

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790783

研究課題名 (和文) 表皮におけるヒアルロン酸合成の制御

研究課題名 (英文) regulation of hyaluronan production by keratinocytes

研究代表者 大谷 朋之 (Ohtani Tomoyuki)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400319

研究成果の概要 (和文)：

hyaluronic acid binding protein (HABP)を用いた蛍光染色を行ったところ、海綿状態皮膚では表皮細胞間の HABP に対する結合性が增強していた。次に、培養ヒト角化細胞を用いて IL-4、IL-13、IFN- γ 処理によりヒアルロン酸合成酵素 3 の mRNA 発現の上昇とヒアルロン酸 (HA) の産生增強を認めた。以上の結果より、接触皮膚炎局所に浸潤する T 細胞が分泌する炎症性サイトカインが、HA 産生を調節し海綿状態を形成していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The staining of HABP was enhanced in spongiosis. IL-4, IL-13, and IFN- γ increased the hyaluronan production and enhanced the HAS3 mRNA expression by NHEK. Hyaluronan accumulation in the spongiotic epidermis was surrounded by keratinocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：皮膚科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ヒアルロン酸、HABP、spongiosis

1. 研究開始当初の背景

(1) 湿疹の特徴的病理変化である海綿状態の病態形成機序はいまだ不明である。

海綿状態は、湿疹皮膚炎群に属する疾患の特徴的病理組織像としてよく知られている。その機序として、多くの教科書では、細胞間

浮腫とのみ記載されているが、どのような機序で細胞間に水が貯溜するかについての解析はこれまで行われてこなかった。最近、Trautmannらにより、接触皮膚炎においては、表皮内に浸潤してくる T 細胞から産生される IFN- γ により表皮細胞の E-cadherin 発現が低

下し、その結果 E-cadherin による表皮細胞間結合が切断され、温存されている desmosome による結合により海綿状態が形成されることが報告された。しかし、その論文のなかで、彼らは、表皮細胞間の水の貯溜は細胞間スペースの拡大による受動的な移動によることを想定している。

(2) 組織内の水分移動には、ヒアルロン酸が重要な役割を果たしている。

ヒアルロン酸 (HA, hyaluronan, hyaluronic acid) は、生体内水分の移動・分布を調節する直鎖状の多糖類で、細胞膜に存在する hyaluronic acid synthase (HAS) 1, 2, 3 により合成される。皮膚においては、真皮線維芽細胞以外に表皮細胞でも産生される。最近、Sayo らは、IFN- γ 処理したヒト培養角化細胞が HAS3 の発現増強とともにヒアルロン酸産生を亢進させることが報告された。一方で、これまでの多くの研究で、アレルギー性接触性皮膚炎において、浸潤 T 細胞が IFN- γ を産生することが報告されている。

2. 研究の目的

(1) ヒト湿疹性病変におけるヒアルロン酸ならびに HAS3 mRNA 発現の検討

そこで、まず、ヒト湿疹性病変において健康皮膚と比較してヒアルロン酸が表皮細胞間により多く蓄積しているかを検討する。すでに、私は、HABP (hyaluronic acid binding protein) をもちいて組織染色で、予備実験で症例数は限られているが、湿疹性病変、とりわけ、海綿状態に一致して表皮細胞間にヒアルロン酸の蓄積を確認している。次に、その表皮細胞間に蓄積しているヒアルロン酸が、皮膚のどの細胞により、また、どの HAS により合成されているのかを検討する。残念ながら、HAS に対する信頼できる抗体は、市販されていないので in situ hybridization により行う。

(2) HAS の発現増加に関連する炎症性サイトカインの同定

すでに、培養ヒト角化細胞においては、IFN- γ により HAS3 mRNA の発現が増加することが報告されているが、最近、Salerno et al、

Asherson et al、Yokozeki et al により、接触皮膚炎の惹起相に於ける IL-4 の重要性が報告されている。そこで、本研究においては、さらに、多くのサイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IL-15、IL-17A、IL-18、IFN- γ 、IFN- α) による HA 産生の調節を検討する。

検討は、HAS 1, 2, 3 mRNA の real-time PCR による解析と HABP を用いたヒアルロン酸のサンドイッチアッセイによっておこなう。

(3) 海綿状態における表皮細胞間のヒアルロン酸蓄積と表皮細胞の E-cadherin の発現の相関について

Trautmann らにより、海綿状態の表皮においては、E-cadherin の発現が低下していることが報告されているが、実際に E-cadherin の発現の低下している部分の表皮細胞間にヒアルロン酸が蓄積しているかを抗 E-cadherin 抗体と HABP による二重染色により検討する。

(4) ヒアルロン酸蓄積の海綿状態における特異性について

最後に、ヒアルロン酸の表皮細胞間への蓄積が、海綿状態に特異的なのか、それとも、表皮細胞間に裂隙の生じる疾患 (天疱瘡など)、あるいは、表皮細胞内にリンパ球が浸潤する疾患 (乾癬、類乾癬) などにも同様に認められる現象なのかを HABP を用いた組織染色で検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト角化細胞による検討

① 培養ヒト角化細胞の培養

培養ヒト角化細胞 (Epicell, KURABO, Osaka, Japan) を専用培地 HuMedia-KG2 で培養する。

② サイトカインによる刺激

培養ヒト角化細胞に、種々のサイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IL-15、IL-17A、IL-18、IFN- γ 、IFN- α 、Peprotech, EC Ltd., London, United Kingdom) による刺激を加える。

③ RNA の抽出と cDNA の作製

上記の細胞をサイトカインによる刺激24時間後に ISOGEN (Nippon gene Inc., Toyama, Japan) を用いて RNA を抽出する。TaKaRa RNA PCR キット (AMV) (Takara Biochemicals, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得る。

④real-time PCR

human GAPDH、HAS1, 2, 3 のシーケンスを GeneBank から入手し forward および reverse primer と TaqMan probe を作成し、95°C15 分の 95°C15 秒、60°C1 分を 40 サイクルの反応条件で行う。PCR 反応は TaqMan system (ABI 7700; PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて行う。

(2) 皮膚組織切片を用いた検討

免疫染色

ビオチン化 HABP (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) を texas-red 標識し、抗 E-cadherin 抗体 (Dako North America Inc. Carpinteria, CA) を FITC 標識し、健常皮膚と接触性皮膚炎皮膚組織の二重染色を行う。

In situ hybridization

In situ hybridization による組織中の HAS1, 2, 3 mRNA の検出を行う。HAS1, 2, 3 遺伝子の核酸配列は GeneBank から入手し probe を作製する。Negative control として DIG-labeled mouse mitogen activated protein kinase binding protein 1 sense RNA probe を用いる。In situ hybridization は、ホルマリン固定しパラフィン包埋した組織を準備し、Discovery automated slide-processing system (Ventana Medical System, Inc, Tucson, AZ) を使用して行う。使用方法は RiboMap in situ hybridization reagent system (Ventana Medical System) に従う。

(3) 培養上清を用いたヒアルロン酸の定量
培養上清を用いてヒアルロン酸の定量を行う。Rilla らの方法に従い、HABP をあらかじめ塗布した 96well のプレートを用いて、サンドイッチ型のアッセイを行う。

(4) 接触性皮膚炎以外の皮膚疾患に関する

検討

接触性皮膚炎以外で表皮に変化を認める皮膚疾患 (乾癬、類乾癬、天疱瘡) についても、同様に、組織の免疫染色を行い HABP の発現を検討する。

4. 研究成果

現在、接触性皮膚炎の特徴的病理変化である海綿状態において、どのようにして表皮細胞間に浮腫が生じるかは明らかにされていない。これまでに、我々は、IFN- γ 処理角化細胞が、生体内水分の移動、分布を調節するヒアルロン酸 (HA) の産生を亢進することを報告してきた。そこで、海綿状態の組織、健常皮膚を対象に、Texas Red 標識した hyaluronic acid binding protein (HABP) を用いた蛍光染色を行ったところ、海綿状態皮膚では表皮細胞間の HABP に対する結合性が増強していた。また、in situ hybridization でも海綿状態皮膚では hyaluronic acid synthase 3 (HAS3) の増強を認めた。次に、培養ヒト角化細胞 (NHEK) を用いて、接触性皮膚炎の病態形成に関与することが知られている種々のサイトカインによる HA 産生の調節を検討した。その結果、real-time PCR で IL-4、IL-13、IFN- γ 処理により HAS3 の mRNA 発現の上昇を認めた。さらに、IL-4、IL-13、IFN- γ 処理により NHEK 細胞表面の E-cadherin 発現が低下した。以上の結果より、接触性皮膚炎局所に浸潤する T 細胞が分泌する炎症性サイトカインが、HA 産生と E-cadherin 発現を調節し海綿状態を形成していることが示唆された。培養上清を用いたサイトカインの定量で IL-4、IL-13、IFN- γ が HA の産生を増強させた。また、接触性皮膚炎以外で表皮に変化を認める皮膚疾患 (乾癬、類乾癬、天疱瘡) についても、同様に、組織の免疫染色を行い HABP の発現を検討したところ、接触性皮膚炎とは異なり、HABP の発現増強は見られなかった。

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 1 件)

①Ohtani T et al. Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. J Invest Dermatol. 2009 ;129:1412-1420. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第38回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会、表皮におけるヒアルロン酸合成とE-cadherin発現の制御-海綿状態皮膚ではヒアルロン酸合成が増強しE-cadherin発現が低下する-、大谷朋之 ほか 大阪, 2008. 11. 8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 朋之 (Ohtani Tomoyuki)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400319

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：