

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10233
研究課題名(和文) 乾癬の病態におけるデルモカイン / の役割の解明

研究課題名(英文) Dermokine function in psoriasis

研究代表者
徳力 篤 (Tokuriki, Atsushi)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：90397274
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)：DMKNは、ヒトやマウスの角化細胞、特に顆粒層などの分化後期に発現する分泌型蛋白質で、ヒトやマウスにおける主要なアイソタイプは、 $DMKN-1$ 、 $DMKN-2$ 、 $DMKN-3$ の3つである。 $DMKN-1$ は、皮膚の恒常性の保持に重要な因子であると推定されていたが、今回の我々の検討から、 $DMKN-1$ は生体内で角化の過程に加えて免疫応答において重要な役割を有している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
先天性魚鱗癬などの角化異常症や尋常性乾癬などの炎症性皮膚疾患は現在根本的な治療がなく、ステロイド外用やレチノイド内服などで症状を緩和する治療が主体となっている。我々が注目したデルモカインは角化異常症や乾癬の病態に関与していると考えられ、皮膚角化症や皮膚炎症性疾患における役割の解明や新規治療の開発を行うことでそれら難治性皮膚疾患患者の生活の質の向上につながる。

研究成果の概要(英文)：Dermokine (DMKN) family members consist of four splicing variants ($DMKN-1$, $DMKN-2$, $DMKN-3$, $DMKN-4$) and each of these is thought to play an important role in inflammatory skin disorders, such as atopic dermatitis and psoriasis. Both $DMKN-1$ and $DMKN-2$ isoforms are expressed specifically in the upper epidermis, although their in vivo functions remain enigmatic. $DMKN-1$ deficiency in mice caused a subtle skin phenotype with transient hyperkeratosis, wrinkle formation, and persisted epidermal impermeability of water during the early neonatal stage. Our data suggests the possible involvement of postnatal stage-specific action of $DMKN-1$ in the corneo-epidermal barrier function.

研究分野：皮膚

キーワード：魚鱗癬 乾癬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DMKN は、ヒトやマウスの角化細胞、特に顆粒層などの分化後期に発現する分泌型蛋白質で、ヒトやマウスにおける主要なアイソタイプは 、 、 の3つである (Matsui, et al, Genomics, 2004, Naso, et al, J Invest Dermatol, 2007)。ヒト DMKN 遺伝子は 19 番染色体に存在するが、その両隣には表皮を含む重層扁平上皮に特異的に発現する Kdap と Suprabasin をコードする遺伝子が存在し、遺伝子複合体を形成している。重層扁平上皮分化に関連した遺伝子複合体としては、ヒト 1 番染色体に存在し、フィラグリン、ロリクリン、インポルクリンなど多くの角化重層扁平上皮関連遺伝子を含む epidermal differentiation complex (EDC) があるが、デルモカイン遺伝子を含む新たな遺伝子複合体も EDC と同様に角化細胞の分化に重要な役割を果たしていると推測される。我々は、3 つの DMKN 分子の中でも表皮に高発現する と (DMKN- /) に着目して検討を進めてきた。特にサイトカイン様ドメインを有する は、自己ないし近傍の細胞に作用することによって機能を発揮していると推察される。我々は、DMKN- / を検出できるモノクローナル抗体を作製して検討したところ、乾癬やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患では恒常状態よりも発現が著明に増強していた (Hasegawa, et al. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013)。また、DMKN- / は glucose-regulated protein78 と結合することで角化細胞の ERK1/2 のリン酸化を抑制して細胞増殖を抑制したり、caspase 活性を上昇させて細胞死を誘導することを明らかにした (Higashi, et al, FEBS Lett, 2012)。さらに、DMKN- は好中球遊走に働く CXC ケモカインの角化細胞からの産生を抑制することも報告している (Hasegawa, et al. J Dermatol Sci, 2013)。このような知見から、DMKN- / の発現低下は、乾癬にみられるような表皮肥厚や角化異常、そして好中球などの細胞浸潤の誘導につながるのではないかと考えた。これを明らかにするために、最近独自に作製した DMKN- / 遺伝子欠損マウスを使用し、乾癬などの皮膚炎症モデルを誘導して DMKN- / の皮膚炎症性疾患における役割の解明や新規治療の開発を目指した。

2. 研究の目的

乾癬などの皮膚炎症性疾患において、白血球などの免疫担当細胞が病態の主要な役割を果たしていると考えられてきている。しかし、それらを制御しているのは表皮細胞から産生される液性因子と考えられ、その同定が求められる。その候補として、我々はデルモカイン(DMKN)- / に注目した。この蛋白は表皮上層の角化細胞に発現し、我々の知見からは in vitro で角化細胞の増殖や好中球の遊走を抑制することがわかっている。本研究では、独自に作製した DMKN- / 欠損マウスの表現型を明らかにする。さらに、乾癬様皮膚炎モデルを誘導して野生型マウスと比較することにより、DMKN- / の表皮角化細胞と免疫担当細胞とのクロストークに与える役割を検証する。ひいてはデルモカインの役割を解明するのみならず、乾癬などの皮膚炎症性疾患の病態解明や新規治療開発へのブレークスルーを引き起こす可能性を有すると考えられた。

3. 研究の方法

(1) DMKN- / の遺伝子欠損型マウスの表現型の解析

Cre-*loxP* システムを用いて DMKN- / の遺伝子欠損型マウスを作製し、その表現型の解析し、角化細胞の多彩な細胞生物学的機能における DMKN- / の役割をより詳細に検討した。

皮膚の肉眼的表現型に及ぼす影響の検討

各遺伝子型間に、皮膚の質感、皮膚乾燥、脱毛、炎症などの差異があるか、自然経過で死亡するまで評価した。

皮膚バリア機能の検討

遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して、in-out バリア、out-in バリア機能の差異について、定期的な経皮水分蒸散量の測定と transdermal diffusion assay (色素 lucifer yellow の角層から真皮への浸透度を測定) で評価した。

皮膚の組織学的表現型の検討

各遺伝子型間に、表皮、角質層の異常、真皮を構成する血管、付属器、間質などの構築に関して評価した。

分子レベルにおける表現型の検討

各遺伝子型間に、フィラグリン、ロリクリンなどの終末角化関連因子の発現を比較した。

(2) 乾癬様皮膚炎モデルの作製と解析

DMKN- / は、角化細胞の角化異常や増殖、好中球の遊走などを制御する作用が示唆されていることから、皮膚炎症性疾患、特に乾癬に注目して検討した。野生型マウスと DMKN- / 欠損マウスにイミキモドを塗布し、同部の表現型の変化、表皮の構造変化、真皮の細胞浸潤を解析した。乾癬の病態形成には、Th17 細胞や T 細胞などが産生する IL-17 (IL-17A, IL-17F) と、これらの細胞の異常な分化と増殖、さらにこれらの維持に重要な IL-23 が中心的な役割を果たしていると考えられている (IL-23/IL-17 軸理論)。TLR-7/8 のアゴニストであるイミキモドをマウスに塗布することで、この理論にかなった乾癬様皮膚病変を誘導することができる (van der Fits, et al, J Immunol, 2009)。この動物モデルを用いて、新規に樹立した DMKN- / 、野生型マウスについて以下の検討を行った。

皮膚の肉眼的表現型 (炎症の程度) の検討

各表現型マウスの背部に、5% イミキモドクリームまたは陰性コントロールクリームを7日間連続で外用した。その間連日、紅斑、浸潤、鱗屑の程度を0点から4点でスコア化し、各遺伝子型間に差異があるか否かを検討した。

皮膚の組織学的表現型の検討

各遺伝子型間に、表皮の構築や肥厚、角質の性状、角層内膿疱の個数などに差異があるか否かについて、HE染色標本を用いて評価した。また浸潤する炎症細胞 (好中球、マクロファージ、T細胞) について、マウスの各遺伝子型間に差異があるか否かを確かめるために、各種免疫化学染色を施行して評価した。

4. 研究成果

生後1週間以内の DMKN- / ホモ欠損型マウスは野生型マウスと比較して肉眼的に皮膚の鱗屑が目立ち、組織学的に顆粒細胞のケラトヒアリン顆粒が小型であった。真皮を構成する血管、付属器、間質などの構築に関しては差が見られなかった。この所見に関しては、最近別のグループが報告した DMKN- / 欠損マウスの結果 (Leclerc, et al. J Cell Sci, 2014) に一致していた。自然経過で死亡するまでの期間に明らかな差は見られなかった。皮膚バリア機能に関して in-out バリア (経皮水分蒸散量) out-in バリア機能 (transdermal diffusion assay) には差は見出せなかった。フィラグリン、ロリクリンなどの終末角化関連因子の新生児期の mRNA 発現に有意な差は見られなかった。

イミキモドクリーム外用による乾癬様皮膚炎モデルでは DMKN 欠損による肉眼的表現型の増悪が見られ、紅斑、浸潤、鱗屑の程度で示される皮膚炎スコアも有意に増悪した (図 1、2)。

皮膚の組織学的変化に関して欠損マウスで表皮と角層が肥厚し、炎症細胞もより多く浸潤して

いた。免疫染色では好中球、マクロファージ、T細胞が遺伝子欠損マウスでより多く浸潤していた。

この結果から DMKN- / は、皮膚の恒常性の保持に重要な因子であると推定されていたが、今回の我々の検討から、DMKN- / は生体内で角化の過程に加えて免疫応答において重要な役割を有している可能性が示唆された。

図1

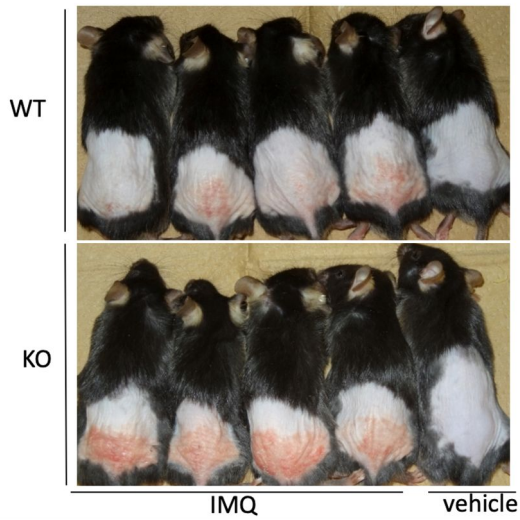
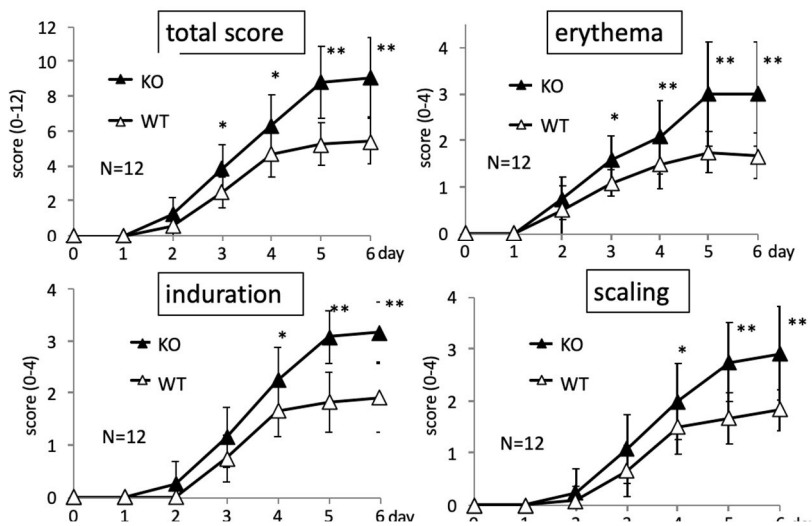


図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----