現量を RT-PCR で検討した。また、皮膚に浸潤するマクロファージの染色を行うことで、このモデルにおける単球・マクロファージ系細胞の関与を検討した。

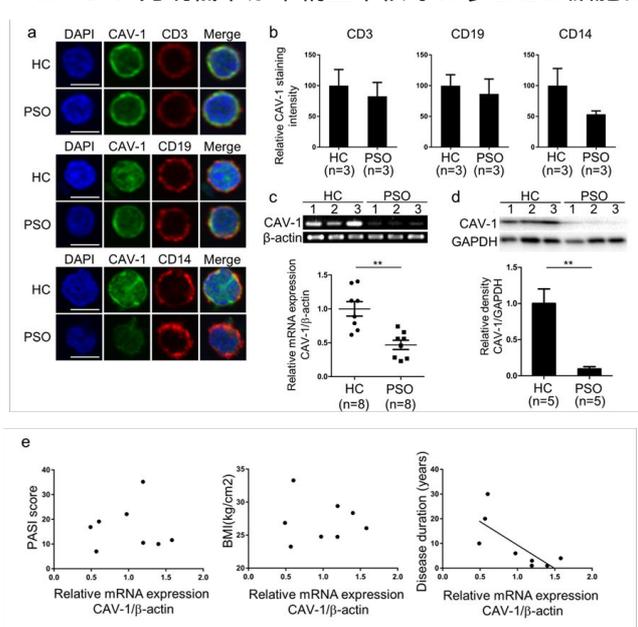
4. 研究成果

乾癬患者末梢血単核球、末梢血顆粒球における Cav-1 発現量は健常対照と比較して低下する



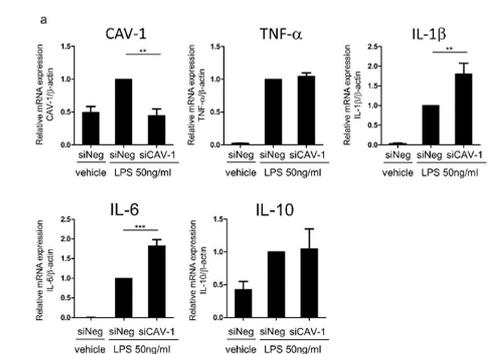
はじめに、乾癬患者のPBMCおよびPMNにおけるCav-1の発現量を評価した。乾癬患者は生物学的製剤の使用歴がなく、現在の免疫抑制剤の使用がないものを選択した。左図に示すように末梢血単核球、末梢血顆粒球のいずれにおいても健常対照と比較して乾癬患者ではCav-1のmRNA発現量は有意に低下していた (a, $P = 0.022$, b, $P = 0.047$)。さらに末梢血単核球におけるCav-1のタンパク発現量は健常対照と比較して乾癬患者で有意に低下していた (c, $P = 0.025$)。末梢血顆粒球においては、Cav-1のタンパク発現にばらつきがあったものの、健常対照と比較して乾癬患者では低い傾向が見られた。しかしその差は有意ではなかった(d, $P = 0.151$)。これらの結果より本研究では末梢血単核球に焦点を当てて更なる検討を行った。生物学的製剤で治療された乾癬患者のうち数名において治療前後の末梢血単核球のCav-1のmRNA発現量を評価した。興味深いことに、生物学的製剤により皮疹が改善すると末梢血単核球におけるCav-1発現量の上昇を確認した (e, $P = 0.002$ in total, $P = 0.016$ vs anti-TNF α)。

乾癬患者の末梢血単核球におけるCav-1発現低下は主にCD14陽性単球において認められる



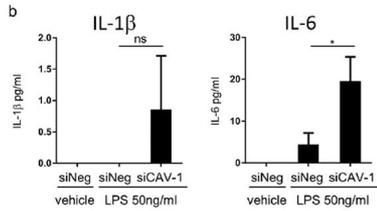
末梢血単核球の二重蛍光免疫染色を行った。乾癬患者および健常対照の末梢血単核球をCD3陽性T細胞、CD19陽性B細胞、CD14陽性単球として染色し、それぞれの細胞におけるCav-1の蛍光輝度をもってCav-1発現量比較した。左図a, bに示すように、Cav-1の蛍光輝度はどの細胞においても健常対照と比較して乾癬患者において低い傾向があった(減量率: T細胞 $17 \pm 10\%$, B細胞 $16 \pm 20\%$, 単球 $43 \pm 14\%$)。また、Cav-1の発現低下が単球において最も顕著であったことから、乾癬患者と健常対照の末梢血よりMACSで分離したCD14陽性単球におけるmRNAおよびタンパク発現を比較したところ、乾癬患者では有意に低かった (c, d, $P = 0.001$, $P = 0.002$)。乾癬患者の単球におけるCav-1発現低下が臨床背景に関連するかを確認する目的

で、単球のCav-1の発現量とPASIスコア、BMI、または罹病期間の間に相関があるかを検討した。eに示すように、PASIスコアやBMIとの相関はみとめなかったが、Cav-1発現量と罹病期間には負の相関を認めた。



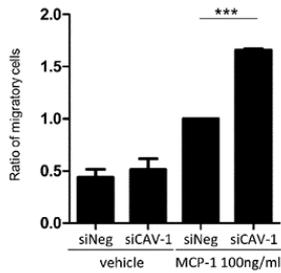
Cav-1抑制単球では炎症性サイトカイン産生が増強する

単球におけるCav-1発現低下がサイトカインの産生に関与するかを検討するため、健常人より分離した単球のCav-1発現をRNA干渉法で抑制し、LPS刺激によるサイトカイン産生量を定量的PCRにて検討した。左図に示すようにCav-1抑制単球におけるIL-1 β とIL-6の発現量は対照と比較して有意に上昇を認めた (a, $P = 0.003$, $P = 0.0002$)。しかしTNF- α とIL-10の発現量に差はなく、IL-17A



については発現を確認できなかった。さらに培養上清における IL-1 β と IL-6 の量を ELISA 法で評価した。Cav-1 抑制単球における IL-6 の量は対照と比較して有意に上昇を認めた (b, $P = 0.045$)、IL-1 β の量は上昇傾向ではあったが有意な差には至らなかった (b, $P = 0.418$)。

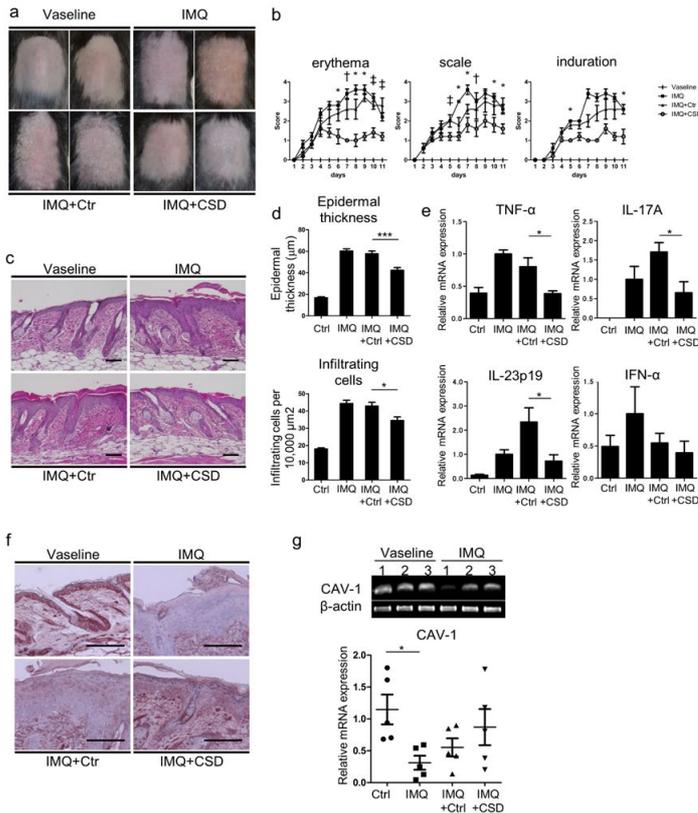
Cav-1 抑制単球では MCP-1 への走化性が亢進する

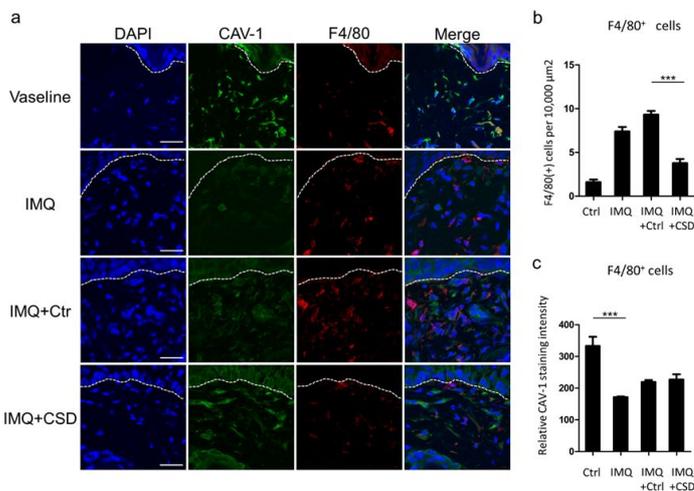


次に、単球における Cav-1 発現低下が単球の皮膚浸潤へ関与している可能性を想定し、Cav-1 発現を RNA 干渉法で抑制した単球における MCP-1 への走化性を検討した。MCP-1 添加培地へ遊走した単球の割合は CAV-1 抑制単球においてコントロール単球と比較して有意に高かった ($P = 0.0005$)。これらの結果を踏まえ、単球における Cav-1 発現低下は単球の遊走能、サイトカイン産生能を介して乾癬病態に関与していると考えた。

CSD ペプチドの全身投与はイミキモド (IMQ) 誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスの皮膚症状を改善させる

乾癬患者においてケラチノサイトだけではなく単球でも Cav-1 低下が見られたことから、IMQ 誘発乾癬様皮膚炎マウスにおいても末梢血免疫細胞において Cav-1 発現異常が認められるのではないかと仮定した。また、CSD ペプチドを全身投与することで免疫細胞の Cav-1 発現を調整し皮膚炎の抑制につながるのではないかと仮説を立てた。CSD ペプチドの腹腔内投与は、コントロールのペプチドと比較して有意に皮膚症状を改善させた (下図 a, b)。また病理組織においての検討でも表皮の厚さと皮膚浸潤細胞数は CSD ペプチド投与に群において有意に抑制された (c, d)。さらには、CSD ペプチドの全身投与は皮膚の TNF- α 、IL-17A、IL-23p19 の発現を抑制した (e, $P = 0.022$, $P = 0.04$, and $P = 0.018$)。次にこれらのマウスの皮膚と PBMC における Cav-1 発現量に変化が見られるかを検討した。IMQ は表皮の Cav-1 発現を減少させ、CSD ペプチドの投与によって回復傾向となることを確認した (f)。さらに、IMQ 外用は PBMC における Cav-1 発現を有意に低下させ ($P = 0.047$)、CSD ペプチドの投与により回復傾向を示した (g)。





このモデルにおいて、真皮における浸潤マクロファージと Cav-1 の蛍光二重染色を行った。左図 a と b に示すように、皮膚に浸潤した F4/80+マクロファージは IMQ 外用によって増加し、CSD ペプチド投与によってこの浸潤が抑えられたこと ($P < 0.0001$)。さらに F4/80 陽性細胞における Cav-1 の蛍光輝度を評価したところ、IMQ 誘発乾癬様皮膚炎マウスの皮膚浸潤マクロファージはコントロールのマウスと比較して CAV-1 の輝度が低かった (c, $P = 0.0007$)。CSD ペプチド投与群

と他の群とで、マクロファージの Cav-1 蛍光輝度に差は認めなかった。

本研究では、乾癬患者の末梢血単球において、Cav-1 発現が有意に低下しており、その結果、サイトカイン産生を増強し、皮膚への単球浸潤を促進することにより乾癬の病因に役割を果たす可能性があることを示唆した。イミキモド誘発乾癬様皮膚炎モデルマウスへの CSD ペプチドによる Cav-1 発現制御は、マクロファージの皮膚浸潤に関与し皮膚表現型を改善した。単球の Cav-1 の発現回復は乾癬治療の標的となる可能性がある。Cav-1 発現低下単球が動脈硬化性炎症に及ぼす影響は、現在継続的に解析中である。

5. 主な発表論文等

1. [雑誌論文](計1件)

Takamura N, Yamaguchi Y*, Watanabe Y, Asami M, Komitsu N, Aihara M. Downregulated Caveolin-1 expression in circulating monocytes may contribute to the pathogenesis of psoriasis. *Sci Rep.* 2019 Jan 15;9(1):125. 査読あり

[学会発表](計6件)

1. 山口由衣

併存症とカベオリンから考える乾癬病態
第 82 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 アフタヌーンセミナー 2018.12.01 Tokyo

2. 山口由衣

乾癬慢性状態とカベオリン
第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 シンポジウム 1
2017.2.11 横浜

3. 山口由衣

乾癬診療 私のこだわり ~基礎編~
第 116 回日本皮膚科学会総会 イブニングセミナー6 2017.6.2 仙台

4. Takamura N, Yamaguchi Y*, Watanabe Y, Asami M, Komitsu N, Aihara M. Downregulated Caveolin-1 expression in monocytes may contribute to the pathogenesis of psoriasis. 47th Annual meeting of the European Society for Dermatological Research. 2017.9, Salzburg, Austria, Selected e-Poster.

5. Yamaguchi Y

Backseat players in the chronic inflammation of psoriasis
41st JSID meeting Luncheon Seminar 2
2016.12.9 Sendai, Japan

6. 山口由衣

乾癬病態をとりまく多彩な因子
一分子標的薬時代の皮膚科医として重要なことー
278 回 東海地方会ランチョンセミナー
2016.12.4 名古屋

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：相原 道子

ローマ字氏名：Michiko Aihara

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90231753

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高村 直子

ローマ字氏名：Naoko Takamura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。