

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32661

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893265

研究課題名(和文)皮膚の恒常性維持における細胞死の役割

研究課題名(英文) Deletion of Cflip in the epidermis results in TNFR1-dependent and independent lethal dermatitis

研究代表者

朴 雪花 (PIAO, Xuehua)

東邦大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70739812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス抑制遺伝子であるcFlipを表皮特異的欠損させたマウスはTNF依存性に皮膚炎を発症し、E18.5日で胎生致死になる。cFlipとTnfr1を二重欠損させたマウスは生後5日から皮膚炎を発症し、10日以内に死亡する。組織学検討では皮膚炎を発症した(P5)二重欠損マウスは異常所角化や角化の亢進、分化障害が認められた。マイクロアレイの解析ではIL-6、IL-24などの炎症性サイトカインの発現は上昇し、TNF非依存性に皮膚炎を発症する。

研究成果の概要(英文)：Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) is a protease-inactivate caspase 8 homologue that binds to caspase 8 and blocks apoptosis. Recent studies have shown that cFLIP prevents TNF-induced apoptosis of keratinocytes by using inducible keratinocyte-specific Cflip-deficient mice (Weinlich et al., Cell Rep. 2013; Panayotova-Domitrova et al., Cell Rep. 2013). However, it is unclear whether TNF-independent pathway might contribute to keratinocyte apoptosis in Cflip-deficient mice. Here we show that epidermis-specific Cflip-deficient mice (CflipE-KO) die in utero. Intriguingly, CflipE-KO;Tnfr1-/- mice were born at the expected Mendelian ratio, but still developed severe dermatitis soon after birth. Enhanced apoptosis and a defect in differentiation of keratinocytes were observed in CflipE-KO;Tnfr1-/- mice. Together, cFLIP plays a crucial role in protection of keratinocytes from TNFR1-dependent and -independent apoptosis.

研究分野：皮膚疾患

キーワード：皮膚炎 細胞死 apoptosis ケラチノサイト cFLIP バリア機能 皮膚の分化 TNF

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から様々な生体応答を制御する転写因子 NF- κ B の活性化に関与する分子である I κ B キナーゼのサブユニットや、細胞死制御に関与する FADD やカスパーゼ8などの遺伝子の皮膚特異的な遺伝子欠損マウスの解析から、皮膚の恒常性維持にはこれらの分子が必須の役割を果たしていることが明らかとなっている (Pasparakis, *Nat Rev Immunol* 2009)。代表者らのグループは NF- κ B は cellular FLICE inhibitory protein (cFLIP) の発現を誘導することで、細胞死の抑制に中心的な役割を果たしていることを報告してきた (Nakajima *et al*, *EMBO* 2006; Nakajima *et al*, *Oncogene* 2008)。最近の研究では、細胞死の誘導に関わる FADD がネクローシスを抑制することで、皮膚の恒常性維持に寄与していることが明らかになっている。したがって、アポトーシスとネクローシスの両方を抑制する cFLIP が、皮膚の恒常性維持においても重要な因子であることが推察される。一方で、皮膚のケラチノサイトは何ステップも分化過程を経て最終的には核が消失し、角化層を形成するようになる (Cornification)。この角化層の形成には Keratin 5, 10, Loricrin などの様々なタンパク質が関与していることが明らかにされているものの、この過程において、アポトーシスに必須の実行因子であるカスパーゼ経路がどのような役割を果たしているかについての詳細は依然として不明な点が多い。これまでの報告により、cFLIP は細胞死誘導因子によって誘導されるアポトーシスとネクローシスの両方を抑制することが明らかになっている。したがって、皮膚の恒常性維持における cFLIP の機能の重要性が推察される。

2. 研究の目的

皮膚の恒常性は、ケラチノサイトの増殖分化、および分化の最終過程である角化と、角化層の脱落のバランスの上で維持されている。ケラチノサイトの最終的な分化の結果形成される角化層は、皮膚のバリアー機能維持に重要であると考えられているが、その形成過程における細胞死の役割の詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では細胞死抑制因子である cFLIP の皮膚における機能を解析することで、ケラチノサイトの細胞死と皮膚のバリアー機能の関連性を明らかにし、皮膚のバリアー機能が低下することで発症してくる疾患を治療するための標的分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) ケラチノサイト特異的 *cFlip* 欠損 (*cFlip^{EKO}*)マウスの樹立

皮膚における cFLIP の機能を明らかにするために、*c-Flipflox/flox* マウスと *Keratin5-Cre* トランスジェニックマウスと交配させ、ケラチノサイト特異的に *cFlip* を欠損するコンディショナルノックアウトマウス (*cFlip^{EKO}*) を作製する。皮膚炎のために胎生致死となった場合には (実際に胎生致死であった) timed mating を行い胎生の何日目に皮膚炎が発症し、致死となっているかを明らかにする。

(2) *cFlip^{EKO}* マウスと *Tnfr1* 欠損マウスとの交配による二重欠損マウスの樹立

cFlip^{EKO} マウスは重篤な表現型を示す可能性があり、そのような場合 *cFlip^{EKO};Tnfr1^{-/-}* マウスを樹立し、メンデルの法則に従って出生するかあるいは出生後に皮膚炎が発症するかを検討する。

(3) 皮膚の組織学的解析

cFlip^{EKO} マウスはケラチノサイトの細胞死の亢進の結果、重篤な皮膚炎が発症することが推測される。皮膚組織を TUNEL 染色や活性化型カスパーゼ3に対する抗体で免疫染色し、アポトーシスが亢進しているかを明らかにする。また電子顕微鏡を用いて観察し、ネクロトーシス誘導の有無についても検討する。

(4) また出生直後の野生型と *cFlip^{EKO}* マウスの皮膚からケラチノサイトを採取し、アポトーシスやネクローシス誘導刺激に対する感受性を検討する。

(5) ケラチノサイト分化に関わるタンパク質の発現解析

cFlip 欠損による皮膚の病変を特定するために、ケラチノサイトの分化に関わるタンパク質の発現を免疫染色により解析する。

(6) *cFlip* 欠損により変動する遺伝子発現の網羅的解析

cFlip 欠損によるサイトカインなどの遺伝子発現への影響を解析する。野生型と *cFlip^{EKO}* マウスから採取した皮膚において、マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行う。マイクロアレイによって得られたデータから、*cFlip* 欠損皮膚組織で発現が上昇する遺伝子を同定する。マイクロアレイ解析によって同定された遺伝子の皮膚炎の誘導や増悪への関与、また代償性増殖への関与を発現上昇が認められた炎症性サイトカインに対する中和抗体投与により明らかにする。

4. 研究成果

(1) ケラチノサイト特異的な *cFlip* 欠損 (*cFlip^{EKO}*) マウスは、胎生 18.5 日にはケラチノサイトの細胞死の亢進の結果、胎生

致死となる。組織学検討では *cFlip*^{EKO} マウスの基底層のケラチノサイトはアポトーシスに陥り、炎症性細胞の浸潤、皮膚の肥厚が見られた。

(2) *cFlip*^{EKO} と *Tnfr1* 欠損マウスを交配するとメンデルの法則に従い出生してくるが、生後 5 日目から著明な皮膚炎を発症し、10 日目には全個体が死亡する。

(3) 皮膚炎を発症した *cFlip*^{EKO};*Tnfr1*^{-/-} マウスの組織学的な解析では、細胞死に陥っているケラチノサイトは予想外に少なかったものの野生型マウスに比較して増加しており、異所性の角化や角化の亢進が認められた。また、細胞増殖のマーカーである Ki67 の免疫染色を行ったところ Ki67 陽性の基底細胞数が野生型マウスに比較して、*cFlip*^{EKO};*Tnfr1*^{-/-} マウスでは増加していた。(図 1)

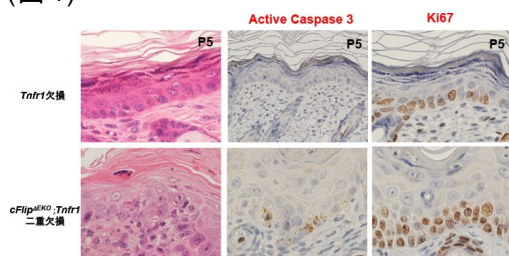


図1.

(4) 野生型と *cFlip*^{EKO} マウスの皮膚からケラチノサイトを採取し、アポトーシスやネクロトーシス誘導する TRAIL や抗 Fas 抗体を用いて初代培養ケラチノサイトを刺激した結果、*cFlip*^{EKO} マウスのケラチノサイトはこれらの刺激に対し細胞死が亢進した。

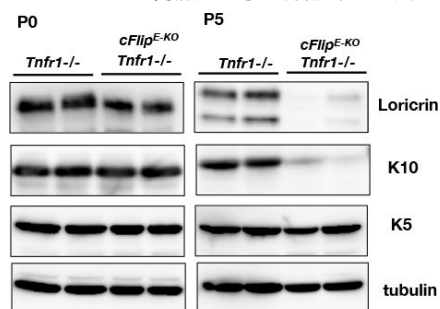


図2.

この結果から、生まれてくる二重欠損マウスに、これらに対する中和抗体を投与したが、皮膚炎による致死の表現系がレスキューできなかった。

(5) 組織学検討では出生直後 (P0) の *cFlip*^{EKO};*Tnfr1*^{-/-} マウスは皮膚の各分化マーカーである K5, K10, loricrin の発現は *Tnfr1* のみを欠損させたマウスと同じく正常であるが、基底層の細胞が一部乱れ、基底層の細胞が増殖した。皮膚炎を発症した (P5) 二重欠損マウスは早期分化マーカーである K5 は発現したが、中後期マーカーである K10, Loricrin の発現は消失し、分化障害が生じられた。(図 2)

(6) マイクロアレイ解析により二重欠損させたマウスは *Il-6*, *Il-24* など炎症性サイトカイン、また組織修復や抗菌ペプチドとして知られる *Reg3g* などの遺伝子の発現が上昇した。これらの炎症性サイトカインの発現と皮膚炎発症及びケラチノサイトの分化障害関連すると考えられる(図 3)。

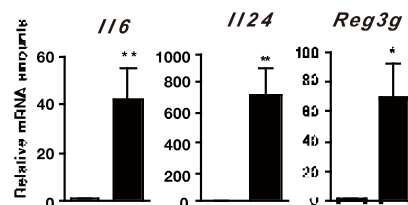


図3.

本研究は、細胞死と皮膚のケラチノサイトの増殖、分化関連に着目した。本研究において細胞死抑制因子である cFLIP を皮膚特異的に欠損したマウスの解析から、ケラチノサイトの細胞死と角化が亢進することを代表者らは見出している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Xhua Piao, Sanae Miyake, Sachiko Komazawa-Sakon, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, and Hiroyasu Nakano.

Deletion of Cflip in the epidermis results in TNFR1-dependent and independent lethal dermatitis. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回生化学会大会合同学会、2015 年 12 月 02 日、神戸ポートアイランド、兵庫県、神戸市

(2) Xuehua Piao, Sanae Miyake, Sachiko Komazawa-Sakon, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, and Hiroyasu Nakano.

Deletion of Cflip in the Epidermis Results in TNFR1-dependent and -independent Lethal Dermatitis. Japanese Australian Meeting On Cell Death, 2015 年 10 月 22 日, Melbourne, Australia.

(3) 朴雪花

皮膚バリア機能における cFLIP の役割,平成 26 年度順天堂アトピー研究センター研究プロジェクト評価会議, 2015 年 3 月 12 日, 東京都文京区順天堂大学 10 号館第一会議室

〔図書〕(計 1 件)

Nakano H, Piao X, Shindo R, Komazawa-Sakon S.

Springer International Publishing AG, Current
Topics in Microbiology and Immunology
“Apoptosis” 2015 年、200(1-22)

〔その他〕

ホームページ等

東邦大学生化学ホームページ

<http://tohobiochemi.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

朴 雪花 (PIAO, Xuehua)

東邦大学・医学部・博士研究員

研究者番号:70739812