

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791071

研究課題名(和文)

尋常性乾癬のケラチノサイト増殖に対するシクロスポリンの作用機序の解明

研究課題名(英文)

Studies on molecular mechanism of cyclosporine A to keratinocytes in psoriasis

研究代表者

横田 憲二 (YOKOTA KENJI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20456651

研究成果の概要(和文)：尋常性乾癬の表皮では、小胞体ストレス応答(UPR)が低下していることが分かった。乾癬治療薬サイクロスポリンA(CyA)によって培養ケラチノサイト(KC)にUPRが誘導されることが分かった。サイクロフィリンB(CypB)はCyAの標的分子であるが、培養KCのCypBの発現を低下させることによってUPRが誘導されることが分かった。以上の結果はCypBがKC増殖抑制の標的であることを強く示唆すると考えた。

研究成果の概要(英文)： the UPR was downregulated in keratinocytes from psoriatic lesions, characterized by immunocytochemical staining of GRP78/Bip, CHOP/GADD153, HRD1 and C/EBPb. CyA treatment and siRNA-mediated knockdown of Cyp B induced the UPR in HaCaT cells or HSC-1 cells. Altogether, we demonstrate that in psoriasis vulgaris CyA or reduction in Cyp B by RNA interference might induce the UPR in keratinocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：小胞体ストレス応答、ケラチノサイト、サイクロスポリンA、サイクロフィリンB、尋常性乾癬、ケラチノサイト増殖性疾患、小胞体ストレス、有棘細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

ケラチノサイト(KC)は表皮の大半をしめ、約2週間で基底層、有棘層、顆粒層、角層へと移動する。この細胞は各層において、形態を刻々と変えていき、最終的には角化という分

化にいたる特異な細胞である。

ところで、尋常性乾癬ではKCの分化に異常をきたしており、正常表皮では基底層のKCだけが未分化な状態にあるのに対して、尋常性乾癬では有棘層の細胞が増殖期にあり、顆粒

層において、急速に分化をするため、錯角化がおきる。尋常性乾癬の治療薬 CyA は、T 細胞内でサイクロフィリン A と結合し、カルシニューリンを阻害することで、転写因子 NFAT が誘導するインターロイキン 2 等のサイトカインの発現を阻害し、その結果乾癬病変部の T 細胞の活性を抑制する。この免疫抑制の機序が CyA の尋常性乾癬 に対する治療効果の主な作用機序であると考えられている。ところが、CyA は全身投与によって尋常性乾癬病変部の KC 内に存在することが報告されている。その意義として、直接 KC の増殖を抑制する作用が予測されているが、CyA の KC 増殖抑制の分子メカニズムについては、いまだ詳細にされていない。その理由のひとつとして、KC の分化の分子メカニズムそのものが、明確に解明されていないことがあげられる。

さて、UPR とは、たんぱく質産生の亢進あるいは小胞体内のカルシウム減少などが原因で、小胞体内に折りたたみ異常蛋白質が蓄積したときに生じる転写因子の活性化に引き続いた小胞体内シャペロンの転写誘導などのシグナル伝達システムである。いわば、小胞体ストレスを介した細胞のホメオスタシス維持のための機構であり、UPR の研究は国内外で近年急速な勢いでその詳細な分子メカニズムが明らかにされてきている。その他にも、UPR は血球系の細胞が分化をする際に必須なシグナルとして、また神経細胞と膵β細胞において、それぞれポリグルタミン病をはじめとした神経変性疾患、糖尿病、における役割について多施設からの報告がある。しかし、表皮を含む重層上皮組織における UPR の生理学的な意義についての研究は、今まで全く手がつけられておらず、私たちが先駆的な研究を行っている。今までの研究の成果を以下に述べる。Bip は UPR において誘導されてくる小胞体内シャペロンである。私たちは

ヒト皮膚免疫組織化学の結果、Bip は表皮基底層にはほとんど存在せず、KC の分化に伴って誘導されていることを発見し報告した (JID 127:75-80, 2007)。KC の分化に UPR が関与することを予測し、実験を進めたところ、Bip 以外にも、5 種類の UPR 誘導蛋白質 CHOP, HRD1, PDI, GRP94, C/EBPβ が分化と共に誘導されていることを観察した。重層培養表皮 (*in vitro* 正常表皮相当モデル) を用いても分化と共に誘導されていた。さらに、マイクロアレイを用いた研究により、UPR により増殖抑制遺伝子を含む KC 分化関連遺伝子の一部が制御されることを発見した。さらに、UPR の活性低下を SCC, 尋常性乾癬などの KC 増殖性疾患の KC において観察した。以上の結果を報告した (JID 129:2126-2135, 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はサイクロスポリン A (CyA) が UPR 活性化を介して KC の増殖を抑制することを分子レベルで証明することである。CyA は細胞内結合たんぱく質サイクロフィリン (16 種類発見されている) を介して細胞内シグナルを伝達する。そこでまず、尋常性乾癬をはじめとした KC 増殖性皮膚疾患における治療標的サイクロフィリンを同定することを目的とする。研究全般の最終的な目標はサイクロフィリンをターゲットとした KC 増殖抑制薬の開発である。

## 3. 研究の方法

(1) 尋常性乾癬において、小胞体ストレス応答誘導蛋白質の表皮内局在を検討した。尋常性乾癬における、Bip, CHOP, HRD1, PDI, GRP94, C/EBPβ の分布を免疫組織化学にて 10 検体用いて検討した。

(2) TGFβによりケラチノサイトのUPRが活性化するか否かを検討した。

TGFβはケラチノサイトの分化を促進する。TGFβを培養ケラチノサイト(HaCaT細胞)に添加して、小胞体ストレス応答マーカーの変動をリアルタイムPCR法にて検討した。

(3) サイクロスポリンAによりケラチノサイトの増殖が抑制されるか否かを検討した。MTS ELISA アッセイシステムにて、CyAのHaCaT細胞に対する増殖抑制効果を検討した。

(4) 尋常性乾癬治療薬であるサイクロスポリンA、類似物質際クロスポリンDによって培養ケラチノサイトにUPRが誘導されるか否かを検討した。

HSC-1、HaCaT細胞にCyAとその類似物質CyDがUPRを引き起こすか否かを検討した。リアルタイムPCR, フローサイトメトリー, ウェスタンブロットにて観察する。UPRの確認はUPR誘導遺伝子BipとCHOPをプローブとした。

(5) 培養ケラチノサイトのサイクロフィリンを発現低下させて、UPRが誘導されるか否かを検討した。

HSC-1細胞, HaCaT細胞, を用いて, short interference (si)RNAによりサイクロフィリンA-Cを発現低下させて、UPR、KC分化マーカー上昇が起きるか否かを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 尋常性乾癬の表皮では、UPRが低下していることが分かった。

(2) TGFβによりケラチノサイトのUPRが活性化していることが分かった。

(3) サイクロスポリンAによりケラチノサイトの増殖が抑制されることが分かった。

(4) サイクロスポリンA、サイクロスポリンDによって培養ケラチノサイトにUPRが誘導されることが分かった。

(5) 培養ケラチノサイトのサイクロフィリンBの発現を低下させることによってUPRが誘導されることが分かった。

以上の結果はサイクロフィリンBがKC増殖抑制の標的であることを強く示唆すると考えた。

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馬場義博, 横田憲二, 松本高明, 澤田昌樹, 榊原章浩, 佐々直人, 富田靖: 陰茎亀頭部の有棘細胞癌の1例 皮膚科の臨床 52巻10号1459-1462(2010), 査読有

②横田憲二, 帆足俊彦, 大原國章: 乳房下縁のアポクリン汗腺癌 乳癌との鑑別を要した例 皮膚病診療 31巻6号707-710(2009), 査読有

[学会発表] (計13件)

①横田憲二, 澤田昌樹, 松本高明, 秋山真志: 臨床的に早期病変を呈していたが、多発リンパ節転移のあった乳房外Paget病の1例 (2011年2月日本皮膚科学会東京支部学術大会)

②横田憲二, 澤田昌樹, 松本高明, 秋山真志: 足部皮膚悪性腫瘍切除術における膝窩部坐骨神経ブロックの使用例 (2010年12月日本皮膚科学会東海地方会)

③横田憲二, 河野通浩, 室 慶直: CPC: 足底の黒色腫瘍 (2010年10月第61回日本皮膚科学会中部支部総会)

④石川明日香, 横田憲二, 澤田昌樹, 松本高明, 室 慶直: 基底細胞症候群の2例 (2010年9月第61回日本皮膚科学会中部支部大会)

- ⑤横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
室 慶直：皮膚外科領域の超音波ガイド下  
末梢神経ブロックの活用法 (2010年9月第  
25回日本皮膚外科学会総会)
- ⑥横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：悪性黒色腫に対して施行した  
ICG 蛍光法によりセンチネルリンパ節生検  
の検討 (2010年6月第26回日本皮膚悪性  
腫瘍学会)
- ⑦澤田昌樹、横田憲二、榊原章浩、松本高  
明、富田靖、下山芳江、是坂哲、伊藤史  
郎：先天性巨大色素性母斑より発症した悪  
性黒色腫の小児例と成人例 (2010年4月日  
本皮膚科学会総会)
- ⑧横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：皮膚悪性腫瘍に対して行った蛍  
光 法・色素法・RI 法の3法によるセンチ  
ネルリンパ節生検の比較検討 (2010年4月  
第110回日本皮膚科学会総会)
- ⑨横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：Gluteal fold V-Yadvancement  
flap にて再建した外陰部 Paget 病の2例  
(2010年3月第251皮膚科学会東海地方  
会)
- ⑩横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：ICG 蛍光法にてセンチネルリン  
パ節生検を施行した皮膚悪性腫瘍の3例  
(2009年12月 第250回日本皮膚科学会  
東海地方会)

⑪横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：人中溝部の有棘細胞癌に対して  
単独ペプロマイシン療法にて奏功した1例  
(2009年9月 第61回 日本皮膚科学会  
中部支部学術大会)

⑫横田憲二、河野通浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：CPC:右膝部の皮下腫瘍 (2009年  
7月 日本皮膚病理学会)

⑬横田憲二、榊原章浩、澤田昌樹、松本高明、  
富田 靖：名大にて施行した ICG 蛍光法の  
検討 (2009年5月 第25回日本皮膚悪性  
腫瘍学会)

[図書] (計2件)

①横田憲二、大原國章 **angiokeratoma**  
知っておきたい皮膚疾患3巻：四肢編、  
p41 (2009)

②横田憲二、大原國章：肝斑 知っておきたい  
皮膚疾患1巻：頭頸部編 p133 (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田憲二 (YOKOTA KENJI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20456651

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし