

アトピー性皮膚炎における新規オートファジーの関与とそれを応用した治療法開発

東京医科歯科大学難治疾患研究所

清水 重臣

We aimed to elucidate the role of autophagy in skin development. There are two types of autophagy, namely canonical autophagy and alternative autophagy, and we generated various skin-specific autophagy gene-knockout mice. Although simple knockout mice of canonical autophagy and alternative autophagy did not show any remarkable abnormalities, double-knockout (Beclin1-knockout) mice died within a day after birth owing to impairment of epidermal barrier. Furthermore, we found that Beclin 1 deficiency causes mislocalization of integrins, abnormal cell detachment of basal cells and their immature differentiation, and abnormal skin development.

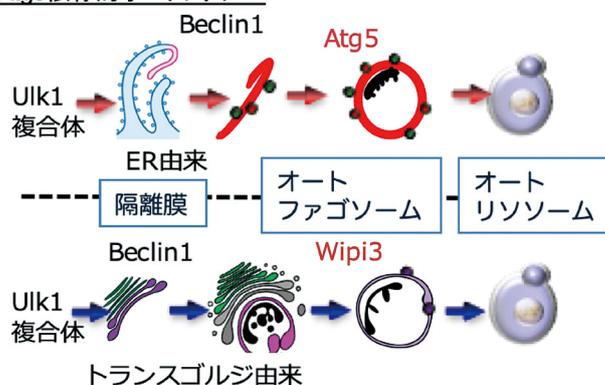
We also screened a low-molecular weight compound library to identify chemicals with alternative autophagy-inducing activities and successfully identified candidate compounds. By the application of these compounds to atopic dermatitis model mice, we obtained TMD-AD129 compound which exhibited strong anti-dermatitis activity. At present, we are optimizing this compound for development as drugs.

1. 緒言

ヒトの皮膚には200種以上の菌が共生しているが、皮膚には、角質層などによる「物理的バリア」、表皮角化細胞から分泌される抗菌ペプチドによる「自然免疫バリア」、細胞内に侵入した細菌を殺菌するオートファジー機構「ゼノファジー」の3種のデフェンス機構が備わっており、微生物による侵入を阻止し恒常性を保っている。しかし、宿主側の変調や微生物叢のプロファイルに変化が生じると、恒常性が破綻し(dysbiosis)、アトピー性皮膚炎などの疾患発症へとつながっていく。

オートファジー(自食現象)とは、細胞内の自己構成成分(例えば、不要なタンパク質や傷害を受けたオルガネラなど)を分解する細胞機能であり、細胞内浄化作用を有するため、その変調は様々な疾患や病態の原因となる。皮膚細胞においても、オートファジー機構は存在しており、紫外線を浴びたときなどにオートファジーが活性化されることが知られている。皮膚細胞を含めて、全ての細胞は2種類のオートファジー機構を有している。即ち、Atg5分子に依存して小胞体膜に由来する通常型オートファジーとAtg5分子を利用せずゴルジ体膜に由来する新規オートファジーである^{1,2)}(図1)。両者ともに、初期段階では、隔離膜と呼ばれる小さな2重膜構造物が形成される。この隔離膜は伸長すると共に湾曲し、細胞質やオルガネラを囲い込み、最終的には両端が融合したオートファゴソームがで

Atg5依存的オートファジー



新規オートファジー

図1 全ての細胞は、Atg5依存的オートファジーと新規オートファジーの2つの機能を有している。両者は、①膜の由来、②実行分子、③分解基質を異にしている。

き上がる。オートファゴソームが形成されると、その後リソソームが直接融合し、リソソームの消化酵素によってその内容物が消化される。リソソームには、カテプシンなどのタンパク質分解酵素、酸性リパーゼ、DNA分解酵素など様々な種類の消化酵素が含まれているため、内容物はほぼ完全に消化されることとなる。2種類のオートファジーは、これらのオートファジー形態に関しては、ほとんど差異が認められない。一方、2つのオートファジーは、(1)誘導する刺激の種類、(2)オートファジー膜の由来、(3)実行分子の種類、(4)分解する基質の種類が異なっており、細胞内では、全く異なる役割を果たしている³⁻⁵⁾。

前述のごとく、アトピー性皮膚炎の発症には、宿主側の変調が大きく関わっているため、オートファジーの変調はその原因のひとつとなりうる。そこで、本研究では、まず皮膚においてオートファジーがどのような役割を果たしているかを明らかにした。次に、新規オートファジーを活性化できる化合物を探索して、アトピー性皮膚炎の治療への



The role of alternative autophagy in atopic dermatitis and its therapeutic use

Shigeomi Shimizu

Tokyo Medical and Dental University, Medical Research Institute

応用を目指した。

2. 方法

2.1. 皮膚におけるオートファジーの役割を明らかにする

方法1:

オートファジー分子を欠損したマウスを複数作製し、neonateならびに adult miceにおいてその表現系を観察した。皮膚に異常が見られた場合には、皮膚からの水分蒸散量(TWEL)をTWEL測定器を用いて計測した。また、皮膚の組織を採取し、免疫組織染色ならびにwestern blottingによる解析を行った。基底細胞の分裂方向の測定には、survivin染色法を用いた。

2.2. アトピー性皮膚炎に有効な新規オートファジー誘導天然物/化合物を開発する

方法2:

約20000種類の低分子化合物と約5000種類の天然物から、新規オートファジー誘導化合物/天然物をハイスループレットアッセイにより同定した。

ダニ抗原塗布による皮膚炎を作製し、各化合物を塗布(n=5, 1日おき, 200μL患部に塗布/匹)し、8日後に皮膚炎の程度をスコア化した。

3. 結果

課題1: 皮膚におけるオートファジーの役割を明らかにする

上記課題のために、皮膚特異的オートファジー欠損マウスを複数種類作成した⁶⁾。

- 1: 通常型オートファジー欠損マウス: Atg5 floxマウス、Atg7 floxマウス、Atg14 floxマウスを、それぞれkeratin5 (K5)-creマウスと交配して、皮膚特異的通常型オートファジー欠損マウスを作製した。しかしながら、皮膚に明らかな異常を認めるマウスはなかった。
- 2: 新規オートファジー欠損マウス: Wipi3 floxマウスをK5-creマウスと交配して、皮膚特異的新規オートファジー欠損マウスを作製した。しかしながら、皮膚の顕著な異常は認められなかった。
- 3: 両オートファジー欠損マウス: 両方のオートファジーに共通して機能するBeclin1のfloxマウスとK5-creマウスと交配して、皮膚特異的両オートファジー欠損マウスを作製したところ、当該マウスはすべて生後1日以内に死亡した。また、死因は皮膚のバリア形成機構の不全による多量の水分蒸散量が原因であると思われた(図2)。さらに、皮膚の詳細な解析を行ったところ、K5の発現量が多い一方、K10やFilaggrinの発現量が低く、基底層からの皮膚細胞分化に異常があることが判明した(図3)。

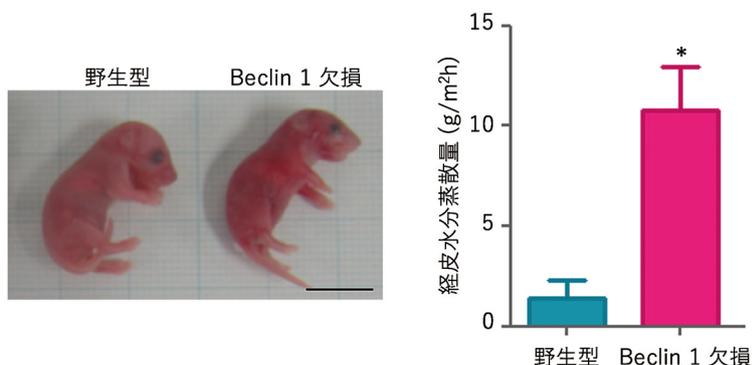


図2: 皮膚特異的Beclin1欠損マウスは、皮膚のバリア形成機構の不全によって、水分蒸散量が多く、生後1日以内に死亡した。

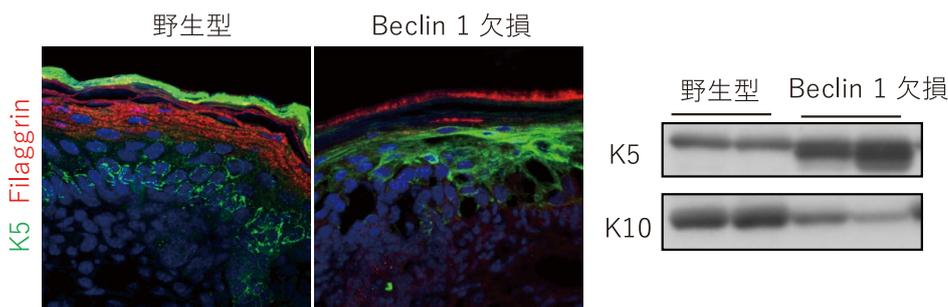


図3 皮膚特異的Beclin1欠損マウスは、K5の発現量が多く、一方、K10の発現量やFilaggrinの発現量が低く、基底層からの皮膚細胞の分化に異常があることが判明した。

このため、基底層細胞の分裂方向を、Survivin染色にて観察したところ、正常よりも垂直方向の分裂が多く、細胞が十分に分化しないまま基底層から上層に上がっているものと思われた(図4)。また、この原因が細胞接着に機能するインテグリンの局在異常に起因する可能性が考えられた。即ち、本来細胞膜に存在して細胞外マトリックスと結合するインテグリンが細胞内にとどまっていたため、これが原因であると思われた(図5)。

以上より、皮膚において、2つのオートファジーは代

償しながら、基底細胞の細胞分化を正常に保っていること、これにより、正常な皮膚が形成されることが明らかとなった。

課題2: 約20000種類の低分子化合物と約5000種類の天然物を新規オートファジーモニター細胞に投与し、ハイスループットスクリーニングにて、約110種類の新規オートファジー誘導化合物/天然物を見いだした(図6)。
 ビオスタAD誘発NC/Ngaマウス皮膚炎モデルを作製

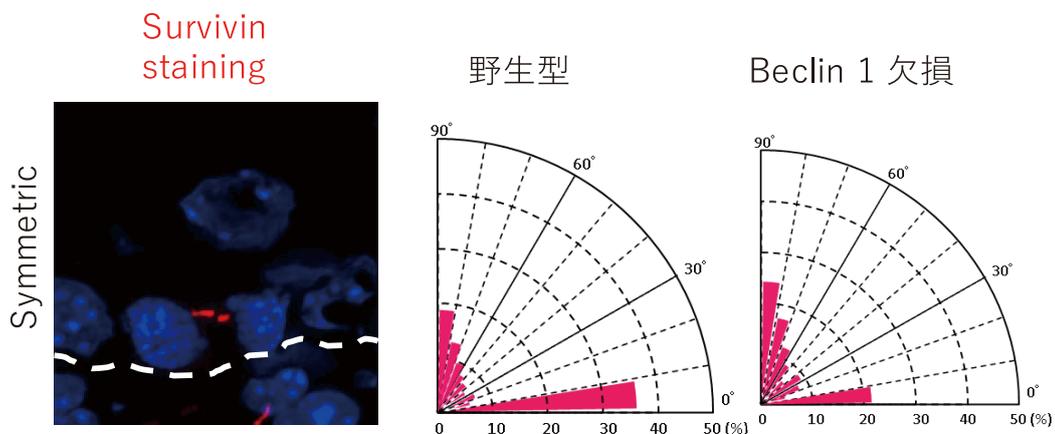


図4 Survivin染色により、基底層細胞の分裂方向を解析したところ、皮膚特異的Beclin1欠損マウスでは、水平方向より垂直方向の分裂が多く、未分化のまま上層に上がっていることが示された。

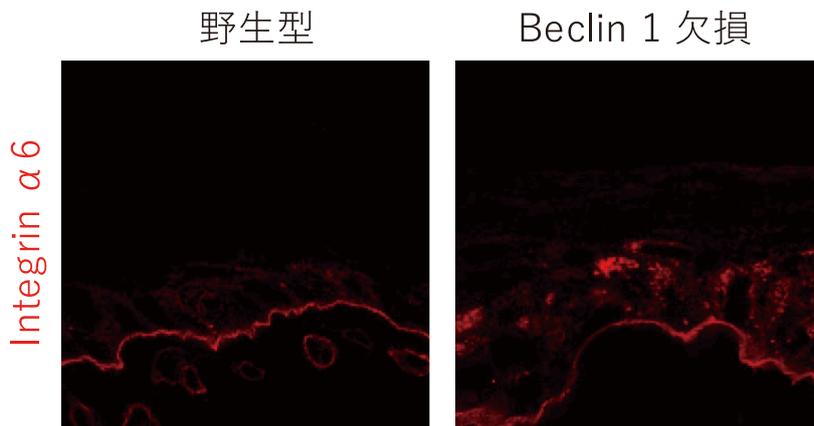


図5 皮膚特異的Beclin1欠損マウスでは、インテグリンの局在が異常であった。

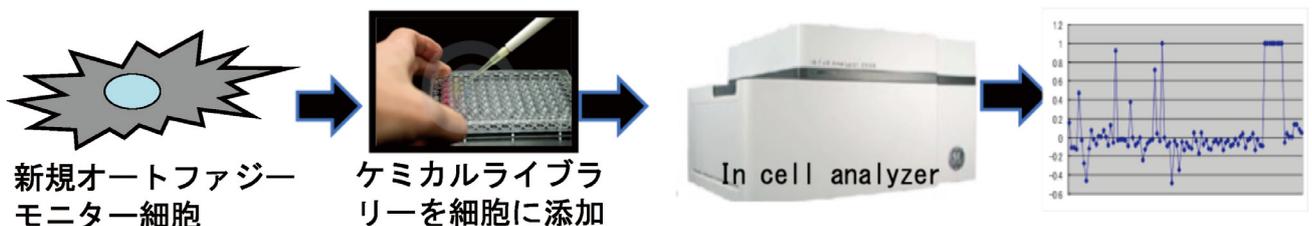


図6 ハイスループットを用いた新規オートファジーの計測
 新規オートファジーモニター細胞に化合物ライブラリーを投与して、その後の、新規オートファジー誘導をCell Imagerで定量測定する。

対照液塗布



- ① 発赤・出血:2
- ② 痂皮形成・乾燥:2
- ③ 浮腫:1
- ④ 擦傷・組織欠損:2
- 合計スコア:7**

TMD-AD129塗布



- ① 発赤・出血:1
- ② 痂皮形成・乾燥:2
- ③ 浮腫:0
- ④ 擦傷・組織欠損:1
- 合計スコア:4**

図7 TMD-AD129を隔日に塗布したマウスは皮膚炎が改善した。

し、各化合物 (200 μL) を隔日に塗布し、8日目に皮膚の性状をスコア化した。その結果、化合物TMD-AD129を塗布したマウスにおいて、皮膚炎の顕著な改善を認めた(図7)。また、このマウスにおいては、脾臓の重量も 0.1032 ± 0.032 g (対照は 0.142 ± 0.024 g) と腫大が顕著に抑えられていた。

これらの結果より、新規オートファジー誘導化合物の塗布により、アトピー性皮膚炎が改善することが示された。

4. 考 察

本研究によって、皮膚形成を正常に行うために、2つのオートファジーが代償的に機能していること、その主な機序が、インテグリンの細胞膜への局在制御によることが明らかとなった。新規オートファジーは、ゴルジ体から細胞外あるいは細胞膜にタンパク質を輸送する際に、その量の調節を行っている。即ち、過剰な分子が輸送されようとするときに、新規オートファジーが活性化されて、これらを分解するのである。皮膚においては、インテグリンが新規オートファジーの分解基質となっているため、新規オートファジーが破綻すると、インテグリンが細胞内に異常に蓄積する(図5)。すると、新たなインテグリンが合成されずに細胞膜上のインテグリン量が減少し、細胞接着性が低下するものと考えられる。さらに、細胞接着性が低下すると、

未分化細胞が分化されないまま脱接着して上層に上がり(図4)、皮膚の形成不全が起こる(図1)ものと考えられた。新規オートファジーの機能不全は通常型オートファジーによって代用されるので、両者のオートファジーを欠損させたときのみ皮膚形成異常が出現するものと考えられる。

このように、オートファジーは皮膚形成に関わっているために、皮膚炎等の病態においても何らかの関与があるものと思われた。実際に、アトピー性皮膚炎の皮膚に新規オートファジー誘導化合物を塗布することによって、劇的な皮膚症状の改善ならびに脾臓重量の改善が認められている。今後、インテグリンの局在を含めて、新規オートファジー誘導化合物の作用メカニズムを明らかにすることが重要である。

5. 総 括

本研究により、2つのオートファジーは代償しながら、正常な皮膚形成に機能していることが明らかとなった。また、新規オートファジーの誘導により、アトピー性皮膚炎の改善が期待できることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の遂行にご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Nishida, Y.; Arakawa, S.; Fujitani, K.; Yamaguchi, H.; Mizuta, T.; Kanaseki, T.; Komatsu, K.; Otsu, K.; Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. *Nature* **2009**, *461*, 654-658.
- 2) Honda, S.; Arakawa, S.; Nishida, Y.; Yamaguchi, H.; Ishii, E.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2014**, *5*, 4004.
- 3) Yamaguchi, H.; Arakawa, S.; Kanaseki, T.; Miyatsuka, T.; Fujitani, Y.; Watada, H.; Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. *EMBO J.* **2016**, *35*, 1991-2007.
- 4) Torii, S.; Yamaguchi, H.; Nakanishi, A.; Arakawa, S.; Honda, S.; Moriwaki, K.; Nakano, H.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2020**, *11*, 17544.
- 5) Yamaguchi, H.; Honda, S.; Torii, S.; Shimizu, K.; Arakawa, K.; Katoh, K.; Miyake, K.; Miyake, N.; Fujikake, N.; Sakurai, H.; Arakawa, S.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2020**, *11*, 5311.
- 6) Noguchi, S.; Honda, S.; Saitoh, T.; Matsumura, H.; Nishimura, E.; Akira, S.; Shimizu, S. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 37.