

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08792

研究課題名(和文)慢性皮膚炎症に伴う細胞老化における代謝とエピゲノム変化の役割

研究課題名(英文)A role of remodelings of metabolism and epigenome code in the cellular senescence associated with chronic dermatitis

研究代表者

大森 深雪 (Omori-Miyake, Miyuki)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30462667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、慢性皮膚炎症において、表皮ケラチノサイトで起こるエピゲノム変化および代謝変化の役割を明らかにすることを目的として行われた。研究の結果、特定の環境刺激がエピゲノム変化関連因子の発現を減弱させること、この因子の恒常的な発現低下は、表皮における規則だった構造分子の発現異常、環境刺激に対する増殖応答、解糖系代謝トランスポーター発現の低下、炎症応答による特定の免疫細胞の集積の減弱を起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんや免疫細胞の先行研究で進みつつある慢性炎症とエピゲノム変化や代謝変化との関連性について、本研究では初めて表皮を対象に検討した。その結果、表皮の様な体細胞でも、エピゲノム変化関連因子の発現は、代謝状態の変化や炎症応答性の性状変化に関与することが示唆された。この発見は、長期間の加療を必要とする慢性皮膚疾患において、エピゲノムや代謝を標的とした創薬の研究基盤の構築に大いに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Our present study has been performed to unveil roles of metabolic and epigenetic remodeling in epidermal keratinocytes under chronic dermatitis settings. As results, we found that a TLR7 agonist could have regulated the expression of menin and that the deficiency of menin in keratinocytes led to dysregulations of layer-dependent expressions of epidermal structural proteins, proliferative responses, the expression of a glucose transporter, and the infiltration of immune cells in response to repeated applications of an antigen.

研究分野：免疫学、皮膚科学

キーワード：慢性炎症 皮膚 エピゲノム 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は体表を覆う最大の臓器であり、皮膚の表層にある表皮には、日常生活で経験する外来異物への接触や紫外線への暴露など、環境からの刺激を絶えず受けるという特徴がある。表皮を構成するケラチノサイトは、増殖と機能獲得を繰り返しながら再生され続けることで、外来性の刺激から表皮以深の皮膚を防御する機能を担っている。しかし、外来性の刺激が表皮に加わると、表皮は一過性の炎症状態となる。炎症状態の表皮は、サイトカインを介して皮膚常在型の免疫細胞を活性化する。免疫細胞の活性化状態は概ね一時的で、時間の経過とともに収束するが、アレルギー性皮膚炎のような特定の外因性抗原への接触が断続的に続く場合や、自己免疫性皮膚炎やがんのような特定の内因性抗原への暴露が継続的に続く場合には、炎症が慢性化する。

体内の個々の細胞では、“代謝とエピゲノムの適切な管理”のもとに恒常性が維持されている。実際、中心炭素代謝を担う一部の中間産物や補酵素の中には、エピゲノム変化を起こすもの含まれており、両者は相互に関連し細胞システムを支えていることが近年の研究で明らかになってきた。しかし、増殖や機能獲得が著しく亢進する炎症下の活性化した細胞では、定常状態の“代謝とエピゲノムの適切な管理”が一時的に乱されるものと考えられる。また、“代謝とエピゲノムの適切な管理”の乱れが慢性化する場合には、代謝やエピゲノムの変化が繰り返されるうちに、不可逆的な変化、つまり、疲弊形質や老化形質の獲得が起こることが最近の T 細胞の研究で明らかにされている。同様の現象が、炎症が慢性化した表皮でも起こるものと想定される。

しかし、一時的あるいは慢性的な炎症状態にある表皮ではどのような“代謝とエピゲノムの適切な管理”の乱れが起こるのか、さらに言えば、定常状態の表皮における“代謝とエピゲノムの適切な管理”とはどのようなものであるのか、ということについての包括的な研究は、ほとんど進んでいないのが実情であった。

2. 研究の目的

以上の研究背景をもとに、本研究では、慢性皮膚炎症において、表皮細胞で起こる代謝変化およびエピゲノム変化の役割を明らかにすることを最終的な目的とした。具体的には、エピゲノム変化に関わるヒストン修飾関連因子を表皮特異的に欠損したマウスを掛け合わせにより作製し、定常状態の表皮における組織・細胞形態および性状の変化、慢性皮膚炎発症時の表皮における組織・細胞形態および性状の変化、慢性皮膚炎発症時の表皮における代謝状態の変化について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、タモキシフェン投与により、ケラチン 14 プロモーター依存的にヒストン修飾関連因子を欠損できるマウスを用いた。最初に、タモキシフェン投与の経路・部位・量などの基礎実験を行った。タモキシフェン投与条件は、投与後のマウスの局所の皮膚状態、掻破行動、遺伝子欠損状態の維持を指標に決定した。続いて、ヒストン修飾関連因子を表皮特異的に欠損させたマウスで、定常状態の表皮の形態と性状を組織学的に解析した。最後に、ハプテンの反復塗布によるアレルギー性皮膚炎モデル、TLR7 アゴニストの反復塗布による乾癬様皮膚炎モデル、紫外線の反復照射による光老化モデルにより慢性皮膚炎を発症させ、表皮の構造分子の発現、組織学的な変化、老化形質を指標として、研究に用いる実験系をしぼった。その慢性皮膚炎下にある表皮について、ヒストン修飾関連因子の発現と代謝関連分子の発現を測定し、表皮細胞の性状とヒストン修飾関連因子・代謝関連分子の発現との関連性を考察した。

4. 研究成果

タモキシフェン投与条件に関しては当初、先行研究を参考に設定する予定であったが、マウスの目視観察の結果、掻破行動を誘発することから基礎実験が必要という見解に至った。投与経路に関しては、ケラチン 14 の発現が表皮以外の上皮細胞にも認められることに鑑みて、血行性ではなく、局所的な塗布が適切という結論に至った。投与経路に関しては、耳介皮膚への塗布、背部皮膚への塗布、尾部皮膚への塗布を検討した。表皮形態がヒトの表皮に最も近いと言われていた尾部の皮膚では、タモキシフェン塗布後にマウスの掻破行動が顕著であったことから、掻破しにくい部位として、耳介皮膚あるいは背部皮膚への塗布がより適切であるという結論に至った。タモキシフェン投与量に関しては、先行研究を参考に設定したものの、一部のマウスで掻破行動がみられたこと、耳介塗布で一過性の腫張が認められたことから、先行研究より低濃度の 3 mg / mL 濃度で塗布することとし、塗布後の腫張が収束する 2 週間程度経過してから、実験に用いることとした。また、標的遺伝子の欠損状態は、タモキシフェンの塗布終了後、1 ヶ月以上は維持されていることを遺伝子発現解析および免疫組織染色により確認した。

ヒストン修飾関連因子として、研究開始当初は、H3K27 のメチル化関連因子および H3K

4 のメチル化関連因子に着目し、表皮特異的欠損マウスの作製を行った。しかし、新規性の観点から、H3K4 のメチル化関連因子を対象をしばって研究を進めることとした。H3K4メチル化関連因子欠損マウスでは、分化途上のケラチノサイトに発現する構造分子ケラチン1の発現が2週間後の時点では低下し、4週間後には増加に転じていた。また、4週後の表皮を組織学的に観察すると、有棘層より表層で見られる扁平な細胞形態が、H3K4メチル化関連因子欠損マウスではより深層から観察されていた。

耳介でアレルギー性皮膚炎を発症させたマウスを観察してみたところ、耳介腫張に有意な差異は認められなかったものの、H3K4メチル化関連因子欠損マウスの表皮では、対照マウスの表皮に比べて、扁平な細胞や有顆粒の細胞がより深層まで広範に分布していた。有棘層以降のケラチノサイトで発現するケラチン1および顆粒層のケラチノサイトで発現するフィラグリンの免疫組織染色を行なったところ、両分子の発現は細胞形態の傾向と一致して、H3K4メチル化関連因子欠損マウスでより広範の細胞に発現が認められた。また、真皮に浸潤した免疫細胞の形態的差異を認めたことから、局所耳介から回収した免疫細胞をフローサイトメトリーで同定した。その結果、皮膚に集積した樹状細胞、マクロファージ、CD4陽性T細胞の数が、H3K4メチル化関連因子欠損マウスで減少していることが明らかとなった。

耳介で乾癬様皮膚炎を発症させたマウスを観察したところ、H3K4メチル化関連因子欠損マウスの耳介腫張は、対照マウスより軽度であった。この実験モデルでは、表皮基底層の細胞で激しい細胞増殖が認められるが、増殖応答をKi67の免疫組織染色で解析したところ、H3K4メチル化関連因子欠損マウスではKi67陽性細胞の存在頻度が有意に低下していた。表皮を構成する構造分子の発現分布を免疫組織学的に解析したところ、通常、基底層・有棘層・顆粒層のそれぞれ限定的に発現するケラチン5、ケラチン1、フィラグリンの発現が、H3K4メチル化関連因子欠損マウスではより広範な発現域を示すことが明らかになった。

アレルギー性皮膚炎あるいは乾癬様皮膚炎を発症させたマウスの表皮において、解糖系代謝関連因子GLUT1の発現を定量的PCRで確認したところ、いずれの実験系でも、H3K4メチル化関連因子欠損マウス表皮でGLUT1の発現が低下していた。さらに、乾癬様皮膚炎の発症させた対照マウスの表皮では、H3K4メチル化関連因子の発現が減弱していた。

最後に、細胞老化を伴う慢性皮膚炎症モデルとして、紫外線連続照射による光老化の誘導を試みたが、本研究に用いた実験条件では、老化細胞で上昇するSA- β -galactosidase活性のある細胞は検出されなかった。

以上を総括すると、特定の環境刺激がH3K4メチル化関連因子の発現を減弱させること、表皮における恒常的なH3K4メチル化関連因子の欠損状態は、環境刺激応答性の表皮細胞の分化・増殖応答・免疫細胞へのクロストーク能を変化させることが明らかになった。また、定常状態でH3K4メチル化関連因子の欠損がおこる状況下において、表皮細胞の正常な分化、つまり恒常的なバリア機能の維持に影響する可能性がある、ということが示唆された。特定の環境刺激によるH3K4メチル化関連因子の発現低下はどのようなメカニズムで起こり、その影響はどのくらいの期間持続するのか、H3K4メチル化関連因子欠損の表皮性状への影響は可逆的なのか、あるいは不可逆的なのか、老化細胞が高頻度で存在する表皮では、どのような表皮性状への影響が観察されるのか、については将来の研究展望とする。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------