

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689054

研究課題名(和文) 乾癬病変のエピジェネティック制御機構解明による新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic dysregulation of psoriasis lesions and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

小川 靖(Ogawa, Yasushi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10567754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乾癬ケラチノサイトにおいて転写活性化因子LEDGFが媒介するエピジェネティクス異常による病態形成機序を検討した。乾癬ケラチノサイトではLEDGFが核内に移行し、そこでトリメチル化されたヒストン蛋白(H3K36me3)と結合し、MLL等の重要なクロマチン修飾複合体を同部に誘導する。その結果として同部位のH3K4me3という転写活性化に関わる修飾パターンの亢進をもたらし、乾癬関連遺伝子の転写の安定化に至る機序の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study examined a novel pathogenic mechanism of psoriasis where the epigenetic changes in affected keratinocytes promotes and stabilize the psoriatic skin lesions. The transcription activation cofactor LEDGF shows unique nuclear localization in the proliferating psoriatic keratinocytes. Our study revealed LEDGF shows extranuclear localization in G0/G1 keratinocyte cells, whereas upon stimulation with extracellular growth signals, it translocalizes to the nucleus via MEK and PI3K kinase-mediated mechanism. LEDGF was found to be a H3K36me3 reader, and when localized to the nucleus, it binds to the H3K36me3 motif and recruits the histone modification complex MLL. The present study is in support of the epigenetic model of psoriasis pathogenesis where the nuclear translocalized LEDGF enhances the di- and tri- methylation of H3K4 of the promoter regions of inflammatory cytokines and other psoriasis associated genes, leading to their enhanced and sustained expression.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 ケラチノサイト 乾癬 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

乾癬は外来診療で遭遇することの多い、臨床的に重要な皮膚疾患である。外用療法が一般的に行われているが、多くの場合慢性の経過を辿り、治療は非常に長期間にわたる。感染の病態形成には Th17 細胞をはじめとする T 細胞や樹状細胞だけでなく、病的に活性化した表皮角化細胞(KC)の産生するサイトカインが必須である。近年、様々な疾患で、クロマチン修飾などのエピジェネティクスの異常が疾患形成に重要な役割を果たすことが判明している。

我々は、先に転写活性化因子 LEDGF が乾癬 KC において特異的に核内局在を示すことを示し、LEDGF 過剰発現 KC 株(LEDGF-HaCaT)が実際の乾癬表皮とよく類似した細胞内シグナル変化と遺伝子発現変化を示すことを報告した。LEDGF は遺伝子の中でも特に転写が亢進している領域に選択的に結合していることが知られているが、その分子の詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、転写活性化因子 LEDGF に着目する。

(1) 乾癬 KC における LEDGF の分子的挙動の変化とその機序について検討し、病理的な意義を解明する。

(2) 乾癬 KC におけるエピジェネティクス異常とその乾癬病理における意義を解明する。

(3) この過程に作用する低分子化合物を探索する事により、新しい乾癬治療戦略を開拓する。

3. 研究の方法

(1) LEDGF が乾癬 KC 内で正常 KC 内と異なった挙動を示すメカニズムを検討する。LEDGF-HaCaT により、LEDGF の局在を生細胞を用いて可視化する事で、局在変化を起こすシグナルを同定する。

(2) LEDGF が認識するヒストンメチル化部位を同定する。LEDGF がヒストン修飾に及ぼす影響を検討するため、LEDGF-HaCaT に対して修飾ヒストン特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP)を行う。これらの結果から同定される新規エピジェネティクス関連因子について、LEDGF-HaCaT の機能的アッセイと乾癬病理組織の免疫組織染色から、乾癬病態への関与を検証する。

(3) LEDGF をケラチン K14 プロモーター下で構成的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、皮膚に各種刺激を与える事で乾癬様病変の誘発を行う。組織学的、免疫組織学的な検討と、遺伝子発現パターンの解析から、乾癬モデルとしての妥当性を検証する。

(4) LEDGF-HaCaT は IL-6 を過剰産生するため、培養液の IL-6 を測定し、細胞生存数と比較する事で、低分子化合物のスクリーニングを行う。得られた候補化合物を上記 1)、2)のアッセイにより検証する

4. 研究成果

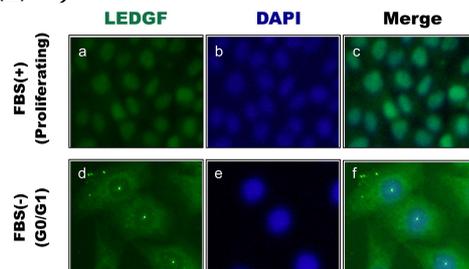
(1) 我々は先に、LEDGF が皮膚表皮では基底細胞層を除いては核外に局在するが、乾癬表皮内では特徴的な核内局在を示す事を示した。

LEDGF に蛍光タンパク質を融合し、定常的に過剰発現させた角化細胞株(LEDGF-HaCaT)を作製し、このメカニズムを検討した。

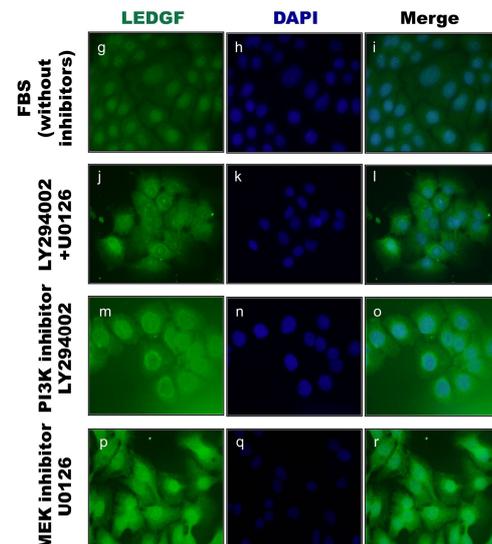
LEDGF-HaCaT では、通常の培養条件下では、乾癬 KC に類似した核内局在を示す。我々は、この細胞を無血清培地で培養し、飢餓状態にする事により G0/G1 周期を誘導する事で、LEDGF が細胞質に移行する事を発見した。この状態で血清刺激を行うと、LEDGF の核内局在が回復した。

この LEDGF の局在調節には、MEK および PI3K シグナル経路が関与している事が証明された。この事は、乾癬病変において、各種増殖シグナル下で活性化した KC では LEDGF が核内局在する事を良く説明している (図 1)。

(図 1)



HaCaT細胞を血清飢餓下で72時間培養した後、免疫染色を行い、LEDGFの細胞内局在を検討した。増殖中のHaCaTではLEDGFは核内に局在したが(a, b, c)、血清飢餓により増殖を停止したHaCaTではLEDGFは細胞外に局在した(d, e, f)。



72時間の血清飢餓後、血清添加培地に戻して48時間培養した。LEDGFは核内に移動した(g, h, i)。血清添加によるLEDGFの核内への移行は、PI3K阻害剤 LY294002およびMEK阻害剤 U0126の投与により阻害された(j, k, l)。LY294002もしくはU0126の単独投与ではこの阻害効果は部分的にのみ認められた(m, n, o, p, q, r)。

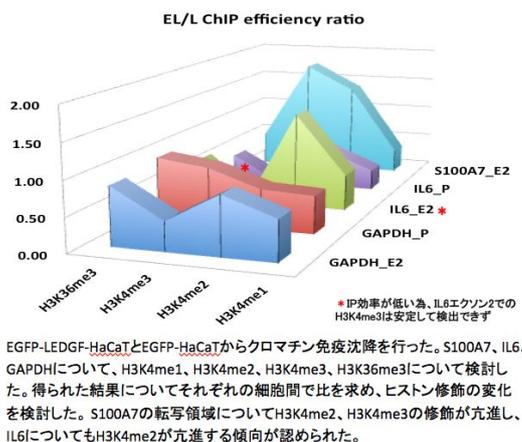
(2) LEDGF の核内での機能についてはこれまで、転写活性化因子である事が知られていた。また、核内に局在する際に、クロマチンと結合し、特に転写が亢進した領域に結合する事である事が知られていたが、その機序は不明であった。また、ヒストン修飾複合体であり、癌遺伝子とその構成要素を含むである MLL 複合体と LEDGF が核内で結合する事が知られていた。

我々は LEDGF の PWWP ドメインがトリメチル化した H3K36 と結合する事を確認し、この特定のモチーフが LEDGF をゲノム上の転写活性化を起こす部位にリクルートしていると推測した。同様の報告が本研究機関中に海外のグループから報告された。

我々はこの LEDGF のクロマチン上への移動が及ぼす影響を検討する為に、LEDGF-HaCaT を用いた免疫沈降アッセイを行い、検討した。LEDGF-HaCaT では、乾癬 KC と同様に、IL-6、S100A7、S100A9 などの関連遺伝子の発現が活性化する一方、filaggrin の発現は低下している。これらの乾癬病変関連遺伝子のプロモーター領域について、各種のヒストン修飾モチーフの変化を LEDGF の存在下と非存在下で比較を行った。その結果、遺伝子の転写活性化に関わる修飾モチーフである、H3K4 のトリメチル化が LEDGF の存在下で亢進している事が示された。(図 2)

これらの結果は、増殖促進因子としての LEDGF の性格と、その予測されるエピジェネティックな機能とよく一致している事から、乾癬 KC において LEDGF が病変形成的に働き、ヒストン修飾を通じてその病態を安定化させている事が推測された。

(図 2)



(3) 本研究では、乾癬の皮膚病変において、エピジェネティックな変化が病態形成に関与する事を示すモデル系として、転写活性化因子 LEDGF の過剰発現モデルが最適であると考え、遺伝子改変マウスを作成した。具体的には、ヒト LEDGF をケラチン K5 プロモーター下で過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、RT-PCR とタグ付けされた FLAG エピトープの免疫染色により表皮内で

のトランスジーンを発現を確認した。テープによるストリッピング、TPA の局注等の方法で病変誘発を試みたが、野生型マウスと有為な差は認められなかった。モデルマウスでの LEDGF の発現量が低い事が疑われた為、再度新たな系統のマウスを樹立したが、明らかに野生型に対して有為な差を認める事ができなかった。

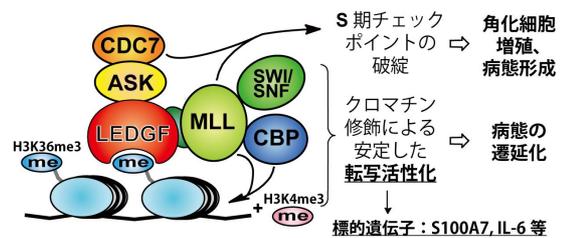
また、乾癬 KC の病的变化を救済する事のできる低分子化合物を探索する為に、LEDGF-HaCaT を用いた、有用化合物のスクリーニングを行う事を試みた。この細胞の培養上清中の IL-6 を ELISA で測定するアッセイ系を作成し、米国 FDA で認可された化合物と既知のクロマチン修飾因子阻害剤についてスクリーニングを試みたが、該当する薬剤を見いだす事はできなかった。原因として、アッセイ系の感度が不足する事が考えられた。

(4) 結論として、本研究により、乾癬 KC において LEDGF が媒介するエピジェネティクス異常により、病変形成を促進する因子の発現が亢進し、安定化するという病態形成モデルを支持する結果が得られた。

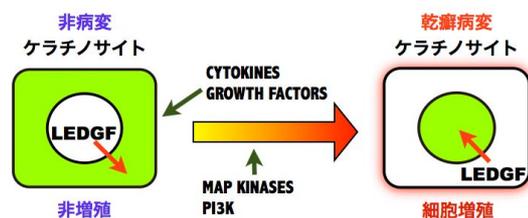
すなわち、乾癬 KC の増殖を促進する外部シグナルにより、LEDGF が核内に移行し、H3K36me3 モチーフと結合し、MLL 等のクロマチン修飾複合体を同部にリクルートする事を通じ、同部位の H3K4me3 の修飾亢進をもたらす事で、乾癬関連遺伝子の転写の活性化をもたらすというメカニズムの存在が示唆された。(図 3、図 4)

一方で、このモデルに基づくモデルマウスの開発、有用化合物の開発は、残念ながら本研究で達成することができなかった。これらについては、今後の課題として取り組んでいきたい。

(図 3)



(図 4)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1 Shimizu Y\*, Ogawa Y\*, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M. A Palindromic Motif in the -2084 to -2078 Upstream Region is Essential for ABCA12 Promoter Function in Cultured Human Keratinocytes. Scientific Reports (2014) 4:6737. \*These authors contributed equally.

2 Yasuda K, Sugiura K, Takeichi T, Ogawa Y, Muro Y and 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.

3 Shibata A, Ogawa Y, Sugiura K, Muro Y, Abe R, Suzuki T and Akiyama M. High survival rate of harlequin ichthyosis in Japan. J Am Acad Dermatol (2014) 70(2): 387-8.

4 Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K and Akiyama M. Revertant mutation releases confined lethal mutation, opening Pandora's box: a novel genetic pathogenesis. PLoS Genet (2014) 10(5): e1004276.

5 Hane H, Muro Y, Watanabe K, Ogawa Y, Sugiura K and Akiyama M. Establishment of an ELISA to detect anti-glycyl-tRNA synthetase antibody (anti-EJ), a serological marker of dermatomyositis/polymyositis and interstitial lung disease. Clin Chim Acta (2014) 4319-14.

6 Takama H, Sugiura K, Ogawa Y, Muro Y and Akiyama M. Possible roles of barrier to autointegration factor 1 in regulation of keratinocyte differentiation and proliferation. J Dermatol Sci (2013) 71(2): 100-6.

7 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 and 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.

8 Shimizu Y, Sugiura K, Aoyama Y, Ogawa Y, Hitomi K, Iwatsuki K and Akiyama M. Novel ABCA12 missense mutation p.Phe2144Ser underlies congenital ichthyosiform erythroderma. J Dermatol (2013) 40(7): 581-2.

9 Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Shimoyama Y, Muro Y and 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.

10 Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ito Y, Ogawa Y, Muro Y and 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'-repair exonuclease 1. J Invest Dermatol (2012) 132(12): 2855-7.

〔学会発表〕(計 2 件)

1 Yasushi Ogawa, Takuya Takeichi, Michihiro Kono, Nobuyuki Hamajima, Toshimichi Yamamoto, Kazumitsu Sugiura and Masashi Akiyama Reversion-triggered release of confined lethal mutations: an unreported genetic pathogenesis 44th meeting of the European Society for Dermatological Research, 2014/9/11 Denmark, Copenhagen

2 小川 靖、杉浦 一充、安田 佳世、武市 拓也、室 慶直、秋山 真志 乾癬表皮細胞における LEDGF/DFS70 の役割の 解明 第 111 回日本皮膚科学会総会 2012 年 6 月 2 日 京都府京都市 国立京都国際会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 靖 (OGAWA, Yasushi)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 10567754

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

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

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：60222551