

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591656

研究課題名(和文) 乾癬の発症に関与する皮膚バリア障害

研究課題名(英文) Skin barrier abnormality in the pathogenesis of psoriasis

研究代表者

中島 喜美子(Nakajima, Kimiko)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：20403892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚バリア機能維持には角層細胞間脂質が重要な機能を担う。我々は角層細胞間脂質の構成脂質の1つであるセラミドの合成酵素(serine palmitoyl transferase: SPT)遺伝子を表皮特異的に破壊したマウスにおいて、バリア破綻とともに乾癬類似の皮膚病変を自然に発症し、IL-17、IL-22を産生する γ -T細胞が誘導され、さらに抗IL-12/23p40抗体投与によって皮膚病変誘導が抑制されることを示し、皮膚バリア破綻が乾癬病変を誘導することを報告した(J Invest Dermatol 2013; 133: 2555)。

研究成果の概要(英文)：Ceramides play an essential role in the epidermal permeability barrier. We generated Sptlc2 targeted mice under control of the keratin 5 promoter (SPT-CKO mice), thereby knocking out the function of serine palmitoyltransferase (SPT), the critical enzyme for ceramide biosynthesis. SPT-CKO mice impaired water-holding capacity and barrier function. From 2 weeks of age, they developed skin lesions like psoriasis. Skin lesions showed up-regulation of psoriasis-associated genes, such as IL-17A, IL-17F, IL-22. In the skin lesions and draining lymph nodes, there were increased numbers of T cells that produced IL-17 (γ -17 cells), most of which also produced IL-22. In vivo treatment of SPT-CKO mice with an anti-IL-12/23p40 antibody ameliorated the skin lesions and reduced the numbers of γ -17 cells. Therefore, we conclude that a ceramide insufficiency in the epidermis leads to psoriasis-like lesions in mice, likely mediated by IL-23-dependent IL-22-producing γ -17 cells.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：乾癬 皮膚バリア セラミド IL-17 γ -T 細胞

1. 研究開始当初の背景

乾癬は欧米で人口の 2-4%を占める頻度の高い皮膚疾患であり、本邦においても患者数は増加している。乾癬は、表皮角化細胞の増殖亢進による表皮肥厚を伴う角化および顕著な炎症により特徴づけられる慢性の炎症性疾患である。乾癬の病態は表皮と免疫系の病的クロストークによって形成される。しかし、表皮と免疫系のどちらが一次的な引き金を引き乾癬の病態を形成するかは不明である。免疫系の異常として抗菌ペプチドなどの刺激による樹状細胞の活性化によるサイトカイン産生（自然免疫）およびそれに引き続く IL-23/Th17 軸を中心とした免疫異常（獲得免疫）について、*in vivo*、*in vitro* の新しい知見が次々に明らかになりつつある。様々な炎症性皮膚疾患で認められる皮膚のバリア機能の破綻が、皮膚炎症の成因か結果なのかは明らかではないが、乾癬皮疹における皮膚バリア破綻が病態の原因であるか結果であるかも不明である。アトピー性皮膚炎患者において皮膚バリア形成に重要なフィラグリン蛋白をコードする遺伝子の突然変異があることが明らかになり、一次的な表皮バリア破綻が皮膚炎症を引き起こす可能性が示され、乾癬についても表皮バリア維持に関わる LCE(late cornified envelop)遺伝子が疾患感受性遺伝子に同定された(Trend Genet 2010; 26: 415)。以上のことより、乾癬の病態発症に表皮バリア破綻が一次的に関与する可能性を考え、検討した。

2. 研究の目的

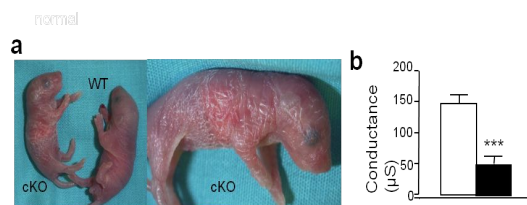
モデルマウスを用いて一次的バリア破綻から乾癬様皮膚炎発症を検討し、乾癬の成因としてのバリア破綻を新たに位置づける。

3. 研究の方法

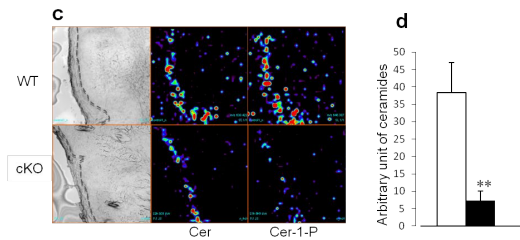
- (1) *de novo* のセラミド合成経路における律速酵素である serine palmitoyltransferase (SPT) を表皮特異的にノックアウトしたマウス (K5.SPT-KO) の表現型および免疫異常を検討する。
- (2) K5.Stat3C 乾癬モデルマウスのバリア破綻と応答する免疫系の解析をする。
- (3) 乾癬患者皮膚におけるバリア機能を解析する。

4. 研究成果

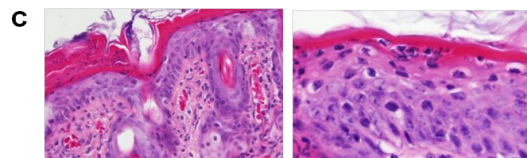
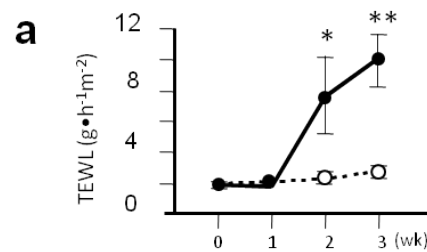
新生 K5.SPT KO マウスの皮膚は乾燥しており、水分量の著明な減少を認めた (図 1a, b)。



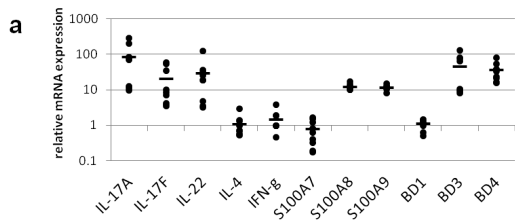
質量顕微鏡を用いてセラミドの局在を観察すると、コントロールマウスの表皮と比較して K5.SPT KO マウスの表皮におけるセラミドの発現量は低下していた (図 1c, d)。



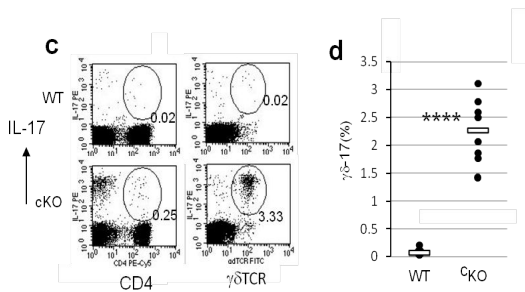
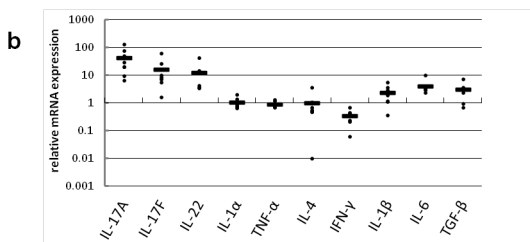
K5.SPT KO マウスにおける経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss: TEWL) の上昇は、2 週齢で出現し (図 2a) 同時期より、成長障害、脱毛、びまん性の紅斑を認めた (図 2b)。紅斑の病理組織所見は、角質肥厚、不全角化、角層内への好中球の浸潤、表皮肥厚、真皮浅層の血管の拡張、真皮における炎症細胞浸潤を認め、乾癬に類似した所見を示した (図 2c)。



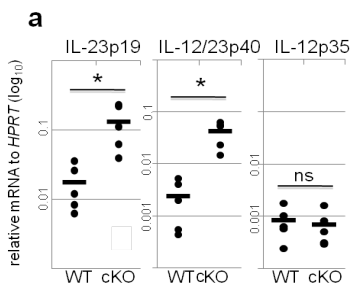
次に、K5.SPT KO マウスの皮膚病変部における、乾癬関連遺伝子発現を正常マウスの皮膚と比較し解析したところ、IL-17A, IL-17F, IL-22, S100A8, S100A9, α -defensin (BD)3, BD4 の発現を認め、人の乾癬病変における所見と類似した結果であった (図 3a)。



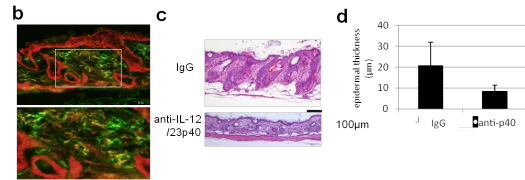
皮膚所属リンパ節においても IL-17A, IL-17F, IL-22 遺伝子の高発現を認めた(図 3b)。皮膚所属リンパ節から細胞を採取し、FACS 解析したところ、IL-17 を産生する細胞は、 γ -T 細胞であった(図 3c,d)。



また、K5.SPT KO マウスの皮膚病変においては、正常マウスの皮膚と比較して IL-23p19, IL-12/23p40 遺伝子の高発現を認めたが、IL-12p35 の発現は差がなかった(図 4a)。



さらに、K5.SPT KO マウスの皮膚病変において、IL-23 を産生する CD11c 陽性細胞を認め、3 日齢の K5.SPT KO マウスに、抗 IL12/23p40 抗体 0.3mg を腹腔内投与したところ、皮膚病変の誘導は抑制され、皮膚所属リンパ節における IL-17 産生 γ -T 細胞は減少したことを示した(図 4b,c,d)。



以上の研究により、表皮細胞内の de novo ceramide 合成経路を抑制した K5.SPT KO マウスは、バリア障害の発現とともに、乾癬類似の病理組織所見、サイトカインプロファイルおよび IL-23/IL-17 軸の免疫変調を呈し、このマウスにおいては、表皮内における de novo ceramide 合成抑制がまず存在し、それが免疫を誘導したことから乾癬の病態において皮膚バリア障害が一次的要因となることを示し、報告した。("Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. " *J Invest Dermatol* 133: 2555-65, 2013) 表皮細胞と免疫担当細胞のクロストークは、サイトカイン、ケモカインなどの液性因子が決定する。表皮バリア障害と IL-23/IL-17 をクロストークさせる液性因子は何であることを明らかにするのが今後の課題である。この論文中で、乾癬患者の皮疹部においてはバリア障害を認めたことも報告した。引き続き、抗 γ -T 細胞抗体を用いて病変の誘導の抑制について検討している。また、K5.SPT KO マウスに天然セラミドクリームを外用したところ治療効果を認めたため、ヒトの乾癬病変に対する天然セラミドクリームの治療効果を検討している。また、K5.Stat3C マウス(乾癬モデルマウス)におけるバリア破綻と免疫応答の解析も現在行っており、今後報告していく予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 32 件)

Yamamoto M, Nakajima K, Takaishi M, Kitaba S, Magata Y, Kataoka S, Sano S: Psoriatic Inflammation Facilitates the Onset of Arthritis in a Mouse Model. *J Invest Dermatol* 135: 445-453, 2015 査読有
DOI: 10.1038/jid.2014.426.

Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kamijima R, Fujimoto C, Kataoka S, Terada Y, Sano S: Epicutaneous application of Toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: A new model of SLE. *Arthritis & Rheumatism* 66: 694-706, 2014 査読有
DOI: 10.1002/art.38298.

Takaishi M, Nakajima K, Ouyang W, Sano S: Psoriasis-like skin lesions are dependent on IL-23 dependent on IL-22 but develop in the absence of IL-22 in a model mouse. *J Dermatol Sci* 73: 261-4, 2014 査読有 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.11.008.

Yokogawa M, Takaishi M, Nakajima K, Kamijima R, DiGiovanni J, Sano S, Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells. *Mol Carcinog* 52: 760-9, 2013 査読有 DOI: 10.1002/mc.21901.

Hirai T, Kanda T, Sato K, Takaishi M, Nakajima K, Yamamoto M, Kamijima R, DiGiovanni J, Sano S: Cathepsin K is involved in development of psoriasis-like skin lesions through TLR-dependent Th17 activation. *J Immunol* 190: 4805-11, 2013 査読有 DOI: 10.4049/jimmunol.1200901.

Tarutani M, Nakajima K, Takaishi M, Ohko K, Sano S: Epidermal hyperplasia induced by Raf-MAPK signaling requires Stat3 activation. *J Dermatol Sci* 72: 110-5, 2013 査読有 DOI:10.1016/j.jdermsci.2013.06.007.

Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol* 133: 2555-65, 2013 査読有 DOI: 10.1038/jid.2013.199.

Nakajima K: The critical role of the IL-23/Th17 axis in the pathogenesis of psoriasis. Review. *J Dermatol* 39: 219-24, 2012 査読有 DOI:10.1111/j.1346-8138.2011.01458.x. v

Tarutani M, Nakajima K, Uchida Y, Takaishi M, Goto-Inoue N, Ikawa M, Setou M, Kinoshita T, Elias P, Sano S, Maeda Y: GPHR-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for formation of lamellar granules and the skin barrier. *J Invest Dermatol* 132: 2019-25, 2012 査読有 DOI: 10.1038/jid.2012.100.

Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Nakajima K, Holleran WM, Sano S, Uchida

Y, Setou M: Imaging mass spectrometry visualizes ceramides and the pathogenesis of Dorfman-Chanarin syndrome due to ceramide metabolic abnormality in the skin. *PLoS One* 7: e49519, 2012 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0049519.

Nakajima H, Nakajima K, Tarutani M, Sano S: The role of pigment epithelium-derived factor as an adipokine in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 304: 81-84, 2012 査読有 DOI: 10.1007/s00403-011-1193-1.

[学会発表](計20件)
(国際学会)

Nakajima K, Kataoka S, Yamamoto M, Malissen B, Takaishi M, Sano S. Langerin-expressing cells are dispensable for development of psoriasis-like lesions in a mouse model. The 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, Heidelberg, Germany, 2014.

Nakajima K, Ujihara M, Yamamoto M, Teraishi M, Uchida Y, Akiyama M, Sano S. Epidermal triglyceride levels are correlated with severity of ichthyosis in Dorfman-Chanarin syndrome. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy (TGCV) and Neutral Lipid Storage Disease (NLSD) Osaka, Japan, Osaka University Nakanoshima Center. 2013.4.19-20.

Nakajima K, Kataoka S, Inoue N, Terao M, Setou M, Katayama I, Takeda J, Sano S. Ceramide deficiency in epidermis leads to development of psoriasis-like lesion associated with IL-23-dependent proliferation of gd-17 cells. The 99th annual meeting of American Association of Immunologists, Boston, USA, 2012.5.4-8

Nakajima K, Kataoka S, Inoue N, Terao M, Setou M, Katayama I, Takeda J, Sano S. Ceramide deficiency in epidermis leads to development of psoriasis-like lesion associated with IL-23-dependent proliferation of gd-17 cells. The 75th SID annual meeting, Raleigh, USA, 2012.5.9-12.

Nakajima K, Kataoka S, Inoue N, Terao

M, Setou M, Katayama I, Takeda J, Sano S. Ceramide deficiency in epidermis leads to development of psoriasis-like lesion associated with IL-23-dependent proliferation of gd-17 cells. The 61th Montagna Symposium on the Biology of Skin, Oregon, USA, 2012.11.15.

(国内学会)

中島喜美子:表皮細胞からみた乾癬の病態, 第28回日本乾癬学会学術大会シンポジウム、東京、東京ドームホテル, 2013年9月13日-14日.

中島喜美子: 表皮脂質異常と皮膚バリア障害, 第111回日本皮膚科学会総会教育講演, 京都, 国立京都国際会館, 2012年6月1日-3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 喜美子 (NAKAJIMA, Kimiko)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号: 20403892

(2) 研究分担者

中島 英貴 (NAKAJIMA, Hideki)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号: 70314995

志賀 健夫 (SHIGA, Takeo)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 70444768

佐野 栄紀 (SANO, Shigetoshi)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 80273621