

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09770

研究課題名(和文) 内因性Ahrリガンドのアトピー性皮膚炎への効果

研究課題名(英文) FICZ improves atopic dermatitis by enhancement of filaggrin production.

研究代表者

内 博史 (Uchi, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50437787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の表皮では、フィラグリンの産生低下により角層のバリア機能が低下しているため、外来抗原が容易に侵入し湿疹病変の発症を繰り返す。本研究ではトリプトファン代謝物である6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)が、ケラチノサイトにおいて、アリル炭化水素受容体を介してフィラグリン産生を促進することを明らかにした。次にNc/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルにおいて、FICZを局所投与することでフィラグリン量が正常化し、湿疹病変も改善することを明らかにした。今回の結果から、FICZがアトピー性皮膚炎に対する新しい治療選択肢となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis imposes significant socio-econo-psychologic burdens on the affected individuals and phototherapy is recommended for patients with extensive lesions. Ultraviolet irradiation generates various tryptophan photoproducts including 6-formylindolo[3,2-b]-carbazole (FICZ). FICZ is a potent endogenous agonist for aryl hydrocarbon receptor (AHR). We found FICZ significantly upregulated the gene expression of filaggrin in cultured keratinocytes in an AHR-dependent manner. In addition, FICZ improved the atopic dermatitis-like skin inflammation and transepidermal water loss in NC/Nga mice compared with those of control mice. On histology, FICZ significantly reduced the epidermal and dermal thickness as well as the number of mast cells. Topical FICZ also significantly reduced the gene expression of IL22. These findings highlight the beneficial role of FICZ-AHR and provide a new strategic basis for developing new drugs for chronic eczema.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：アトピー性皮膚炎 FICZ アリル炭化水素受容体 フィラグリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 表皮の最外層に位置する角層は、外部からのアレルゲンや病原性微生物の侵入などに対するバリアとして機能するだけでなく、体内からの水分の喪失を抑制する作用や角層自身の水分保持機能により、生体のホメオスタシス維持に極めて重要な役割を果たしている。角層が正常なバリア機能を発揮するためには、角層を構成する角質細胞内でケラチンフィラメントがフィラグリン (FLG) と結合・凝集し、規則正しく配列する必要がある。FLG は角層の下層に位置する顆粒細胞内のケラトヒアリン顆粒の中で、前駆物質であるプロフィラグリンとして存在し、角化の際に FLG に分解される。FLG はケラチンフィラメントを凝集させた後は、角層上層で分解され保水機能を持つ天然保湿因子 (natural moisturizing factor) の主成分となる。

(2) 日本皮膚科学会によると、アトピー性皮膚炎は「寛解・増悪を繰り返す、痒痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」と定義される。つまりアトピー性皮膚炎の主体は、長期間持続する痒痒の強い湿疹であり、その背景として表皮角層のバリア機能の破綻が存在する。近年、アトピー性皮膚炎患者の表皮においてフィラグリンの発現が低下していることが明らかにされた。つまり FLG の産生低下により、角層のバリア機能・水分保持能が低下し、外来性抗原が容易に皮膚に侵入できることが、アトピー性皮膚炎の病態形成に大きく関与していると考えられる。

(3) アトピー性皮膚炎治療の現状は、対症療法に終始しており十分とは言いがたい。治療のメインはステロイド軟膏の外用であり、治療が対症的である以上、ステロイド軟膏外用が長期に渡ることは避けがたく、そのため皮膚の菲薄化や潮紅など一定の副作用が生じることがあり、しかも本邦ではステロイドフォビアとでもいふべきステロイド軟膏に対する根強い忌避反応があり、患者のコンプライアンスは決して高くない。そこで、よりアトピー性皮膚炎の病態・原因に即し、かつ患者が安心して使用することができる治療薬の開発は急務であるといえる。FLG 産生促進作用を有する物質は、そのような要求を満たす薬剤の開発につながる可能性があると考えられるが、現在までに臨床応用に至った化合物は存在しない。

## 2. 研究の目的

アリル炭化水素受容体 (AHR) の内因性リガンドとして発見された 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) は、紫外線によって生体内でトリプトファンから生成されるが、その生理機能は未知な部分が多い。申請者らはこれまで FICZ がケモカインの産生を介して免疫反応を調整する作用を有することを明らかにしてきたが (J

Dermatol Sci 2011;62:42-9, J Dermatol Sci 2013;72:9-15)、FICZ の受容体である AHR は人体の最外層である表皮に強く発現が認められることから、FICZ にはさらに生体防御やホメオスタシスの維持などの作用があるのではないかと考えた。そこで申請者は、ヒト培養角化細胞 (HaCaT 細胞) を用いて表皮の角化に必要な遺伝子 (FLG, involucrin, loricurin, sprr-1b, -2d, -2e, -2g) の発現に及ぼす FICZ の作用をスクリーニングしたところ、FICZ が FLG 遺伝子の発現を増強することを見出した。本研究では FICZ が角化細胞からの FLG 産生を増強するメカニズムを解明し、さらに *in vivo* でのマウスアトピー性皮膚炎モデルにおける FICZ の治療効果があるのか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 我々はすでに培養ヒト角化細胞株である HaCaT 細胞において、FICZ が FLG 遺伝子の発現を増強することを明らかにしている。そこで FICZ の FLG 産生への作用が AHR を介していることを、siAHR を用いて確認する。すなわち HaCaT 細胞に siAHR をトランスフェクトすることで、FICZ 刺激による FLG 産生増強作用がブロックされるか否かを、リアルタイム PCR およびウエスタンブロットングにより検討する。さらにより生体での反応に近いと考えられているヒト皮膚 3 次元培養モデルでも同様の検討を行う。

(2) 次に Nc/Nga マウスにコナヒョウヒダニ抗原を週 2 回塗布し続けることで、アトピー性皮膚炎に類似した皮膚炎を誘発することができる。Nc/Nga マウスは抗原塗布開始後、約 2 週間で皮膚炎を発症する。皮膚炎発症後、週 2 回の抗原塗布を継続しながら、FICZ 含有軟膏、溶媒のみを含有するコントロール軟膏、及び陽性コントロールとして吉草酸ベタメタゾン (リンデロン V<sup>®</sup>) 軟膏をマウス病変部に連日塗布し、臨床症状の推移を紅斑、浮腫、びらん、鱗屑について、クリニカルスコアを評価する。また同時期に皮膚水分保持能の評価として、水分蒸散量を閉鎖チャンバー方式水分蒸散量測定装置を用いて測定する。さらに皮膚の病理学的検討も行う。経時的に病変皮膚をトレパンを用いて採取し、湿疹の指標である表皮肥厚、海綿状態、炎症細胞浸潤について Hematoxylin-Eosin 染色および免疫染色によって評価する。

## 4. 研究成果

(1) ケラチノサイトの生存率に対する FICZ の影響

ヒト表皮細胞株に 0-100nM 濃度の FICZ を処理し、CCK-8 assay を用いて生存細胞を評価した。いずれの濃度においても、FICZ はケラチノサイトの生存率に影響を与えなかった。

(2) FICZ による AHR 活性化

AHR はリガンドが結合すると、細胞質から核

内へ移行し、CYP1A1 を誘導することが知られている。そこで FICZ の AHR 活性化を確認するために、ヒト表皮細胞を FICZ (100nM) で処理した。主として細胞質へ局在していた AHR は FICZ 処理により核内へ移行し、また CYP1A1 の発現を有意に促進した。以上より、FICZ が AHR のリガンドであることが示された。

( 3 ) FICZ による FLG 遺伝子およびタンパク質の誘導

次に FICZ が皮膚バリア機能を司るタンパク質に影響を与えるかどうかを RT-PCR で検証した。FICZ は、それらの多くの遺伝子( LCE1A, LCE1B, LCE3D, LCE3E, KRT1, KRT10, S100A7, S100A13, S100A15, CRNN, RPTN, TCHH, TCHHL1, HRNR, SPRR1B, SPRR2E, SPRR2G, IVL ) に影響を与えなかったが、FLG および SPRR2D 遺伝子の発現を有意に上昇させた。FLG についてさらに検討し、FICZ の濃度依存的に CYP1A1 並びに FLG 遺伝子を誘導することを確認した。さらに免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法により、FICZ が FLG やプロフィラグリンをタンパク質レベルで産生を増強することを確認した。

( 4 ) FICZ の AHR 依存性

次に FICZ による FLG の発現増強作用が AHR を介しているか否かを、AHR に対する siRNA を用いて評価した。siAHR を導入したヒト表皮細胞は、FICZ による FLG 産生の誘導が抑制されたことから、FICZ による FLG 産生の誘導は AHR 依存的であることが証明された。

( 5 ) FICZ 含有軟膏によるアトピー性皮膚炎モデルマウスへの効果

NC/Nga マウスの背部と耳介部に、週 2 回ダニ抗原とラウリル硫酸ナトリウムを塗布すると 3 週間で皮膚炎を生じ、その後も同様の工程を 2 週間繰り返した。初回感作から 3 週間以降は、ネガティブコントロールとして白色ワセリン、FICZ 含有軟膏、ポジティブコントロールとしてベタメタゾン軟膏を NC/Nga マウスの背部と耳介部に週 3 回 2 週間塗布した。白色ワセリン群では皮膚炎の改善が見られなかったが、FICZ 含有軟膏群やベタメタゾン軟膏群では、皮膚炎症状が改善していた。更に経表皮水分蒸散量 (TEWL) も FICZ 含有軟膏群とベタメタゾン軟膏群で改善した。

( 6 ) FICZ 軟膏群での FLG 産生の回復と炎症の改善

NC/Nga マウスでのダニ抗原誘発皮膚炎では、FLG の発現が低下し、表皮肥厚や肥満細胞の浸潤が多く見られると報告されている。未処理の正常な NC/Nga マウスでは FLG は表皮顆粒層に見られるが、ダニ抗原誘発皮膚炎を生じた後では FLG 量が減少していた。しかし FICZ 含有軟膏群ではベタメタゾン軟膏群よりも明らかに FLG 量が回復した。更に組織学的にも白色ワセリン群と比して、FICZ 含有軟

膏群やベタメタゾン軟膏群では、表皮真皮肥厚が著しく改善し、浸潤していた肥満細胞数や CD68 陽性細胞数も減少していた。

( 7 ) FICZ と炎症性サイトカイン  
最後に、各軟膏を塗布した皮膚での炎症性サイトカイン ( IL-1A, IL-1B, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ) の発現について、RT-PCR 法を用いて検証した。FICZ 含有軟膏群では IL-22 や IFN- $\gamma$  の発現が有意に減少し、ベタメタゾン軟膏群では IFN- $\gamma$  の発現のみが抑制されていた。

5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, Furue M. Protective role of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *J Dermatol Sci* 2018;90(3):284-294. 査読あり

Tsuji G, Hashimoto-Hachiya A, Kiyomatsu-Oda M, Takemura M, Ohno F, Ito T, Morino-Koga S, Mitoma C, Nakahara T, Uchi H, Furue M. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death Dis* 2017;8(7):e2931. 査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Mari Kiyomatsu-Oda, Hiroshi Uchi, Saori Morino-Koga, Masutaka Furue. Tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, inhibits atopic dermatitis - A clue linking "photoeffectiveness" to aryl hydrocarbon receptor-, Society for Investigative Dermatology 2017 Annual Meeting, Portland, USA.

Hiroshi Uchi, Mari Kiyomatsu-Oda, Masutaka Furue. The tryptophan photoproduct FICZ improves atopic dermatitis by enhancement of fillagrin production. the 47th Annual ESDR Meeting 2017, Salzburg, Austria.

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内 博史（UCHI, Hiroshi）  
九州大学・大学院医学研究院皮膚科・准教授  
研究者番号：50437787

##### (2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

（ ）