

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659550

研究課題名（和文） 蕁麻疹と血管透過性：膜蛋白のプロセッシングと分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of urticarial development

研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

研究成果の概要（和文）：

ヒスタミンによる血管透過性亢進に関して、ectodomain shedding を介した分子機構の一端を解明した。本課題では血管内皮細胞に発現する接着分子 VE-cadherin に着目し、ヒスタミンを介したシグナルが、VE-cadherin を細胞外領域で化学的に切断することを示した。方法は Western blot に従い、可溶型 VE-cadherin を検出することにより shedding を同定した。

研究成果の概要（英文）：

The biochemical cleavage of VE-cadherin was found in cultured endothelial cells. Western blot analysis from cell lysates and conditioned media revealed that VE-cadherin undergoes ectodomain shedding in response to histamine, leading to the disruption of EC junctions and the induction of vascular hyperpermeability. These findings represent the development of urticaria, a pathological alteration of vasculature in the skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：血管内皮細胞、細胞間接着、シェディング、ヒスタミン、マイクロ流路

## 1. 研究開始当初の背景

急性蕁麻疹は、罹患者が多い代表的な皮膚疾患であり、その病態を理解することは極めて重要である。典型的な急性蕁麻疹は I 型アレルギー反応により誘導され、その主体は皮膚肥満細胞が担う。肥満細胞の活性化によりヒスタミンが遊離する一方、ヒスタミン受容体(H<sub>1</sub>レセプター)は、血管内皮細胞が豊富に発現する。H<sub>1</sub>レセプターは、7回膜貫通G蛋白質共役型受容体である。従って、H<sub>1</sub>レセプターにヒスタミンが結合するとG蛋白質を介したホスファチジルイノシトールの加水分解が起こり、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)とジ

アシルグリセロールが増加する。IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、血管内皮細胞の骨格変化を誘導する。この結果、真皮毛細血管では血漿成分の漏出が生じ、病理組織学的には血管浮腫、さらに臨床的には膨疹が形成される。

しかし、物質透過性は細胞膜のインテグリンに依存するものであり、血管内皮細胞の膜蛋白変化こそが、血漿成分の漏出の本質である。しかし、蕁麻疹形成に関わる血管内皮細胞の膜蛋白変化と、その分子機構に関する検討は国内外を通じて極めて乏しい。

## 2. 研究の目的

ヒスタミンによる血管透過性亢進に関して、ectodomain shedding を介した分子機構を解明する。蕁麻疹の本質は、ヒスタミンによる血管透過性の亢進である。しかし、血管内皮細胞の膜蛋白に着目した研究は極めて乏しい。そこで、血管内皮細胞に発現する接着分子 VE-cadherin に着目し、ヒスタミンを介したシグナルが、VE-cadherin を細胞外領域で化学的に切断することを示す。この発想は世界に先駆けるものであり、極めて斬新である。さらに血管研究の難しさは、生体における血管機能の変化を経時的に評価する方法がないことに起因する。そこで、本申請課題では *ex vivo* 流体デバイスを開発し、皮膚微小血管の変化を経時的に測定する新たな評価法を確立する。この方法に立脚し、シグナル遮断薬の薬理作用を経時的かつ定量的に測定することを目指す。

## 3. 研究の方法

- ①ヒスタミンによる ectodomain shedding  
血管の透過性変化は、ヒスタミン濃度に依存する。通常の平面培養では、 $1 \times 10^{-4}$  M で検討する人が多い。そこで本申請課題では、VE-cadherin の ectodomain shedding の至適化を行い、ヒスタミンに関する濃度依存性及び時間依存性を検討する。方法は Western blot による。細胞は、ヒト新生児皮膚微小血管由来初代培養内皮細胞(HDMEC)を用いる。
- ②切断酵素の同定  
血管内皮細胞による ectodomain shedding は、膜結合型 Metalloproteinase (MMP) が切断酵素であることが多い。そこで、候補遺伝子を siRNA を用いてノックダウンし、切断酵素を同定する。
- ③抗ヒスタミン剤の薬効評価  
VE-cadherin の ectodomain shedding を指標に、抗ヒスタミン剤の効果を判定する。方法は Western blot で検出する。

## 4. 研究成果

- ①ヒスタミンによる ectodomain shedding  
まず始めに、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞に対するヒスタミンの至適濃度を検討した。濃度は、 $1 \times 10^{-4}$  M から  $1 \times 10^{-6}$  M まで段階的に評価した。時間は、ヒスタミン添加後 1 分から 30 分まで経時的に評価した。この結果、ectodomain shedding を誘導するヒスタミンの至適濃度は、 $1 \times 10^{-4}$  M であることが分かった。次に、ヒスタミン濃度  $1 \times 10^{-4}$  M を用いて

VE-cadherin ectodomain shedding の経時的变化を Western blot で検出した。この結果、VE-cadherin の shedding はヒスタミン添加 1 分後から生じることを見出した (図 1 A)。

### ②切断酵素の同定

培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞に発現する可能性がある膜結合型 MMP として ADAM10 と ADAM17 が存在する。そこで、各分子に対する siRNA を培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞し、ヒスタミン存在下で VE-cadherin の shedding を Western blot で検出した。この結果、VE-cadherin の shedding は、ADAM10 または ADAM17 で抑制されることを見出した。

### ③抗ヒスタミン剤の薬効評価

ヒスタミン受容体(H<sub>1</sub>レセプター)に対する拮抗阻害薬を用いて、ヒスタミン存在下で VE-cadherin の shedding を検出した。この結果、あらかじめ培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞を抗ヒスタミン剤で処理した群では、VE-cadherin の shedding が抑制されることが明らかとなった。この結果は、抗ヒスタミン剤の効果が、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞の膜表面の酵素活性に及び、ADAM10 または ADAM17 の酵素活性を抑制する効果があることを示唆するものである。

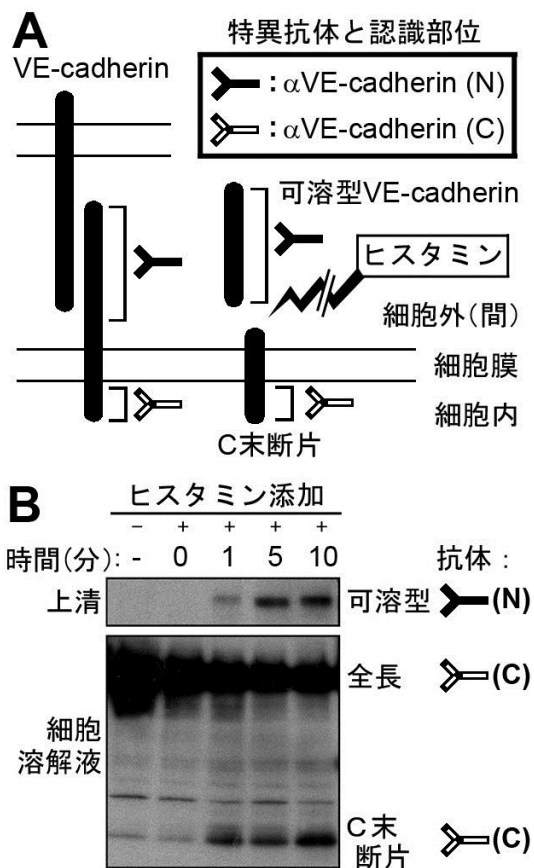


図 1 (A) VE-cadherin は homophilic に結合し、adherence junction を形成する。ヒスタミンを始め、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞

胞に対して血管透過性因子を添加すると、細胞膜にはカルシウム・インフラックスが生じる。この結果、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞では細胞内シグナルが生じ、VE-cadherinは細胞外領域で酵素的切断を受けることが推測される。VE-cadherinの認識部位が異なる二つの抗体を用いると、培養ヒト皮膚微小血管内皮細胞で生じる ectodomain sheddingを検出できる。(B) ヒト皮膚由来血管内皮細胞を用いた Western blot。ヒスタミン添加1分後、培養上清中に可溶性 VE-cadherinが検出された。一方、細胞溶解液 cell lysateにはC末断片が出現した。この実験結果は、VE-cadherinのectodomain sheddingを示唆している。

#### 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 10 件)

1. Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y, Katoh N. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2012; 181:2217-24.
2. Liersch R, Hirakawa S, Berdel WE, Mesters RM, Detmar M. Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph nodes by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. *Int J Oncol.* 2012; 41:2073-8.
3. Sasaki N, Shinjo M, Hirakawa S, Nishinaka M, Tanaka Y, Mawatari K, Kitamori T, Sato K. A palmtop-sized microfluidic cell culture system driven by a miniaturized infusion pump. *Electrophoresis.* 2012; 33:1729-1735..
4. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K. Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol.* 2012; 39:366-74.
5. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res.* 2011; 71:7502-12.
6. Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. Kerjaschki D, Bago-Horvath Z, Rudas M, Sexl V, Schneckenleithner C, Wolbank S, Bartel G, Krieger S, Kalt R, Hantusch B, Keller T, Nagy-Bojarszky K, Huttary N, Raab I, Lackner K, Krautgasser K, Schachner H, Kaserer K, Rezar S, Madlener S, Vonach C, Davidovits A, Nosaka H, Hämmerle M, Viola K, Dolznig H, Schreiber M, Nader A, Mikulits W, Gnant M, Hirakawa S, Detmar M, Alitalo K, Nijman S, Offner F, Maier TJ, Steinhilber D, Krupitza G. *J Clin Invest.* 2011; 121:2000-12.
7. Mite allergen is a danger signal for the skin via activation of inflammasome in keratinocytes. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:806-14.
8. PPAR $\gamma$  mediates innate immunity by regulating the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S,

- Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K. *J Dermatol Sci*. 2010; 60:179-86.
9. Sayama K, Yamamoto M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K. E2 polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem*. 2010; 39:30042-9.
  10. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K. Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS ONE* 2010; 5:e11275-84.

[学会発表] (計9件)

1. 平川聡史. 皮膚と循環：血管・リンパ管から考える病態生理. シンポジウム：階層的循環システム構築の機序とその破綻 (指定演題) 第90回日本生理学会大会. 平成25年3月28日. 東京.
2. 平川聡史. 皮膚と循環：血管・リンパ管から考える病態生理. 第90回日本生理学会大会. シンポジウム 招待講演. 東京. 2013年3月27日-29日.
3. 平川聡史. 癌とリンパ管新生. 第100回日本病理学会総会 シンポジウム2 腫瘍と間質 分子細胞組織からのアプローチ シンポジウム 招待講演. 横浜. 平成23年4月28日.
4. 平川聡史. リンパ管新生とリンパ節転移の基礎的解析. 第35回日本リンパ学会総会 シンポジウム3：リンパ行性癌転移. 指定演題. 東京. 平成23年6月4日.
5. Hirakawa S. A functional role of LYVE-1 in

- VEGF-A-induced lymphangiogenesis and psoriasis. The 61<sup>st</sup> annual Montania Symposium. Gleneden Beach, Oregon, October 11 - 15, 2012.
6. Hirakawa S, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Tokura Y. Elevated expression of LYVE-1 in novel three-dimensional constructs by cultured dermal lymphatic endothelial cells. The 36<sup>th</sup> annual meeting of the Society for Japanese Investigative Dermatology. Kyoto, December 9-10, 2011.
  7. Hirakawa S. Pathological lymphangiogenesis requires VEGF-A for endothelial proliferation and migration. The 9<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology. Busan, South Korea. August 25-26, 2011.
  8. Hirakawa S. Lymphatic vessels in inflammation and tumor metastasis. EC8 Zurich 2011. 8<sup>th</sup> International Symposium on the Biology of Endothelial cell. Zurich, Switzerland. June 15-18, 2011.
  9. Hirakawa S. Pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. World Congress of Dermatology 2011. Seoul, South Korea. May 24, 2011.

[図書] (計2件)

1. 平川聡史. 慢性炎症におけるリンパ管新生. 佐藤靖史 (編集). 血管新生研究の最先端. の最先端. pp280-286. 2012. 医薬ジャーナル社. 東京.
2. 平川聡史. がん転移とリンパ管ニッチ. 須田年生 (編集). がん幹細胞. Pp167-172. 羊土社. 東京.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：血管透過性亢進抑制作用の評価法  
発明者：山内 豊彦、平川聡史、山下 豊、戸  
倉新樹  
権利者：国立大学法人浜松医科大学・浜松ホ  
トニクス株式会社  
種類：特許願  
番号：特願 2013-034570  
出願年月日：2013年2月25日  
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/derm/achievements/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平川 聡史 (HIRAKAWA SATOSHI)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50419511