

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19790771

研究課題名(和文) 皮膚における TNF- 変換酵素の機能解析

研究課題名(英文) The role of TNF- converting enzyme in skin

研究代表者

川口 雅一 (KAWAGUCHI MASAKAZU)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10302291

研究成果の概要：我々はラット創傷モデルの解析から、創傷治癒過程において表皮および真皮に TNF- 変換酵素(TACE)の発現が亢進することを見出した。また選択的 TACE 阻害剤を用いた検討からケモカインや EGF 受容体の ligand の発現を TACE が調節している可能性を見出した。このことは、創傷治癒において TACE はケラチノサイトの遊走に関わる分子の発現を調節し創傷治癒に關与するだけでなく、ケモカインの発現を調節し炎症のコントロールを行なっている可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：TACE 創傷治癒 増殖因子 ケラチノサイト ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞表層に局在する膜結合型タンパク質は種々の刺激により細胞外へ放出され (shedding)、発生、分化、炎症反応などに關与している。Shedding に関わるプロテアーゼの一つとして TACE (TNF converting enzyme; ADAM-17) が知られ、TACE は細胞膜

結合 TNF 前駆体を shedding し、活性型 TNF を産生する。TACE ははじめ、TNF- の shedding に関与する酵素として発見されたが、その後の解析から現在は様々な発生や分化、免疫などに關与する分子の shedding に関与することがわかってきた。我々はこれま

で TACE の皮膚における発現と局在を明らかにしてきた。特に尋常性乾癬では病変部皮膚に発現が亢進し、肥満細胞で強い発現が見られた。肥満細胞株ではイオノマイシン刺激により TNF- $\alpha$  が遊離されるが、TACE 阻害剤が濃度依存性にこれを抑制した。また、ラット背部皮膚に TPA を塗布して得られる炎症モデル、および皮膚の器官培養系における TACE 阻害剤の効果を検討し、TACE 阻害剤は TPA 誘導性の皮膚の炎症を抑制することを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

TACE は EGF receptor (EGFR) の ligand である TGF- $\beta$ 、HB-EGF など shedding するため、創傷治癒に関わると考えられるため、TACE がケラチノサイトの増殖、あるいは遊走に関与するか検討する。また、皮膚における創傷治癒時の mRNA の発現を解析するとともに、皮膚特異的 TACE トランスジェニックマウスを作成し、これまで知られていない皮膚における TACE の新たな機能を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

Sprague-Dawley rat を購入し使用した。皮膚創傷モデルとして 12 週から 14 週の雌のラットの背部に 3mm トレパンで傷をつけ、経時的に 0 日、1 日、3 日、5 日、7 日、15 日で傷を含めて 6mm トレパンで皮膚を回収した。採取した組織はすぐに液体窒素で凍らせて保存した。

### (2) TACE 阻害剤

TACE は MMP と構造が似ており、TACE 阻害剤の多くは、MMP も阻害してしまうため、我々は TACE 特異的の高い阻害剤を用いて実験を行った。

### (3) siRNA による TACE mRNA の knockdown

ヒトの TACE siRNA を Qiagen より購入し使

用した。

### (4) 細胞培養

正常ヒトケラチノサイトは KURABO より購入し、Keratinocyte-SFM medium (Invitrogen) に epidermal growth factor (EGF) と bovine pituitary extract (BPE) を添加し培養した。ラットケラチノサイトの cell line である FRSK cells (JCRB0005) は Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) より購入し DMEM+10% fetal calf serum (FCS) で培養した。培地は 2 ~ 3 日に 1 回交換した。

### (5) Alamar Blue cell proliferation assay

FRSK cells ( $5.0 \times 10^3$ ) を 96-well multiwell plate に撒き、24 時間後、様々な濃度の TACE 阻害剤を添加した。阻害剤添加後、17 時間で 10  $\mu$ l の alamarBlue を添加し、3 時間後吸光度を測定した。実験は 3 回繰り返し行った。

### (6) In vitro migration assay

FRSK cell とケラチノサイトを 24-well multiplate に撒き、コンフルエントになるまで培養した。Yellow pipette tip で dish の中央に cell free area を作成した後、dish を洗浄し新しい培地に交換し、TACE 阻害剤 1  $\mu$ M を添加した。阻害剤添加後 20 時間でデジタルカメラで写真を撮り細胞遊走を Scion Image を用いて計測した。実験は 3 回繰り返し行った。

### (7) Extraction of Total RNA

Total RNA は TRIZOL (Invitrogen) を用いて回収後、RNase free DNase 処理を行い RNeasy Mini Kit (Qiagen) で精製した。

### (8) Real-Time Quantitative RT-PCR

Real-time PCR は LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics) を用いた。QuantiTect™ SYBR Green RT-PCR kit (QIAGEN) により RT-PCR を行った。TACE と GAPDH の primer は以下のものを使用した。

TACE: forward primer 5'-ACC TGA AGA GCT TGT  
TCA TCG AG-3'

reverse primer 5'-CCA TGA AGT GTT CCG ATA  
GAT GTC-3'

GAPDH: forward primer 5'-GAA GGT GAA GGT  
CGG AGT-3'

reverse primer 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT  
TC-3'

TGF- $\beta$ 、HB-EGF、amphiregulin(AR)、CCL2、  
CCL5、CCL27、CXCL10 の primer は TAKARA よ  
り購入したものを使用した。

RT-PCR の条件は以下の通り

The cDNA products were amplified with 40  
cycles of PCR

first denaturation 95 °C 15 分

denaturation 94 °C 15 秒

annealing 53 ° (GAPDH)、55 °C (TACE)、

58 ° (CCL2, CXCL10, TGF- $\beta$ , HB-EGF and AR)、

60 ° (CCL5 and CCL27) 20 秒

extension 72 °C 20 秒.

実験データは quantification program  
software (Roche Molecular Biochemicals)  
で解析した。結果は TACE/GAPDH 比で示した。

(9)ケラチノサイトからのケモカイン分泌

ケラチノサイトを 24-well multiplate に  
撒き培養し、細胞密度が 70-80%になったとこ  
ろで dish を洗浄し EGF と BPE を含まない培  
地で 24 時間培養後、TNF- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  を  
添加し、24 時間後に培養液中の MCP-1 と  
RANTES 濃度を ELISA(会社名)で測定した。  
TACE 阻害剤は TNF- $\alpha$  または IFN- $\gamma$  添加する  
1 時間前に添加した。実験は 3 回繰り返し行  
った。

(10) *In situ* hybridization

ラット TACE 特異的 primer を用いて、ラッ  
ト脳から cDNA をクローニングした。Primer  
は以下の通り。

5'-TAA GTA CAT GGG CCG AGG AG-3' (forward

primer)

5'-TCC AGC AGC ATC TTC ACA TC-3' (reverse  
primer),

PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega)に  
挿入し、シーケンスを行い塩基配列を確認  
した。DIG でラベルした RNA probe は  
MAXIscript™ in vitro transcription kit  
(Ambion)と DIG Labeling Kit (Boehringer)  
を用いて作成した。ラット皮膚の新鮮凍結切  
片は 15  $\mu$ m の厚さでクリオスタットで薄切  
し MAS コートガラススライドに乗せ、4%  
paraformaldehyde/0.1 M sodium phosphate  
buffer (pH 7.2)で切片を固定した。Nucleic  
Acid Detection kit (Boehringer)で発色さ  
せた。陰性コントロールとして sense probe  
を用いた。

(11)皮膚特異的 TACE トランスジェニックマ  
ウスの作成

Human TACE cDNA、および dominant negative  
体をケラチン 14 プロモーターの下流につな  
げたコンストラクトを作成する過程で、  
Kozak 配列を入れたコンストラクトを作るた  
めに、これらの cDNA を鋳型として PCR 後、  
シーケンスして配列を確認した。

4 . 研究成果

TACE は EGFR の ligand である TGF- $\beta$ 、HB-EGF  
なども shedding するため、創傷治癒に関わ  
ると考えられるため、TACE 阻害剤を用いてケ  
ラチノサイトの増殖、あるいは遊走に關与す  
るか検討した。TACE 阻害剤は様々なものが知  
られているが、多くは MMP 阻害活性を有する  
ため特異性がない。今回は MMP 阻害活性が少  
なく TACE 特異的阻害剤を用いて検討を行な  
った。多くの実験は MMP 阻害活性を示さない  
1  $\mu$ M の濃度で TACE 阻害剤を使用した。siRNA  
は TACE の knockdown 効率が悪いために使用  
できなかった。ラットのケラチノサイト  
cell line である FRSK を用いて細胞増殖を

alamar blue assay を用いて検討したところ、1 ~ 20  $\mu$  M のいずれの濃度においても細胞増殖を抑制しなかった。また FRSK cell や正常ヒト皮膚のケラチノサイトをコンフルエントになるまで培養し、yellow tip で傷をつけて細胞遊走を検討したところ両方の細胞において、細胞の遊走を阻害しました。また、コンフルエントになる前のケラチノサイトを TACE 阻害剤で 4 時間処理すると、EGFR の ligand である TGF- $\beta$ 、HB-EGF、AR の mRNA の発現が減少した。このことは TACE は EGFR の ligand の shedding だけでなく mRNA 発現を調節していることを示している。

TACE mRNA の発現を検討するために、DIG をラベルした RNA probe を用いて、*in situ* hybridization を行なった。TACE mRNA は毛包に多く発現していたが、正常表皮にはほとんど発現が見られなかった。ラット創傷皮膚を検討すると、表皮では傷を受けた 1 日後に傷の先端のケラチノサイトに発現が見られ、3 日には遊走しているケラチノサイトに発現が見られた。表皮の発現は 7 日目には見られなくなった。真皮では傷を受けた部位に 5 日目ころから発現が増加し、15 日目でも発現が見られた。これまで様々な細胞で TACE の mRNA 発現調節の検討の報告がある。滑膜細胞では低酸素や TNF- $\alpha$  により、血管内皮細胞では TNF- $\alpha$ 、HL-60 では LPS により発現が増加し、膵癌細胞では細胞周期により発現が変動する。我々は細胞周期を調節するために、血清除去、ミモシン、ノコダゾールなどをケラチノサイトに添加し検討を行った。また様々なサイトカインや増殖因子を添加し TACE mRNA の発現を real time PCR で検討したところ、TNF- $\alpha$  などのある種のサイトカインや増殖因子で TACE の発現が亢進した。TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  はケラチノサイトの増殖や遊走に関与し、また TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  により TACE が活性化さ

れることが知られており、これに合致した結果と考えた。この結果より、創傷治癒において TACE mRNA はある種のサイトカインや増殖因子により発現の調節が行われていることが考えられた。血管内皮細胞では TNF- $\alpha$  と同時に IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、EFG、VEGF で刺激するとさらに発現が亢進することが知られているが、ケラチノサイトを TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  の組み合わせで刺激して検討したが、同様の結果は得られなかった。

次に、TACE がケモカインの発現を調節するか検討した。これまでの報告で EGFR signal がケモカインの発現を調節することが知られていた。過去の報告によると、EGFR knockout mouse は創傷治癒時の好中球や肥満細胞の数に変化が起きること、TNFR knockout mouse では創傷治癒時に好中球やマクロファージの浸潤数が減少すること、またケラチノサイトにおいて CCL2、CCL5、CXCL10 などは EGFR を阻害すると発現が変化することが知られている。我々はケラチノサイトを培養し、TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  で刺激したときのケモカイン発現を real time PCR と ELISA で検討した。ケモカインは創傷治癒時にケラチノサイトで発現することが知られている CCL2、CCL5、CCL27、CXCL10 について検討した。CCL2、CCL5、CXCL10 は TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  で刺激すると mRNA の発現が亢進し、TACE 阻害剤によりさらに発現が亢進した。CCL27 は TNF- $\alpha$  刺激でのみ発現が亢進し、TACE 阻害剤によりさらに発現が亢進した。ELISA でケラチノサイトからの分泌タンパクを CCL2 と CCL5 について検討したところ、CCL2 は mRNA の結果と同様 TACE 阻害剤によりサイトカイン誘導性の産生が亢進した。またサイトカインにより誘導された CCL2 は TGF- $\beta$  を加えると産生が減少した。CCL5 は IFN- $\gamma$  によつてのみ産生され、サイトカインにより誘導された CCL2 は TGF- $\beta$  を

加えると産生が減少した。

これらの結果より、TACEはTGF- $\beta$  やHB-EGFといったケラチノサイトの遊走に関わる分子の shedding を介して創傷治癒に関与するだけでなく、ケモカインの発現を調節し、創傷治癒時の炎症細胞のコントロールを行っている可能性があるということが示唆された。すなわち、創傷刺激などの様々な刺激により TNF- $\alpha$  などのサイトカインが産生され、このサイトカインはケラチノサイトを刺激しケモカインの mRNA の発現と産生を亢進させ、同時に TACE の発現を亢進させ活性化させる。TACE により TGF- $\beta$  などが shedding され EGFR signaling を活性化すると、CCL2、CCL5 などのケモカインは発現が減少する。TACE が阻害された状態では TGF- $\beta$  などの shedding が行われず EGFR signaling が働かないためケモカインの発現が亢進する可能性があることが示唆された。

TNF- $\alpha$  の生理活性の多くは炎症に関与しており、これを阻害する製剤はすでに、RA やクローン病治療薬として承認され、優れた効果が報告されている。TACE は腎疾患の病態、あるいは癌などにおいて重要な働きがあることが報告されてきており、TACE 阻害剤は腎疾患や関節炎モデルにおいて有効な治療薬になりうる可能性が示唆されている。TACE 阻害剤は TNF- $\alpha$  を阻害するため様々な炎症性疾患や癌に有効であると考えられているが、少なくともケラチノサイトにおいては、ケモカインの発現を亢進させ炎症を惹起させる可能性もあり、動物モデルなどを用いたさらなる検討が必要と考えられた。

## 5．主な発表論文等

- [雑誌論文] (計0件)
- [学会発表] (計0件)
- [図書] (計0件)
- [産業財産権] (計0件)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

川口 雅一 (KAWAGUCHI MASAKAZU)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号：10302291

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者