

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 5 月 15 日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791277
 研究課題名（和文） 皮膚における、抗真菌薬の新しい抗炎症・レドックス制御作用に関する研究
 研究課題名（英文） Research for anti-inflammatory and redox effects of antifungal drug in the skin
 研究代表者
 高原 正和（TAKAHARA MASAKAZU）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：20398093

研究成果の概要（和文）：

今回の研究で、抗真菌薬であるケトコナゾールは、殺真菌効果だけではなく、ヒト皮膚の表皮細胞に対して抗炎症作用を発揮した。さらにその作用は、ダイオキシン受容体として知られている aryl hydrocarbon receptor (AhR) の活性化を介していることが判明した。AhR は Nrf2、NQO1 の発現を誘導し、活性酸素や IL-8 産生、DNA 障害を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that ketoconazole exerted anti-inflammatory effects in addition to an anti-fungal effect in human skin keratinocytes. The effects are dependent on activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR), which induced Nrf2 and NQO1 leading to inhibition of ROS, IL-8 production, and DNA damage.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類は受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) に結合すると、その代謝経路である AhR signaling を活性化する。また、植物性フラボノイドなども AhR に結合し、この代謝経路を活性化する。申請者らは、タバコの煙に含まれる主要なダイオキシン類であるベンゾピレンをヒト表皮細胞に投与したところ、AhR signaling を活性化し、CYP1A1 酵素、活性酸素 (ROS) 産生を介して炎症性サイトカインである IL-8 を誘導することを初めて明らかにし、喫煙による皮膚炎増悪メカニズムの一端を報告した

(Tsuji G, Takahara M, et al. J dermatol Sci, in press)。表皮細胞においても AhR signaling が機能的に働くことが確認されたことになる。また、Nrf2 は、抗酸化機構 (redox system) のスイッチとして重要な分子であるが、AhR と協調して働き、活性酸素などの酸化ストレスを抑制しうることが示されている。この Nrf2 を選択的に活性化させれば、様々な酸化ストレス、炎症反応から細胞を防御できる可能性がある。

アゾール系抗真菌薬、ケトコナゾール (KCZ) は、表在性真菌症だけでなく、炎症性皮膚疾患の治療に一定の効果が報告されている。こ

れは、常在真菌マラセチアが増悪させる炎症反応を抑制するという機序が考えられていた。しかし近年、KCZは直接的に炎症反応自体を抑制しうるということが明らかになった。例えば、KCZはヒト培養リンパ球において活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)産生を抑制し (Biochem Pharmacol. 2006;72(4):463)、ヒト表皮細胞において TNF α 刺激下でのケモカイン産生を抑制する。その詳細な機序は、未だに明らかではないが、KCZはヒト肝細胞に対する AhR signaling の活性化を示唆する報告 (Toxicol Sci. 2007 May;97(1):32) があったことから、我々は、KCZが AhR-Nrf2 を活性化しうるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

アゾール系抗真菌薬は、真菌感染症だけでなく様々な炎症性皮膚疾患にも有効であるが、直接的な抗炎症作用を有していることが、明らかになってきた。しかし、その機序についてはほとんど不明である。本研究の目的は、ヒト表皮細胞における aryl hydrocarbon receptor (AhR)、およびそれと協調し、redox system のスイッチでもある nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を介した、アゾールの抗炎症作用のメカニズムを詳細に解明し、臨床応用へ発展させることである。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト表皮細胞にアゾール系抗真菌薬を投与して、AhR-Nrf2 の活性化の有無を検討する。蛍光抗体を用いた免疫染色を行い、AhR、Nrf2 が細胞質から核内へ移行するかどうかを観察する。また、qRT-PCR を用いて AhR 活性化の指標となる CYP1A1 の発現を確認する。Nrf2、NQO1 の発現を qRT-PCR、ウェスタンブロットで検討する。

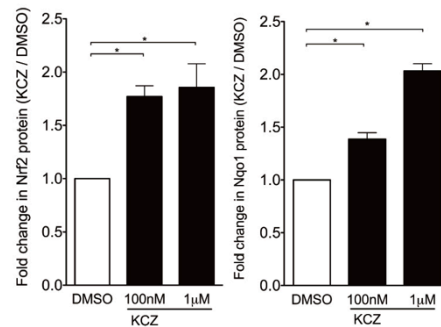
(2) TNF α やベンゾピレンで培養ヒト表皮細胞を刺激し、活性酸素や炎症性サイトカインの産生、DNA 障害を確認する。それに対するアゾールの抑制効果を検討する。

(3) AhR-Nrf2 に依存しているかどうかを、siRNA の導入によりノックダウンして検討する。

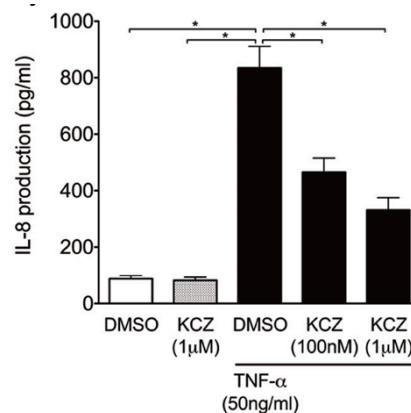
4. 研究成果

(1) 抗真菌薬 (ケトコナゾール (KCZ)、フルコナゾール、テルビナフィン) を培養ヒト

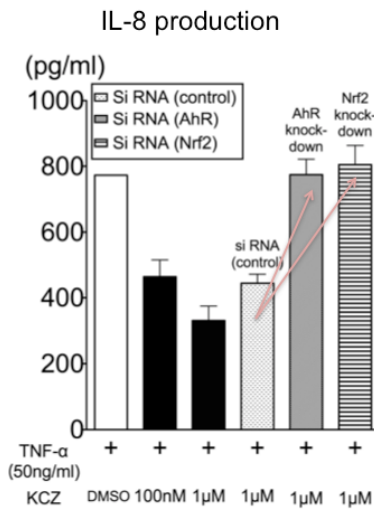
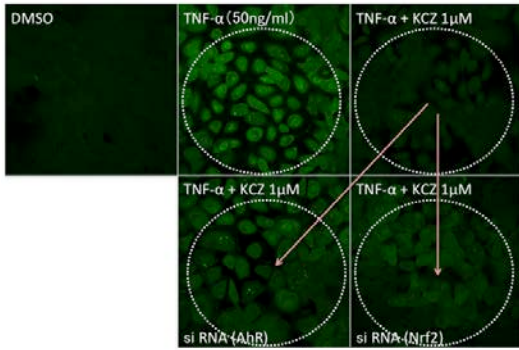
表皮細胞に投与したところ、アゾール系では、AhR、Nrf2 を活性化することが判明した。特に KCZ は、Nrf2 の核内への移動を強く誘導することが免疫染色で明らかとなった。また RT-PCR とウェスタンブロットによる解析で、Nrf2 の mRNA およびタンパクレベルで発現を惹起した。さらに、その下流となる解毒酵素の 1 つ、NQO1 の発現を mRNA およびタンパクレベルで発現を惹起した (下図)。



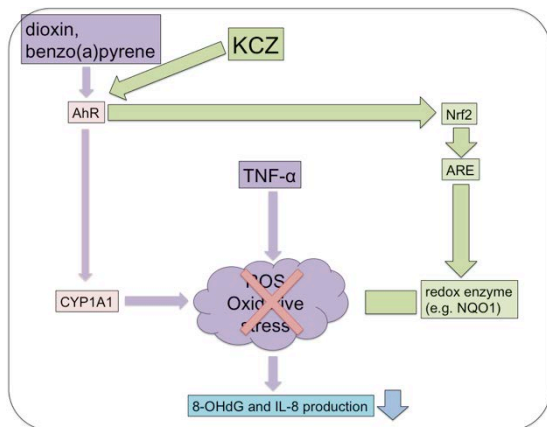
(2) 次に KCZ の抗炎症作用について検討するため、TNF α 刺激下で KCZ をヒト表皮細胞に投与した。その結果、TNF α により活性酸素と IL-8 産生が誘導されたが、KCZ はそれらを抑制する結果が得られた。



(3) さらに、AhR または Nrf2 のいずれかを siRNA を用いてノックダウンすると、KCZ の抑制効果が失われた。また、Nrf2 の活性化は、AhR のノックダウンにより消失することもわかった。さらに、AhR の古典的リガンドの 1 つであるベンゾピレンは、ヒト表皮細胞から IL-8 の産生と DNA 障害を反映する 8-hydroxydeoxyguanosine の産生を促したが、KCZ はこれらも抑制することが明らかとなった。



これらの結果から、KCZはAhRに結合することで、Nrf2を活性化し、抗酸化、抗炎症効果を発揮することが示唆された。これは、これまでは解明されていなかった新しいメカニズムである。下にシエーマを示す。また、シナロピクリンやビデンスピローサにてもKCZと同様の機序で炎症抑制効果が得られることが判明した。



(4) その他、KCZはAhRを介してSirt1を活性化し、インボルクリン発現を誘導して角化を促すことが明らかになった。

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 2件)

- (1) Gaku Tsuji, Masakazu Takahara, Hiroshi Uchi, Tetsuo Matsuda, Takahito Chiba, Satoshi Takeuchi, Fumiko Yasukawa, Yoichi Moroi, Masutaka Furue. Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *J Invest Dermatol* 2012 Jan;132(1):59-68.
- (2) 高原正和、北和代、永江航之介、八谷顕子、日高らん、磯谷智世、土井和子、竹井賢二郎、古江増隆 ビデンス・ピローサエキスによるヒト表皮細胞のNrf-2およびNqo1産生亢進 西日本皮膚科採用

[学会発表] (計 4件)

- (1) Masakazu Takahara, Gaku Tsuji, Masutaka Furue. Immunomodulation by tobacco smoking: A possible mechanism exacerbating skin diseases. 22nd World Congress of Dermatology, 2012/5/24-29, Seoul, Korea
- (2) Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Yasukawa F, Moroi Y, Furue M. Aryl hydrocarbon receptor modulates keratinocyte differentiation by SIRT1 expression. SID 71st Annual Meeting 2011/5/4-7, Phoenix, USA
- (3) Tsuji G, Takahara M, Matsuda T, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, Moroi Y, Furue M. Ketoconazole activates nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) via aryl hydrocarbon receptor signaling pathway: A possible mechanism of anti-inflammatory effect. 22nd World Congress of Dermatology. 2011/5/24-29, Seoul, Korea

- (4) Tsuji G, Takahara M, Yan X, Hachiya A, Uchi H, Takeuchi S, Yasukawa F, K. Takei K, Moroi Y, Furue M. Cynaropicrin, an extract from artichoke, inhibits UVB-induced oxidative stress in cultured human keratinocytes. Society of Investigative Dermatology 72nd Annual meeting (Raleigh, USA) 2012/5/10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 正和 (TAKAHARA MASAKAZU)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20398093

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：