

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19739

研究課題名(和文)セマフォリン3Aの発現に関与するシグナル伝達系の解明と難治性痒み治療薬の開発

研究課題名(英文)Characterization of the signaling pathway involved in the transcriptional regulation of semaphorin 3A in normal human epidermal keratinocytes

研究代表者

鎌田 弥生(KAMATA, YAYOI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00410035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)を用いてシグナル伝達及び転写制御の観点から、アトピー性皮膚炎のかゆみの難治化の鍵となるセマフォリン3A(Sema3A)の発現制御機構を解析した。ヒトSema3A遺伝子プロモーターをクローニング後、近位プロモーター領域を同定し、転写因子AP-1が結合することを明らかにした。また、AP-1、PKC及びMAPKの各阻害剤存在下ではSema3A発現が抑制されることが明らかとなった。以上の結果は、NHEKにおけるSema3Aの発現がPKC/MAPK/AP-1シグナル伝達経路を介して制御されていることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the signaling pathway involved in the transcriptional regulation of semaphorin 3A (Sema3A) in normal human epidermal keratinocytes (NHEK). The 5'-flanking region of Sema3A gene was cloned and a critical region for Sema3A promoter activity was identified. In this region, transcription factor binding sites including activator protein (AP)-1 were found. Chromatin immunoprecipitation assay revealed AP-1 bound to the proximal promoter. Up-regulation of Sema3A mRNA by calcium was significantly decreased by AP-1 inhibitor (T-5224). Similarly, it was also decreased by protein kinase C (PKC) inhibitor (Go6976), MEK1/2 inhibitor (PD98059), and JNK inhibitor (SP600125). These results suggest that Sema3A expression in NHEK is mediated by the PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in the proximal promoter, and provide a new insight to identify novel antipruritic drug targets.

研究分野：皮膚科学

キーワード：発現制御 セマフォリン3A 表皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(以下、AD)のかゆみは既存薬が効きにくい難治性であり、集中力低下や不眠など患者の quality of life を著しく低下させる。かゆみを抑制することは AD 治療に必要不可欠であり、国民の関心も高い。

通常、健常者の皮膚における知覚神経線維は大部分が表皮と真皮の境界部に留まり、表皮内には少数の神経線維しか見られない。一方、乾燥肌や AD の病変部皮膚では、神経線維を伸長させる神経伸長因子の発現増加と、神経線維を退縮させる神経反発因子の発現減少により多数の神経線維が表皮内に増生する(Tominaga et al, J Dermatol Sci, 2014, 41: 205-212)。表皮内神経線維の増生は外部刺激を受容しやすい環境を生み出し、搔破のような外部刺激は知覚神経を興奮させ、かゆみを増悪させる。

これまで、申請者らは神経反発因子の一種であるセマフォリン 3A(以下、Sema3A)に着眼し、研究を進めてきた。ドライスキンモデルマウスに対するナローバンド UVB などの紫外線照射は Sema3A の発現量を正常化すると同時にかゆみを抑え(Kamo et al, J Dermatol Sci, 2011, 62: 91-97) 組換え Sema3A タンパク質を配合した軟膏は AD モデル NC/Nga マウスの引っ掻き行動を抑制、皮膚炎も改善した(Negi et al, J Dermatol Sci, 2012, 66: 37-43)。以上の結果は、Sema3A が表皮内神経線維の増生によるかゆみの治療標的になることを強く示唆した。しかしながら、正常な表皮における Sema3A の発現制御機構及び、AD 病変部や乾燥肌で Sema3A の発現が減少する機序は不明である。

先行研究では、転写因子の一種であるレチノイド関連オファン受容体(以下、ROR)

の発現を siRNA で抑制すると正常ヒト表皮角化細胞(以下、NHEK)における Sema3A 発現が抑制され、ROR 作動薬であるコレステロール硫酸や SR1078 を添加すると Sema3A 発現が増加することを報告した(Kamata et al, J Dermatol Sci, 2015, 79: 84-86)。また、抗菌ペプチドの LL-37 は Mitogen-Activated Protein Kinase(以下、MAPK)の一種である ERK1/2 を介して、NHEK における Sema3A の発現を誘導することも明らかにした(Umehara et al, J Invest Dermatol, 2015, 135: 2887-2890)。正常なバリア機能を有する表皮は基底層から顆粒層に向かってカルシウム濃度勾配を形成しているが、乾燥肌や AD 病変部などバリア機能が低下した表皮ではカルシウム濃度勾配が消失する(Menon et al, Br J Dermatol, 1994, 130: 139-147)。また、カルシウムを添加した NHEK では Sema3A 発現が促進されるという報告があり(Fukamachi et al, J Dermatol Sci, 2011, 61: 118-123)。バリア破壊に伴う表皮内カルシウム濃度の異常が Sema3A の発現にも影響を及ぼしていることが示唆された。

2. 研究の目的

正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)における Sema3A の発現制御メカニズムをシグナル伝達及び転写制御の観点から解析し、AD 病変部における Sema3A 発現の減少メカニズムを解明する。最終的に Sema3A 発現促進作用に焦点を当てた AD の新規かゆみ治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト Sema3A プロモーター領域のクローニング

ヒト Sema3A の 5' -上流遺伝子は Genome Walker Kit (Clontech, Mountain View, CA USA)を用いてクローニング後、PCR で数種類の 5' 末端欠失体を作製、pGL3-Basic vector (Promega, Madison, WI USA)に連結したレポータープラスミドを作製した。転写因子結合配列の部位特異的変異導入は QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA USA)を用いて行った。転写因子結合配列のデータベース検索は BIOBASE P-Match-Public v1.0 (<http://www.gene-regulation.com/index.html>)を用いた。レポータープラスミドは X-tremeGENE HD DNA transfection reagent (Roche, Basel, Germany)を用いて、NHEK に導入した。トランスフェクション効率の補正のため pRL-TK vector を共導入した。細胞は 0.15 mM または 1.4 mM CaCl₂ 存在下で 24 時間培養後、Passive Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ活性値はウミシイタケルシフェラーゼ活性値で補正した。

(2) NHEK の培養

正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)は 0.15 mM CaCl₂の存在下で、KGM-Gold Single Quots を添加した KBM-Gold (Lonza, Switzerland)を用いて、37 °C、5% CO₂存在下で培養した。NHEK の分化誘導は 1.4 mM CaCl₂の存在下で培養することで行った。

阻害剤の実験は、増殖期の NHEK (0.15 mM CaCl₂)に各阻害剤を添加し、37 °C でプレインキュベーションを行った後、1.4 mM CaCl₂による分化誘導刺激をした。24 時間後、total RNA の抽出を行った。

(3) Real-time PCR による遺伝子発現解析

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて抽出後、PrimeScript RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan)を用いて cDNA に逆転写した。定量 RT-PCR は SYBR Premix Ex Taq (Takara) と遺伝子特異的プライマーを用い、Applied Biosystems Fast Real-Time PCR system で解

析を行った。mRNA量はRPS18で補正後、対照群に対する相対比として示した。

(4) プロモーター領域の解析

siRNAによるノックダウン解析

各候補転写因子の siRNA (40 nM siGENOME SMARTpool siRNA) (Thermo Scientific) は、Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) を用いて NHEK に導入した。72 時間培養後、total RNA を抽出、Real-time PCR で解析した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を用いた。1.4 mM CaCl₂ で 3 時間刺激後の NHEK からクロマチンを調製し、転写因子特異的抗体 10 µg とクロマチン調製液を 4 で一晩インキュベート後、プロテイン G アガロースビーズと 4 で 2 時間インキュベートし、免疫沈降を行った。免疫沈降物から DNA を抽出し、*Sema3A* のプロモーター配列に特異的なプライマーを用いて Real-time PCR による解析を行った。

核抽出液の調製と Western Blot

NHEK の核抽出液は NE-PER nuclear extraction reagent に各々プロテアーゼインヒビター及びホスファターゼインヒビターを添加し調製した。核抽出液 (5 µg/lane) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし、SDS-PAGE 後、Powered Blot (ATTO, Tokyo) を用いて PVDF メンブレンに転写した。2% BSA またはブロックエース (DS Pharma Biomedical, Tokyo, Japan) でメンブレンをブロッキング後、各一次抗体と 4 で一晩インキュベーションした。TBST でメンブレンを洗浄後、二次抗体 (HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) Superclonal secondary antibody) と室温で 1 時間インキュベーションした。TBST 洗浄後、メンブレンを Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate と反応させ、バンドを発光検出した。

(5) シグナル伝達系阻害薬が *Sema3A* の発現に及ぼす影響の解析

増殖期の NHEK (0.15 mM CaCl₂ 存在下で培養) に MAPK 阻害剤 (PD98059, SB203580, SP600125) または PKC 阻害剤 (Gö6976, GF109203X) を添加し、37 でプレインキュベーションを行った後、1.4 mM CaCl₂ による分化誘導刺激をした。24 時間後、total RNA の抽出を行った。

(6) 統計処理

統計処理は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) を用いて、one-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test or Dunnett's multiple

comparison test) or two-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison test) によって行った。

4. 研究成果

(1) カルシウムによる分化誘導時の *Sema3A* の発現動態の解析

in vitro 及び *in vivo* において、表皮角化細胞の正常な分化は主にカルシウムによって制御される (Bikle and Pillai, Endocrine Rev, 1993, 14: 3-19)。そこで、*Sema3A* の発現調節におけるカルシウムの関与を明らかにするため、NHEK の培養液に終濃度 1.4 mM CaCl₂ を添加して分化誘導を行い、*Sema3A* の発現動態を Real-time PCR で解析した。その結果、分化誘導開始後 9~24 時間後をピークに *Sema3A* の発現が約 2 倍促進された。24 時間後以降では分化マーカーであるケラチン K10 の発現増加と共に、*Sema3A* の発現は減少した。

(2) *Sema3A* の転写調節機構の解析

Sema3A の遺伝子発現調節に関わる転写因子を同定するため、ヒト *Sema3A* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、解析を行った。ヒト *Sema3A* 遺伝子のプロモーター領域を連結したプラスミドは NHEK に導入後、24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイを行った。*Sema3A* プロモーターの 5' 末端欠失体を用いた解析では、近位プロモーター領域が -134 ~ -24 bp の間に存在することが明らかとなった。この領域に存在する AP-1 結合部位の部位特異的変異導入は、*Sema3A* プロモーター活性を減少させた。また、*Sema3A* プロモーター領域への転写因子の結合を ChIP アッセイにより解析した結果、*Sema3A* の近位プロモーター領域への AP-1 の結合が認められた。

AP-1 は Jun (c-Jun, JunB, JunD) と Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) がヘテロ二量体を形成することで転写因子として機能する。カルシウム刺激前後に核抽出液を調製し、Western Blot で AP-1 構成タンパク質の核移行を解析した。その結果、AP-1 の構成タンパク質である Fos はカルシウムによる分化誘導刺激により、核移行が増大することが判明した。もう一方の AP-1 構成タンパク質である Jun は分化誘導刺激前でも核内に局在しており、分化誘導後も局在の変化は無かった。カルシウムによる表皮角化細胞の分化誘導は *Sema3A* の発現を一過性に促進するが、AP-1 阻害剤 T-5224 存在下では抑制された。

次に、siRNA を用いて Jun 及び Fos の発現を抑制し、*Sema3A* の発現変動を解析した結果、Jun と Fos の発現を同時に抑制すると、*Sema3A* の発現が有意に抑制された。同様に、Jun と Fos を共過剰発現させると、*Sema3A* の発現が促進された。以上の実験結果は、*Sema3A* の発現制御に転写因子 AP-1 が関与することを強く示唆した。

(3) *Sema3A* の発現制御に関与するシグナル伝達経路の同定

同定した候補転写因子の一つである AP-1 は MAPK により活性化されて核移行し、遺伝子発現を調節する。そこで、*Sema3A* の発現制御に関与するシグナル伝達系を明らかにするため、MAPK 及び PKC 阻害剤で処理後に、*Sema3A* 発現誘導作用を有する Ca^{2+} で NHEK を刺激し、*Sema3A* の発現動態を解析した。

表皮角化細胞では PKC α , β , γ の発現が報告されている (Bikle et al, Expert Rev Endocrinol Metab, 2012, 7: 461-472)。本研究でも Western Blot により NHEK 細胞溶解液中の上記 PKC isoform の発現を確認した。PKC は conventional PKC に分類され、 Ca^{2+} 及びジアシルグリセロール (以下、DAG) によって活性化される。NHEK を 1.4 mM $CaCl_2$ 及び DAG 類似体の 10 nM ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (以下、PMA) で刺激すると、24 時間後に *Sema3A* の発現が促進された。その発現促進効果は、NHEK を PKC 阻害薬 (Gö6976) 及び pan PKC 阻害薬 (GF109203X) で前処理することにより、完全に消失した。

次に、MAPK 阻害剤を用いた解析を行った。MAPK は ERK, p38, JNK 経路に大別されるため、各々の MAPK に対する阻害剤を使用した。その結果、1.4 mM $CaCl_2$ 刺激 24 時間後の *Sema3A* 発現促進効果はいずれの MAPK 阻害剤を使用した際にも抑制された。その作用は特に ERK1/2 及び JNK 阻害剤で顕著だった。さらに、MAPK は細胞増殖因子や紫外線照射等によって活性化することから、皮膚科領域で汎用されるナローバンド-UVB を NHEK に照射し、*Sema3A* の発現変動を確認した。その結果、照射線量依存的に *Sema3A* の発現が誘導された。以上の結果は、*Sema3A* 発現制御に PKC 及び MAPK が関与することを示唆した。

(まとめ)

本研究は神経反発因子 *Sema3A* に着眼し、正常ヒト表皮角化細胞において PKC/MAPK/AP-1 シグナル系が *Sema3A* の発現制御に関与することを明らかにした。

カルシウムによる NHEK の分化誘導時、*Sema3A* の発現は一過性に増加するが、有棘層～顆粒層の分化マーカータンパク質であるケラチン K10 の発現と入れ替わりに *Sema3A* の発現は減少した。既報 (Tominaga et al, Br J Dermatol, 2008, 158:836-837) の免疫組織化学染色では、健常表皮の *Sema3A* は主に有棘層の細胞間隙に局在することが確認されている。本研究の結果から、*Sema3A* は基底層及び有棘層下層で合成後、細胞外に分泌され、表皮角化細胞の分化と共に上層へと押し上げられ、有棘層の細胞間隙で検出されたと考えられた。

一方、*Sema3A* のプロモーター領域を解析し

た結果、AP-1 が *Sema3A* の発現制御に関わる転写因子の一つであることが明らかとなった。AP-1 は表皮角化細胞の増殖、分化、アポトーシスの制御に関わる転写因子で、正常な表皮角化細胞では表皮分化マーカータンパク質であるロリクリンやフィラグリンなどの転写制御に関与することが知られている (Kyriotes et al, 2012, 21: 643-649)。また、*Sema3A* の発現制御に関わる AP-1 の上流シグナルの 1 つとして PKC 及び MAPK 経路が同定された。アセトン処理によるドライスキモデルマウスにナローバンド UVB を照射すると、表皮における *Sema3A* の発現が増加し、表皮内神経線維が退縮する (Kamo et al, J Dermatol Sci, 2011, 62: 91-97)。本研究結果は、紫外線療法による *Sema3A* 発現の正常化に MAPK/AP-1 シグナル系が関与することを示唆した。

本研究成果により、NHEK における *Sema3A* の発現制御機構の一端を明らかにすることが出来た。しかしながら、未だ AD 病変部における *Sema3A* の発現減少メカニズムを説明するに至っていない。現在、他のシグナル伝達系にも注目し、研究を継続中である。また、*Sema3A* 発現促進作用に焦点を当てた AD の新規かゆみ治療薬の開発についても、既存薬のドラッグリポジショニングなど多様な視点から研究を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件、全て査読有)

Kamata Y, Sakaguchi A, Umehara Y, Suga Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Bepotastine besilate downregulates the expression of nerve elongation factors in normal human epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci, in press, 2018. (査読有)

Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Antimicrobial peptides human LL-37 and α -defensin-3 modulate the expression of nerve elongation factors in human epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci, 2017, 88: 365-367. (査読有)

Sakaguchi A, Kamata Y, Takahashi N, Matsuda H, Kosaka R, Umehara Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Oral administration of milk-derived phospholipids inhibits penetration of cutaneous nerve fibers into epidermis in an acute dry skin model mouse. Clin Exp Dermatol, 2017, 42: 890-894. (査読有)

他 3 件

[学会発表](計 15 件)

Kamata Y, Umehara Y, Sakaguchi A, Suga

Y, Tominaga M, Takamori K. *Sema3A* expression is regulated by calcium/PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in normal human epidermal keratinocytes. 9th World Congress of Itch, Wroclaw, Poland, October 15-17, 2017. (口頭発表)

Kamata Y, Umehara Y, Sakaguchi A, Suga Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Calcium increases semaphorin 3A expression by activating PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in normal human epidermal keratinocytes. The 42st Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, Kochi, December 15-17, 2017. (ポスター発表)

鎌田弥生, 富永光俊, 坂口安澄, 梅原芳恵, 高森建二. ドラッグリポジショニングに向けたセマフォリン 3A 発現調節剤の *in vitro* スクリーニング. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016 年 9 月. (ポスター発表)

他 12 件

〔図書〕(計 1 件)

Kamata Y, Tominaga M, Takamori K. Itch in Atopic Dermatitis Management. Itch - Management in Clinical Practice. 1st ed, Szepietowski JC and Weisshaar E (eds): Karger AG, 2016; 50: 86-93.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: セマフォリン 3A 発現亢進剤

発明者: 臼杵靖剛, 五十嵐靖之, 高森建二, 鎌田弥生, 富永光俊, 松田浩則, 田村具博, 向井克之.

権利者: 株式会社ダイセル、国立大学法人北海道大学、学校法人順天堂、国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2016-091429

出願年月日: 2016 年 4 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

鎌田弥生, 富永光俊, 梅原芳恵, 高森建二. 神経反発因子に着眼したアトピー性皮膚炎のかゆみ治療薬の開発. アレルギーの臨床, Vol. 36, No. 9, 58-63, 2016.

富永光俊, 加茂敦子, 鎌田弥生, 梅原芳恵, 高森建二. 皮膚疾患と痒み. アレルギー・免疫, Vol. 23, No. 9, 54-66, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 弥生 (KAMATA, Yayoi)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 00410035