

平成23年 5月 6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2010

課題番号：21591464

研究課題名（和文） 皮膚侵襲シグナルに対する恒常性維持に関わる新規調節分子の動態解析

研究課題名（英文） Analysis of novel homeostatic regulator of the skin.

研究代表者

片山 一郎 (KATAYAMA ICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80191980

研究成果の概要（和文）：

本研究では11 $\beta$ HSD1の皮膚組織における役割をとくに恒常性の維持といった点から研究した。外界刺激による11 $\beta$ HSD1発現の変動は紫外線・ハプテン（TNCB）・TNF $\alpha$ によりmRNA、タンパクレベルで上昇した。角化細胞増殖に対するsi11 $\beta$ HSD1、11 $\beta$ HSD1阻害薬の効果を検討したところ、増殖が亢進したためにsi11 $\beta$ HSD1は増殖抑制因子として働いていることが明らかとなった。in vivoにおいて11 $\beta$ HSD1阻害薬はマウスの創傷治癒を促進することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The role of 11 $\beta$ HSD1 in skin homeostasis was studied. The mRNA expression and protein level of 11 $\beta$ HSD1 increased by stimuli, such as UVB, haptens, and TNF $\alpha$ . 11 $\beta$ HSD1 knockdown by si11 $\beta$ HSD1 and 11 $\beta$ HSD1 inhibition by specific inhibitor suppressed differentiation of keratinocytes and enhanced proliferation. In vivo studies, selective inhibitor of 11 $\beta$ HSD1 promoted cutaneous wound healing. Taken together, we consider that 11 $\beta$ HSD1 acting as a regulator of keratinocytes proliferation and differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：皮膚生理学、11 $\beta$ HSD1と皮膚の恒常性、グルココルチコイド、アレルギー、発ガン

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚は紫外線・物理的刺激など様々な外界からのストレスに常にさらされている臓器である。我々は細胞内でのコルチゾール活性化酵素である11 $\beta$ HSD1が表皮角化細胞にも発

現していることを発見した。11 $\beta$ HSD1は小胞体に存在する酵素でコルチゾール（不活型）をコルチゾン（活性型）に変換する。近年、脂肪細胞における11 $\beta$ HSD1発現が肥満や耐糖能異常に関与することから、注目されている酵素である。また、ステロイドによって影

響を受けやすい疾患である、骨粗鬆症や緑内障においても 11 $\beta$ HSD1 はその病因に関与することが知られている。皮膚もステロイドの影響をうける臓器の一つであり、皮膚においても 11 $\beta$ HSD1 は何らかの役割を担っていることが推測される。

## 2. 研究の目的

当研究課題は皮膚における 11 $\beta$ HSD1 の役割を、おもに恒常性の維持といった点から解明することを目的とする。また、ストレス侵襲刺激による 11 $\beta$ HSD1 の動態と炎症性サイトカイン産生への影響を *in vitro*, *in vivo* で明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 角化細胞においては 11 $\beta$ HSD1 の発現 表皮角化細胞での 11 $\beta$ HSD1 発現を健常表皮の免疫組織学的染色を行うことにより検討する。また、マウス皮膚でも同様に免疫組織学的染色と、Western Blot により検討する。

(2) 11 $\beta$ HSD1 発現を調節する因子 表皮角化細胞における、11 $\beta$ HSD1 の調節因子を様々な刺激を与えることにより検討する。具体的には外界刺激に相当する紫外線やハプテン、界面活性剤、LPS やサイトカインなどにより細胞を刺激し、11 $\beta$ HSD1 発現を評価する。また、*in vivo* における 11 $\beta$ HSD1 調節因子も同様の刺激を加えることにより検討する。

(3) 表皮角化細胞増殖に対する 11 $\beta$ HSD1 の役割 (*in vitro*) 表皮角化細胞増殖における 11 $\beta$ HSD1 の役割を解明するために、培養表皮角化細胞に 11 $\beta$ HSD1 阻害薬および、siRNA をトランスフェクトし、増殖能を MTS アッセイおよび BrdU で評価する。

(4) 表皮角化細胞増殖に対する 11 $\beta$ HSD1 の役割 (*in vivo*) *In vivo* における表皮角化細胞の増殖の評価のために、ヘアレスマウスに 11 $\beta$ HSD1 阻害薬を外用し、皮膚組織を採取し、HE 染色および、Ki-67 による免疫組織学的検査で表皮増殖能を評価する。

(5) 創傷治癒における 11 $\beta$ HSD1 阻害薬の効果の検討 11 $\beta$ HSD1 の臨床応用への一つとして創傷治癒に及ぼす 11 $\beta$ HSD1 阻害薬の効果を検討する。C57BL/6 マウスおよび、創傷治癒遅延モデルとして有名な Ob/Ob マウス背部に創傷を作成し、11 $\beta$ HSD1 阻害薬を2日に1回投与し、

創傷面積を算出することにより創傷治癒を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 角化細胞においては 11 $\beta$ HSD1 の発現 ヒト健常表皮では 11 $\beta$ HSD1 の発現は基底層では低く、有棘層より上層でその発現が上昇する。このことから、11 $\beta$ HSD1 は角化細胞の増殖や分化に関係することが推測された。そこで *in vitro* で Ca を付加することにより、角化細胞の分化誘導をおこなったところ、*in vitro* でもその発現が上昇することがわかった。

(2) 11 $\beta$ HSD1 発現を調節する因子 様々な外界刺激による 11 $\beta$ HSD1 発現の変動を調べたところ、紫外線・ハプテン (TNCB)・TNF $\alpha$ により 11 $\beta$ HSD1 発現が mRNA, タンパクレベルで上昇することを見出した。また、マウス皮膚に同様に紫外線照射、ハプテンの外用を行ったところ、マウス皮膚でも 11 $\beta$ HSD1 発現は一過性に上昇した。このことより、11 $\beta$ HSD1 は外界刺激に反応してその発現が上昇する因子であることがわかった。

(3) 表皮角化細胞増殖に対する 11 $\beta$ HSD1 の役割 (*in vitro*) 角化細胞増殖に対する 11 $\beta$ HSD1 の役割を検討するために、si11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD1 阻害薬を用いた。11 $\beta$ HSD1 阻害薬の添加により表皮角化細胞の増殖が MTS アッセイ、BrdU アッセイで上昇したことより、11 $\beta$ HSD1 は表皮角化細胞の増殖に抑制的に働いていることが推測された。さらに、真皮線維芽細胞に対しても同様に 11 $\beta$ HSD1 阻害薬を付加し、増殖濃度を MTS アッセイで検討したところ、11 $\beta$ HSD1 阻害薬は真皮線維芽細胞の増殖も促進した。このことから、11 $\beta$ HSD1 は真皮線維芽細胞の増殖に対しても抑制的に作用していることが考えられた。

(4) 表皮角化細胞増殖に対する 11 $\beta$ HSD1 の役割 (*in vivo*) 次に、*in vivo* における 11 $\beta$ HSD1 の役割を検討するために、ヘアレスマウスの背部皮膚に 11 $\beta$ HSD1 阻害薬を5日間外用し、皮膚を採取し評価した。HE 染色で表皮の厚さを測定したところ、阻害薬を外用した群はコントロールである DMSO を外用した群に比し顕著に表皮が肥厚していた。また、増殖細胞を Ki-67 染色により評価したところ、11 $\beta$ HSD1 阻害薬外用マウスにおいて、Ki-67 陽性細胞の数が有意に上昇していた。このことから、*in vivo* においても、11 $\beta$ HSD1 は表皮角化細胞の増殖に抑制的に働いていることが考えられた。

(5) 創傷治癒における 11 $\beta$ HSD1 阻害薬の効果の検討

最後に、臨床応用を考え、創傷治癒に及ぼす 11 $\beta$ HSD1 阻害薬の効果を検討した。C57BL/6 マウスと創傷治癒遅延のモデルとして用いられる Ob/Ob マウスを用いて検討を行った。C57BL/6 マウスにおいて、11 $\beta$ HSD1 阻害薬を 2 日に 1 度外用した群ではコントロールの DMSO 外用群に比べて創傷治癒が促進した。また、Ob/Ob マウスでも同様に 2 日に 1 度 11 $\beta$ HSD1 阻害薬を外用して評価したところ、Ob/Ob マウス群では C57BL/6 マウス群以上に 11 $\beta$ HSD1 阻害薬は創傷治癒を促進した。Ob/Ob マウスは肥満をきたし、11 $\beta$ HSD1 発現が内臓脂肪で上昇していることが知られているが、皮膚組織においても、11 $\beta$ HSD1 発現は上昇していた。このことから、Ob/Ob マウスの創傷遅延には 11 $\beta$ HSD1 の上昇が何らから関与していることが推測された。

以上の結果より、我々は 11 $\beta$ HSD1 が表皮角化細胞の増殖抑制因子として働いていることを見出した。11 $\beta$ HSD1 阻害薬を用いることにより表皮を増殖できることが期待され、11 $\beta$ HSD1 は今回、その効果が証明できた創傷治癒だけでな、表皮がひ薄化するような状態や疾患、表皮の増殖が必要な状態においても治療のターゲットとなりうるのではないかと考えた。

#### 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 11 件)

- ① Hirakawa S, Katayama I. Multiple lymphadenopathy as an initial sign of extramammary Paget's disease. *British Journal of Dermatology*, 164 : 200-203, 2011 (査読有り)
- ② 中川幸延 片山一朗. Identification of Semaphorin 4B as a Negative Regulator of Basophil-Mediated Immune Responses. *Journal of Immunology* 186: 2881-2888, 2010 (査読あり)
- ③ 室田浩之 片山一朗. Olopatadine hydrochloride improves dermatitis score and inhibits scratch behavior in NC/Nga mice., *Int Arch Allergy Immunol* 153 : 121-132, 2010(査読有り)
- ④ 寺尾美香 片山一朗. Cutaneous symptoms in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome and increased ERK phosphorylation in skin fibroblasts. *British Journal of Dermatology* 163 : 881-884, 2010 (査読有り)

- ⑤ 室田浩之 片山一朗. Effects of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor and low-density lipoprotein on proliferation and migration of keratinocytes. *British Journal of Dermatology* 163 : 128-137, 2010 (査読有り)
- ⑥ 花房崇明 片山一朗. Good's syndrome (hypogammaglobulinemia with thymoma) presenting intractable opportunistic infections and hyperkeratotic lichen planus. *Journal of Dermatology* 37 : 171-174, 2010 (査読有り)
- ⑦ Katayama I. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat Immunol.* 594-600, 2010 (査読有り)
- ⑧ Shimbo T, Katayama I. Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. *PLoS One.* 5:5 e10566, 2010(査読あり)
- ⑨ 室田浩之 片山一朗. Effects of nonsedative antihistamines on productivity of patients with pruritic skin diseases. *Allergy*, 65 : 929-930, 2010 (査読有り)
- ⑩ 寺尾美香 片山一朗. Tumor necrosis factor-alpha processing inhibitor-1 inhibits skin fibrosis in a bleomycin-induced murine model of scleroderma. *Exp Dermatol.* 19 : 38-43, 2010 (査読有り)
- ⑪ Shima Y, Katayama I. (14人中11番目) The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)*, doi: 10.1093 Online 1-5, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 寺尾美香 片山一朗. 11 $\beta$ -HSD as a novel regulator of epidermal differentiation: Considering the possible involvement in aberrant keratinizing disorders. 第35回 日本研究皮膚科学会, 和歌山 (2010.12.3-5)
- ② 寺尾美香 片山一朗. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is strongly expressed in differentiated keratinocytes and regulates epidermal turnover. 東京 (2010.7.31)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 一郎 (KATAYAMA ICHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 80191980

(2) 研究分担者

吉良 正浩 (KIRA MASAHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 90314335

室田 浩之 (MTROTA HIROYUKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 90363499

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：