

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591617

研究課題名(和文) 乾癬表皮角化細胞における細胞周期S期亢進を介したエピジェネティクス異常機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of abnormal epigenetic mechanisms through S-phase of the cell cycle in the psoriatic epidermal keratinocytes

研究代表者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RanBP2とRanGAP1は乾癬皮疹部角化細胞(KC)において核膜に過剰発現し、NLSを有するLEDGFおよびチロシン705リン酸化STAT3の核細胞質間輸送に深く関与している可能性が示唆された。また乾癬皮疹部KCにおいて、MAPK/Erk1/2とPI3K/Akt経路のシグナルがRanBP2とRanGAP1を制御している可能性が示唆された。さらに、KC特異的LEDGFトランスジェニックマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：We indicated that RanBP2 and RanGAP1 are overexpressed and that the phosphorylation of S53 in MCM2 is significantly upregulated not only in the spinous layers but also in the basal layers of psoriatic epidermis. We also suggest that RanBP2 and RanGAP1 regulate the intracellular localization of LEDGF and phosphorylated Y705 STAT3 via the PI3K/Akt and MAPK/Erk1/2 pathways in our psoriatic model systems of HaCaT cells. These findings suggest that RanBP2 and RanGAP1 may play pivotal roles in the pathogenesis of psoriasis via translocation of LEDGF and phosphorylated Y705 STAT3 into the nucleus in psoriatic KCs. Moreover, we created a KC specific LEDGF transgenic mouse.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬 表皮角化細胞 細胞周期 エピジェネティクス LEDGF RanBP2 RanGAP1 トランスジェニックマウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬は銀白色の鱗屑をともない境界明瞭な盛り上がった紅斑が全身に出現する。乾癬の患者の90%位がこの症状を呈し、尋常性乾癬とよばれる。大きさ、数、形は様々で、発疹が癒合して大きな病変を作ることもある。できやすい部位は慢性の機械的な刺激を受けやすい頭部、肘・膝、臀部、下腿伸側などである。青壮年期に発症することが多く、多発する。発症頻度は人口のおよそ0.1%と推定されている。昔は日本人には極めてまれと考えられていたが、徐々に増加傾向である。白人では人口の2-3%といわれており頻度の高い皮膚病として知られている。病因については近年多くの知見が得られているが、全容解明には至っていない。乾癬ではTh17細胞、制御性T細胞、Tip-DC、形質細胞様樹状細胞等の炎症細胞からのサイトカインなどによる表皮角化細胞(KC)の活性化のほかに、活性化したKCから炎症細胞へのフィードバックも病態形成に重要であると考えられていた。乾癬のKCでは、細胞周期S期のマーカーであるPCNA等が高発現している。しかし、この乾癬のKCにおけるS期亢進とこの細胞自身の遺伝子発現制御の相互関係についての分子機構については、ほとんど解析がなされていなかった。

(2) 細胞周期S期活性化因子かつ、転写補助因子であるLens epithelium derived growth factor (LEDGF)は、正常表皮の基底層においては核に局在し分化に従い細胞質へ局在移行するが乾癬のKCにおいては基底層と有棘層の両層で核内に存在することを発見し、さらにLEDGF過剰発現KC株は乾癬のKCに類似する遺伝子発現を示すことを研究代表者らは報告していた(Sugiura K et al, J Invest Dermatol 2007, Takeichi T, Sugiura K et al, J Invest Dermatol 2010)。つまり、LEDGFは乾癬の病態に重要な働きをしていることが示唆されていた。

(3) ところでLEDGFは核局在シグナル(NLS)を有する。同じくNLSを有する705チロシンリン酸化STAT3二量体も、正常表皮の基底層においては核に局在し分化に従い細胞質へ局在移行するが、乾癬表皮においては基底層と有棘層の両層で核に局在する。NLSタンパク質の核細胞質間輸送には、角膜孔複合体(NPC)の構成分子であるヌクレオポリンが重要な役割を担っており、そのひとつであるRan binding protein 2 (RanBP2)は、Ran-GTPase activating protein 1 (RanGAP1)と複合体を形成し、輸送の方向性を決定付けている。

(4) また乾癬KCにおいては、上皮成長因子受容体(EGFR)シグナル伝達の下流にあるMAPK/Erk1/2とPI3K/Akt経路の活性化が知られているが、この2つの増殖シグナルと核

細胞質間輸送に関する分子との関連は明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) LEDGFの核内局在制御の分子機構を解明すること。KCにおけるNLSタンパク質の核細胞質間輸送の変化が、乾癬の病態機構に深く関与しているのではないかと考えた。

(2) LEDGFが生体内で本当に乾癬の病態に関与しているかどうか解明すること。KC特異的LEDGF過剰発現トランスジェニックマウスの皮膚症状を観察することで解明できると考えた。

### 3. 研究の方法

(1) 乾癬患者10例(平均年齢56歳; 35歳~78歳)の皮膚組織、および10例の正常皮膚組織(平均年齢56歳; 16歳~79歳)を用いて以下のそれぞれの抗原に対しての免疫組織化学を実施した。

RanBP2  
RanGAP1  
705チロシンリン酸化STAT3  
LEDGF  
53セリンリン酸化MCM2

(2) 培養表皮角化細胞であるHaCaT細胞を用いて免疫細胞化学を実施した。細胞処理条件は以下のように実施した。72時間血清飢餓の後に、培養液中に血清のみを加えた増殖条件のコントロール群と、血清入り培養液中にMEK1阻害剤およびPI3キナーゼ阻害剤またはmTOR阻害剤を単独または同時に添加した阻害剤添加群で比較検討した。以下それぞれの抗原に対しての免疫細胞化学を実施した。

389リン酸化70S6K  
DNA  
RanGAP1  
RanBP2  
Ki67  
LEDGF  
705チロシンリン酸化STAT3  
CDC7

(3) HaCat細胞の抽出液を用いてウエスタンブロットを実施した。細胞処理条件は以下のように実施した。3日間血清飢餓の後に、培養液中に血清のみを加えた増殖条件のコントロール群と、血清入り培養液中にMEK1阻害剤とPI3キナーゼ阻害剤を同時に添加した群で比較検討した。以下それぞれの抗原に対してのウエスタンブロットを実施した。

RanBP2  
RanGAP1  
Ran  
beta-actin  
LEDGF  
705チロシンリン酸化STAT3  
CDC7

(4) KC 特異的プロモーターを用いた KC 特異的 LEDGF 過剰発現トランスジェニックマウスを作成した。特異的プライマーを作成し、実際に作成されているかどうか確認をした。週齢による、皮疹の観察、病理所見の観察を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) RanBP2 と RanGAP1 の皮膚組織 KC での局在について：免疫組織化学で両者は正常皮膚組織では KC の細胞質に局在したが、乾癬皮膚部組織では KC の核辺縁に局在した。

(2) 乾癬 KC における S 期活性化の新規マーカーについて：免疫組織化学で S 期活性化マーカーである 53 セリンリン酸化 MCM2 は正常皮膚 KC に比べて乾癬 KC では著明に染色されていた。乾癬 KC の S 期活性化を確認し、MCM2 も活性化されていることが明らかになった。

(3) HaCat 細胞における LEDGF、705 チロシンリン酸化 STAT3、CDC7 の局在について：免疫細胞化学で 3 者とも血清存在下では核内に局在していたが、72 時間血清飢餓で 3 者とも細胞質に局在した。

(4) MEK1 阻害剤と PI3 キナーゼ阻害剤または MEK1 阻害剤と mTOR 阻害剤処理による RanBP2 と RanGAP1 と Ran の発現について：免疫細胞化学とウエスタンブロットで RanBP2 と RanGAP1 は発現が低下した。一方 Ran は発現が低下しなかった。MAPK/Erk/1/2 と PI3K/Akt 経路により RanBP2 と RanGAP1 の発現は制御されていることを示唆する結果を得た。

(5) MEK1 阻害剤と PI3 キナーゼ阻害剤または MEK1 阻害剤と mTOR 阻害剤処理による LEDGF、705 チロシンリン酸化 STAT3、CDC7 の局在について：免疫細胞化学で 3 者とも細胞質に局在した。

(6) (1) ~ (5) の結果をまとめると、RanBP2 と RanGAP1 は乾癬皮膚部 KC において核膜に過剰発現し、NLS を有する LEDGF およびチロシン 705 リン酸化 STAT3 の核細胞質間輸送に深く関与している可能性が示唆された。また乾癬皮膚部 KC において、MAPK/Erk/1/2 と PI3K/Akt 経路のシグナルが RanBP2 と RanGAP1 を制御している可能性が示唆された (図 1)。

(7) KC 特異的 LEDGF 過剰発現トランスジェニックマウスの作成に成功した。週齢による自然経過で乾癬様皮疹の発症はなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Sugiura K, Kitoh T, Watanabe D, Muto M, Akiyama M. Childhood-onset psoriatic arthritis in Down syndrome with psoriasis susceptibility variant CARD14 rs11652075. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54(1):197-9.

Nakai N, Sugiura K, Akiyama M, Katoh N. Acute generalized exanthematous pustulosis caused by dihydrocodeine phosphate in a psoriasis vulgaris patient with a heterozygous IL36RN mutation. *JAMA Dermatol* 2015;151(3):311-5.

Sugiura K, Uchiyama R, Okuyama R, Akiyama M. Varicella zoster virus-induced generalized pustular psoriasis in a baby with heterozygous IL36RN mutation. *J Am Acad Dermatol* 2014;71(5):e216-8.

Sugiura K, Oiso N, Iinuma S, Matsuda H, Minami-Hori M, Ishida-Yamamoto A, Kawada A, Iizuka H, Akiyama M. IL36RN Mutations Underlie Impetigo Herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2014;134(9):2472-4.

Sugiura K, Muro Y, Akiyama M. Solitary organizing pneumonia in systemic sclerosis mimicking lung adenocarcinoma. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(9):2648.

Sugiura K. The genetic background of generalized pustular psoriasis: IL36RN mutations and CARD14 gain-of-function variants. *J Dermatol Sci* 2014;74(3):187-92.

Sugiura K, Muto M, Akiyama M. CARD14

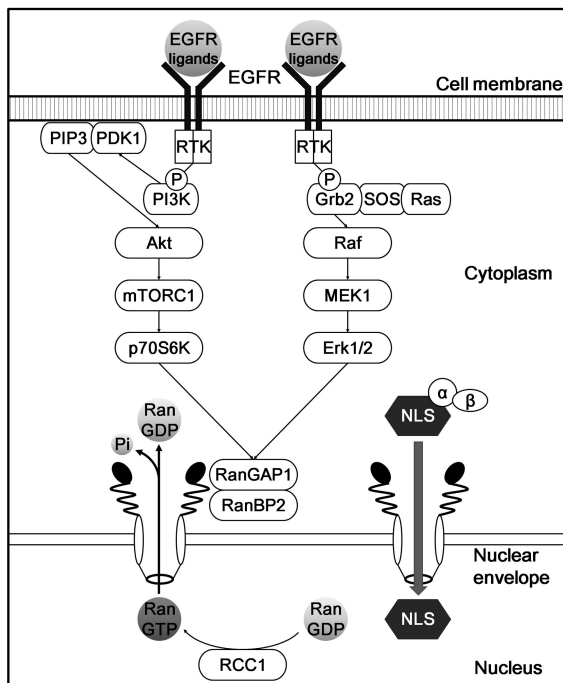


図 1

乾癬皮膚部KC内の増殖シグナルと核内移行シグナルの関係

c.526G>C (p.Asp176His) is a Significant Risk Factor for Generalized Pustular Psoriasis with Psoriasis Vulgaris in the Japanese Cohort. *J Invest Dermatol* 2014;134(6):1755-7.

Sugiura K, Haruna K, Suga Y, Akiyama M. Generalized pustular psoriasis caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28(12):1835-6.

Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K, Akiyama M. Revertant Mutation Releases Confined Lethal Mutation, Opening Pandora's Box: A Novel Genetic Pathogenesis. *PLoS Genet* 2014;10(5):e1004276.

Yasuda K, Sugiura K, Takeichi T, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Nuclear envelope localization of Ran-binding-protein 2 and Ran-GTPase-activating protein 1 in psoriatic epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol* 2014;23(2):119-24.

Sugiura K, Shoda Y, Akiyama M. Generalized Pustular Psoriasis Triggered by Amoxicillin in Monozygotic Twins with Compound Heterozygous IL36RN Mutations: Comment on the Article by Navarini et al. *J Invest Dermatol* 2014;134(2):578-9.

Kono M, Sugiura K, Suganuma M, Hayashi M, Takama H, Suzuki T, Matsunaga K, Tomita Y, Akiyama M. Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. *Hum Mol Genet* 2013;22(17):3524-33.

Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T, Tsuda K, Nishida E, Togawa Y, Nakajima K, Sakakibara A, Kawachi S, Shimizu M, Ito Y, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Muro Y, Ishida-Yamamoto A, Sano S, Matsue H, Morita A, Mizutani H, Iizuka H, Muto M, Akiyama M. The Majority of Generalized Pustular Psoriasis without Psoriasis Vulgaris Is Caused by Deficiency of Interleukin-36 Receptor Antagonist. *J Invest Dermatol* 2013;133(11):2514-21.

Sugiura K. Unfolded protein response in keratinocytes: Impact on normal and abnormal keratinization. *J Dermatol Sci*

2013;69(3):181-6.

Muro Y, Sugiura K, Nakashima R, Mimori T, Akiyama M. Low prevalence of anti-DFS70/LEDGF antibodies in patients with dermatomyositis and with other systemic autoimmune rheumatic diseases *J Rheumatol* 2013;40(1):92-3.

Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ito Y, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. Severe chilblain lupus is associated with heterozygous missense mutations of catalytic amino acids or their adjacent mutations in the exonuclease domains of 3' exonuclease 1. *J Invest Dermatol* 2012;132(12):2855-7.

Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Shimomura Y, Ogawa Y, Muro Y, Akiyama M. A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p.Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol* 2012;167(3):699-701.

Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Ogawa Y, Akiyama M. LEDGF/DFS70 activates the MK2/IL6/STAT3 pathway in HaCaT. *J Dermatol Sci* 2011 63: 203-5.

Watanabe K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. IgE and IgG(4) autoantibodies against DFS70/LEDGF in atopic dermatitis. *Autoimmunity* 2011 44: 511-9.

〔学会発表〕(計1件)

杉浦一充. Familial generalized pustular psoriasis: 第6回自己炎症性疾患研究会;2013年2月2日,ベルサール八重洲(東京都千代田区)

〔その他〕

名古屋大学研究シーズ集「無菌性の膿疱性疾患の病態解明と新規治療戦略の開拓」  
<http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/unite/jp/detail/0000081.html>  
名古屋大学学術研究・産学官連携推進本部  
汎発性膿疱性乾癬の病因を特定: 遺伝子検査での確かな診断が可能に  
[http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/public/\\_research\\_ja/highlights/detail/0000802.html](http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/public/_research_ja/highlights/detail/0000802.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉浦一充 (SUGIURA Kazumitsu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 70335032

(2)研究分担者

室 慶直 (MUR0 Yoshinao)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 80270990