

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253071

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎発症機序の解明

研究課題名(英文)Pathogenic mechanisms of atopic dermatitis

研究代表者

川上 敏明 (Kawakami, Toshiaki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60143418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎(AD)はかゆみを伴う慢性の炎症性皮膚疾患である。先進国では過去数十年間で患者数が激増している。ステロイド等の治療薬が多くの患者で有効であるが、副作用によって治療が困難な症例も多い。ADの発症機序として、皮膚のバリア機能の低下や免疫機能の異常が指摘されている。本研究は、自然発症のADモデルとアレルゲンによる誘発ADモデルを用いて、発症機序を細胞レベルと分子レベルで解明することを目的とした研究であり、未完成ながら、マスト細胞は発症に必要なが、良く似た機能を持つ好塩基球やCD4 T細胞においてPLC-3が誘発ADモデルに必要なことを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease featured with itching and type 2 inflammation. Evidence has been accumulated showing that skin barrier impairment and immune dysregulation underlie the disease. This research project has been focused on revealing the disease pathogenesis at the cellular and molecular levels by studying murine AD models that develop skin inflammation in either a spontaneous or allergen-induced manner. So far, our data have shown that mast cells, but not basophils, are required for allergen-induced skin inflammation. Our analysis of conditional knockout mice lacking the Plcb3 gene encoding phospholipase C-3 in various cell-specific fashions has not been completed yet. However, our data indicate that Plcb3 in CD4 T cells is not required for spontaneous development of AD-like skin inflammation in Plcb3-deficient mice.

研究分野：アレルギー、マスト細胞、シグナル伝達

キーワード：アトピー性皮膚炎 マスト細胞 Phospholipase C-3 Stat5 Periostin

### 1. 研究開始当初の背景

我々は2009年、Phospholipase C(PLC)-3がタンパク質脱リン酸化酵素のSHP-1と転写因子のStat5に結合して存在(SPS複合体)し、SHP-1がStat5の脱リン酸化(Tyr-694)を効率よくすることでStat5の過剰な活性化を防いでいることを見出した。このメカニズムが失われたPLC-3ノックアウト(KO)マウスでは造血幹細胞・骨髄系細胞(マスト細胞を含む)のphospho-Stat5レベルが亢進していて、骨髄増殖病(myeloproliferative neoplasm, MPN)などの腫瘍やアトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)様の皮膚炎症が自然発症する。本研究はPLC-3 KOマウスの自然発症のADモデルとダニ抗原とSEB(Staphylococcal enterotoxin B)による誘発ADモデルを解析することでAD発症の機序を解明し、Jak-Stat5阻害剤を新規AD治療法となすべく行う前臨床研究である。

### 2. 研究の目的

本研究はPLC-3 KOマウスの自然発症のADモデルとダニ抗原とSEB(Staphylococcal enterotoxin B)による誘発ADモデルを解析することでAD発症の機序を解明し、Jak-Stat5阻害剤を新規AD治療法となすべく行う前臨床研究である。

### 3. 研究の方法

自然発症ADモデルと誘発ADモデルの両モデルで、マスト細胞でのJak-Stat5系がAD様炎症において重要であることは既に証明済みであった。しかし、マスト細胞の活性化に重要な高親和性IgE受容体FcRIが誘発ADモデルでは必要だが、自然発症のADに必要な否か不明である。また、微生物の感染がこの発症に関わるかも不明である。(1)まず、FcRIや病原微生物に関わるか否かを各種のPLC-3<sup>-/-</sup>との二重KOマウスを作製して検討する。次いで、(2)PLC-3やStat5を欠損した皮膚・免疫細胞をもつ各種のマウスを作製して誘発ADモデル実験を施行し、(3)PeriostinやTSLPとSPS複合体構成分子との関係を詳細に解析する。最後に、(4)誘発ADモデルで最適なJak-Stat5阻害剤の探索をする。

### 4. 研究成果

(1)PLCb3<sup>-/-</sup>マウス自然発症ADにおいてIgE抗体と微生物の感染の関与  
これまでに、PLCb3<sup>-/-</sup>;FceRIa<sup>-/-</sup>マウスが生まれ、皮膚炎が観察されている。したがって、FcRIは自然発症のADには重要でないと考えられる。同様にPLCb3<sup>-/-</sup>;Myd88<sup>-/-</sup>の二重KOマウスが極く少数生まれ、観察中である。

(2)誘発ADモデルにおいて好塩基球が必

要ないことを、Bas-Treck, Mcpt8-DTRなどの好塩基球欠損マウスや、Ba103抗体を用いた好塩基球除去マウスを用いて明らかにした(Ando et al., manuscript in preparation)。当研究室にてPLCb3のfloxedマウスが作製され、各種のCKOマウスを作製中である。CD4-Creとのかけ合わせにより、CD4 T細胞においてPLCb3が誘発ADモデルに必要なことを見いだしている。さらに、Col1a2-CreERTマウスとのかけ合わせにより、線維芽細胞においてPLCb3が誘発ADモデルに必要なというデータを得たが、つい最近になって、Col1a2-CreERTマウスの購入先であるJackson LaboratoryがCol1a2-CreERTマウスとCol1a1-CreERTマウスを取り違えたことが判明した。従って、このデータは間違いであると思われる。また、K14-Creとのかけ合わせにより、皮膚上皮細胞におけるPLCb3の役割も検討しつつある。既存のStat5 floxedマウスとのかけ合わせにより、線維芽細胞特異的なStat5 CKOマウスを作製して、皮膚上皮細胞特異的なStat5 CKOマウスを作製して、誘発ADモデルで検討中である。さらに、PLCb3の酵素活性を欠くマウスが作製されつつある。これらを用いて誘発AD実験や試験管内での機能解析を施行する予定である。

### (3)線維芽細胞におけるPeriostin発現の制御

出原らにより慢性皮膚炎症におけるPeriostinの役割が解明された。我々の研究のより、PLCb3<sup>-/-</sup>マウスの線維芽細胞(いわゆるMEF)では野生型のMEFよりPeriostin産生レベルが高く、MEFにおけるPeriostinの発現は恒常的にStat5によって制御され、Th2サイトカイン刺激によって活性化されるStat6によって誘導されることが推定された。PLCb3とStat5やStat6との関係を調べるため、あらたにCRISPR/Cas9の手法により、関連する遺伝子をknockoutすることで解析を進めている。

### (4)誘発ADモデルで最適なJak-Stat5阻害剤の探索

我々が期待した一連のStat5阻害剤は、開発したトロント大学の研究者から協力が得られず、調べられなかった。

### 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15件)

① Kawakami, T., Ando, T., and Kawakami, Y. Hypothetical atopic dermatitis – myeloproliferative neoplasm syndrome. *Front. Immunol.* 6:434, 2015. doi: 10.3389/fimmu.2015.00434. 査読有

②Carroll-Portillo, A., Cannon, J.L., te Riet, J., Holmes, A., Kawakami, Y., Kawakami, T., Cambi, A., and Lidke, D.S. Mast cells and dendritic cells form synapses that facilitate antigen transfer for T cell activation. *J. Cell Biol.* 210:851-864, 2015. 査読有

③Draber, P., Halova, I., Polakovicova, I., and Kawakami, T. Signal transduction and chemotaxis in mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2015.02.057. [Epub ahead of print]. 査読有

④Ando, T., Xiao, W., Gao, P., Namiranian, S., Matsumoto, K., Tomimori, Y., Hong, H., Yamashita, H., Kimura, M., Kashiwakura, J., Hata, T.R., Izuhara, K., Gurish, M.F., Roers, A., Rafaels, N.M., Barnes, K.C., Jamora, C., Kawakami, Y., and Kawakami, T. Critical role for mast-cell Stat5 activity in skin inflammation. *Cell Reports* 6:366-376, 2014. 査読有

⑤Kawakami, T., Kashiwakura, J., and Kawakami, Y. Histamine-releasing factor and immunoglobulins in asthma and allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 6:6-12, 2014. 査読有

⑥Kawakami, T. and Ando, T. Salmonella's masterful skill in mast cell suppression. *Immunity* 39:996-998, 2013. 査読有

⑦Ando, T., Matsumoto, K., Namiranian, S., Yamashita, H., Glatthorn, H., Kimura, M., Dolan, B. R., Lee, J.J., Galli, S.J., Kawakami, Y., Jamora, C., and Kawakami, T. Mast cells are required for full expression of allergen/SEB-induced skin inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 133:2695-2705, 2013. 査読有

⑧Xiao, W., Kawakami, Y., and Kawakami, T. Immune regulation by phospholipase C-b isoforms. *Immunol. Res.* 56:9-19, 2013. DOI 10.1007/s12026-012-8341-3. 査読有

[学会発表](計11件)

①Kawakami, T. IgE Heterogeneity in Food Allergy, NIAID Workshop entitled "IgE Regulation in Allergic Diseases", April 19-20, 2016, Rockville, Maryland(USA).

②Kawakami, T. Preventive and therapeutic amelioration of food allergy by inhibitors of histamine-releasing factor, The 31st Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, April 3-8, 2016, Charleston, South Carolina(USA).

③Kawakami, T. Histamine-releasing factor in food allergy, The 7th EMBRN International Mast Cell and Basophil Meeting, Keynote Speaker, October 21-23, 2015, Marseille(France).

④Kawakami, T. Phospholipase C-b3 in the defense against skin inflammation, SPC-NUS Workshop "Mast cells in immune disorders and tissue homeostasis", October 19-20, 2015, Imagine Foundation, Necker Hospital Campus, Paris(France).

⑤Kawakami, T. Phospholipase C-b3 in the defense against skin inflammation, Academy of Immunology and Microbiology (AIM) Workshop on Immunology 2014, November 9-10, 2014, Pohang(Republic of Korea).

⑥Kawakami, T. Phospholipase C-b3 in atopic dermatitis, The 14th Annual Meeting of The Korean Atopic Dermatitis Association, November 8, 2014, Seoul(Republic of Korea).

⑦Kawakami, T. IgE heterogeneity in mast cell biology, The Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, the Breakfast Seminar entitled "New insights into IgE biology", February 28-March 4, 2014, San Diego, California (USA).

⑧Kawakami, T. Phospholipase C-b3 as a tumor suppressor and a guardian of the immune system, 2013 International Conference "Inflammation, Cancer and Metabolic Disorders", November 4-6, 2013, at National Health Research Institutes, Zhunan, Miaoli(Taiwan).

⑨Kawakami, T. Phospholipase C-b3 as a tumor suppressor and a guardian of the immune system, The LIAI-IMS Workshop, October 30-31, 2013, RIKEN IMS, Yokohama(Japan).

⑩Kawakami, T. Phospholipase C-b3 as a tumor suppressor and a guardian of the immune system, The 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference, September 8-13, 2013, Kos(Greece).

⑪Kawakami, T. PLC-b3 as a tumor suppressor and guardian against skin inflammation, Special International Symposium "Inositide-Dependent Phospholipase C Activity and Signalling",

July 18-19, 2013, Ulsan(Republic of Korea).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

川上 敏明(Toshiaki Kawakami)  
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命  
医科学研究センター・アレルギー研究チ  
ーム・チームリーダー  
(なお 2016 年 4 月 1 日以降は、Professor,  
La Jolla Institute for Allergy and  
Immunology; Professor, University of  
California School of Medicine )  
研究者番号：60143418

##### (2)研究分担者

出原 賢治 (Kenji Izuhara )  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：00270463

松本 健治 (Kenji Matsumoto )  
国立研究開発法人国立成育医療研究セン  
ター・免疫アレルギー・感染研究部・部長  
研究者番号：60181765