

システムズバイオロジーを用いた 皮膚恒常性制御機構の理解

東京理科大学 生命医科学研究所 教授 ^{くぼ}久保 ^{まさと}允人

はじめに

皮膚は外界と生体の仕切りとなるとして働く器官であり、外来からの物理的刺激や侵入する微生物に対する最初のバリアとなる。皮膚は表皮細胞の薄いシートからなる表皮と、コラーゲンを含む真皮から構成され、表皮は表面から順に角層・顆粒層・有棘層・基底層の4層から構成される。角化細胞は基底層が細胞分裂することで生まれ、成長しながら押し上げられ、空気に触れることで細胞死が起こることで角層が形成されていく。この細胞分裂と細胞死から構成される表皮は、再生と破壊を繰り返しながら恒常性が維持される。特に、体毛を持たないヒトの皮膚のバリアシステムは地上での生活環境に適合するように、長い歴史の中で構築されたヒト特有のものと言える。

角層の下の顆粒層で、細胞と細胞の隙間をシールすることでバリアの働きをなすのがタイトジャンクションである。タイトジャンクションは、角層を通り抜けた異物が隙間を通り抜けて体内に侵入してくるのを防ぐ役割をなしている。角層実質は、セラミドなどの角層細胞間脂質とケラチンやフィラグリンから構成される。フィラグリンはケラチン線維を凝集するとともに、分解されて天然保湿因子として角層の水分保持やpHを下げる働きを持つ。角層細胞には細胞膜の裏打ちタンパク周辺帯があり、皮膚バリア機能の維持に働いている。

アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰り返

す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患である。患者の多くは家族歴・気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎(AD)などの既往歴を持つとともに、IL-4やIL-13などのTh2サイトカインを高産生するためIgE抗体を産生しやすい素因を持つ。

近年、AD発症にはフィラグリン遺伝子の変異が関与することが注目されるようになった。また、フィラグリン遺伝子に異常がなくても、AD患者の皮膚組織ではIL-4やIL-13が産生されることによりフィラグリンの発現が低下してしまう。そのため、AD患者の皮膚は乾燥してしまい、pHがアルカリに傾いた結果として、患者の皮膚バリア機能は低下して、抗原(アレルゲン)の皮膚への侵入しやすさにつながる。非自己であるダニや花粉のようなアレルゲンは、免疫反応により排除される方向へと誘導される。

一方、これらアレルゲンに含まれるプロテアーゼによって上皮からのIL-33産生を誘導することで、Th2型の免疫応答を促進する。このTh2環境では、表皮からTh2型ケモカインであるCCL17も産生され、さらにアレルギー性炎症が促進される。また、最近では黄色ブドウ球菌やコリネバクテリウムなどの異常増殖が、AD発症に関与することが分かってきている。

前述したフィラグリンの知見は、ADにおけるバリアの重要性を示す証拠となったが、フィラグリン欠損マウスではADの発症が起らないことから、ADはバリアの破綻だけ

では説明できない。本稿では、ADメカニズムをシステムレベルで解析する数理モデルとサイトカイン活性化シグナルSTAT3分子に着眼した解析結果を紹介する。

数理モデルによるAD発症メカニズム解析

AD発症および悪化のメカニズムを理解するため、われわれは、アトピーにかかわる環境要因、皮膚バリア機能および免疫応答（角化細胞と免疫細胞）の相互制御関係に着目した数理モデルを構築した（図1）。この数理モデルに含まれる相互制御関係のそれぞれは、いずれも公開されている臨床データとADマウスモデルで明らかになっているものを基盤とする。これらトランスクリプトームデータ情報を系統立てて数理モデルとして記述することで、モデルの数理解析やコンピュータシミュレーションが可能となる。この手法により、システムの一部に摂動（遺伝子変異や環境要因の変化など）が加わった場合のシステム全体の動的変動、例えば病態がどのように時間変化するか、治療の効果はどのように現れるかを予測できる。

われわれが提案した数理モデルは、バリア機能、炎症/免疫応答のダイナミクスを常微分方程式とスイッチ制御則で記述したハイブリッドモデル（図1）である。以下、このモデルの概要を説明する。このモデルは、バリアの状況、環境要因、Th2反応など炎症との動的制御関係を独立した常微分方程式で表し、ダブルスイッチと呼ばれるモチーフがADの発症および悪化メカニズムを説明する鍵となっている。ダブルスイッチとは、皮膚炎発症を決める可逆スイッチ1と全身性の反

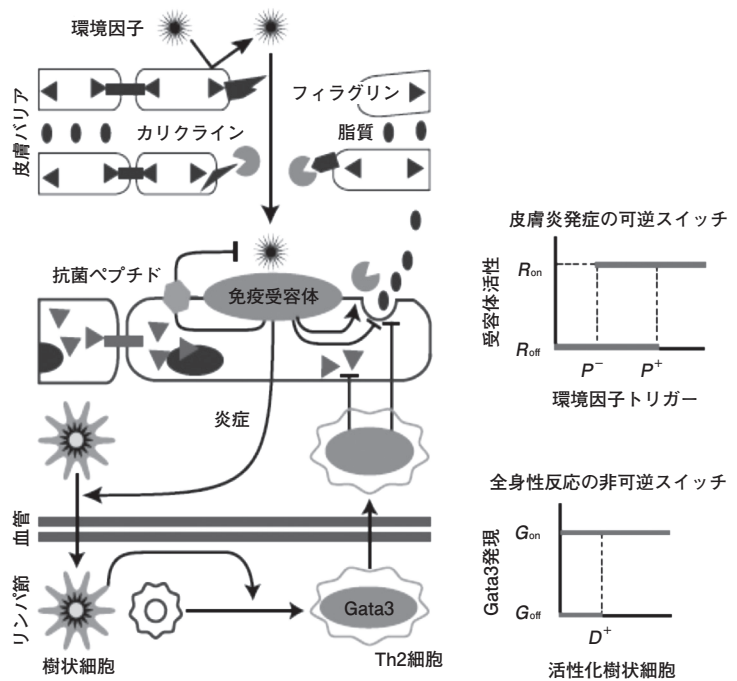


図1 アトピー発症および悪化メカニズムの数理モデル

応を制御する非可逆スイッチ2からなる。皮膚の状態や悪玉細菌（黄色ブドウ球菌）の増殖によって活性化する自然免疫受容体で構成されるセンサーが働くと、スイッチ1が起動して炎症反応が起きる。これにより、抗菌ペプチドの発現が亢進し、カリクレインなどの蛋白分解酵素が活性化することでバリアに傷害が起き、皮膚炎の継続的な発症に繋がると仮定する。このスイッチは、自然免疫受容体とバリアの状態とのバランスによって制御され、悪玉細菌の量が一定の閾値を超えるとスイッチ1が活性化して発症へと移行する。ただし、炎症は適切な処置により閾値を下げることで症状を改善できることから、スイッチ1はシーソーのように可逆性を有することが想定される。

スイッチ1による自然免疫受容体の活性化は、上皮系細胞由来のアレルギー性サイトカイン（TSLP, IL-33など）産生を誘導することで樹状細胞を活性化する。これにより、反応系は自然免疫から獲得免疫へ移行することで、スイッチ2を起動する。このスイッチ2

は、IL-4レベルを上昇させることにより、T細胞でのGATA3を発現させてTh2反応を促進する。このスイッチ2は非可逆性であることから、このスイッチが入ることにより、反応は一方向的に悪化の方向を加速的に進行する。このダブルスイッチ機構では、スイッチ1が長時間オンになっている、あるいは断続的ではあるが頻繁にオンになる場合に、スイッチ2がオンになり、その非可逆性より、スイッチ2がオンになるとスイッチ2は常にオンの状態になり、AD症状の悪化につながる。このシミュレーションを使うことにより、公開されている臨床データとアトピー性皮膚炎で得られているトランスクリプトームデータを非常に良く説明することができるものであった。

システムズバイオロジーとSTAT3マウスモデルを用いたAD解析

Signal Transduction and Activator of Transcription (STAT) 分子は、サイトカインで起動して、JAKキナーゼによるリン酸化で核内へ移行して転写を制御する分子である。STAT3は、IL-6ファミリー受容体を含む30種以上のサイトカイン・増殖因子の下流で働く分子として知られており、癌および白血病細胞で恒常的に活性化している分子である。ヒトにおいてSTAT3は、高IgE症候群の原因遺伝子となることが知られており、この疾患はSTAT3遺伝子で起こる dominant negative 変異によって起こる。新生児からアトピー様皮膚炎を発症し、血清IgEが高値を示す免疫不全症である。

STAT3の皮膚特異的欠損マウスは、ヒト高IgE症候群に近似するAD様皮膚炎病態を誘導する。この皮膚炎の発症は、80%以上のマウスで生後15~20週の間眼周辺部から起こりはじめ、炎症はかゆみを伴う引っ掻き行動に伴って頭部全体に広がり、重傷化していく。このとき、皮膚炎の発症とIgEの産生は

常に連動して起こる。一方、20%以下のマウスでは20週以降でも発症は認められないことから、STAT3欠損だけでは発症する個体としない個体が存在していた。このことは、STAT3欠損単独では皮膚炎に至らないことを示しており、多因子による複雑系で構成されていることを示唆している。

そこで、発症するマウス群(発症群)と発症しないマウス群(非発症群)それぞれについて、生後2週から15週の間起こるトランスクリプトームの変化をRNAシーケンス法により網羅的に解析した。この経時的変化をコントロールマウス群と比較することにより、STAT3が制御する皮膚の恒常性やバリア構成に関わる遺伝子と皮膚炎との関係を検討した。

RNAシーケンス法により得られた23000遺伝子の経時的発現データをもとに、週齢ごとにコントロールのデータと対応付けしてedgeRによる正規化と検定を行った。得られた遺伝子の発現変化のパターンを基盤に、発症群で発現が低下する遺伝子群(クラスター1)、STAT3欠損により発現が上昇する遺伝子群(クラスター2)、発症群で発現が上昇する遺伝子群(クラスター3)の3つのクラスターに分類し、それぞれのクラスターに属する遺伝子を抽出した。それぞれのクラスターに属する遺伝子群を対象に、IPAパスウェイ解析(約500種類以上の科学雑誌から査読された遺伝子情報を抽出し、Ingenuity社独自の分類によってデータベース化したパスウェイ解析ソフト)を利用して、それぞれのクラスターのパスウェイによる重み付けを行った。

クラスター1(572遺伝子)とクラスター2(311遺伝子)は、組織の形態形成・組織の発生・分化に関連するパスウェイを共通に含んでいた。なかでも、クラスター2には皮膚の組織形成に関わるパスウェイに入る遺伝子が含まれていた。特に、角層実質を構成するケラチンやその関連遺伝子(82遺伝子)は、生

Upstream Regulator	Activation Z-score	P-value
IFN- γ	9.633	2.77E-84
TLR4	7.695	3.3E-67
STAT3	1.793	3.75E-65
Myd88	8.309	1.26E-54
TNF	7.647	1.66E-54
IRF3	6.601	5.48E-53
IL-1β	7.488	4.83E-50
TICAM1	7.441	6.93E-50
IFN- α R1	3.039	1.83E-49
STAT1	6.74	6.63E-49
TLR3	7.447	1.51E-48
TLR9	7.324	4.55E-43
IRF7	6.358	2.3E-39
IKKβ	6.084	9.6E-38
IL-4	2.88	3.13E-35
IFN- β 1	4.354	1.28E-33
STAT6	-0.218	2.88E-33
IRAK4	1.322	3.81E-31
NFκB	5.066	6.47E-29
IKKγ	4.801	8.45E-27

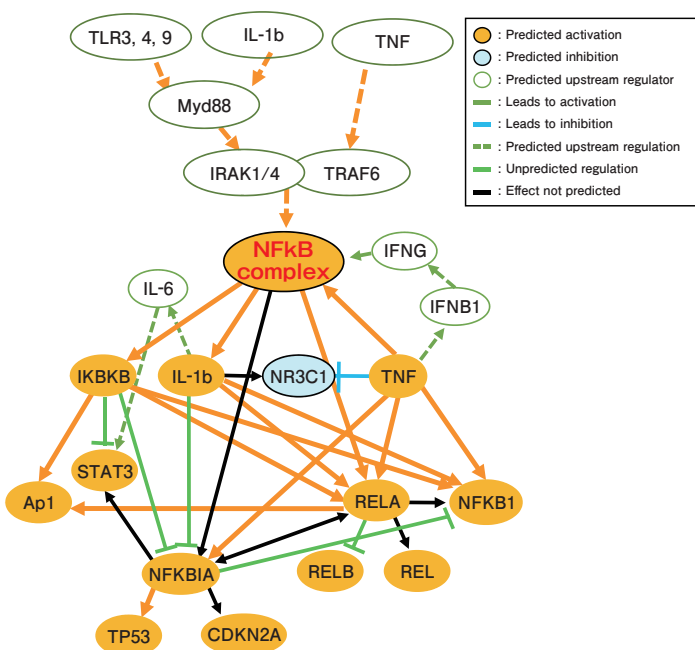


図2 クラスタ-3に属する遺伝子の多くはNFκBによって制御される

後2週目まではコントロールに対して高い発現を示し、成長に伴い低下してコントロールと同じレベルになる経時的变化をとった。このパスウェイ解析の結果は、STAT3が幼少期での角層の構成する遺伝子の発現を制御しており、その遺伝的欠損は表皮バリアの造成に強い影響をもたらすことを示していた。

しかしながら、この変化は非発症群（すなわちSTAT3遺伝子に欠損はあるが、皮膚炎の発症には至らない）でも同様に観察されることから、角層構成遺伝子のアブノーマルな発現変化は、皮膚炎の発症は至らないサイレントな表現系に留まることが明らかとなった。この結果は、STAT3欠損は皮膚炎を起こす環境作りに寄与する遺伝的要因にはなるが、発症に至るためには付加的因子（2ndスイッチ）の必要性が想定された。

われわれは、2ndスイッチの実体を見つけるヒントがクラスタ-3（発症群で発現上昇する遺伝子群；1181遺伝子）にあると想定し、

このクラスタを対象にIPAパスウェイ解析を行った。この解析結果は転写因子NFκBを含め、Toll様レセプター（TLR）-Myd88-IRAK4経路、インターフェロン（IFN）、TNF、IL-1といったNFκBの上流に位置するシグナル経路の関与を示していた（図2）。また、皮膚炎の発症はSTAT3を欠損した皮膚へのLPSの投与、黄色ブドウ球菌の異常増殖と深く関連していたことから、悪玉細菌が誘導するTLR-Myd88-IRAK4経路が発症の引き金となる2つめのスイッチであることが明らかにされた。

このことから、皮膚炎の発症には、バリアに影響を及ぼす遺伝的要因（1stスイッチ）に加えて、環境因子の影響により悪玉細菌が誘導するTLR-Myd88-IRAK4経路とTh2反応を制御する因子群が複合的に働く2ndスイッチの存在が必要となり、AD発症は遺伝的要因と環境要因が複合的な組み合わせで起こる多因子疾患であることが想定された。