

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11327

研究課題名(和文) IKZF1による眼表面炎症制御機構の解明ならびに新規抗炎症治療薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of regulation mechanism of ocular surface inflammation by IKZF1

研究代表者

上田 真由美 (UETA, MAYUMI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60398386

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)：IKZF1による皮膚粘膜炎症(眼表面炎症含む)の制御機構を解析して、IKZF1がリンパ球だけではなく、眼表面上皮や皮膚表皮に発現していることを明らかとした。さらに、ヒト培養上皮細胞において、IKZF1は、TLR3リガンドであるpolyI:Cで誘導されること、IKZF1を抑制すると様々な炎症性サイトカインの産生が抑制されることを明らかとした。また、ケラチン5をプロモーターとして結膜上皮ならびに皮膚表皮等上皮特異的にIKZF1を強発現させたIKZF1 Tgマウスは、皮膚粘膜炎症を自然発症すること、IKZF1 Tgマウスの表皮では、様々な遺伝子が強発現していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ゲノム関連解析によりIKZF1遺伝子が皮膚粘膜炎症性疾患の発症に大きく関与していることが研究代表者の以前の研究で明らかとなっている。本研究は、生体において、IKZF1遺伝子が皮膚粘膜炎症を制御していることを世界で初めて発見した重要な研究である。本研究により、IKZF1は皮膚粘膜炎症疾患に対する新規治療薬の標的となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that human epidermis and conjunctival epithelium expressed IKZF1, and in PHCjECs and HEKa, the expression of IKZF1 mRNA was upregulated by stimulation with polyI:C, a TLR3 ligand. In *Ikzf1* Tg, we observed dermatitis and mucosal inflammation including the ocular surface. In contact dermatitis model, inflammatory infiltrates in the skin of *Ikzf1* Tg were significantly increased compared with wild type. Microarray analysis showed that *Lcn2*, *Adh7*, *Epgn*, *Ifi202b*, *Cdo1*, *Gpr37*, *Duoxa1*, *Tnfrsf4*, and *Enpp5* genes were significantly upregulated in the epidermis of *Ikzf1* Tg compared with wild type.

研究分野：眼表面炎症

キーワード：IKZF1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外来抗原に対する構造的・機能的なバリアを構成する上皮細胞が、炎症性疾患の病態に大きく関与することが近年報告されている。NFκB の活性化に必要な NEMO 分子を腸管上皮特異的に欠損させたマウスでは、炎症性腸疾患を発症する (Nenci; Nature 2007)。リンパ球増殖因子として同定された TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) は、表皮や気道上皮に発現することによりアレルギー炎症を誘導する (Ziegler; JACI 2012, Zhou; Nat Immunol 2005)。炎症に大きく関与するプロスタグランジン (PG) の受容体も上皮細胞に発現し炎症を制御している。とくに PGE₂ 受容体の一つである EP3 は、表皮や気管上皮、眼表面上皮に強く発現してアレルギー炎症を抑制している (Honda; JACI 2009, Kunikata; Nat Immunol 2005, Ueta; JACI 2009)。

我々は、難治性眼表面炎症疾患である Stevens-Johnson 症候群 (SJS) の遺伝子多型解析を行い、この EP3 の遺伝子 PTGER3 の遺伝子多型が SJS 発症に強く関連していること、さらに SJS 患者眼表面上皮においてこの EP3 蛋白の発現が著明に減弱していることを世界で初めて見出した (Ueta; JACI 2010)。このことは、眼表面ならびに皮膚粘膜炎症の制御に上皮細胞も大きく関与していることを示している。さらに我々は、SJS の全ゲノム関連解析を行い、IKZF1 遺伝子が発症に強く関連することを明らかとした (Ueta; JACI 2015)。また、遺伝子多型の機能解析を行い発症に関わる IKZF1 遺伝子多型が、splicing variants の発現に関わっていること、患者で多い遺伝子型では正に機能する full-length IKZF1 isoform Ik1 と比較して負に機能する IKZF1 isoform (dominant negative isoform) Ik2 の割合が有意に減少している事を明らかとした (Ueta; JACI 2015)。このことは、難治性眼表面炎症疾患 SJS では IKZF1 遺伝子の機能が亢進している可能性を示唆している。IKZF1 は、そのノックアウトマウスの解析より、リンパ球をはじめとした免疫細胞の分化増殖にかかわっていることが明らかとなっている。しかし、上述のように、SJS では、上皮細胞がその病態に大きく関与していることから、我々は、眼表面上皮、皮膚表皮における IKZF1 の発現を解析し、mRNA ならびに蛋白ともに発現していることを明らかとしている。

本研究では、我々が得ている科学的知見を礎に、粘膜上皮細胞による炎症制御機構の解明、特に IKZF1 による眼表面炎症の制御機構の解明に焦点を当て研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、“上皮細胞による眼表面炎症制御機構の解明”にある。IKZF1 は、リンパ球等の免疫細胞に発現しその分化増殖にかかわっていることが報告されている。我々は、眼表面上皮にも IKZF1 が発現し、眼表面炎症制御に関わっていることを世界で初めて見出した。本研究では、IKZF1 による眼表面炎症制御機構を解明し、新規抗炎症治療薬への応用を目指す。本研究により、IKZF1 を介した上皮細胞による炎症制御機構が解明されれば、既存の免疫細胞を標的とした抗炎症治療薬とは作用機序の異なった、上皮細胞を標的とする斬新な抗炎症治療薬の開発へと進展する事が期待される。我々は、本研究期間中に、眼表面上皮細胞による炎症制御機構の解明、特に IKZF1 を介した炎症制御機構の解明に焦点をあて研究を行った。

3. 研究の方法

研究代表者は、IKZF1 による皮膚粘膜炎症 (眼表面炎症含む) の制御機構の解明を目的に、以下を行った。

- 1) ヒト in vivo 眼表面 (結膜) 組織と皮膚組織の IKZF1 の免疫染色を行い、ヒトにおける IKZF1 蛋白の発現を解析した。
- 2) ヒト in vivo 眼表面 (結膜) 上皮と皮膚表皮から mRNA を抽出し、IKZF1 遺伝子の発現を、RT-PCR 法によって解析した。
- 3) ヒト培養眼表面上皮細胞を用いて、IKZF1 発現を制御 (促進・抑制) する因子を明らかとすること目的に、ヒト培養結膜上皮細胞に、TLR3 リガンドである polyI:C を添加して、IKZF1 mRNA の発現変化を、定量 PCR にて解析した。
- 4) ケラチン 5 をプロモーターとして結膜上皮ならびに皮膚表皮等上皮特異的に IKZF1 を強発現させた IKZF1 Tg マウスを肉眼的ならびに組織学的に解析した。
- 5) IKZF1 によって制御される因子を明らかとすることを目的に、ヒト培養眼表面 (結膜) 上皮

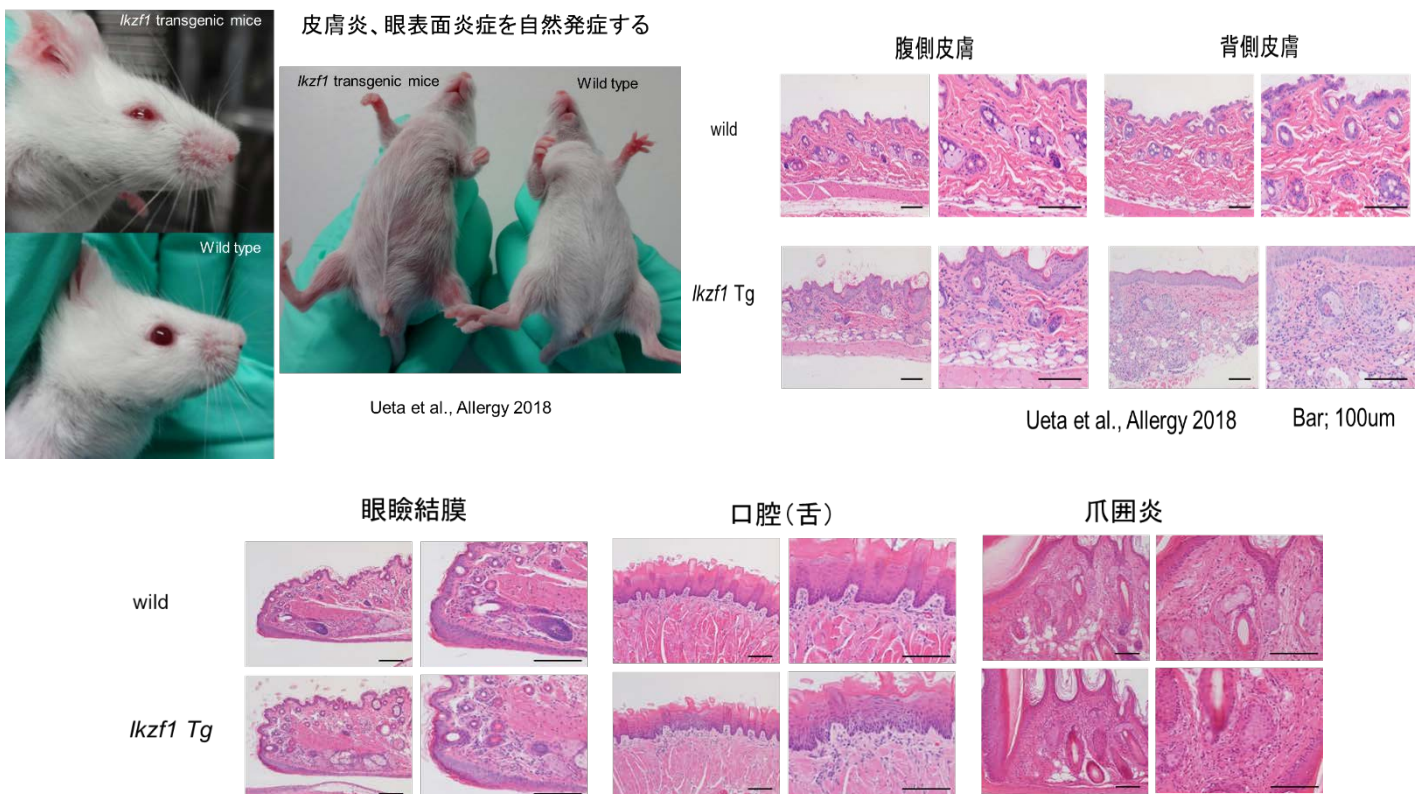
細胞を用いて IKZF1 の発現抑制系を確立した。具体的には、ヒト培養結膜上皮細胞に、IKZF1 の siRNA をトランスフェクションし、IKZF1 mRNA の発現を抑制、その IKZF1 mRNA を抑制した結膜上皮細胞と、コントロールを比較して、どのような遺伝子の発現に影響があるのかを、定量 PCR で解析した。

- 6) ケラチン5をプロモーターとして結膜上皮ならびに皮膚表皮等上皮特異的に IKZF1 を強発現させた IKZF1 Tg マウスの表皮を採取し、その遺伝子発現を野生型と比較することにより、IKZF1 に制御されている因子を明らかとする。
- 7) ケラチン5をプロモーターとして結膜上皮ならびに皮膚表皮等上皮特異的に IKZF1 を強発現させた IKZF1 Tg マウスに接触性皮膚炎を誘導し、皮膚炎症細胞浸潤を野生型と比較することにより、IKZF1 に制御されている炎症病態を明らかとする。

4. 研究成果

研究代表者は、IKZF1 による皮膚粘膜炎症（眼表面炎症含む）の制御機構として、下記を明らかとした。

- 1) ヒト in vivo 眼表面（結膜）組織と皮膚組織の IKZF1 の免疫染色を行い、ヒトにおける IKZF1 蛋白の発現を解析したところ、結膜上皮と皮膚表皮に IKZF1 蛋白が発現していることを明らかとした。IKZF1 の発現は、リンパ球をはじめとした免疫細胞の報告があったが、上皮細胞における発現の報告は、研究代表者が世界で初めてである。
- 2) IKZF1 遺伝子の発現を、RT-PCR 法によって解析した結果、ヒト in vivo 眼表面（結膜）上皮と皮膚表皮、IKZF1 mRNA が発現していることが確認された。
- 3) ヒト培養結膜上皮細胞に、TLR3 リガンドである polyI:C を添加して、IKZF1 mRNA の発現変化を定量 PCR にて解析したところ、polyI:C の添加 24 時間とピークに、IKZF1 mRNA の発現が有意に著明に上昇した。
- 4) ケラチン5をプロモーターとして結膜上皮ならびに皮膚表皮等上皮特異的に IKZF1 を強発現させた IKZF1 Tg マウスを肉眼的に解析したところ、生後より脱毛を伴う皮膚炎を認めた、また、眼表面炎症を生じているマウスも見られた、組織学的に解析したところ、野生型と比較して、皮膚組織の炎症細胞が増加しており、眼瞼組織や口腔粘膜、爪の付け根も、炎症細胞浸潤が増加していた。組織学的解析からは、IKZF1 Tg マウスは、皮膚炎、眼表面炎症、口内炎、爪囲炎を認めることが明らかとなった。



- 5) ヒト培養結膜上皮細胞に、IKZF1 の siRNA をトランスフェクションし、IKZF1 mRNA の発現を抑制したところ、MCP-1 と IL-6 の発現が有意に低下することが明らかとなった。
- 6) IKZF1 Tg マウスの表皮を採取し、その遺伝子発現を野生型と比較したところ、Lcn2, Epgn, Ifi202b, Cdo1, Duoxa1 and Tnfrsf4 遺伝子の発現が、野生型と比較して IKZF1 Tg マウスの表皮で有意に上昇していることが明らかとなった。
- 7) IKZF1 Tg マウスに接触性皮膚炎を誘導し、皮膚炎症細胞浸潤を野生型と比較したところ、炎症細胞浸潤が、IKZF1 Tg マウスで有意に増加していることが明らかとなった、このことは、IKZF1 Tg マウスが自然発症の皮膚粘膜炎症を生じるだけではなく、誘導性の炎症も増悪することを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 11 件)

1. Nakamura N, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Konishi E, Yasuike R, Masuda K, Matsunaka H, Murakami Y, Yokosawa E, Katoh N. Stratum corneum Toll-like receptor 3 expressions correlate with the severity of atopic dermatitis lesions. *J Dermatol Sci*. 2019 May 21. pii: S0923-1811(19)30121-5. doi:10.1016/j.jdermsci.2019.05.005. 査読有
2. Mieno H, Ueta M, Yamada K, Yamanaka Y, Nakayama T, Watanabe A, Kinoshita S, Sotozono C. Expression of prostaglandin E₂ receptor 3 in the eyelid epidermis of patients with Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Br J Ophthalmol*. 2019 Apr 18. pii: bjophthalmol-2018-313587. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-313587. 査読有
3. Ueta M, Hamuro J, Ohsako S, Kinoshita S. Distinctly regulated functions and mobilization of CD11c-positive cells elicited by TLR3- and IPS-1 signaling in the cornea. *Immunol Lett*. 2019 Feb;206:49-53. doi: 10.1016/j.imlet.2018.12.004. Epub 2018 Dec 17. 査読有
4. Ueta M. Results of Detailed Investigations Into Stevens-Johnson Syndrome With Severe Ocular Complications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Nov 1;59(14):DES183-DES191. doi: 10.1167/iovs.17-23537. 査読有
5. Tamagawa-Mineoka R, Yasuoka N, Ueta M, Katoh N. Influence of topical steroids on intraocular pressure in patients with atopic dermatitis. *Allergol Int*. 2018 Jul;67(3):388-391. doi: 10.1016/j.alit.2018.01.004. Epub 2018 Feb 16. 査読有
6. Shinomiya K, Ueta M, Kinoshita S. A new dry eye mouse model produced by exorbital and intraorbital lacrimal gland excision. *Sci Rep*. 2018 Jan 24;8(1):1483. doi: 10.1038/s41598-018-19578-6. 査読有
7. Ueta M, Nishigaki H, Sotozono C, Kinoshita S. Downregulation of interferon- γ -induced protein 10 in the tears of patients with Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications in the chronic stage. *BMJ Open Ophthalmol*. 2017 Aug 7;1(1):e000073. doi: 10.1136/bmjophth-2017-000073. eCollection 2017. 査読有
8. Lee HK, Yoon KC, Seo KY, Ueta M, Kim MK. Chronic ocular complications of Stevens-Johnson syndrome associated with causative medications in Korea. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018 Mar - Apr;6(2):700-702.e2. 査読有
9. Ueta M, Hamuro J, Nishigaki H, Nakamura N, Shinomiya K, Mizushima K, Hitomi Y, Tamagawa-Mineoka R, Yokoi N, Naito Y, Tokunaga K, Katoh N, Sotozono C, Kinoshita S. Mucocutaneous Inflammation in the Ikaros Family Zinc Finger 1 (IKZF1) - keratin 5 specific transgenic mice. *Allergy*. 2018 Feb;73(2):395-404 査読有
10. Yasuike R, Tamagawa-Mineoka R, Ueta M, Nakamura N, Kinoshita S, Katoh N. The role of toll-like receptor 3 in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *J Dermatol Sci*. 2017 Nov;88(2):184-191. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.017. 査読有
11. Ueta M, Sawai H, Shingaki R, Kawai Y, Sotozono C, Kojima K, Yoon KC, Kim MK, Seo KY, Joo CK, Nagasaki M, Kinoshita S, Tokunaga K. Genome-wide association study using the ethnicity-specific Japonica array: Identification of new susceptibility loci for cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications. *J Human Genetics*. 2017 Apr;62(4):485-489. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. Mayumi Ueta. Genetic Predisposition and Pathology of SJS with severe ocular complications, 2019 OSW (Ocular Surface Workshop), introduction to SJS, Karnal, India, 2.Feb. 2019, symposium
2. Mayumi Ueta. Genetic Predisposition and Pathology of SJS with severe ocular complications, 2019 OSW (Ocular Surface Workshop), OCP, Karnal, India, 3.Feb. 2019, symposium
3. Mayumi Ueta. Genetic Predisposition and Pathology of Stevens-Johnson Syndrome with Severe Ocular Complications. 2018 ISCAR (international severe cutaneous adverse reaction) meeting, Matsue, Japan, 11.10. 2018
4. Mayumi Ueta. Genetic background of Stevens-Johnson syndrome with ocular complications. 4th Chulalongkorn Eye Center-Kyoto Prefectural University of Medicine Joint meeting. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2018.8. 31.
5. Mayumi Ueta., Genetics and Stevens-Johnson Syndrome (SJS) - How close are we to identifying predisposed individuals? Ocular Surface and Keratoprosthesis Conference (OSKON) 2018, Chennai, India, 2018. 7.27.
6. Mayumi Ueta. Regulation of CD11c positive cells by TLR3 in the cornea. Gordon Research Conference 2018: Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology. Defining the Mechanisms Through Which the Cornea, Tear Film and Immune System Operate Under Pathological Conditions, Session: Innate and Acquired Immunity in Corneal Pathophysiology, Ventura, CA, US. Feb 21, 2018, 2018
7. Mayumi Ueta, Pathology of Stevens-Johnson Syndrome. 3rd Chulalongkorn Eye Center-Kyoto Prefectural University of Medicine Joint meeting. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2017.8.22.
8. Mayumi Ueta, Katsushi Tokunaga, Hiromi Sawai, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita Genetic Predispositions for Cold medicine related Stevens-Johnson Syndrome / Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Ocular Complications. SJS/TEN 2017, Orland USA March 2nd, 2017.
7. Mayumi Ueta. Pathology of Stevens-Johnson Syndrome. 2nd Chulalongkorn Eye Center-Kyoto Prefectural University of Medicine Joint meeting. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 2016.8.23.
8. Risa Tamagawa-Mineoka, Naomi Nakamura, Mayumi Ueta, Eiichi Konishi, Risa Yasuike, Koji Masuda, Hiroshi Matsunaka, Yumi Murakami, Emiko Yokosawa, Norito Katoh, Elevated expressions of stratum corneum Toll-like receptor 3 in atopic dermatitis lesions, 2019 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, San Francisco, USA, poster 398, 24 Feb, 2019
9. Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Suzuko Ohsako, Shigeru Kinoshita. Regulation of *Ikzf1* inducible genes in epidermis, oral, Oral Abstract Session (OAS) 34-5. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2018 in München, Germany, May 29th, 2018
10. Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Kiyoko Oosako, Shigeru Kinoshita. *Regulation of Ikzf1 inducible genes by TLR3 and IPS-1. Poster*, 2018.4.29. 2018 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), in Hawaii, USA
11. Mayumi Ueta, Suzuko Ohsako, Shigeru Kinoshita. Regulation of CD11c positive cells by TLR3 in the cornea. poster, Feb 18 - 23, 2018 Gordon Research Conference 2018 : Cornea and Ocular Surface Biology and Pathology. Defining the Mechanisms Through Which the Cornea, Tear Film and Immune System Operate Under Pathological Conditions, Ventura, CA, US.
12. Mayumi Ueta, Junji Hamuro, Naomi Nakamura, Risa Tamagawa-Mineoka, Norito Katoh, Shigeru Kinoshita. Elevated Expression of Ikaros Family Zinc Finger 1 (*IKZF1*) Exacerbates Mucocutaneous Inflammation, oral The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress 2017 in Helsinki, June 18th, 2017
13. MAYUMI Ueta, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita, Skin Inflammation of *Ikzf1*-EGFP Transgenic Mice, poster. The EAACI/ESCD Skin Allergy Meeting, SAM 2017, 27 – 29 April 2017, Zürich, Switzerland
14. Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita. Down-regulation of IP-10 in Tears of Patients in the Chronic Stage of Stevens-Johnson Syndrome. Asia Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2017, in Brisbane, Australia, Feb 7,

2017.

15. Mayumi Ueta, Hiromi Sawai, Ryosei Shingaki, Yusuke Kawai, Chie Sotozono, Kaname Kojima, Masao Nagasaki, Shigeru Kinoshita, Katsushi Tokunaga, Genome-wide association study using the Japonica array for cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular complications. The American Society of Human Genetics (ASHG) 2016, Vancouver, Canada. Oct 19-20, 2016
16. Mayumi Ueta, Chie Sotozono, Katuhiko Shinomiya, Norihiko Yokoi, Shigeru Kinoshita. Protein Expression of the Susceptibility Genes for Stevens-Johnson syndrome in the Ocular Surface. Poster. 2016 American Academy of Ophthalmology, Chicago, USA. 2016. 10. 17.
17. Mayumi Ueta, Hiromi Nishigaki, Katsuhiko Shinomiya, Norihiko Yokoi, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita. *IKZF1* Expression and Upregulation by polyI:C in Human Ocular Surface Epithelial Cells. <poster>2016 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Seattle, WA, USA. May 3. 2016.
18. Mayumi Ueta, Chie Sotosono, Shigeru Kinoshita. Stevens-Johnson syndrome with severe ocular surface complications might be associated with disordered innate immune response. <oral>19th ANNUAL IOSS (International Ocular Surface Society) MEETING. Seattle, WA, USA. April 30. 2016.
19. Mayumi Ueta, Hiromi Sawai, Junji Hamuro, Yuki Hitomi, Chie Sotozono, Katsushi Tokunaga, Shigeru Kinoshita. Regulation of Mucocutaneous Inflammation by Cold Medicine-Related Stevens-Johnson Syndrome susceptibility gene, *IKZF1*. <oral> The 13th International Congress of Human Genetics. Kyoto, Japan 5 April 2016.

[図書] (計 3 件)

1. 上田真由美、Stevens-Johnson 症候群、眼科診療マイスターII、診断と治療, p90-95, 2017, メジカルビュー社
2. 上田真由美、Stevens-Johnson 症候群、眼科疾患、最新の治療 2016-2018, p111, 2016、南江堂
3. 上田真由美、Stevens-Johnson 症候群、今日の眼疾患治療指針第 3 版 2 治療総論 6 角膜疾患, 2016. P365-368, 医学書院.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://frontier-medueta.com/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：西垣 裕美

ローマ字氏名：Hiromi Nishigaki

研究協力者氏名：大迫 清子

ローマ字氏名：Seiko Ohsako

※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。