



Overexpression of phospholipase C ϵ in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration

竹中, 延之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5114

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005114>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 竹中 延之
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第 5114 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 23 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Overexpression of phospholipase C ϵ in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration (角化細胞におけるホスホリパーゼ C ϵ の過剰発現はサイトカインの発現を上昇させ、表皮肥厚と T 細胞浸潤を伴う皮膚炎を引き起こす)

審 査 委 員

主 査 教 授 錦織 千佳子
教 授 南 康博
教 授 的崎 尚

(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Overexpression of phospholipase C ϵ in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and T-cell infiltration

角化細胞におけるホスホリパーゼ C ϵ の過剰発現はサイトカインの発現を上昇させ、表皮肥厚と T 細胞浸潤を伴う皮膚炎を引き起こす

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
分子生物学
(指導教員：片岡 徹 教授)

竹中 延之

緒言

表皮角化細胞は角層という外界とのバリアーを形成すると共に、種々のサイトカイン等を分泌することで免疫応答のメディエーターとしても機能している。皮膚には樹状細胞や CD4 陽性 T 細胞など多くの免疫細胞が存在しており、免疫応答の制御破綻が、炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎の発症に関与していると考えられている。これらの疾患は主に T 細胞由来のサイトカインが発症原因と考えられてきたが、角化細胞由来のサイトカイン等も皮膚疾患に大きく関与していると考えられている。

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) はホスファチジルイノシトール 4,5 - ビスリン酸を加水分解してジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を産生する酵素であり、様々な細胞応答を引き起こす。当研究室では、低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras 及び Rap の新規のエフェクターとして PLC ϵ を同定した。PLC ϵ 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた研究により、PLC ϵ がケモカインを含むサイトカイン類の産生制御に広く関与することが示唆された。

本研究では、表皮角化細胞での PLC ϵ の機能解析を目的とし、PLC ϵ を角化細胞特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現型の解析を行った。

実験方法・結果

1. 表皮角化細胞特異的 PLC ϵ 過剰発現マウスの作製と PLC ϵ 導入遺伝子の発現

Cre リコンビナーゼ (Cre) 依存的に導入遺伝子の転写が活性化されるベクター (CAG-XstopX-mPLC ϵ -IRES-NLLacZ) を用いてトランスジェニックマウス (CAG-XstopX-PLC ϵ マウス) を作製した。このマウスを表皮基底層細胞特異的に機能するヒト 5 型ケラチン (K5) プロモーター制御下で Cre を発現する K5-Cre マウスと交配し、角化細胞特異的に PLC ϵ を過剰発現するマウス (以下、K5-PLC ϵ -TG マウスと呼ぶ) を作製した。導入遺伝子の角化細胞での過剰発現は抗 PLC ϵ 抗体を用いた免疫染色法で確認した。

2. K5-PLC ϵ -TG マウスの病理学的解析

K5-PLC ϵ -TG マウスはメンデルの法則から予測される比率で得られ、出生直後は外見上、野生型マウスと区別がつかなかった。しかし、生後 9 日目以降、K5-PLC ϵ -TG マウスは皮膚全体に鱗屑を現し、さらに組織学的な解析から、表皮肥厚、過剰角化

と共に不全角化を伴う皮膚炎を自然発症することが分かった。肥厚を起こしている表皮細胞では、STAT3 が活性化されていた。これらの表現型は、免疫抑制剤であるFK506 軟膏（タクロリムス軟膏）やステロイド軟膏による処置で軽減された。しかし、軟膏処置を停止すると、表現型の再発が認められた。これらの症状は、生後9週目までに改善し、消失してしまった。しかし、一部のK5-PLCε-TG マウス（～5%）では、生後8ヶ月までに皮膚炎が、特に尾部と耳介にて再発し、その症状はより重篤なものであった。

3. K5-PLCε-TG マウス皮膚への炎症細胞の浸潤

生後9、26日目（症状を呈している時期）、及び6日目と15週（症状を呈していない時期）のマウス皮膚の組織切片を作製し、炎症細胞特異的な抗体を用いた免疫染色にて種々の炎症細胞の浸潤を解析した。鱗屑等症状が現れている生後9日目、26日目では好中球、マクロファージの皮膚への顕著な浸潤数の増加が認められたことから、K5-PLCε-TG マウスの表皮肥厚は炎症細胞の浸潤と同時に起こる事が分かった。また、CD4 陽性 T 細胞の浸潤数もこの時期に顕著な増加が認められたことから、CD4 陽性 T 細胞が皮膚炎発症に重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、表皮 CD205 陽性樹状細胞（これらは CD207 [ランゲリンとして知られる] 陽性でもある）も同時期に増加を認めたが、真皮 CD205 陽性樹状細胞は、P6 においても増加していた。一方、CD317 陽性形質細胞様樹状細胞は、P6 の K5-PLCε-TG マウスで顕著に増加していた。これらの事から、少なくとも形質細胞様樹状細胞は、T 細胞浸潤に先立って浸潤していることが分かった。

4. リンパ節及び脾臓の T 細胞領域における T 細胞の活性化

生後6、9、26日目及び16週令のK5-PLCε-TG マウスから皮下リンパ節と脾臓の組織切片を作製し、活性化 T 細胞マーカーの1つである CD54 抗体を用いた免疫染色で解析した。その結果、症状が現れている K5-PLCε-TG マウスでは皮下リンパ節の CD4 陽性 T 細胞の大半が CD54 陽性であったが、脾臓では CD54 陽性 CD4 陽性 T 細胞の増加は認められなかった。これらのことから、K5-PLCε-TG マウスの炎症は全身性ではなく皮膚限局的であることが明らかとなった。

5. K5-PLCε-TG マウス皮膚の炎症性サイトカイン等の発現変化

生後6、9、26日目、及び15週令のK5-PLCε-TG マウス皮膚を用いて、皮膚炎発症に関わりうるサイトカイン類の mRNA レベルを定量的 RT-PCR にて解析を行った。その結果、鱗屑が現れているマウス皮膚では、インターロイキン (IL)-17、IL-22、インターフェロン (IFN)-γ といったヘルパー T (Th) 細胞由来と考えられるサイト

カインの発現が上昇していた。組織切片の免疫染色による解析から、これらサイトカインの産生細胞は皮膚に浸潤している CD4 陽性 T 細胞であり、また、それらの CD4 陽性 T 細胞の大半が IL-22 産生細胞であることが分かった。一方、IL-4 については目立った上昇が無かった。さらに、Th 細胞の一種である Th17 細胞の分化・安定化に関わる IL-23 の発現上昇も顕著に認められた。IL-23 の発現上昇は、皮膚炎を示す以前の生後6日目のK5-PLCε-TG マウス皮膚においても認められたことから、これが皮膚炎発症に重要である可能性が考えられた。また、Cxcl-1/2、Ccl-20 や Cxcl-10 など、好中球や T 細胞の遊走に関わるケモカインの発現上昇も認められた。

6. K5-PLCε-TG マウス由来角化細胞におけるサイトカイン類の発現変化

角化細胞の初代培養を行い、PLCεの過剰発現に伴って転写誘導されるサイトカイン類の mRNA レベルを定量的 RT-PCR にて解析したところ、皮膚での発現上昇が認められた IL-23、IL-1、Ccl-20、Cxcl-1/2 や Cxcl-10 などの発現が顕著に上昇していた。このことから、角化細胞におけるこれらの遺伝子の発現誘導への PLCεシグナル伝達系の関与が示唆された。

7. K5-PLCε-TG 角化細胞の IL-23 産生能解析

文献情報から、K5-PLCε-TG マウスの皮膚炎発症に IL-23 が関与すると予想した。そこで、初代培養角化細胞の培養上清への IL-23 の分泌量を ELISA 法にて定量した。その結果、K5-PLCε-TG マウス由来細胞での増加が認められた。さらに、抗 IL-23 p19 抗体を用いた皮膚切片の免疫染色の結果、生後6、9、26日目のK5-PLCε-TG マウス表皮において IL-23 の発現上昇が確認された。また、症状が消失している15週令では IL-23 陽性細胞は検出されなかったことから、K5-PLCε-TG マウスの表皮肥厚への IL-23 の関与が示唆された。

8. 皮膚炎への IL-23 阻害効果

抗 IL-23 中和抗体を K5-PLCε-TG マウス皮下へ注射し、その影響を検討した。その結果、IL-23 中和化により、CD4 陽性 T 細胞の浸潤の抑制と皮膚炎の治癒が認められた。さらに中和化により浸潤を抑制された CD4 陽性 T 細胞の大半は IL-22 産生細胞であった。これらのことから、IL-23 の発現上昇は K5-PLCε-TG マウスの皮膚炎発症に重要であることが示唆された。

9. 皮膚炎発症における FK506 軟膏の効果

症状発現前の生後6日目から FK506 軟膏処置を行い、生後9日目に皮膚の組織切片を作製し、その効果について詳細な解析を行った。その結果、軟膏処置は効果的に皮膚炎の発症を抑制し、T 細胞浸潤も顕著に抑制した。Th 細胞由来のサイト

カイン類を定量的 RT-PCR で解析したところ、Th17 細胞由来の IL-17 と IL-22 の発現は完全に消失したが、Th1 サイトカインの一つである IFN- γ や IL-23 の発現変化は認められなかった。以上の結果は、K5-PLC ϵ -TG マウスの皮膚炎発症に、IL-22 産生 CD4 陽性 T 細胞が関与するという考え方を支持した。

考察

本研究で、表皮角化細胞特異的 PLC ϵ 過剰発現マウス (K5-PLC ϵ -TG マウス) を作出し、このマウスが生後 9 日目から鱗屑を伴う皮膚炎を自然発症することを見出した。K5-PLC ϵ -TG マウスでは、PLC ϵ の過剰なシグナルが角化細胞における IL-23 の発現や T 細胞等に対する遊走因子の発現を誘導し、これらが IL-22 産生 T 細胞 (おそらく Th17 細胞と思われる) の浸潤を引き起こし、分泌された IL-22 が角化細胞の増殖を引き起こし、皮膚炎の発症に繋がると考えられる。

現在、IL-23 や IL-22 の発現上昇は尋常性乾癬、関節リウマチや炎症性腸疾患などの炎症性疾患の発症に繋がっていると考えられている。K5-PLC ϵ -TG マウスで観察された表現型、即ち表皮肥厚や角化細胞における STAT3 の異常な活性化、炎症細胞の皮膚への浸潤、Th サイトカインの上昇などは、ヒト乾癬の皮膚でも見られるものである。従って、K5-PLC ϵ -TG マウスは、炎症性疾患の発症機構の解明に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2147号	氏名	竹中 延之
論文題目 Title of Dissertation	角化細胞におけるホスホリパーゼ C α の過剰発現はサイトカインの発現を上昇させ、表皮肥厚とT細胞浸潤を伴う皮膚炎を引き起こす Overexpression of phospholipase C α in keratinocytes upregulates cytokine expression and causes dermatitis with acanthosis and Tcell infiltration		
審査委員 Examiner	主査 錦織 千佳子 Chief Examiner 副査 南 康博 Vice-examiner 副査 的 崎 尚 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

表皮角化細胞は角層という外界とのバリアーを形成すると共に、種々のサイトカイン等を分泌することで免疫応答のメディエーターとしても機能している。皮膚には樹状細胞やCD4陽性T細胞など多くの免疫細胞が存在しており、免疫応答の制御破綻が、炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎の発症に関与していると考えられている。これらの疾患は主にT細胞由来のサイトカインが発症原因と考えられてきたが、角化細胞由来のサイトカインも大きく関与していると考えられている。

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC) はホスファチジルイノシトール 4,5 -ビスリン酸を加水分解してジアシルグリセロールとイノシトール三リン酸を産生する酵素であり、様々な細胞応答を引き起こす。申請者の指導教員片岡らは、低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras 及び Rap の新規のエフェクターとして PLC α を同定し、PLC α 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた研究により、PLC α がケモカインを含むサイトカイン類の産生制御に広く関わることを示した。

申請者達は、表皮角化細胞での PLC α の機能解析を目的とし、Cre リコンビナーゼ (Cre) 依存的に導入遺伝子の転写が活性化されるベクター (CAG-XstopX-mPLC α -IRES-NLacZ) を用いてトランスジェニックマウス (CAG-XstopX-PLC α マウス) を作製し、このマウスを表皮基底層細胞特異的に機能するヒト 5 型ケラチン (K5) プロモーター制御下で Cre を発現する K5-Cre マウスと交配して、角化細胞特異的に PLC α を過剰発現するマウス (以下、K5-PLC α -TG マウスと呼ぶ) を作製した。

得られた K5-PLC α -TG マウスは、出生直後は外見上、野生型マウスと区別がつかなかったが、生後 9 日目以降、K5-PLC α -TG マウスは皮膚全体に鱗屑を現し、さらに組織学的な解析から、表皮肥厚、過剰角化と共に不全角化を伴う皮膚炎を自然発症することを示した。肥厚を起こしている表皮角化細胞では、STAT3 が活性化されていた。これらの表現型は、抗炎症薬であるステロイド軟膏や免疫抑制剤である FK506 軟膏 (タクロリムス軟膏) による処置で軽減された。そこで、炎症細胞特異的な抗体を用いた免疫染色にて種々の炎症細胞浸潤の解析を行ったところ、鱗屑等症状が現れている生後 9 日目、26 日目では好中球、マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、骨髄系樹状細胞の皮膚への顕著な浸潤数の増加が認められ、CD317 陽性形質細胞様樹状細胞は、生後 6 日目の K5-PLC α -TG マウスで顕著に増加していたことから、形質細胞様樹状細胞は他の炎症細胞に先立って浸潤していることが示唆された。次に、生後 6、9、26 日目、及び 15 週令の K5-PLC α -TG マウス皮膚を用いて、皮膚炎発症に関わりうるサイトカイン類の mRNA レベルを定量的 RT-PCR にて解析したところ、症状が現れているマウス皮膚では、インターロイキン (IL)-17、IL-22、インターフェロン (IFN)- γ といったヘルパー T (Th) 細胞由来と考えられるサイトカインの発現が上昇していた。さらに、Th 細胞の一種である Th17 細胞の分化・安定化に関わる IL-23 の発現上昇も顕著に認められた。IL-23 の発現上昇は、皮膚炎を示す以前の生後 6 日目の K5-PLC α -TG

マウス皮膚及び K5-PLC ϵ -TG マウス由来角化細胞においても認められたことから、これが皮膚炎発症に重要である可能性を考え、初代培養角化細胞の培養上清への IL-23 の分泌量を ELISA 法にて定量したところ、K5-PLC ϵ -TG マウス由来細胞での増加が認められた。さらに、抗 IL-23 p19 抗体を用いた皮膚切片の免疫染色の結果、生後 6、9、26 日目の K5-PLC ϵ -TG マウス表皮において IL-23 の発現上昇が確認され、IL-23 は角化細胞から産生されることが明らかとなった。次に、抗 IL-23 中和抗体を K5-PLC ϵ -TG マウス皮下へ注射し、その影響を検討した。その結果、IL-23 中和化により、CD4 陽性 T 細胞の浸潤の抑制と皮膚炎の治癒が認められた。さらに中和化により浸潤を抑制された CD4 陽性 T 細胞の大半は IL-22 産生細胞であることが明らかとなった。FK506 軟膏処置により好中球、T 細胞の浸潤を顕著に抑制され、Th 細胞由来のサイトカイン類の RT-PCR を用いた定量的解析では、Th17 細胞由来の IL-17 と IL-22 の発現は完全に消失したが、Th1 サイトカインである IFN- γ の発現変化は認められなかった。免疫染色により IL-22 産生 T 細胞の浸潤が軟膏処置により抑制されており、IL-22 産生 T 細胞が皮膚炎に関与することを支持する結果であった。

K5-PLC ϵ -TG マウスでは、PLC ϵ の過剰なシグナルが角化細胞における IL-23 の発現や T 細胞等に対する遊走因子の発現を誘導し、これらが IL-22 産生 T 細胞（おそらく Th17 細胞と思われる）の浸潤を引き起こし、分泌された IL-22 が角化細胞の増殖を引き起こし、皮膚炎の発症に繋がると考えられた。

本研究は、トランスジェニックマウスの作成を通じた PLC ϵ の皮膚炎における機能に関する研究である。さらに、この研究はこれまであまり注目されていなかった表皮角化細胞が、IL-23 などの炎症性サイトカインの産生を通じて IL-22 産生 T 細胞を皮膚に集積させ、それにより慢性皮膚炎の発症に重要な役割を果たし得ることを示したものとして、価値ある集積であると思われる。よって本研究者は、博士（医学）の学位を取得する資格があると認める。