

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08747

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎における表皮角化細胞のガレクチン7産生機構とその意義

研究課題名(英文) The mechanisms and its role of galectin-7 production system on epidermal keratinocyte in atopic dermatitis.

研究代表者

島内 隆寿 (Shimauchi, Takatoshi)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90399204

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)：我々はGal-7がアトピー性皮膚炎患者の病変部皮膚と血清で増加しており、さらに血清Gal-7値がバイオマーカーになり得ることを示した。また、Gal-7はIL-4/IL-13刺激によりstat6依存性に培養表皮角化細胞から放出され、細胞接着障害に対する防御に貢献することを見出した。つまり、Gal-7がIL-4/IL-13誘導性の皮膚バリア機能障害を保護する新たなalarminであると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎におけるTh2誘導性の皮膚バリア機能障害がGal-7によって保護されている全く新しい概念を提唱する成果が得られた。これは病理学的、分子生物学的に重要であるばかりか、外的にGal-7を補い、皮膚バリア機能障害を改善させるといふ、アトピー性皮膚炎における新規外用剤の開発へとつながる可能性をも持つ。アトピー性皮膚炎に苦しむ患者は多く、学術的にも社会的にも大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that increased Gal-7 expression levels in both skin lesions and sera in atopic dermatitis (AD) patients. Furthermore, the serum Gal-7 levels could be a biomarker for AD patients. Our in vitro data also showed that IL-4/IL-13 facilitated the extracellular release of endogenous Gal-7 in keratinocytes via STAT6 signaling pathway, that contributes to protection against the disruption of cell adhesion. Our study unveils the characteristic of Gal-7 and its possible role as an alarmin that reflect the IL-4/IL-13-induced skin barrier impairment in AD.

研究分野：アトピー性皮膚炎

キーワード：ガレクチン-7 アトピー性皮膚炎 細胞接着 IL-4 IL-13 Stat6 alarmin バリア機能障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis: AD) 患者は免疫学的に Th2 環境にシフトしており、Th2 サイトカインの IL-4、IL-13 は直接的に表皮角化細胞のフィラグリンの発現を低下させ、皮膚バリア機能障害をもたらす¹⁾。

一方、ガレクチンファミリーは非糖化可溶性レクチンで、 β ガラクトサイドに高い親和性を持ち、蛋白、脂質、微生物に発現する糖鎖と結合することで、様々な生体反応に寄与するとされる。表皮角化細胞ではプロトタイプであるガレクチン-7 (galectin-7: Gal-7) が特異的に発現されており、増殖、分化、アポトーシス、細胞接着といったホメオスタシスに深く関与している²⁾。最近、Gal-7 が E-cadherin と共存することで、表皮角化細胞の形態学的構造の安定化 (stabilization) にも関与することが報告されている³⁾。

AD 患者の表皮角化細胞では、Gal-7 の発現が亢進しており、皮膚バリア障害と正の相関を示すことは既に報告されていた⁴⁾。しかしその病因論的な意義については不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AD 患者における表皮角化細胞の Gal-7 発現亢進が、IL-4/IL-13 刺激誘導性の細胞接着障害を補完させ、形態学的構造を安定化させる“生体防御機構”の一つと推測した。つまり、本研究課題の核心的な問いは、Gal-7 が表皮角化細胞における“stabilizer”としての役割を担っているか?ということであった。以上を踏まえ、本研究の目的を以下に記す。

- 1) 正常表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocytes: NHEKs) の Gal-7 発現亢進のメカニズムを各種サイトカインと細胞内シグナル伝達機構に着目して解析する。
- 2) 3次元培養表皮モデルを作成し、AD 患者における Gal-7 発現パターンの再現を試みる。さらに上記系で Gal-7 発現を抑制させることで、その機能的解析を行う。
- 3) AD モデルマウスにおける表皮角化細胞の Gal-7 発現動態と Gal-7 外的塗布による治療応用への可能性を検証する。

3. 研究の方法

1) 2次元培養 NHEKs における各種サイトカイン刺激下での Gal-7 発現制御とシグナル伝達機構の解明

NHEKs を単純培養し、Th1 (IFN- γ , 50 ng/mL)、Th2 (IL-4+IL-13 各 50 ng/mL)、Th17/Th22 (IL-17+IL-22 各 50 ng/mL) サイトカインを添加し、48 時間培養した。培養後の NHEKs から RNA、蛋白を抽出し、qPCR、western blot 法による Gal-7 の発現解析を行った。培養上清中の Gal-7 濃度を ELISA 法にて測定し、NHEKs 内の Gal-7 発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、STAT シグナル群 (STAT3、5、6) のリン酸化を western blot 法にて解析した。次に、siRNA 法を用いて STAT3、6 をそれぞれ発現抑制させた NHEKs を準備し、IL-4+IL-13 存在、非存在下における Gal-7 発現/産生能を western blot 法、ELISA 法にて解析した。

2) 3次元培養表皮モデルを用いた Gal-7 の機能解析

3次元培養表皮モデルに IL-4+IL-13 (各 50、100 ng/mL) を添加し 48 時間培養した。表皮構造の変化ならびに Gal-7 発現とその分布について qPCR、HE 染色法、免疫染色法を用いて解析した。次に、レンチウイルスベクターを用いた shRNA 法にて Gal-7 発現を抑制した NHEKs を準備し、3次元培養表皮モデルを作成した。得られた Gal-7^{+/-} 3次元培養表皮モデルの IL-4+IL-13 存在、非存在下における病理学的所見、E-cadherin の発現動態を HE 染色法、免疫染色法を用いて評価

した。また、この系に recombinant human Gal-7 投与による変化も観察した。

3) AD モデルマウスにおける表皮角化細胞の Gal-7 発現動態の検証

AD モデルマウスの 1 つである、NC/Nga マウスを用いる。4% SDS で皮膚のバリアを破壊後、マウス背部および耳介部にダニ虫体成分を含む軟膏（ビオスタ[®]AD）を週 2 回、計 3 週間塗布することで、AD 類似の皮膚症状を誘発した。惹起された病変部皮膚における Gal-7 の発現動態を免疫染色で確認した。

4. 研究成果

1) 我々は、AD 患者、尋常性魚鱗癬、正常人の皮膚角層内蛋白に対するプロテオーム解析により 400 種類以上の蛋白を同定し、いくつかの興味深い蛋白について報告した⁵⁾。そこで角層内 Gal-7 値を測定したところ、正常人より高いという結果を得た（図 1 a）。さらに AD 患者病変部皮膚では正常人に比較して、表皮角化細胞間と角層内に Gal-7 が高発現、貯留している像を認めた（図 1 b, c）。また、AD 患者の血清 Gal-7 値は正常人より高く（図 2 a）、バリア障害マーカーである経皮水分蒸散量（trans epidermal water loss; TEWL）（図 2 b）や、SCORAD（図 2 c）を含む多くの病勢マーカーと正の相関を示すことも確認した。

図1 AD患者の表皮角化細胞における Gal-7 の発現増強と角層内、細胞間への沈着

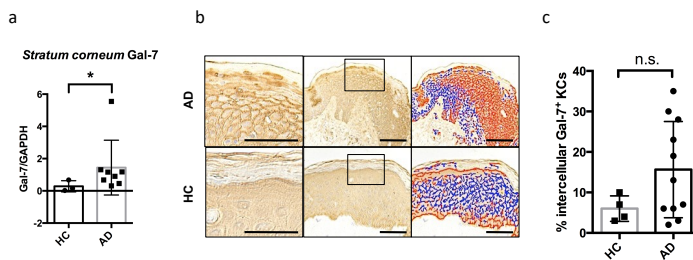
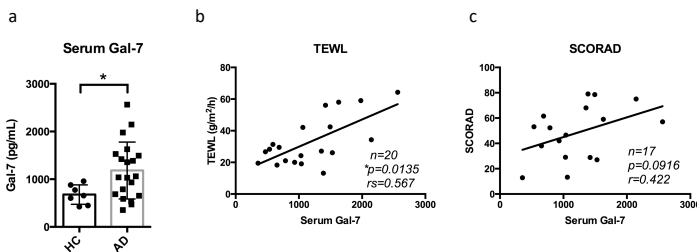


図2 血清Gal-7値はAD患者の病勢マーカー、バリア機能障害と相関する



2) 次に、*in vitro* の系（2次元、3次元培養表皮角化細胞）において、Gal-7 は IL-4/IL-13 刺激により細胞内から細胞外へ放出されることを認めた（図 3a-e）。また、これは IL-4/IL-13 誘導性の stat6 シグナル伝達機構に依存することが示された（図 4a-e）。

図3 2次元, 3次元培養表皮角化細胞からのIL-4/IL-13誘導性Gal-7の放出

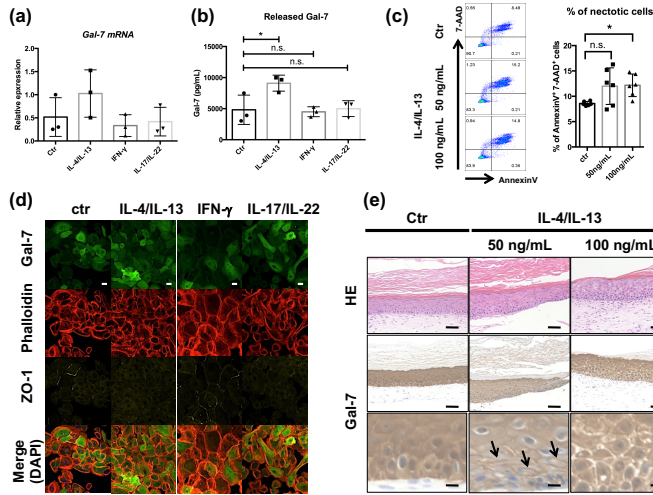
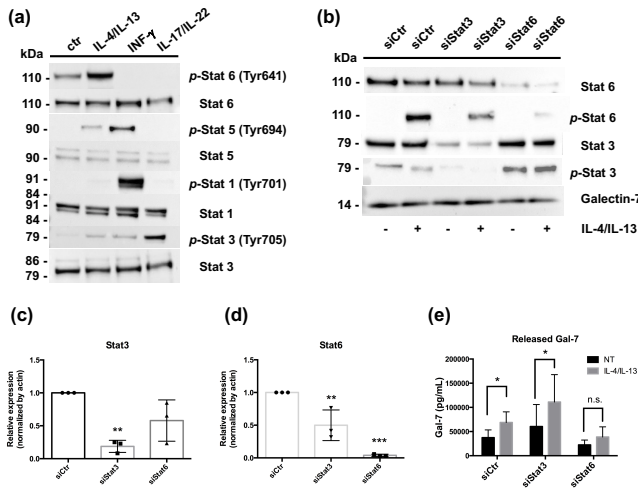
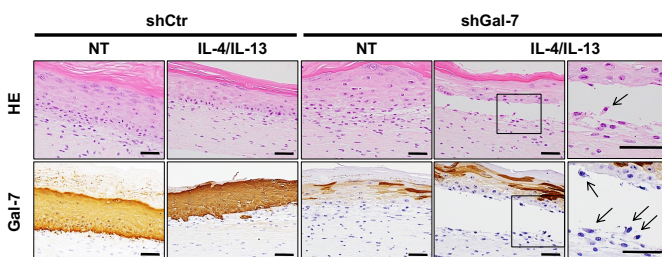


図4 培養表皮角化細胞からのIL-4/IL-13誘導性Gal-7の放出はstat6依存性である



3) Gal-7^{+/-} 3次元培養表皮角化細胞を用いた系では、Gal-7非存在下ではIL-4/IL-13刺激により基底層での接着が破壊され、棘融解細胞様の角化細胞が観察された(図5)。即ち、Gal-7はIL-4/IL-13誘導性の細胞接着障害から表皮角化細胞を保護している可能性を示唆する所見であった。しかし、この系において、E-cadherinとの関連や、外的に投与した recombinant human Gal-7が細胞接着障害を回復させるという証明までには至らなかった。

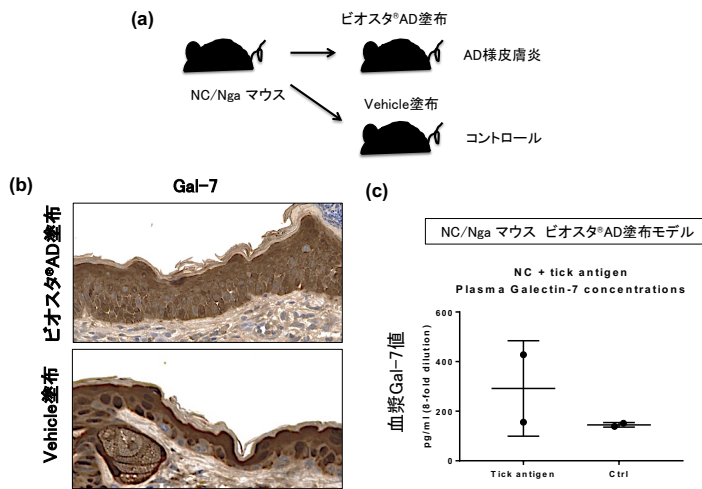
図5 Gal-7はIL-4/IL-13誘導性の表皮角化細胞の接着障害を保護する作用を呈する



4) これまでの知見をADモデルマウスで再現性が得られるか検証した(図6a)。その結果、AD惹起マウスにおいて、病変部皮膚でのGal-7の表皮細胞間への沈着を認めたが、コントロール

群では細胞内に貯留したままであった (図 6b)。さらに血漿中の Gal-7 を測定した結果、AD 惹起マウスにおいて上昇する傾向を認めた (図 6c)。AD マウスモデルについては現在も引き続き検討中である。

図6 AD モデルマウスにおける表皮角化細胞のGal-7発現動態と血漿Gal-7値の上昇



5) 結論

本研究の結果より、血清 Gal-7 値が AD 患者のバイオマーカーになり得ることが示された⁶⁾。また、Gal-7 は IL-4/IL-13 刺激により stat6 依存性に病変部から放出され、細胞接着障害に対する防御に貢献することをも見出した⁶⁾。つまり、Gal-7 が皮膚バリア機能障害を保護する新たな alarmin であると考えられた⁶⁾。本研究は、Th2 誘導性の皮膚バリア機能障害が Gal-7 によって保護されるという全く新しい概念を提唱するものであり、学術的に重要なインパクトを与える。Gal-7 がアトピー性皮膚炎の新規外用治療薬の可能性について、今後も検討していく予定である。

<引用文献>

- 1) Amano W, et al. J Allergy Clin Immunol. 136: 667, e7, 2015.
- 2) Advedissian T, et al. Int J Mol Sci. 18: 2760, 2017.
- 3) Advedissian T, et al. Sci Rep. 7: 17086, 2017.
- 4) Niiyama S, et al. Int J Cosmet Sci. 38: 487-95, 2016.
- 5) Sakabe J, et al. J Allergy Clin Immunol. 134: 957-60, 2014.
- 6) Umayahara T, et al. Clin Exp Allergy. 50: 922-31, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umayahara Takatsune, Shimauchi Takatoshi, Iwasaki Manami, Sakabe Jun ichi, Aoshima Masahiro, Nakazawa Shinsuke, Yatagai Tsuyoshi, Yamaguchi Hayato, Phadungsaksawasdi Pawit, Kurihara Kazuo, Tokura Yoshiki	4. 巻 50
2. 論文標題 Protective role of Galectin 7 for skin barrier impairment in atopic dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Allergy	6. 最初と最後の頁 922 ~ 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.13672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島内隆寿
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎における海綿状態とその意義
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatoshi Shimauchi, Takatsune Umayahara, Manami Iwasaki, Masahiro Aoshima, Shinsuke Nakazawa, Yoshiki Tokura
2. 発表標題 A potential role of galectin-7 as a stabilizer for IL-4/IL-13-induced barrier disruption in atopic dermatitis
3. 学会等名 International Eczema Council at the SID Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------