

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16600

研究課題名(和文) 乾癬病態形成におけるNF- κ B1の役割の解析研究課題名(英文) Roles of NF- κ B1 in imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis

研究代表者

鈴木 一正 (Suzuki, Kazumasa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40835089

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)：乾癬の病態形成では、ケラチノサイトへのIL-17A刺激が重要であるが、ケラチノサイト内IL-17Aシグナルについては不明な点が多い。本研究者は乾癬の疾患感受性遺伝子でありIL-17Aシグナルの下流分子であるNF- κ B1に注目し、NF- κ B1欠損マウスにおけるImiquimod誘導性乾癬様皮膚炎を解析し、NF- κ B1欠損マウスでは乾癬様皮膚炎が減弱することを見出した。また、野生型マウスおよびNF- κ B1欠損マウスから純化したケラチノサイトをIL-17Aで刺激し、刺激前後の遺伝子発現変化をRNAシーケンス法にて網羅的に解析し、その中でも特に重要と考えられる遺伝子の欠損マウスの作成を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は、本邦で約40万人の患者が存在する慢性の炎症性角化症である。生物学的製剤の開発により治療成績は向上したが、一部患者は治療抵抗性であり、さらなる治療戦略確立が急務である。ケラチノサイトへのIL-17A刺激が乾癬の病態形成に中心的な役割を果たしていることが明らかにされているが、ケラチノサイト内IL-17Aシグナルについて不明な点が多い。本研究では、ケラチノサイトにおけるIL-17A-NF- κ B1シグナルを解析し、NF- κ B1が発現誘導し乾癬の病態形成に関与する分子を明らかにした。さらに、当該分子が関与する乾癬病態の一端を明らかにし、乾癬の新規治療法開発に向けた基盤の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that IL-17A stimulation to keratinocytes is an important factor in the pathogenesis of psoriasis. However, the signaling pathway of IL-17A in keratinocytes has not been well understood. We focused on NF- κ B1, which is a disease susceptibility gene for psoriasis and is a downstream molecule of IL-17A signaling. We revealed that imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis was attenuated in NF- κ B1-deficient mice compared to those in wild-type mice. Then, I performed RNA-seq analysis of primary cultured keratinocytes stimulated with IL-17A, purified from wild-type mice and NF- κ B1-deficient mice. As the result, we revealed that the gene expression profile of NF- κ B1-deficient keratinocytes was significantly different from that of wild-type keratinocytes. Among them, we attempted to generate transgenic mice which lack the gene considered to be particularly important in the RNA-seq analysis.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：乾癬 ケラチノサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬は、本邦で約 40 万人の患者が存在する慢性の炎症性角化症であり、代表的な Th17 細胞性疾患と考えられている。TNF-A、IL-12/23p40、IL-17A などを標的とした生物学的製剤の開発により治療成績は向上したが、一部の患者は治療抵抗性であり、治療中断後の再燃率も高く、さらなる治療戦略の確立が急務であった。

IL-17A を標的とした生物学的製剤の乾癬に対する高い有効性より、IL-17A が乾癬の発症・増悪に中心的な役割を果たしていることは明らかであるが、IL-17A がどのように乾癬の病態に寄与しているかは不明であった。ケラチノサイトの異常増殖が乾癬の中心的病態であること、IL-17A がケラチノサイトの増殖を誘導すること (J Allergy Clin Immunol 2017;140(3):645) より、ケラチノサイト内の IL-17A シグナルが乾癬の発症・増悪に重要な役割を果たしていることが推測されたが、その詳細は依然不明であった。

Sheng らは乾癬患者のゲノムワイド関連解析より、新たな乾癬の疾患感受性遺伝子として NF- κ B1 を同定し、NF- κ B1 が乾癬の発症あるいは増悪に関与している可能性を示した (Nat Commun 2014;5:4331)。また、Nikamo らは、NF- κ B1 のイントロン領域の遺伝子多型が、乾癬の病態悪化に関与している可能性を示した (J Invest Dermatol 2015: 135; 1969)。NF- κ B ファミリー分子である NF- κ B1 は、TNF-A、IL-17 などのサイトカイン刺激により RelA とヘテロダイマーを形成し、核内に移行後、標的遺伝子の転写を促進する一方で、RelA 以外の NF- κ B ファミリー分子ともヘテロダイマーを形成し、様々な遺伝子の転写調節に関与していることが知られている。しかしながら、NF- κ B1 がどのように乾癬の病態形成に関与しているかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究者は乾癬の疾患感受性遺伝子であり、IL-17A シグナルの下流分子である NF- κ B1 に注目し、ケラチノサイトにおける IL-17A-NF- κ B1 シグナルを解析し、NF- κ B1 が発現誘導し乾癬の病態形成に寄与する分子機構の同定を目指す。本研究により乾癬の病態解明とともに、新規治療法開発に向けた基盤が確立される。

3. 研究の方法

(1) Imiquimod 誘導性乾癬モデルは、Imiquimod を 5-8 日程度繰り返し塗布することで乾癬様の病態を誘発することができるマウスモデルとして、近年頻用されている (J Immunol 2009: 182(9):5836)。野生型マウスと NF- κ B1 欠損マウスに Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎を誘起し、皮膚病理組織、PASI (psoriasis area and severity index) score を指標に比較検討した。

(2) 野生型マウスおよび NF- κ B1 欠損マウスから純化したケラチノサイトを IL-17A で刺激し、刺激前後の遺伝子発現変化を RNA シークエンス法にて網羅的に解析した。

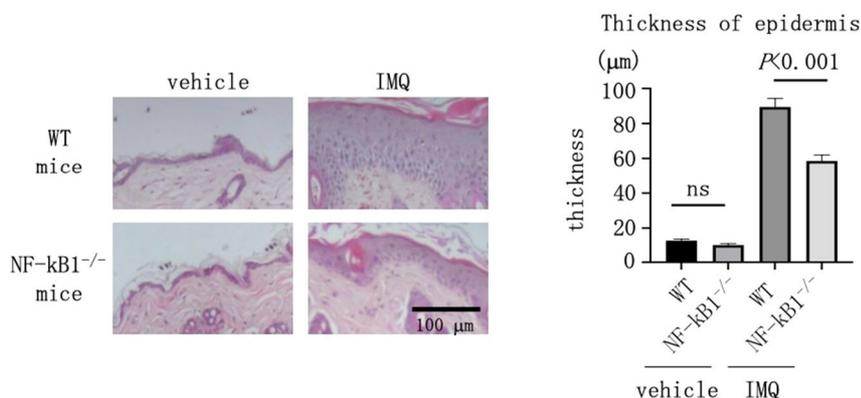
(3) 野生型マウスと NF- κ B1 欠損マウスに Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎を誘起し、皮膚局所から RNA を抽出した。抽出した RNA について qPCR を行い、皮膚局所における上記遺伝子の発現プロファイルを qPCR 法でも解析した。

(4) CRISPR/Cas9 システムを用いて、上記遺伝子の中で特に乾癬の病態形成に重要と思われるものについて遺伝子欠損マウスの作成を試みた。

(5) 本学皮膚科より乾癬患者の皮膚生検組織の供与を受け、乾癬患者皮膚部における上記遺伝子の発現を qPCR 法及び免疫組織染色にて評価する。これら分子の発現と乾癬患者の臨床情報(病型、臨床経過、治療反応性など)との相関を解析する。

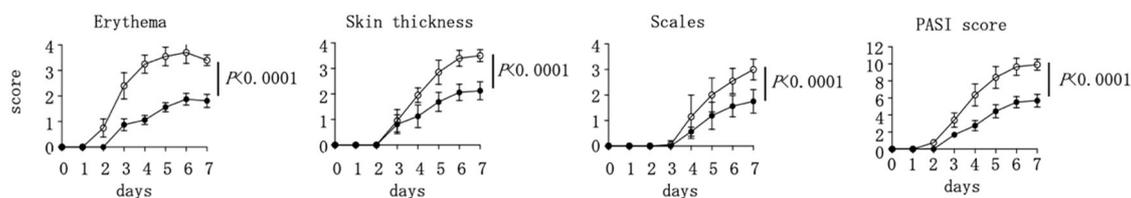
4. 研究成果

(1) 野生型マウスと NF- κ B1 欠損マウスに Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎を誘起し、皮膚



(図1) NF- κ B1欠損マウスにおけるImiquimod誘導性乾癬

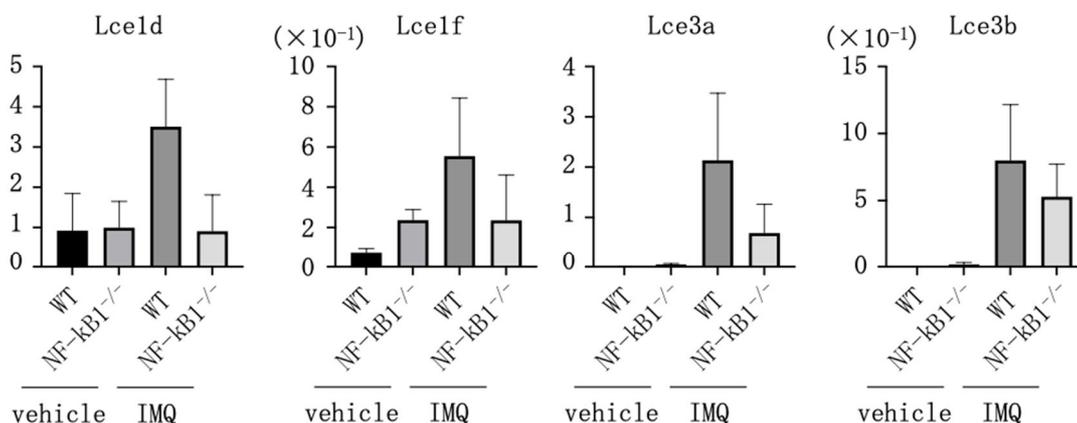
病理組織、PASI (psoriasis area and severity index) score を指標に比較検討し、NF-kB1 欠損マウスでは野生型マウスに比して Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎が軽症化することを見出した (図 1,2)。



(図2) NF-kB1欠損マウスにおけるPASI score

(2) 野生型マウスおよびNF-kB1 欠損マウスから純化したケラチノサイトを IL-17A で刺激し、刺激前後の遺伝子発現変化を RNA シークエンス法にて網羅的に解析した。その結果、NF-kB1 欠損マウス由来のケラチノサイトでは野生型マウスに比して、IL-17A 誘導性の IL-17C、CXCL1、s100a8、Zc3h12a、IL-36 ファミリー遺伝子などの RNA 発現が著明に減弱することを見出した。IL-17C と IL-36 ファミリー分子は乾癬病変部位で炎症性サイトカインやケモカインの産生を促進することにより乾癬の病態形成に寄与する可能性が示されており (J Immunol 2013;190(5);2252、J Immunol 2014;192(12);6053)、これらの分子の発現量低下がNF-kB1 欠損マウスで Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎が軽症化する一因である可能性がある。さらに本研究者は、野生型マウスのケラチノサイトとNF-kB1 欠損マウスのケラチノサイトで LCE (late cornified envelope) ファミリー遺伝子とSPRR (small proline rich protein) ファミリー遺伝子の RNA 発現プロファイルが著明に異なることを見出した。皮膚のバリア機能において重要な役割を担っている表皮角層バリアは細胞骨格関連タンパクの架橋構造と細胞間脂質により構成され、病原生物やアレルゲンなどの侵入を物理的に阻止し皮膚組織の恒常性を維持している。細胞骨格関連タンパクの架橋構造は、細胞膜を細胞内から裏打ちする周辺帯と呼ばれる構造に大きく依存し、LCE タンパクやSPRR タンパクは、角層ケラチノサイトの周辺帯を形成するタンパクとして知られている。またChiricozziらは、IL-17A 刺激によりヒトケラチノサイトでSPRR 遺伝子の発現が上昇すること (J Invest Dermatol 2011;131;677)、de Cidらは、乾癬患者のゲノムワイド copy number variants 解析でLCE3B とLCE3C の欠損により乾癬の発症頻度が著明に上昇すること (Nat Genet 2009;41;211)を示した。以上より、LCE タンパクやSPRR タンパクが乾癬の病態形成に関与していることが示唆されるが、これらの分子群がどのように乾癬の病態形成に寄与しているかは依然不明である。

(3) 野生型マウスおよびNF-kB1 欠損マウスに Imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎を惹起し、皮膚局所におけるLCE、SPRR 遺伝子の発現プロファイルをqPCR法でも解析し、上記遺伝子が乾癬の病態形成に置いて重要な役割を果たしていることを示した (図3)。



(図3) 皮膚局所におけるLCE、SPRR遺伝子の発現プロファイル

(4) さらにCRISPR/Cas9システムを用いて、その中でも特に重要と考えられる遺伝子のケラチノサイト特異的遺伝子欠損マウスの作成を試みた。しかしながら、CRISPR/Cas9システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスの作成には技術的な困難が伴い、作成には至っていない。今後は、floxedマウスを入手或いは定法により作成し、KRT14-Creマウスと交配することにより、ケラチノサイト特異的遺伝子欠損マウスを作成する方針としている。

(5) 現在倫理審査の申請を行なっているところである。

今後も上記の NF- κ B1 誘導性分子の乾癬の病態形成における役割、その作用機構について解析を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田匡志、鈴木浩太郎、鈴木一正、田中繁、岩田有史、中島裕史
2. 発表標題 ポドサイトに発現するSOCS3はIMQ誘発性ループスにおいて糸球体腎炎を抑制する
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木一正、影山貴弘、古田俊介、池田啓、加々美新一郎、杉山隆夫、海辺剛志、渡邊紀彦、中島裕史
2. 発表標題 自己免疫疾患患者におけるニューモシスチス肺炎の予後
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木一正、鈴木浩太郎、福田匡志、岩本太郎、田中繁、横田雅也、岩田有史、前澤裕子、須藤明、中島裕史
2. 発表標題 Roles of NF- κ B1 in imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
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
---------	---------