

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16018

研究課題名(和文)皮膚バリア不全に伴う細胞性免疫低下に関わる新規機序の解明

研究課題名(英文) A mechanism regulating immunosuppression associated with defective epidermal barrier function

研究代表者

石塚 洋典 (ISHITSUKA, YOSUKE)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：50778628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚の最外層に存在する表皮は、異物や病原体の侵入に対する物理的なバリアである。一方で、このような抗原に対する過剰な免疫反応はアレルギーや自己免疫疾患につながる。表皮細胞間に存在するランゲルハンス細胞(LC)は、角質層を超えて侵入した抗原を捉えて過剰な免疫応答を抑制し、生体恒常性を維持する。LCの機能と表皮の分化(角化)がどのように維持されているのかは明らかでなかった。申請者は、本研究を通して角化に関連する主要な蛋白質であるロリクリンがLCの機能を直接制御することによって免疫反応を制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は表皮が単なる物理的障壁としてではなく、免疫担当細胞の機能分化制御する“場”として機能している可能性を示した。特に以前よりin vitroで指摘されていたように、表皮分化が循環移動性樹状細胞の最終分化に直接的な影響を及ぼす可能性も示唆している。本知見を応用すれば、皮膚局所の疾患制御のみならず、全身の免疫反応を制御することによる自己免疫やアレルギー疾患の新規治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The epidermis, the uppermost protective layer of the integument, serves as a protective shield against foreign materials or pathogens. However, excessive inflammatory responses cause tissue-destructive consequences, such as allergy or autoimmunity. Epidermal Langerhans cells (LCs) sense antigens penetrating the interstitial space downward, regulating inflammatory responses, and contributing to tissue homeostasis. It has not been clear how LC's critical immunoregulatory function is controlled within the epidermal niche. The investigator found that the major epidermal differentiation protein loricrin regulates LC's differentiation and function through the project.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮 角化 ロリクリン ランゲルハンス細胞 細胞間接着 TGF-

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

表皮の再外層を被覆する表皮は、物理的外傷に対する防御壁として作用するばかりでなく、外傷等の非得意的刺激に応じてイトカインを産生することによって、主として  $T_{H17}/T_{H2}$  型の炎症反応を惹起する (1)。表皮最終分化層である角層の透過性バリア機能を維持するフィラグリン (FLG) やデスモグレイン等の機能欠失変異とアトピー性皮膚炎 (AD) との関わりが注目を浴びる一方で、AD に見られる表皮分化不全に伴う細胞性免疫の低下の意義や機序の詳細について着目した研究は皆無であった。また、表皮抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞 (LC) は、炎症惹起よりもむしろ炎症抑制性の機能が重要視されつつあった(2)。さらに角化の遺伝子発現調節に重要な1番染色体長腕の Epidermal differentiation complex 中の遺伝子多型の中で、AD と優位な相関を示したのは FLG のみであった (3)。そこで申請者らは、表皮の最終分化蛋白であるロリクリン (LOR) に着目した。研究開始までに、ロリクリン欠損 (LKO) マウスの表現型解析を通して、1. KEAP1/NRF2 系を介した抗酸化応答によるバリア修復 (4, 5)、2. LOR が角層透過性バリア機能とは独立して発達する可能性 (6, 7)、3. 紫外線防御等物理的な障壁としての角層の重要な役割に寄与している可能性を明らかにしていた (8, 9)。さらに LKO マウスは、AD の病態に深く関与する接触過敏症 (CHS) が抑制されていることも見出し、これまでに明らかでなかった角化細胞と LC との直接作用を介した LOR の免疫調節作用を強く疑った。

### 2. 研究の目的

抗酸化環境応答としての角化と AD や尋常性乾癬 (PsO) との関わりを明らかにするとともに、LKO マウス表皮における LC の表現型解析を通して LOR の免疫機能分化に与える役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) LC 欠損マウスを用いて LKO マウスにおける CHS 抑制と LC の表現型との関わりを明らかにする。
- (2) 電子顕微鏡的観察を通して、これまでに明らかにされていなかった LKO マウスにおける出生後の角層バリア維持機能を明らかにする。
- (3) LKO マウスにおける皮膚バリア修復機序に関わることが知られている KEAP1/NRF2 系を介した抗酸化応答を介した AD および尋常性乾癬における病態修飾機序を明らかにする。
- (4) LC が関与するとされる芳香族炭化水素 (DMBA) を用いた化学発癌系における LKO マウスの表現型を解析し、LOR の抗酸化応答における役割を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) LKO マウスにおける CHS は、先天的に LC を欠損する Langerin (Lg)-DTA マウスと交配すると、野生型 (WT) と同水準まで回復した。一方で養子移入による検討からは、この免疫抑制に LC は直接的な関与がないことが明らかにされた。今後は LC の生体内挙動を確認するためにレポーターマウス (Lg-EGFP マウス) を用いて生体内挙動を検討するとともに、制御性 T 細胞 (Treg) を条件付きで欠損する DEREG マウスを用いて免疫抑制が Treg を介した反応であることを明らかにする。
- (2) LKO マウスにおける角層間脂質は WT と同等であり、テープによる角層除去後の経皮水分蒸散量で評価したバリア修復能も WT と同様であったが、NRF2 を欠損させるとその修復反応優位に抑制された。査読付き英文誌に公表済み (10)。
- (3) NRF2 欠損マウスは、イミキモド塗布による乾癬型組織反応が増悪していた (11) 一方で、ハプテン反復塗布によって誘発した AD 様皮膚反応が WT と比較して著明に減弱していた (12)。このことは、KEAP1/NRF2 系を介した抗酸化応答が角層修復を促す一方で、物理的組織傷害に応じた炎症反応を惹起していることが示唆された (13)。査読付き英文誌に公表済み (11, 14)。
- (4) LKO マウスでは DMBA/TPA を用いた二段階化学発癌に対して感受性が高く、LOR を介した表皮細胞の成熟が、表皮の抗酸化応答能に主要な役割を果たしていることを示唆した (15)。査読付き英文誌に公表済み (15)。
- (5) 以上の研究成果より、毛包間表皮の分化状態によって皮膚の組織反応性が制御されるとい

う独創的な作業仮説 “ structural imprinting–皮膚免疫の刷り込み機構 - ” (13, 16)を着想した。  
今後は基盤研究に移行し、表皮の構造と免疫動態を統合的に解析する。

【参考文献】

1. T. Dainichi, A. Kitoh, A. Otsuka *et al.*, The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol* **19**, 1286-1298 (2018).
2. T. Doebel, B. Voisin, K. Nagao, Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol* **38**, 817-828 (2017).
3. A. S. Paller, J. M. Spergel, P. Mina-Osorio *et al.*, The atopic march and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol* **143**, 46-55 (2019).
4. **Y. Ishitsuka**, A. J. Huebner, R. H. Rice *et al.*, Lce1 Family Members Are Nrf2-Target Genes that Are Induced to Compensate for the Loss of Loricrin. *J Invest Dermatol* **136**, 1656-1663 (2016).
5. A. J. Huebner, D. Dai, M. Morasso *et al.*, Amniotic fluid activates the nrf2/keap1 pathway to repair an epidermal barrier defect in utero. *Dev Cell* **23**, 1238-1246 (2012).
6. Y. Suga, M. Jarnik, P. S. Attar *et al.*, Transgenic mice expressing a mutant form of loricrin reveal the molecular basis of the skin diseases, Vohwinkel syndrome and progressive symmetric erythrokeratoderma. *J Cell Biol* **151**, 401-412 (2000).
7. P. J. Koch, P. A. de Viragh, E. Scharer *et al.*, Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol* **151**, 389-400 (2000).
8. **Y. Ishitsuka**, D. R. Roop, Loricrin Confers Photoprotective Function against UVB in Corneocytes. *J Invest Dermatol* **138**, 2684-2687 (2018).
9. R. H. Rice, B. P. Durbin-Johnson, Y. Ishitsuka *et al.*, Proteomic Analysis of Loricrin Knockout Mouse Epidermis. *J Proteome Res* **15**, 2560-2566 (2016).
10. **Y. Ishitsuka**, T. Ogawa, Y. Nakamura *et al.*, Loricrin and NRF2 Coordinate Cornification. *JID Innov* **2**, 100065 (2022).
11. T. Ogawa, **Y. Ishitsuka**, S. Inoue *et al.*, Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Regulates Epidermal Keratinization under Psoriatic Skin Inflammation. *Am J Pathol* **190**, 577-585 (2020).
12. T. Ogawa, **Y. Ishitsuka**, Y. Nakamura *et al.*, NRF2 Augments Epidermal Antioxidant Defenses and Promotes Atopy. *J Immunol* **205**, 907-914 (2020).
13. Y. Ishitsuka, D. R. Roop, The Epidermis: Redox Governor of Health and Diseases. *Antioxidants* **11**, 47 (2022).
14. T. Ogawa, **Y. Ishitsuka**, Y. Nakamura *et al.*, NRF2 Augments Epidermal Antioxidant Defenses and Promotes Atopy. *J Immunol* 10.4049/jimmunol.2000274 (2020).
15. T. Ogawa, **Y. Ishitsuka**, Y. Nakamura *et al.*, Loricrin Protects Against Chemical Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 10.1016/j.jid.2021.12.015 (2021).

16. **Y. Ishitsuka**, D. R. Roop, T. Ogawa, "Structural imprinting" of the cutaneous immune effector function. *Tissue Barriers* **9**, 1851561 (2021).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 0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 Ishitsuka Yosuke, Ogawa Tatsuya, Nakamura Yoshiyuki, Kubota Noriko, Fujisawa Yasuhiro, Watanabe Rei, Okiyama Naoko, Fujimoto Manabu, Roop Dennis R., Ishida-Yamamoto Akemi	4. 巻 2
2. 論文標題 Loricrin and NRF2 Coordinate Cornification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100065 ~ 100065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xjidi.2021.100065	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Roop Dennis R.	4. 巻 11
2. 論文標題 The Epidermis: Redox Governor of Health and Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11010047	査読の有無 無
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 Ogawa Tatsuya, Ishitsuka Yosuke, Nakamura Yoshiyuki, Watanabe Rei, Okiyama Naoko, Fujisawa Yasuhiro, Fujimoto Manabu, Roop Dennis R., Nomura Toshifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Loricrin Protects against Chemical Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.12.015	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Roop Dennis R.	4. 巻 21
2. 論文標題 Loricrin: Past, Present, and Future	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2271 ~ 2271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072271	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Ogawa Tatsuya, Roop Dennis	4. 巻 9
2. 論文標題 The KEAP1/NRF2 Signaling Pathway in Keratinization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 751 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9080751	査読の有無 無
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 Ogawa Tatsuya, Ishitsuka Yosuke, Nakamura Yoshiyuki, Kubota Noriko, Saito Akimasa, Fujisawa Yasuhiro, Watanabe Rei, Okiyama Naoko, Suga Yasushi, Roop Dennis R., Fujimoto Manabu	4. 巻 205
2. 論文標題 NRF2 Augments Epidermal Antioxidant Defenses and Promotes Atopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 907 ~ 914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000274	査読の有無 無
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 Ogawa Tatsuya, Ishitsuka Yosuke, Inoue Sae, Nakamura Yoshiyuki, Saito Akimasa, Okiyama Naoko, Fujisawa Yasuhiro, Furuta Junichi, Watanabe Rei, Fujimoto Manabu	4. 巻 190
2. 論文標題 Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Regulates Epidermal Keratinization under Psoriatic Skin Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 577 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.10.022	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Roop Dennis R., Ogawa Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 "Structural imprinting" of the cutaneous immune effector function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1851561 ~ 1851561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2020.1851561	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Hanaoka Yuma, Tanemura Atsushi, Fujimoto Manabu	4. 巻 13
2. 論文標題 Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Age of Immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1148 ~ 1148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13051148	査読の有無 無
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 Ishitsuka Yosuke, Roop Dennis R.	4. 巻 138
2. 論文標題 Loricrin Confers Photoprotective Function against UVB in Corneocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2684 ~ 2687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.06.164	査読の有無 無
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 Oya K, Ishitsuka Y, Fujimoto M	4. 巻 98
2. 論文標題 Coccygeal Nodule in an Infant: A Quiz	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 824 ~ 825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-2955	査読の有無 無
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 Ogawa T., Ishitsuka Y., Iwamoto K., Koguchi-Yoshioka H., Tanaka R., Watanabe R., Fujisawa Y., Fujimoto M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Programmed cell death 1 blockade-induced cutaneous sarcoid-like epithelioid granulomas in advanced melanoma: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e260 ~ e261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.14781	査読の有無 無
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 Ishitsuka Y, Iwamoto K, Oya K, Nakamura Y, Watanabe R, Okiyama N, Fujisawa Y, Fujimoto M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Pegylated interferon- 2b for local control of Langerhans cell sarcoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 835-836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3411	査読の有無 無
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 Ogawa T, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Maruyama H, Nakamura Y, Tanaka R, Taguchi S, Fujimoto M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Bilateral metachronous cutaneous apocrine carcinoma with reduced PTEN expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 372-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3292	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Colorado Denver		