

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591476

研究課題名（和文）モデルマウスを用いた乾癬の病態解明及び治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the therapy for psoriasis by using mouse model

研究代表者

樽谷 勝仁 (TARUTANI MASAHIRO)

高知大学・教育研究部・医療学系・准教授

研究者番号：30301261

研究成果の概要（和文）：

マウスの表皮に Raf を誘導すると乾癬様の表皮肥厚が起こる。この表皮肥厚では乾癬の皮疹で上昇するサイトカインの上昇がみられることが判明した。この Raf 誘導性のマウスの表皮肥厚には好中球の浸潤が認められたため、好中球に対する抗体を投与すると Raf 誘導性表皮肥厚は軽減された。次に乾癬皮疹の形成に重要である Stat3 を欠損させるとこの Raf 誘導性の乾癬様の表皮肥厚は減弱し、Raf 誘導乾癬様皮疹の形成に Stat3 が重要な役割を果たしていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Psoriasis-like skin hyperkeratosis appeared by expressing Raf protein in mice skin by using tamoxifen induced Raf transgenic mice. And the cytokines, which increase in psoriatic skin also elevated in these mice skin. As neutrophil infiltration was seen in these Raf induced skin hyperkeratosis, we treated these mice with anti-neutrophil antibody. The result is that hyperkeratosis was diminished. Next, we disrupted Stat3 in these Raf induced mouse skin using stat3 knockout mice, then Raf-induced skin hyperkeratosis was diminished. These data suggest that Stat3 plays an important role for the pathogenesis of Raf induced psoriasis-like mouse skin hyperkeratosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：Raf, IL-17 乾癬、モデルマウス、Stat3

1. 研究開始当初の背景

乾癬は欧米において全人口の約 2% が罹患する非常に頻度の高い慢性の皮膚疾患であり、近年本邦でも患者数が増加中である。乾癬は表皮の異常な増殖とリンパ球など免疫細胞の著明な皮膚への集積を特徴としているが、病因は不明であり表皮か免疫細胞か

どちらの異常によるものかは論争の的であった。免疫細胞の異常に着目した乾癬の新しい治療法として炎症により発症し、その時に産生されるサイトカインである TNF- α に対する抗体が乾癬に対する治療として用いられるようになってきており、日本でも臨床研究が行われつつある。最近では特に Th-17

サイトカインとの関連性が議論されている。逆に表皮細胞の異常が原因ではないかという観点からの研究で表皮細胞のStat3というシグナル伝達蛋白の活性化に引き続き皮膚リンパ球が活性化する結果乾癬が発症するという論文が発表されている。この乾癬の病態解明の手段の1つとしてモデルマウスを用いる方法が挙げられる。モデルマウスとして上記のStat3トランスジェニックマウスを含めた表皮特異的にある蛋白質を発現させたマウス及びJunノックアウトマウスを含めた数種類のノックアウトマウスが乾癬のモデルマウスとして知られている。このマウスの中に表皮分化に伴って発現するインボルクリンのプロモーターの下流にMAPKシグナル伝達経路の下流に位置するMEK1をつなげたコンストラクトを持つトランスジェニックマウスも挙げられており、このマウスは表皮肥厚と炎症細胞浸潤が両方起こることが確認されている。

以前より私はRas-Raf-Mapkのシグナル伝達経路と表皮の増殖についての研究を行っており、表皮にタモキシフェンを塗ったときのみRafとRasを活性化させることができるトランスジェニックマウスを作成し、表皮のみにRafやRas(H-Ras)を活性化させると表皮の肥厚が観察されることと、組織学的に観察すると正常の10倍以上の表皮の肥厚を認め、顆粒層の消失、不全角化が認められることを報告している。

これらマウスの表皮の外観はあたかもヒトの乾癬のような外観を呈しており、表皮特異的に発現を制御できるRas, Rafトランスジェニックマウス(K14-ER:Rasマウス、K14-Raf:ERマウス)では表皮にRasあるいはRafを発現させると表皮肥厚に伴って炎症細胞浸潤も認められるという結果を得た。Rasのシグナル伝達経路の下流にあるAktのトランスジェニックマウスでは表皮肥厚は起こるが、炎症細胞は浸潤しないので、この現象はRas-Raf-MAPK経路特異的に起こる現象であると考えている。

また、ヒトの乾癬の表皮においても活性化されたMAPKは有棘層以上の角化細胞に発現していることが確認されたためにK14-Raf:ERマウスが乾癬のモデルマウスになりうると考え、このマウスの表皮にRafを発現させたときの皮膚に浸潤するサイトカインを調べたところ、IL-18, MCP-1蛋白の上昇が認められ、皮膚所属リンパ節のT cellはインターフェロン γ とIL-17が刺激により上昇し、Th-17サイトカインがRafの表皮における発現に伴って上昇することが確認され、乾癬病変におけるサイトカインの変化に酷似していることが判明している。

2. 研究の目的

K14-Raf:ERマウスにおける表皮肥厚及び炎症細胞の浸潤のメカニズムを詳細に解析し、乾癬の病態の解明と、乾癬の新しい治療法の開発に役立てる。またこの表皮におけるMAPKのシグナル伝達系路の役割を解明することにより乾癬のみならず皮膚癌を含むその他皮膚疾患の病態の解明にも役立つと考えている。

このモデルマウスの特徴は他のモデルマウスが産まれたときからある遺伝子がないか、または皮膚で強制発現している、その発現をコントロールできないのに対して、今回使用するマウスではタモキシフェンを皮膚に塗布するのみでRafの発現を表皮に誘導することができ、タモキシフェンを塗布してから1週間という短い期間で乾癬類似の病態を作り出せるという点、つまり発現をコントロールできるという点である。この点において他のトランスジェニックマウスを用いるよりも乾癬のモデルマウスとして優れていると考えている。

3. 研究の方法

(1) K14-Raf:ERマウスにおけるタモキシフェン投与時の乾癬様表皮肥厚が起こるメカニズムの検討

これまでにK14-Raf:ERマウスにタモキシフェンを塗布し表皮特異的にRaf-1を発現させると白血球が表皮に浸潤し、その後表皮の肥厚が起こることが確認され、上昇してくるサイトカインも数種類同定されている。また、このRaf誘導性の乾癬様皮疹の角層には好中球浸潤がみられた。そこで、このRaf誘導性の乾癬様皮疹形成における好中球の役割を検討するために好中球特異的抗体をタモキシフェンによって表皮Rafを誘導する前後に腹腔内に投与して好中球を消失させたときのRafによる皮膚の変化を検討し、好中球がこの乾癬様病変の形成にどのような役割を果たしているかを検討する。

(2) K14-Raf:ERマウスと他のノックアウトマウスとの掛け合わせによる検討

IL-17ノックアウトマウスとK14-Raf:ERマウスを掛け合わせ、その表皮にタモキシフェンを塗布し、IL-17のない状態でのRaf誘導性の乾癬様表皮肥厚について肉眼的、組織学的及び免疫組織学的に検討する。

乾癬の病因に深く関係しているStat3ノックアウトマウスとの掛け合わせを行い、Stat3のない状態でのRaf誘導性の乾癬様表皮肥厚について同様に検討するとともにStat3のインヒビターによってこのRaf誘導性乾癬様皮疹が改善するかどうかについても検討する。

本研究は遺伝子組換え実験および遺伝子組み換え生物を用いる実験を含むため、遺伝

子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に従い、高知大学において遺伝子組換え実験安全管理規程に基づいて手続きを行い、所定の教育訓練を受け、機関より承認を得た上で実験を行った。また、実験動物の取り扱いについても、高知大学による審査を受け、承認を得た上で動物福祉に基づいて実施した。

4. 研究成果

この Raf 誘導性の乾癬様表皮肥厚における好中球の役割を検討するために好中球に対する抗体を投与すると、部分的に表皮肥厚は軽減され、表皮肥厚反応の一部は好中球がその役割をになっていることがわかった (図1)。

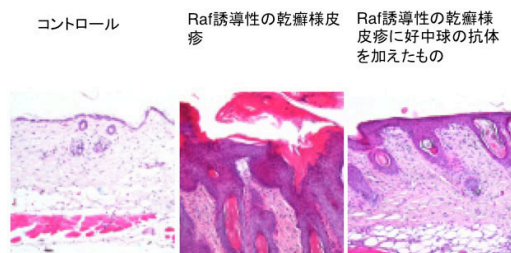


図1 好中球の抗体によるRaf 誘導性乾癬様皮疹の減弱

次に同マウスと IL-17A ノックアウトマウスをかけあわせ、IL-17 がいない状態で Raf による表皮肥厚が軽減されるかどうか検討した。表皮に Raf のみ発現するマウスと表皮に Raf を発現する IL-17A ノックアウトマウスそれぞれ5匹ずつを用いて表皮の肥厚の程度や放出されるサイトカインを観察したが、IL-17 をノックアウトしたマウスの表皮においても Raf 誘導性の表皮の肥厚、放出されるサイトカインに差を認めなかった。(図2)

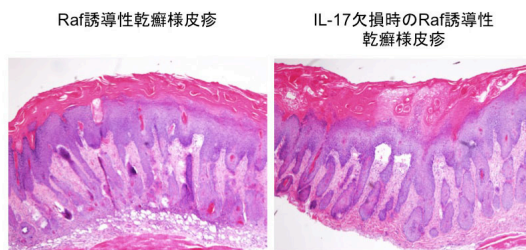


図2 IL-17はRaf 誘導性乾癬様皮疹に影響を与えない。

次いで Raf 誘導性の乾癬様表皮肥厚に Stat3 が関与しているかどうかについて免疫組織学的に検討した結果、Raf 誘導性の表皮肥厚に Stat3 が過発現していることが確認された (図3)。

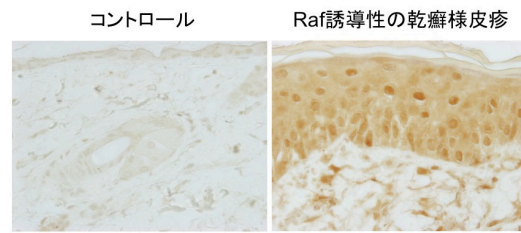


図3 Raf誘導性乾癬様表皮におけるStat3の発現

そこで次に K14-Raf:ER マウスと表皮特異的 Stat3 ノックアウトマウス (K5-Cre: Stat3 f/f マウス、以下 Stat3-マウス) をかけあわせて表皮のみ Stat3 が欠損しているタモキシフェン依存性の表皮特異的 Raf マウスを作成し、Stat3 が存在しない状態での Raf による乾癬様表皮肥厚の形成について検討した。その結果 Stat3 が存在しないとタモキシフェン誘導性の Raf による表皮肥厚が減弱することが確認された (図4)。

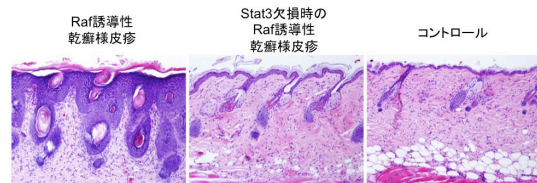


図4 Stat3欠損によるRaf誘導性乾癬様皮疹の減弱

次に Raf+Stat3-マウス (Stat3 ノックアウトマウス表皮に Raf を発現したマウス) における乾癬に関係する因子の発現をリアルタイム PCR 法により調べた。その結果、Raf+Stat3+マウス (Raf を表皮に誘導したマウス) で発現の増加が見られた VEGF と IL-1β が Raf+Stat3-マウスでは誘導されず、ケラチン 10 の発現は Raf+Stat3-マウスにおいて同処理後に逆に増加していた (図5)。

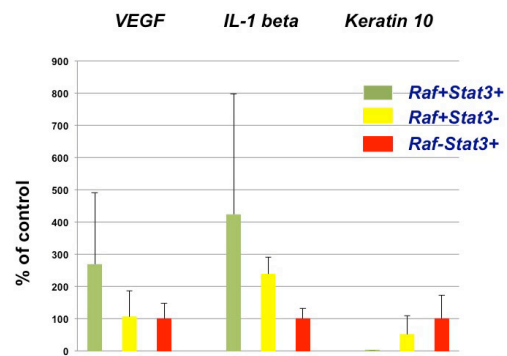


図5 Stat3欠損によるRaf誘導性乾癬様皮疹の遺伝子発現の変化

TNF- α , c-myc, IL-18, IL-23 はすべてのマウスでタモキシフェン処理後もその発現に変化がなく、IL-17A, IL-22, IFN- γ , IL-4 はすべてのマウスでタモキシフェン処理後もその発現を認めなかった。次いで確認のため Raf 誘導性の乾癬様表皮肥厚が Stat3 のインヒビターである STA21 により抑制されるかどうか検討したところ、STA21 により Raf 誘導性の乾癬様表皮肥厚は抑制されることが判明した (図 6)。

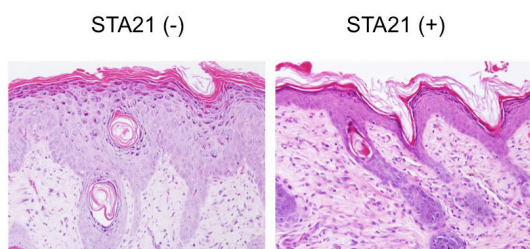


図6 STA21外用によるRaf誘導性乾癬様表皮疹の減弱

これらの結果より VEGF や IL-1 β が Stat3 を介した Raf 誘導性乾癬様表皮疹の形成に関与している可能性があり、今後このメカニズムを検討することにより乾癬の病態の解明、治療法の開発に役立つものと考えている。

また、乾癬の皮疹が実際 Stat3 のインヒビターにより抑制され、これが乾癬治療に応用できる可能性があることも示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Kanda T, Tarutani M, Iiyama T, Asao N, DiGiovanni J, Sano S. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol* 査読有 131(1), 2011, 108-117
- ② Tarutani M, Imai Y, Yasuda K, Tsutsui H, Nakanishi K, Yamanishi K.: Neutrophil-dominant psoriasis-like skin inflammation induced by epidermal-specific expression of Raf in mice. *J Dermatol Sci.* 査読有 58(1), 2010, 28-35

[学会発表] (計 5 件)

- ① Tarutani M, Miyoshi K, Takaishi M and Sano S : Psoriasis-like skin lesion induced by Raf-MAPK signaling requires Stat3 activation. 36th Annual Meeting of the Japanese Society for

Investigative Dermatology. 2011. 12/9-11, Kyoto, Japan

- ② 樽谷勝仁、他 3 名 : Raf の活性化により引き起こされる乾癬様皮疹は Stat3 シグナルを必要とする、第 26 回角化症研究会、東京、2011, 7/30
- ③ Tarutani M, Miyoshi K, Takaishi M and Sano S : Psoriasis-like skin lesion induced by Raf-MAPK signaling requires Stat3 activation. 71st annual meeting of the society for investigative dermatology, Concurrent Minisymposium 3, Epidermal Structure and Function, Phoenix, Arizona, U. S. A., 2011, 5/4-7
- ④ 樽谷勝仁 : 乾癬、掌蹠膿疱症の新しい病因論と治療 乾癬の病因論 2010、第 109 回日本皮膚科学会総会、教育講演、大阪、2010, 4/20
- ⑤ Tarutani M, Imai Y, Tsuda T, Nakanishi K, Yamanishi K : Neutrophil-dominant psoriasis-like skin inflammation induced by epidermis-specific Raf expression in mice, 39th Annual ESDR Meeting, Poster presentation, Budapest, Hungary, 2009, 9/12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樽谷 勝仁 (TARUTANI MASAHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号 : 30301261