

## 論 文 内 容 要 旨

The expression of prolyl isomerase Pin1 is expanded in the skin of patients with atopic dermatitis and facilitates IL-33 expression in HaCaT cells

(プロリン異性化酵素 Pin1 の発現はアトピー性皮膚炎患者の皮膚で拡大しており、HaCaT 細胞での IL-33 発現を促進する)

The Journal of dermatology, 2022, in press.

主指導教員：浅野 知一郎教授

(医系科学研究科 医化学)

副指導教員：稲葉 俊哉教授

(原爆放射線医科学研究所 がん分子病態)

副指導教員：今泉 和則教授

(医系科学研究科 分子細胞情報学)

金本 麻裕

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】 アトピー性皮膚炎は先天的なアトピー素因と後天的な環境因子が関連し合い発症する慢性炎症性湿疹である。アトピー性皮膚炎の病因には多数のサイトカインが関与し、その中でも IL-33 はアトピー性皮膚炎モデルマウスや患者の皮膚の内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞に豊富に存在し、炎症反応や自己免疫反応を誘発すると考えられており、アトピー性皮膚炎の研究において注目されている。IL-33 は他のサイトカインと異なり、エキソサイトーシスにより制御されるのではなく、搔破により細胞膜が破壊されると放出され、アラミン蛋白として機能する。実際、IL-33 トランスジェニックマウスは好酸球浸潤を伴う重度の皮膚炎を発症し、ヒトアトピー性皮膚炎患者においては対照群に比べ IL-33 の血漿濃度が高値であることが多いと報告されている。IL-33 がアトピー性皮膚炎の発症において重要な役割を担う可能性があるが、アトピー性皮膚炎において IL-33 発現調節のメカニズムは解明されていない。

プロリン異性化酵素 Peptidyl prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1) は、様々な標的蛋白に結合し、プロリンのシス→トランス異性化を行うことで、その機能を調節している。樹状細胞の IL-33 シグナルには Pin1 が必須であることが既に報告されているが、今回、ヒト表皮に Pin1 が高発現していることを見出したことから、Pin1 が IL-33 の発現調節に関与している可能性を考え、研究に着手した。

【方法】 広島大学病院皮膚科を受診したアトピー性皮膚炎患者および非アトピー性皮膚炎患者から採取した皮膚組織を用い、Pin1 と IL-33 の発現量を免疫染色により検討した。

また、ヒトケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞を用いて、IL-33 発現の調節に対する Pin1 の影響を検討するために、Real-time PCR、ウェスタンブロット法や免疫染色法などを行った。蛋白結合は、免疫沈降と Proximal ligation assay により確認した。

【結果】 Pin1 と IL-33 はともにアトピー性皮膚炎患者のケラチノサイトで豊富に発現していた。ただし、健常者と比べその発現が有意に高いとは言えなかった。次に HaCaT 細胞を用いて TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を共刺激すると IL-33 の発現量は相加的に増加し、一方、Pin1 siRNA で処理すると IL-33 の発現は顕著に抑制された。また、Pin1 阻害剤である Juglone、レチノイン酸 (ATRA) の添加によっても IL-33 発現は抑制された。これらの結果より、Pin1 は IL-33 の発現調節に重要であると考えられた。次に、そのメカニズムを調べるために、細胞内シグナル伝達への影響を検討した。IFN- $\gamma$  刺激は Stat1 をリン酸化し、核内移行すると報告されており、HaCaT 細胞でもこの動向は認められた。Stat1 と Pin1 の結合は確認できたが、予想に反し、Pin1 をノックダウンしても、Stat1 に対する顕著な変化は観察されなかった。次に、NF- $\kappa$ B 経路に対する Pin1 の影響を調べたところ、Pin1 と p65 も結合することを見出した。Pin1 ノックダウンにより、NF- $\kappa$ B サブユニット p65 のリン酸化は抑制され、I- $\kappa$ B  $\alpha$  が分解された後の回復は鈍化された。また、Pin1 は p65 の 254 番目スレオニンに結合することが知られており、このスレオニンをアラニンに置換させたところ、NF- $\kappa$ B 転写活性が減弱した。このことから Pin1 が HaCaT 細胞の NF- $\kappa$ B 経路の正の調節因子として作用することも示唆された。

【考察】 アトピー性皮膚炎患者の皮膚ケラチノサイトで Pin1 及び IL-33 が高発現しており、表

皮の Pin1 が IL-33 発現の調節に関与している可能性が示唆された。Pin1 発現量は健常者とアトピー性皮膚炎患者で同程度であったが、アトピー性皮膚炎患者では表皮が肥厚している分、Pin1 陽性細胞数が増加しており、この増加した分の Pin1 が病変に影響を与えている可能性が考えられる。HaCaT 細胞を用いた研究の結果からは、Pin1 がケラチノサイトで IL-33 の発現を高め、免疫細胞で独自のシグナル伝達を促進し、アトピー性皮膚炎の症状に寄与している可能性が示唆された。特に、Pin1 はケラチノサイトにおいて p65 の機能調節を介して、IL-33 の発現調節に寄与していると考えられた。

【結語】 ヒトケラチノサイトでは IL-33、Pin1 が豊富に分布し、HaCaT 細胞において Pin1 が IL-33 発現の調節において重要な役割を果たすことが示唆された。