

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893011

研究課題名(和文)表皮機能形成過程におけるオートファジーによる小器官リサイクル機構

研究課題名(英文)Organelle recycle system by autophagy in epidermis

研究代表者

高橋 隼也(TAKAHASHI, Toshiya)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30712195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー関連分子であるLC3Bの表皮、皮膚付属器への発現が確認された。また乾癬やアトピー性皮膚炎といった疾患において、表皮顆粒層でのLC3Bの発現がより強くみられ、表皮肥厚による顆粒合成の亢進を反映していると考えた。またヒト培養表皮角化細胞を用いた実験では、LC3Bについて、TLR9リガンドで細胞を刺激した際に発現が増強する傾向が見られた。

これらの結果は、オートファジーが皮膚での様々な物質合成に関与すること、細菌感染によりオートファジー及びそれに続く表皮過形成が誘導されることを示唆するものであるが、その機序を明らかにするには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the expression of LC3B, which is key molecule in autophagy, to epidermis and skin adnexa. In addition, in psoriasis and atopic dermatitis, expression of LC3B in the epidermis granular layer was more strongly seen. Moreover, by the experiment using the normal human epidermal keratinocyte, TLR9 ligand stimulation enhanced expression of LC3B. These results suggested association between autophagy and synthesis of many molecules, and that bacterial infection may induce autophagy and following various material composition in the skin, but did not come to clarify the mechanism.

研究分野：皮膚科学

キーワード：オートファジー 皮膚疾患

### 1. 研究開始当初の背景

外界との境界バリア臓器としての表皮層と脂質・自然免疫機構について;皮膚は、外界との接点となる人体最大の臓器である。皮膚の細胞群、特に表皮角化細胞は、陸上の乾燥しておりかつ温度変化の大きい外界環境から、体内の水分を保持し恒常性を保つためのバリア機能を担っている。この表皮によるバリア機能には、表皮細胞の角化層 (cornified envelope) と表皮細胞からの脂質分泌による角層間脂質層 (lipid lamellar membrane) の層構造形成が、主たる作用をしている。この 10-20 年間の分子生物学的手法により、表皮バリア機能を構成する角層細胞の構成分子 (ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ、フィラグリンなど) について多くの知見が得てきた。私は、大学院の研究テーマとして、テープストリッピングによる角層バリア障害により、表皮細胞から ATP が放出され、皮膚への炎症細胞遊走を誘導することを示した (Journal of Investigative Dermatology . 2013 掲載決定)。また、角層間脂質層の分子 (セラミド、遊離脂肪酸、コレステロールなど) の存在意義も広く議論されている。遊離脂肪酸は自然免疫機構の Toll-like receptor を活性化することが知られている (Eur J Immunol. 2002 Dec;32(12):3337-47.) が、これまで当研究室では、遊離脂肪酸結合蛋白欠損マウスの創傷治癒が遅延すること (Molecular and cellular biochemistry 2006;284:183-188) さらに、自然免疫機構の Toll-like receptor 2 (TLR2) が、表皮バリア機能の脂質層形成に関連する層板顆粒の分泌に影響を与えることを示している (J Invest Dermatol 131, 688-697, 2011)。これらから自然免疫機構から脂質層の形成と、脂質分子から自然免疫機構を介した角化細胞への刺激と制御機構の存在が想定され、外界との接点としての表皮脂質調整機構が想定される。表皮脂質層形成は、表皮角化細胞からの層板顆粒 Lamellar granule の分泌に始まる。セラミドを含め幾つかの分子が層板顆粒を介して表皮角化細胞から分泌されるが、タンパク分解酵素カリクレインも層板顆粒を介して分泌される分子である (J Invest Dermatol 2005;124:360-6)。表皮角層の様態変化の一つに角層剥離があり、表皮カリクレインは、この作用に関与している (J Invest Dermatol 126, 1622-1632. 2006)。表皮カリクレインの一種であるカリクレイン 5 の表皮角化細胞からの分泌は、表皮の分化機構と TLR2 による細菌成分を検知することにより活性化されることが明らかとなり、自然免疫機能が表皮バリア機能を制御する一端が示された (J Invest Dermatol 130, 1297-1306, 2010, J Invest Dermatol 131, 688-697, 2011)。表皮のリサイクル機構としてのオートファジーの可能性について;自然免疫分子 TLR2 による細菌感知は、マクロファージなどの免

疫細胞でオートファジー機構を活性化する (Nature 450, 1253-1257, 2007)。オートファジー機構は、細胞内成分の分解と小胞形成を行う機構であり、元々は飢餓状態でのエネルギー補給機構として研究されてきた。オートファジー機構は細胞内小器官のリサイクル機構ともいえる。私は大学院において、皮膚悪性腫瘍である血管肉腫におけるオートファジーの関与も研究している。予備実験として皮膚におけるオートファジー関連分子 LC3 の発現を免疫染色で確認したところ、表皮層とともに脂腺・汗腺でもオートファジー関連分子 LC3 の発現が確認できた。オートファジー機構の分泌顆粒への関与も示唆されており (J Invest Dermatol 131, 1240-1251, 2011)、オートファジー機能がリサイクル機構として働きつつ、角層細胞の基底層・有棘層・顆粒層・角層の形態的・機能的変化の一端や脱核作用を担っているとも考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生態の最外層で機能する表皮細胞群の分化機構・バリア機能における自然免疫機構を介したオートファジー機構の関与を探索することである。とくに、表皮での小器官からの分子リサイクル機構としてのオートファジーの生物学的意義を検討するものである。表皮は角層を介して排出されるものと考えられているが、その分子を回収・リサイクルすることによって体内恒常性を保つ臓器であるものと想定した研究である。本研究により、皮膚病態での表皮恒常性維持に関わりうる分子を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究計画 1: ヒト皮膚組織におけるオートファジー機構関連分子発現の確認・検討  
概要; 生体皮膚におけるオートファジー関連因子の発現を確認する。正常皮膚での分化過程でのオートファジー関連因子の発現を観察すると共に、乾癬やアトピー性皮膚炎などの角化異常もしくは表皮バリア機能異常を生ずる疾患での動態も確認する。  
実行計画 1-A; 表皮角化細胞分化過程におけるオートファジー機構の誘導・発現: 免疫染色法を用いてオートファジー関連分子 (Atg1, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 16, LC3) の発現を確認する。特に表皮の分化過程との比較のために keratin5 (基底層), keratin10 (有棘層), involucrin (顆粒層) の発現分布と比較する。正常皮膚と角化異常を伴う皮膚病変組織 (尋常性乾癬、アトピー性皮膚炎、扁平上皮癌など) を検討対象組織と考えている。必要に応じ、検討対象組織・病変を拡大する。

研究計画 2: 自然免疫機構によるオートファジー関連分子の発現誘導・制御機構の検討  
概要; 細菌要素による自然免疫機構活性化因

子 (TLRs 刺激因子) で、表皮角化細胞や脂腺細胞を刺激し、オートファジー関連分子の誘導を検討する。また培養ヒト表皮角化細胞の分化刺激 (1.0-1.6 mM の高カルシウム培養) での、オートファジー関連分子の発現も検討する。

(ア) 実行計画 2-A; 培養表皮角化細胞を TLRs 刺激因子 (リガンド) や高カルシウム培地で刺激し、24・48 時間後の遺伝子発現を cDNA microarray で解析する。オートファジー関連分子の発現様式を Real-time PCR で経時的变化を確認する。発現が確認された遺伝子は、ウェスタンブロット法による蛋白変動と、細胞組織染色による細胞内局在の確認を行う。

実行計画 2-B; 細胞内でのオートファジー器官の形成と活性化はオートファジー関連分子の細胞質内での凝集として確認される。カセリサイディンもしくは細菌で刺激された細胞内でのオートファジー関連分子の動態を、免疫染色法で経時的に観察する。観察には共焦点蛍光顕微鏡を用いる。

研究計画 3: ヒト培養細胞の分化と小器官リサイクル過程におけるオートファジー機構関連分子の影響

概要; 研究計画 1, 2 で発現の確認されたオートファジー関連分子を表皮角化細胞に強発現もしくは発現を抑制させ、その分化過程や層板顆粒分泌機能に与える影響を確認する。特にミトコンドリアや核などの細胞内器官の変化に着目する。

(ア) 実行計画 3-A: 遺伝子の強発現にはアデノウイルスベクターを用いる。当研究室はその使用に十分な経験があり (J Invest Dermatol 120(6): 1030-1037, 2003, J Invest Dermatol 120(4): 571-580, 2003、Oncogene 26(35):5038-45, 2007)、当研究室にてアデノウイルスベクター作成・精製・使用の為に機器と空間が確保されている。発現抑制には siRNA を用いる。現時点では LC3, Atg3, 5, 7, 12, 15, 16 の表皮角化細胞における発現を予備実験で確認しており、これらを中心に作成・解析することを計画している。

(イ) 実行計画 3-B: オートファジー関連分子を過剰発現もしくは発現抑制させた表皮角化細胞に対して、必要に応じて抗菌ペプチドと表皮常在細菌 (アクネ杆菌、表皮ブドウ球菌) を併用する。高カルシウム培地での表皮分化誘導を用い、表皮角化細胞分化連動遺伝子 (ケラチン、ロリクリン、インボルクリン) の発現の確認とともに、形態変化を経時的に行う。

(ウ) 実行計画 3-C; オートファジーによる細胞内小器官のリサイクル機構の検討; 発現が確認されたオートファジー関連分子を siRNA 法でノックダウンする。高カルシウムによる分化誘導を行った後に細胞培地と細胞を回収し、それぞれの蛋白濃度を測定する。

オートファジーが表皮細胞分化時のリサイクル機構を担っているのであれば、ノックダウンにより培地中の蛋白が増加することが予見される。また、オートファジー関連分子のノックダウンそのものが表皮角化細胞の分化に関与するかも、分化マーカーの変動で確認する。

(エ) 実行計画 3-D; 三次元培養皮膚においてのオ細胞内小器官のリサイクル機構の検討; オートファジー関連分子を siRNA 法でノックダウンした表皮角化細胞を用い、線維芽細胞含有コラーゲン層の上に表皮細胞層を形成させて三次元培養シートを作る手法を応用する。研究分担者の山崎は、この手技に精通している (J Dermatol Sci 2003, 32, 209-215)。空気曝露による角層形成させた三次元シート完成後に、48 時間三次元培養皮膚を培地浸漬状態で培養する。細胞培地と細胞シートを回収し、オートファジー関連分子ノックダウンによる総蛋白濃度の変動を検討する。オートファジーが表皮細胞分化時のリサイクル機構を担っているのであれば、ノックダウンにより培地中の蛋白流出が増加することが予見される。また、オートファジー関連分子のノックダウンそのものが表皮角化細胞の分化に関与するかも、分化マーカーの変動で確認する。

研究計画 4: 自然免疫機構・オートファジー機構関連分子発現誘導・抑制に伴う皮膚バリア機能の変化の検討。

概要; 研究計画 1, 2, 3 で発現・作用の確認されたオートファジー関連分子をマウス皮膚において強発現もしくは発現を抑制させ、皮膚機能の変化を検討する。皮膚機能評価には、角層透過バリアの指標である経表皮水分蒸散量 (TEWL) と角層保湿機能指標となる角層水分量ならびに皮膚表面 pH、皮表脂質量の計測を行う。当研究室の菊地克子は、皮膚機能評価の第一人者で有り、協力を得る予定である (Br J Dermatol 164(1):97-102, 2011)。分化 (角化) の確認には上述の keratin や involucrin を指標とする。

(ア) 実行計画 4-A: アデノウイルスベクターを投与もしくは siRNA による発現抑制させたマウスの皮膚にて、皮膚機能評価を行う。現時点では LC3, Atg3, 5, 7, 12, 15, 16 を中心に作成・解析することを計画している。

(イ) 実行計画 4-B: 必要に応じて抗菌ペプチドと表皮常在細菌 (アクネ杆菌、表皮ブドウ球菌) を併用する。皮膚機能評価、表皮角化細胞分化連動遺伝子 (ケラチン、ロリクリン、インボルクリン) の発現の確認とともに、脂腺や皮膚付属器の形態変化を検討する。

(ウ) 実行計画 4-C: 必要に応じて、オートファジー機構関連分子の遺伝子改変マウスを用いた研究を考慮する。これらのマウスは、日本国内で入手可能なものがある (大阪大学、東京大学などと連絡済み)

#### 4. 研究成果

実行計画 1-A: オートファジー関連分子についてヒト皮膚の免疫染色を行った。正常皮膚では、オートファジーの key molecule である LC3B は表皮顆粒層でもっとも強く発現していた。また基底層でも染色が確認されたが、有棘層はほとんど染まらなかった。表皮の他、メラノサイト、毛包上皮、汗腺、脂腺といった付属器の腺細胞、毛細血管内皮細胞もよく染まっており、オートファジーが様々な物質合成に関与していることが改めて示された。乾癬やアトピー性皮膚炎といった表皮が肥厚する疾患においては、顆粒層での発現がより強くみられ、表皮肥厚による顆粒合成の亢進を反映していると考えた。有棘細胞癌では症例によって発現に差があり、腫瘍細胞の起源に由来する可能性が示唆された。

実行計画 2-A: ヒト培養表皮角化細胞を Toll 様受容体 (TLRs) 刺激因子 (リガンド) 1-9 で刺激した後 RNA を抽出し realtime-PCR を行ったところ、LC3B について、TLR9 リガンドで細胞を刺激した際に発現が増強する傾向が見られた。ATG5、ATG12 といったオートファジー関連分子の発現に変化は見られなかった。

高カルシウム培地で分化させたヒト培養表皮角化細胞で同様の実験を行ったが、安定した結果が得られなかった。アデノウイルスベクターを用いた ATG8 強発現の検討は行えなかった。

実行計画 2-B: カセリサイジンで刺激した細胞について、共焦点顕微鏡を用いた細胞内オートファジー関連分子の観察を試みたが、安定した結果は得られなかった。

研究計画 3, 4 については実行に至らなかった。

これらの結果は、オートファジーが皮膚での様々な物質合成に関与すること、細菌感染によりオートファジー及びそれに続く表皮過形成が誘導されることを示唆するものであるが、その機序を明らかにするには至らなかった。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

Status of autophagy and mTOR associate with mortality and cell survival of angiosarcoma (T Takahashi)  
International Investigative Dermatology meeting (2013 年 5 月 8 日)  
Edinburgh (U.K.)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 隼也 (TAKAHASHI, Toshiya)