

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16321

研究課題名(和文)新規尋常性乾癬マウスモデルの創製と発症機序の解明

研究課題名(英文)Development of a novel mouse model of psoriasis and elucidation of its pathogenic mechanism

研究代表者

能登 舞 (Noto, Mai)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10738462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの異常が、様々な疾患の発症に関与していることが明らかにされつつある。私たちは、マウスでクラスIIIのPI3-キナーゼ(PI3K)の一つであるVps34を表皮特異的に欠損させると、尋常性乾癬に類似した病変が形成されることを見出した。乾癬では表皮が異常に肥厚することから、幹細胞との関係が示唆される。幹細胞の研究の一環で私たちは、転写因子Sox13が、新たな毛包幹細胞のマーカーになりうることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
食事の西洋化に伴い、わが国では尋常性乾癬の患者が増加し、メタボリック症候群との関連も注目されている。本研究で私たちが作製した、表皮特異的なVps34欠損を基盤とする新しい乾癬モデルは、乾癬発症におけるオートファジーの役割の解明につながる可能性がある。また、Sox13は、新しい毛包幹細胞マーカーとして、幹細胞研究の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities in autophagy have been shown to be involved in the pathogenesis of a variety of diseases. We have found that Vps34 (a class III PI3-kinase)-deficient mouse epidermis developed lesions similar to those in psoriasis vulgaris. In psoriasis, the epidermis is abnormally thickened, suggesting a relationship with stem cells. As part of our stem cell research, we have also found that the transcription factor Sox13 could serve as a novel marker for hair follicle stem cells.

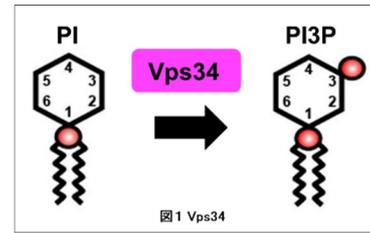
研究分野：皮膚科学

キーワード：尋常性乾癬 Vps34 オートファジー イノシトールリン脂質代謝 Sox13 転写因子 毛包幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Vps34 は、クラス III の PI-キナーゼ (PI3K) の一つで、フォスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環 3 位の水酸基をリン酸化して PI3P をつくる (図 1)。Vps34 はまた、オートファゴソーム、および初期エンドソームの形成を制御している。Vps34 の生体における機能については、これまでに心臓、および肝臓特異的に Vps34 を欠損させたマウスで解析されており、肝臓では肝腫大と脂肪肝を、心臓では心肥大と伝導障害をきたすことが報告されている (文献)。しかし、表皮における Vps34 の機能は未だ不明である。



表皮における Vps34 の機能を調べるために、私たちは Keratin 5 (K5) Cre マウスを用いて、Cre-Lox 系により表皮細胞特異的に Vps34 を欠損させたマウス (Vps34 cK0 マウス) を作製した。このマウスでは、K5 プロモーターが働き始める胎生 14.5 日ころから Vps34 が欠損すると考えられる。Vps34 cK0 マウスは正常に出生してくるが、生後数時間で死亡することが判明した。

この生後直後の致死性の問題を解決し、生後の Vps34 欠損の影響を調べるために、タモキシフェン (TAM) 誘導性のマウス (CreERT2; Vps34 flox マウス) を作製した。このマウスでは、TAM を塗布したところでのみ、局所的に Vps34 を欠損させることができる。この CreERT2; Vps34 flox マウスに TAM の溶媒であるアセトン塗布した時は、表皮に全く異常は見られなかった。しかし、TAM を塗布した時は、Vps34 cK0 マウスの場合のような空胞形成はみられず、表皮肥厚、顆粒層の消失・菲薄化、過角化、不全角化、真皮内の炎症細胞浸潤といった、尋常性乾癬に非常に類似した病理組織像を示した。

以上の結果から、Vps34 は欠損する時期によって、表皮に及ぼす影響が異なることがわかったが、そのメカニズムは不明である。特に、TAM を塗布した CreERT2; Vps34 flox マウスで尋常性乾癬に似た病理組織像がみられることは、尋常性乾癬にオートファジー、エンドサイトーシスといったメンブレントラフィック経路の異常が関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

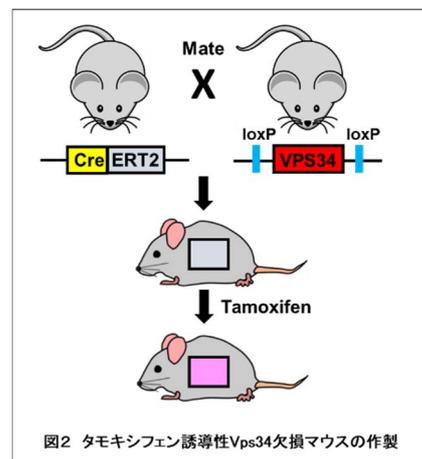
(1) メンブレントラフィック経路の異常が、様々な疾患の発症に関与していることが明らかにされつつある。しかし、皮膚疾患においては、このような観点からの研究はほとんどなされていない。私たちは、エンドソーム、オートファゴソームの形成において中心的な役割を果たす Vps34 に注目し、Vps34 を表皮特異的に欠損させたマウスを作製した。その結果、胎生期に欠損させると著しい空胞形成を、生後に欠損させると尋常性乾癬に類似した病態を示すことがわかった。本研究は、Vps34 が欠損する時期により、表皮に異なった異常が現れるメカニズム解析し、さらに尋常性乾癬をメンブレントラフィック経路の異常という観点から解析することを目的とする。

(2) 乾癬では表皮が肥厚することから、乾癬と幹細胞の関係について解析する。

3. 研究の方法

(1) TAM 依存性 Vps34 欠損マウスの作製

Vps34 cK0 マウスは生後すぐに死亡するため、CreERT2; Vps34 flox マウスを作製した。このマウスでは、TAM を塗布したところでのみ、Cre リコンビナーゼが働いて、Vps34 を欠損させることができる (図 2)。



(2) CreERT2; Vps34 flox マウスの表現型の観察

生後 10 週の CreERT2; Vps34 flox マウスの背部を剃毛して、5 日間連続で TAM 2.5mg を塗布し、14 日後に表皮の変化を観察した。CreERT2; Vps34 flox マウスでみられる角化異常を以下の方法で調べた。

細胞の増殖能を調べる：細胞の増殖能を Ki67、およびリン酸化ヒストン H3 の免疫組織化学染色で解析した。

角化異常の特徴を調べる：基底層 (K5/K14)、有棘層 (K1/K10)、顆粒層 (filaggrin) に特異的なマーカー、および増殖性ケラチン (K6/K16) の発現を免疫組織化学染色で解析した。

炎症性サイトカインの発現を調べる：IL-17、IL-22、IL-23 といった尋常性乾癬の発症に関与しているサイトカインの発現を定量 PCR で調べた。

(3) イミキモド誘導性乾癬モデルマウスとの比較

イミキモドをマウスの背部の皮膚に塗布すると、尋常性乾癬様の病変を誘導できることが報告されている (文献)。TAM を塗布した CreERT2; Vps34 flox マウスでみられる乾癬様病変と、イミキモド誘導性乾癬モデルマウスでみられる病変で、病理組織像、炎症性サイトカインの発現プロファイルを比較検討した。

(4) Sox13 LacZ ノックイン・マウス ($Sox13^{LacZ/+}$) の作製

Sox ファミリーに属する転写因子の一つ、Sox13 の発現と機能を解析するために、Sox13 遺伝子のエクソン 2 にある、開始コドンのところに LacZ 遺伝子を挿入し、LacZ ノックイン・マウス ($Sox13^{LacZ/+}$) を作製した。LacZ 遺伝子がコードする β-ガラクトシダーゼ活性を検出することで (X-gal 染色) Sox13 が発現している部位を解析した。また、 $Sox13^{LacZ/+}$ マウス同志を交配して、LacZ をホモに持つマウス $Sox13^{LacZ/LacZ}$ を作製した。 $Sox13^{LacZ/LacZ}$ は Sox13 のノックアウトマウスに相当すると考えられる。

(5) X-gal 染色、および免疫組織化学染色

X-gal 染色、および免疫組織化学染色の方法の詳細は、文献 [1] に記載した。

4. 研究成果

(1) Vps34 欠損マウスのバリア機能

K5Cre で表皮特異的に Vps34 を欠損させたマウス Vps34 cKO マウスは、外見上大きな異常はなかったが、生後数時間で死亡した。HE 染色でみると、Vps34 cKO マウスでは、表皮細胞の著しい空胞形成が見られ、一部には壊死細胞が散見された。さらに、表皮細胞を顕微鏡で見ると、細胞質内に多数の空胞がみられた。表皮における著しい空胞形成により、バリア機能が障害されている可能性考え、バリアアッセイを行ったが、コントロール・マウスと差はなく、バリア機能に異常はないことが判明した。

(2) TAM を塗布した CreERT2; Vps34 flox マウスの解析

生後 TAM 依存的に Vps34 を欠損させた表皮では、乾癬様の病変が再現性良く形成されることを確認した (図 3)。この表現型は TAM の濃度依存性で、濃度が濃いほどより表皮肥厚、角化異常が顕著になった。TAM を塗布した表皮では、Ki67, PHH3 といった細胞増殖マーカーの発現が上昇していた。また、増殖性ケラチン (K6/K16) の発現、およびリン酸化 STAT3 の発現が、乾癬様病変部で上昇していることが免疫組織化学染色で明らかになった。さらに、定量的 PCR の結果、乾癬様病変部の炎症性サイトカインの発現プロファイルは、乾癬組織のプロファイルと類似していることが判明した。

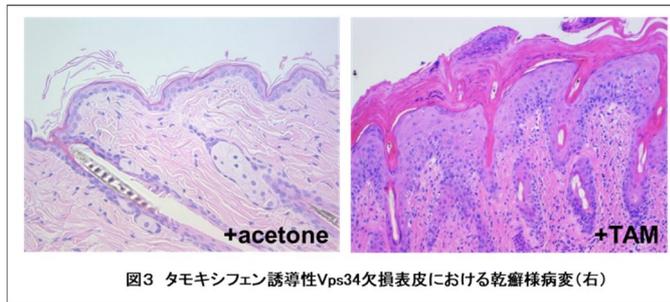


図3 タモキシフェン誘導性Vps34欠損表皮における乾癬様病変(右)

(3) イミキモド誘導性乾癬モデルマウスとの比較

免疫組織化学染色により、TAM を塗布した CreERT2; Vps34 flox マウスでみられる乾癬様病変と、イミキモド誘導性乾癬モデルマウスでみられる病変で、増殖性ケラチン (K6/K16)、およびリン酸化 STAT3 の発現パターンが非常に似ていることがわかった。さらに、定量的 PCR の結果、両者の炎症性サイトカインの発現プロファイルも類似していることが判明した。以上より、Vps34 欠損マウスでみられる乾癬様病変は、尋常性乾癬の新しいモデルとなりうると考えられる。

(4) Sox13 の毛包での発現

$Sox13^{LacZ/+}$ マウスを用いて、Xgal 染色で Sox13 の発現パターンを調べた。その結果、Sox13 は、E (embryonic day) 14.5 から whisker pad に点状に発現し始め、断面でみると、この発現は毛包に一致することがわかった (図 4、文献 [2])。

体表でも E14.5 に毛包に一致した Sox13 の点状のシグナルがみられ、E18 ではシグナル数が多くなり、伸長していることがわかった。断面でみると、Sox13 は毛包の形態形成期には、プラコード、毛芽、毛杭に発現していることが明らかになった (図 4、文献 [2])。

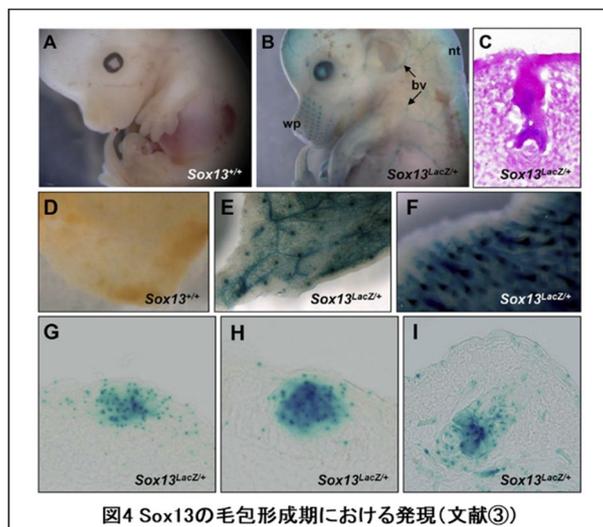


図4 Sox13の毛包形成期における発現(文献③)

(5) Sox13 の毛周期での発現

次に生後の Sox13 の発現パターンを調べたところ、P (postnatal day) 0 では毛包

外層の epithelial sheath に局在することがわかった。P3 前後でこの発現はピークに達し、P15 の退行期に発現が低下した。休止期 (P22) にはバルジ領域、2 次毛芽に、成長期 (P28) になると再び epithelial sheath に発現し、Sox13 の発現は毛周期で厳密に制御されていること

が示唆された。

(6) Sox13 の毛包における発現

Sox13 が epithelial sheath のどこに発現しているのか、毛包の各部位に特異的な抗体との共発現を調べた。その結果、Sox13 は外毛根鞘マーカーである K14 とオーバーラップして発現しているものの、内毛根鞘マーカーである K71 とは毛包下部で部分的にオーバーラップしているのみで、キューティクル (K82)、毛皮質 (K85) のマーカーとはオーバーラップがみられなかった (文献)。

(7) Sox13 欠損マウスの表現型の発現

LacZ 遺伝子をホモにもつ *Sox13^{LacZ/LacZ}* マウスは、Sox13 のノックアウトマウスに相当するが、見かけ上毛の異常はなく、毛包の長さもコントロールマウスと差がなかった。また、組織学的にも毛包の形成異常は見られなかった (文献)。

(8) 今後の展望

Vps34 と乾癬の関係については、Vps34 の欠失による乾癬様の表現型が、オートファジーの異常によるものか、エンドサイトーシスの異常によるものかをさらに詳しく解析する予定である。その点が明らかにできれば、尋常性乾癬の病態に斬新な観点を提供できるだけでなく、メンブレントラフィック経路を作用点とする、新しい尋常性乾癬の治療薬の開発が期待できる。

毛包形成期における Sox13 の発現パターンは、これまでに毛包形成の初期のマーカーとして報告されている Shh, Sox9, Lhx2, Lgr6 などと非常に似ており、これらの因子同様、Sox13 も毛包の形態形成期の最も早期に発現するマーカーである。

Sox13 は毛包形成の初期から発現しているにも関わらず、*Sox13^{LacZ/LacZ}* マウスで異常がみられなかったのは、他の Sox ファミリー、あるいは Sox13 と相互作用する因子によって相補されているためと考えられる。

Sox9 (グループ D) は Sox5 や Sox6 とヘテロダイマーを形成して、軟骨細胞やオリゴデンドロサイトの分化にかかわることが報告されている。Sox5 や Sox6 と同じグループに属する Sox13 も Sox9 とヘテロダイマーを形成して、毛包幹細胞の分化に関与している可能性がある。

引用文献

Jaber N. et.al. Class III PI3K Vps34 Plays an Essential Role in Autophagy and in Heart and Liver Function. *Proc Natl Acad Sci USA*.2012;109:2003-2008.

van der Fits et al Imiquimod-induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J Immunol*.2009;182:5836-5845.

Sox13 is a novel early marker for hair follicle development.
Noto M, Noguchi N, Ishimura A, Kiyonari H, Abe T, Suzuki T, Hasunuma N, Taira M, Manabe M, Osada SI. *Biochem Biophys Res Commun*.2019;509:862-868.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomura Y, Noto M, Yamada K, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M	4. 巻 45
2. 論文標題 Skin grafting cases by negative pressure wound therapy for the treatment of skin tumors and intractable cutaneous ulcers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Akita J Med	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umezono Y, Sato Y, Noto M, Yamada K, Noguchi N, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M	4. 巻 46
2. 論文標題 Incidence rate of cutaneous squamous cell carcinoma is rapidly increasing in Akita Prefecture: Urgent alert for super-aged society	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 259-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noto M, Noguchi N, Ishimura A, Kiyonari H, Abe T, Suzuki T, Hasunuma N, Taira M, Manabe M, Osada SI.	4. 巻 509
2. 論文標題 Sox13 is a novel early marker for hair follicle development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 862-868
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.12.163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 能登 舞, 長田真一, 野口奈津子, 蓮沼直子, 眞鍋 求
2. 発表標題 マウス毛包発生におけるSoxファミリー転写因子の時空間的な発現および機能の解析
3. 学会等名 第26回毛髪科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noto M, Noguchi N, Manabe M, Osada SI
2. 発表標題 Sox13 is a novel marker for hair follicle development and differentiation
3. 学会等名 49th Annunal European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 能登 舞(分担)、梅林芳弘(編)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 168
3. 書名 ナースができる！皮膚病変の見極め術(トリアージ)40	

〔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
---------------------------	-----------------------	----