

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	澁谷 貴史
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Psoriasis-like skin inflammation is reduced in transgenic mice overexpressing inhibitory PAS domain protein (Inhibitory PAS domain protein 過剰発現マウスでは乾癬様皮膚炎が減弱する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>飯沼 晋・本間 大・牧野雄一・山本明美</p> <p style="text-align: right;">J Dermatol. 2019 掲載予定</p> <p>研 究 目 的</p> <p>Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) は、低酸素によって誘導される転写因子であり、HIF-1α と HIF-1β の 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体である。HIF-1 は DNA 上の Hypoxia responsive element(HRE) への結合を介して Vascular endothelial growth factor (VEGF) などの低酸素応答に関わる多くの遺伝子発現を調節する。Inhibitory PAS domain protein (IPAS) は HIF-3α のスプライシングバリエーションであり、HIF-1α との結合により HIF-1 の HRE への結合を阻害する。IPAS は角膜上皮に発現し、HIF-1 を介する VEGF 発現を減少させることにより角膜の無血管構造に寄与していることが明らかになっている (引用文献 1)。さらに IPAS は培養表皮ケラチノサイトでも発現していることが知られている(引用文献 2)。</p> <p>しかしながら IPAS/HIF-3α の皮膚における機能は不明である。乾癬は慢性の皮膚炎症性疾患であり、その病理組織では表皮の過増殖と炎症細胞浸潤に加えて真皮乳頭内の毛細血管の増加と拡張を特徴とする。HIF-1α はヒト乾癬表皮で高発現していることが知られており、VEGF の発現を介して血管新生に寄与していることが示されている(引用文献 3)。本研究の目的は、ヒト乾癬およびマウス乾癬モデルの病態における IPAS/HIF-3α の機能を明らかにすることである。</p>			

材 料 ・ 方 法

①マウス

IPAS トランスジェニックマウスは共同研究者である旭川医科大学内科学講座（病態代謝内科学分野）牧野雄一先生から供与を受けた。このマウスはCMV プロモーター下でFLAG 標識 IPAS(FLAG-IPAS)を高発現するトランスジェニックマウスである。動物実験は旭川医科大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会の承認の下で行われた。

②マウス乾癬様皮膚炎

IPAS トランスジェニックマウスもしくはコントロールマウス（8週齢、メス）を実験に使用した。マウス乾癬様皮膚炎を誘導するため、マウス耳介もしくは除毛した背部皮膚にイミキモド含有クリーム（ベセルナクリーム®）を1日1回連日6日間まで外用し、組織を採取した

③ヒト乾癬

ヒト乾癬組織は旭川医科大学倫理委員会の承認の下で旭川医科大学皮膚科に通院中の乾癬患者から採取された。

④皮膚組織の解析

採取された皮膚組織はヘマトキシリンエオジン染色および免疫組織化学染色（HIF-1 α 、HIF-3 α ）、免疫蛍光染色（Ki67、CD31）で解析した。また一部は組織から蛋白を抽出しウェスタンブロッティング（HIF-3 α ）で解析した。さらに一部は組織から RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR（*HIF1A*、*IPAS/HIF3A*、*VEGFA*）で解析した。

結 果

①ヒト乾癬およびマウス乾癬様皮膚炎における HIF-1 α と HIF-3 α の発現解析

乾癬における IPAS/HIF-3 α の役割を明らかにするため、われわれは最初に HIF-1 α と HIF-3 α のヒト乾癬における発現を解析した。免疫組織化学染色で HIF-1 α はヒト正常表皮の核に局在しており、その発現は乾癬表皮で増加していた。一方、免疫組織化学染色で HIF-3 α もヒト正常表皮の核に局在していたが、その発現は乾癬表皮で減少していた。ウェスタンブロッティングにおいても HIF-3 α の発現は正常皮膚と比較して乾癬皮膚では減少していることを確認した。

次にわれわれは HIF-1 α と IPAS/HIF-3 α のイミキモド外用によるマウス乾癬様皮膚炎における発現を解析した。免疫組織化学染色で HIF-1 α の発現はヒトと同様にマウス正常表皮の核に局在しており、その発現は乾癬様皮膚炎表皮で増加していた。この結果と一致して、リアルタイム RT-PCR で HIF-1 α の標的遺伝子である VEGF の発現は、正常皮膚と比較してマウス乾癬様皮膚炎では増加していた。一方、マウス乾癬様皮膚炎では IPAS/HIF-3 α の発現は低下していた。これらの結果からヒト乾癬およびマウス乾癬様皮膚炎では、HIF-1 α の発現は増加している一方で、IPAS/HIF-3 α の発現は減少していることが明らかになった。

②IPAS トランスジェニックマウスにおける乾癬様皮膚炎の解析

IPAS/HIF-3 α の皮膚における機能を解析するために IPAS トランスジェニックマウスを用いて解析を行った。まず、ウェスタンブロットイングで IPAS トランスジェニックマウスの皮膚における FLAG-IPAS の過剰発現を確認した。IPAS トランスジェニックマウスは発生に明らかな異常が無く、成体皮膚においても組織学的にコントロールマウスと明らかな差異を認めなかった。また CD31 の免疫蛍光染色でも血管構造に明らかな差異を認めなかった。

過去の報告で表皮ケラチノサイトにおける HIF-1 α の活性化は、皮膚炎症において重要な役割を果たすことが報告されている。そこでわれわれは IPAS/HIF-3 α が HIF-1 α の抑制を介して乾癬様皮膚炎を抑制する可能性について検討した。IPAS トランスジェニックマウスとコントロールマウスでイミキモドによる乾癬様皮膚炎の発症を比較したところ、組織学的に IPAS トランスジェニックマウスでは有意に表皮肥厚が抑制されていた。さらに IPAS トランスジェニックマウスでは表皮の Ki-67 陽性細胞が有意に減少していた。リアルタイム RT-PCR で IPAS トランスジェニックマウスでは有意に VEGF の発現が低下しており、IPAS の過剰発現が HIF-1 α -VEGF 経路を抑制することが示唆された。以上の結果から IPAS/HIF-3 α は HIF-1 α の阻害を介して乾癬様皮膚炎を抑制することが明らかになった。

考 案

今回の研究で、われわれは HIF-1 α の阻害因子である IPAS/HIF-3 α の発現が、乾癬表皮では低下していることを明らかにした。さらに IPAS 過剰発現マウスでは HIF-1-VEGF 経路が阻害されることにより乾癬様皮膚炎が抑制されることを明らかにした。以上の結果から乾癬表皮において IPAS/HIF-3 α の発現低下が HIF-1 による VEGF 発現を促進することで乾癬の病態に寄与する可能性が示された。

VEGF による血管新生は乾癬の病態において重要な役割を果たすことが明らかになっている。乾癬病変部では VEGF とその受容体の発現が亢進していることが知られている。さらに表皮ケラチノサイトにおいて VEGF を過剰発現したトランスジェニックマウスでは乾癬様皮膚炎を発症することが知られている(引用文献 3)。乾癬表皮での HIF-1 α の発現は VEGF の発現パターンと一致しており、HIF-1 α の乾癬における重要性が示唆されている。また HIF-1-VEGF 経路は乾癬のみならず創傷治癒や腫瘍形成においても重要な役割を果たしており、皮膚における HIF-1 α の調節メカニズムの解明に注目が集まっている。今回の研究で初めて皮膚における IPAS/HIF-3 α の HIF-1 調節メカニズムの意義が明らかになった。今後も皮膚疾患における IPAS/HIF-3 α の機能を明らかにすることが重要と考えられた。

結 論

今回の研究で、乾癬表皮における IPAS/HIF-3 α の発現低下が、HIF-1 による VEGF 発現を促進することで乾癬の病態に寄与することが明らかになった。

引用文献

1. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*. 2001 Nov 29;414(6863):550-4.
2. Weir L, Robertson D, Leigh IM, Vass JK, Panteleyev AA. Hypoxia-mediated control of HIF/ARNT machinery in epidermal keratinocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Jan;1813(1):60-72.
3. Rezvani HR, Ali N, Nissen LJ, Harfouche G, de Verneuil H, Taieb A, et al. HIF-1alpha in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *J Invest Dermatol*. 2011 Sep;131(9):1793-805.

参考文献

1. Shibuya T, Honma M, Iinuma S, Iwasaki T, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A. Alteration of serum thymus and activation-regulated chemokine level during biologic therapy for psoriasis: Possibility as a marker reflecting favorable response to anti-interleukin-17A agents. *J Dermatol*. 2018 Jun;45(6):710-4.
2. Shibuya T, Honma M, Iinuma S, Iwasaki T, Ishida-Yamamoto A. Persistent pruritus in psoriatic patients during administration of biologics. *J Dermatol*. 2018 Aug;45(8):e223.
3. Shibuya T, Komatsu S, Takahashi I, Honma M, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Kamiya T, Fukuda S, Hashimoto T, Iizuka H. Mucous membrane pemphigoid accompanied by ovarian cancer: a case with autoantibodies solely against gamma(2) -subunit of laminin-332. *J Dermatol*. 2012 Oct;39(10):882-4.