

機関番号：34519

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20790823

研究課題名 (和文) プロテアーゼ活性化受容体を介する表皮制御システムの分子病理学的解析

研究課題名 (英文) The function of protease-activated receptor in keratinocytes

研究代表者

中川 登 (NAKAGAWA NOBORU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90412014

研究成果の概要 (和文)：培養表皮角化細胞をプロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) のアゴニストペプチドの存在下に IL-1 β あるいは TNF- α で刺激すると CXCL8 産生が増強され、その作用はテトラサイクリンによって有意に抑制された。また、アゴニストペプチドと IL-17 刺激では CXCL1 の産生増強もみられ、その効果はシクロスポリン A、活性型ビタミン D₃、コルチコステロイドで有意に抑制された。以上より、PAR2 の活性化は皮膚炎の促進にかかわるとともに、皮膚炎抑制作用を有するこれらの薬剤は表皮角化細胞の PAR2 を介する炎症増幅システムを制御することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：An agonist peptide for protease-activated receptor 2 (PAR2) enhanced the IL-1 β - or TNF- α -induced production of CXCL8, which was markedly suppressed by tetracyclines in normal human epidermal keratinocytes (NHEK). The PAR2 agonist and IL-17 induced also CXCL1, which was significantly decreased by cyclosporine A, active forms of vitamin D₃ and corticosteroids. These results suggest that the activation of keratinocyte PAR2 is involved in the potentiation of pro-inflammatory reactions and this process is modulated by the drugs used for treatment of inflammatory skin disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：(1) プロテアーゼ活性化受容体 (2) 角化細胞 (3) 皮膚炎 (4) サイトカイン (5) ケモカイン (6) 炎症性皮膚疾患

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼ活性化受容体 (Protease-activated receptor ; PAR) ファミリーは PAR1~4 のメンバーを持つ 7 回膜貫通型、G 蛋白共役型受容体の一群である。その活性化機構は、特定のリガンドが受容体に結合して起こるのではなく、種々のセリンプロテアーゼによって受容体の N-末端の細胞外領域の一部が切断され、新しく生じた N-

末端アミノ酸配列がアゴニストとして自らに認識され下流へシグナルが伝達されるというユニークな機構である。乾癬や膿疱性乾癬など、白血球が浸潤する皮膚疾患において、白血球や表皮細胞から産生されるセリンプロテアーゼは PAR2 の活性化を介して CXCL8 等のケモカイン産生を促し、皮膚炎の進展に関わると考えられる。

2. 研究の目的

角化細胞における PAR2 活性化の役割を明らかにし、皮膚炎の病態と制御機構の解明に新たな進展をもたらすことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 材料

PAR2 アゴニストペプチドSLIGKV-NH₂ はBachem社、サイトカインは Peprotech社、Dexamethasone, clobetasol propionate はSigma-Aldrich社より購入した。Cyclosporin A (CyA) はNovartis Pharma社から、1 α , 24R-dihydroxyvitamin D₃ (Tacalcitol) はTeijin社から、それぞれ供与された。なお、ヒト由来サンプルの使用については兵庫医大倫理委員会の承認の下に提供者の同意を取得した。

(2) 培養細胞

培養正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) はCambrex BioScience 社から入手した。T75 フラスコに2 \times 10⁵ 個を接種し、10 ml KGM2 培地 (Kurabo社)中、37 °C、5% CO₂下で培養した。細胞密度が75% 程度でトリプシン処理を行い、12-wellプレートに1.0 \times 10⁴個/cm²の濃度で植え、72 時間培養後、添加物のないKGM2 培地に交換し、薬剤を添加後24 時間培養した。つぎにサイトカイン/SLIGKV-NH₂ を添加、48 時間培養後に培地を集めELISAに、細胞はRNA調製に供した。

(3) CXCL1 /CXCL8 の測定

Human CXCL8 ELISA Kit (Invitrogen 社) と Quantikine Human CXCL1/GRO α ELISA キット (R&D systems 社) を用いた。

(4) トランスフェクションと PAR2 のノックダウン

NHEK を12-well プレートに接種し、72 時間培養後、PAR2-特異的 small interfering RNA (siRNA) (Qiagen 社) を TransIT TKO transfection reagent (Mirus Bio 社) を用いて導入した。24 h 培養後、サイトカイン/アゴニストペプチドを添加し、さらに24 時間培養後、培地をサンプリングした。

(5) 生細胞の測定

Cell counting kits (CCK-8) (Dojindo 社) を用いて生細胞数をモニターした。

(6) 定量的 real-time PCR

NHEK から TRI-ZOL 試薬 (Sigma-Aldrich 社) を用いて全 RNA 抽出し、cDNA を TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems 社) を用いて合成した。ABI 7900H T sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて定量的 real-time PCR を実施した。内部標準とし glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト表皮角化細胞における IL-1 β 、TNF- α 誘導性 CXCL8 産生に及ぼす PAR2 活性化の影響

NHEKにPAR2 アゴニストペプチドSLIGKV-NH₂ を作用させるとCXCL8 産生が濃度依存性に誘導された。IL-1 β 、TNF- α それぞれ単独でもCXCL8 の産生が誘導されるが、SLIGKV-NH₂ 共存下では、さらに強い産生がみられた。この効果はPAR2 特異的siRNAのトランスフェクションにより有意に抑制された。

以上の結果より、角化細胞の PAR2 活性化は IL-1/TNF- α による CXCL8 産生を増強することによって炎症反応の増悪に関与することが示唆された。

(2) サイトカインと PAR2 活性化による CXCL8 産生に及ぼすテトラサイクリン誘導体の効果

SLIGKV-NH₂によって誘導されるCXCL8 は5 および10 μ Mのテトラサイクリン(TET)、ドキシサイクリン(DOX)、ミノサイクリン(MIN)によって有意に抑制された。IL-1 β はSLIGKV-NH₂の存在下にCXCL8 の相乗的な増加を引き起こすが、この相乗効果はDOXやMINで有意に抑制された。TNF- α とSLIGKV-NH₂によるCXCL8 産生増加は10 μ Mのテトラサイクリン系抗生物質により有意に抑制されたが、DOXやMINに比較してTETの抑制効果は弱かった。

以上の結果から、テトラサイクリン系抗生物質は角化細胞のセリンプロテアーゼ-PAR2-CXCL8 axis への抑制作用を通じて皮膚炎の増悪を制御可能性が示唆された。

(3) IL-17 によるケモカイン誘導に及ぼす PAR2 活性化の影響

乾癬や膿疱性乾癬など、白血球が浸潤する皮膚疾患において、白血球や表皮細胞から産生されるセリンプロテアーゼはPAR2 の活性化を介してCXCL8、IL-6 等のサイトカイン産生を促し、皮膚炎の進展に関わると考えられる。そこで、乾癬の病態に中心的な役割を果たすIL-17 が培養角化細胞で誘導するケモカインCXCL8 とCXCL1 の産生に及ぼすPAR2 の役割を検討した。IL-17 はNHEKにおいてCXCL8 とCXCL1 の産生を容量依存性に誘導した。このIL-17 の作用は、SLIGKV-NH₂存在下では増強され、CXCL8 とCXCL1 の産生が強く誘導された。

以上の結果より、角化細胞の PAR2 活性化は IL-17 による CXCL8 と CXCL1 の産生を増強することによって炎症反応の悪化に関与することが示唆された。

(4) IL-17/PAR2 活性化によるケモカイン産生誘導に及ぼすシクロスポリンA、活性型ビタミンD₃、コルチコステロイドの作用

PAR2 の活性化およびIL-17 単独、および両者によって誘導されるCXCL8/CXCL1 産生は、細胞毒性を示さない濃度範囲のカルシニューリン阻害薬シクロスポリンA (CyA) の添加

によって、容量依存性に強く抑制された。また、乾癬の治療薬として用いられている活性型ビタミンD₃である 1 α ,24R-dihydroxyvitamin D₃やコルチコステロイドdexamethasone, clobetasol propionateによってCXCL1の産生は有意に抑制されたが、その効果はシクロスポリンAに比較して軽度であり、CXCL8産生に対してはほとんど効果を示さなかった。

以上の結果から、表皮角化細胞において PAR2 活性化によって増強される IL-17 の効果に関しては、薬剤ごとに抑制作用は異なることが明らかになった。

(5) 膿疱性乾癬における PAR2 の発現の解析と血中 IL-6 の変動

好中球の表皮内浸潤を来す乾癬において PAR2 の発現を抗 PAR2 抗体を用いた免疫組織化学で検討した。PAR2 は正常表皮ではほとんど顆粒層に局在し、弱く発現するだけであるが、乾癬表皮では肥厚した有棘層に広範囲に発現し、膿疱性乾癬表皮では膿疱周囲に強い発現がみられた。

PAR2 のアゴニストペプチドを角化細胞に作用させると、CXCL8 とともに IL-6 の産生も誘導されるとの報告がある。そこで、IL-6 が膿疱性乾癬の病勢とどのように関係するのか、膿疱性乾癬治療前後における IL-6 の血中濃度を測定した。その結果、血清 IL-6 値は膿疱性乾癬の治療開始とともに減少傾向が認められ、IL-6 はその病勢に関連して比較的早期から変動することが判明した。

以上の結果から、乾癬表皮における PAR2 発現増加は皮膚炎の増幅を促進するとともに、膿疱性乾癬では IL-6 などのサイトカインの産生増強、血中濃度の増加を介して疾患病態に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Yamamoto M, Imai Y, Nakagawa N, Yamanishi K. Lichen planus-like dermatoses distributed along the lines of Blaschko. *J Dermatol.* 38:190-191, 2011 (査読有)

② 中川 登, 伊藤孝明, 武井怜子. Klippel-Trenaunay症候群の 11 例の治療経験. *静脈学* 21:61-69, 2010 (査読有)

③ 宮本園子, 伊藤孝明, 中川 登, 山西清文, 木村鉄宣. Rippled-pattern sebaceoma. *臨床皮膚* 64:493-496, 2010 (査読有)

④ Ishikawa C, Tsuda T, Konishi H, Nakagawa N, Yamanishi K. Tetracyclines modulate protease-activated receptor 2-mediated proinflammatory reactions in epidermal keratinocytes. *Antimicrob Agents*

Chemother. 53:1760-1765, 2009 (査読有)

⑤ Tsuda T, Ishikawa C, Nakagawa N, Konishi H, Tarutani M, Matsuki M, Yamanishi K. A novel point mutation of keratin 17 (KRT17) in a Japanese family with pachyonychia congenita type 2: An RNA-based genetic analysis using a single hair bulb. *Br J Dermatol.* 159:730-732, 2008 (査読有)

⑥ Nakagawa N, Tsuda T, Yamamoto M, Ito T, Futani H, Yamanishi K. Adult cutaneous alveolar rhabdomyosarcoma on the face diagnosed by the expression of PAX3-FKHR gene fusion transcripts. *J Dermatol.* 35:462-467, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 山本雅章, 中川 登, 今井康友, 武井怜子, 羽田孝司, 古川紗綾佳, 伊藤孝明, 夏秋優, 山西清文. 足底荷重部の悪性黒色腫に対して土踏まずからの分層植皮で再建した 5 例. 第 25 回日本皮膚外科学会 2010 年 9 月 4 日-5 日, 大分

② 武井怜子, 今井康友, 東田千春, 中川 登, 山西清文. びまん性大細胞型B細胞リンパ腫と急性骨髄単球性白血病と菌状息肉症の合併例. 第 26 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2010 年 6 月 4 日-5 日, 東京

③ 山本雅章, 今井康友, 東田千春, 中川 登, 山西清文. 成人T細胞白血病・リンパ腫とびまん性大細胞型B細胞リンパ腫のcomposite lymphoma. 第 109 回日本皮膚科学会, 2010 年 4 月 16 日-18 日, 大阪

④ 山口瑛, 伊藤孝明, 中川 登, 岡田彩子, 武井怜子, 山本雅章, 長岡悠美, 山西清文. 4 年に及び進行した静脈うっ滞に起因する難治性下腿潰瘍の治療経験, 第 108 回日本皮膚科学会総会・学術大会 2009 年 4 月 24 日-26 日, 福岡

⑤ Yamanishi K, Tsuda T, Ishikawa C, Nakagawa N, Konishi H, Tarutani M, Matsuki M, Yamanishi K. A novel point mutation of keratin 17 (KRT17) in a Japanese family with pachyonychia congenita type 2 lacking hair abnormalities. The 5th EADV Spring Symposium, 2008. 5. 22-24, Istanbul, Turkey

[その他]

ホームページ等

[http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm
t/Ref1.html](http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm
t/Ref1.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 登 (NAKAGAWA NOBORU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：90412014

(2) 研究協力者

山西 清文 (YAMANISHI KIYOFUMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10182586

津田 達也 (TSUDA TATSUYA)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：80434942

今井 康友 (IMAI YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：10529514

石川 千香 (ISHIKAWA CHIKA)
兵庫医科大学・大学院生

山本 雅章 (YAMAMOTO MASA AKI)
兵庫医科大学・大学院生

小西 弘江 (KONISHI HIROE)

兵庫医科大学・実験補助

坂口 祥子 (SAKAGUCHI YOSHIKO)

兵庫医科大学・実験補助