

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：7 2 6 9 6

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 8 9 0 2 4 8

研究課題名（和文）尿酸結晶と ATP の皮膚免疫・皮膚疾患に与える作用の解明

研究課題名（英文）Research for the effect of uric acid crystal and adenosine triphosphate on skin immunity and skin diseases

研究代表者

川嶋 智彦 (KAWASHIMA TOMOHIKO)

公益財団法人冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：3 0 4 3 1 8 5 2

研究成果の概要（和文）：我々は尿酸結晶(Monosodium urate crystal: MSU)が表皮内樹状細胞である Langerhans 細胞(LC)に与える影響について検討した。LC が MSU を多数貪食している像が電子顕微鏡にて確認された。LC は NALP-3 mRNA と ASC 蛋白、活性型 caspase-1 を有していることを、RT-PCR と免疫ブロットにより確認した。MSU は LC からの IL-18 分泌を有意に促進した。さらに、MSU 刺激により有意に LC のリンパ節への遊走が促進された。以上より、MSU は LC の IL-18 分泌促進とリンパ節への遊走促進を介して、皮膚免疫を活性化している可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）： We studied the effect of MSU on Langerhans cells (LC). We confirmed that LC has NALP-3 mRNA and ASC protein by RT-PCR and immunoblot. LC were phagocytosing MSU crystals by electron microscopy. Immunoblot of LC cell lysate demonstrated that MSU stimulation yielded active caspase-1. MSU significantly increased the IL-18 production from LC. Our preliminary data suggested that LC cultured with MSU were promoted to migrate out of the skin to regional lymph node by MSU stimulation. Thus, MSU would stimulate skin immune response via promoting LC migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：皮膚免疫・尿酸結晶・アデノシン三リン酸・ランゲルハンス細胞・樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Danger signal としての MSU や ATP と炎症

生体の初期免疫は外来微生物を検知し、それに反応し、最終的にはそれを排除する目的で起こると考えられてきた。外来微生物に由来する初期免疫を惹起する構造は

pathogen-associated molecular patterns (PAMP)とされ、LPS, ペプチドグリカン、細菌性リポ蛋白、フラゲリン、核酸などが知られている。PAMP に反応する宿主側のセンサーとしては pattern-recognition molecules (PRMs)があり、PRMs は外来微生物の監視システムとして重要とされている。細胞表面

に存在する PRMs のひとつとしては Toll like receptor (TLR)があり、これまで特に詳細に検討されてきた (Cell 124:783-801,2006)。一方、近年、細胞内に存在する PRMs として nucleotide-binding domain-, leucine-rich repeat (LRR)-containing receptor (NLR) family の存在が明らかになってきた。哺乳類の NLR はこれまで 20 種類以上みつまっている。こうした NLR のうち、NACHT (Nalp-, CIITA, HET-E, telomerase-associated protein 1)-LRR(leucine-rich repeat)-PYD (pyrin domain) の構造からなる NALP family はヒトでは 14 種類あることがわかっている。この中で、NALP3 は ASC, CARDINAL とともに蛋白複合体を形成し、caspase-1 を活性化し、IL-1 $\beta$  や IL-18 を介して全身的な炎症を惹起することがわかっている。さらに、この NALP3 は、細胞が死んだり障害されたりした場合に細胞内から放出される ATP や MSU などに反応して炎症を起こすことがわかってきた (図参照)。このような宿主側の細胞破壊に由来し炎症を惹起する物質は PAMP に対し、danger-associated molecular patterns (DAMP) と呼ばれ、DAMP によって誘導される宿主側の反応は danger signal と呼ばれるようになった。ATP や尿酸結晶などの DAMP が宿主側の細胞によって認識されると NALP3 は ASC, CARDINAL との蛋白複合体であるところの NALP3 inflammasome を形成する。NALP3 inflammasome は pro-caspase-1 の maturation を促進し、活性型の caspase-1 とし、caspase-1 は pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 を processing し、成熟型の IL-1 $\beta$ 、IL-18 を生成し、これらのサイトカインは樹状細胞の成熟や活性化をきたし、血管内皮細胞や線維芽細胞からの IL-6 や IL-8 の産生を誘導し、さらにはその IL-8 により好中球が遊走するなどして、炎症が惹起されることがわかってきた (Immunity 27:549-59,2007; Nat Immunol 7: 1250-7,2006; J Clin Invest 116:2262-71,2006)。ATP もそのような DAMP のうちのひとつである (Nature 440:228-32,2006)。LPS などの TLR を介したシグナルがあらかじめ細胞に入ると、pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18 の産生が誘導される。そこに ATP からの、その receptor である P2X7 を介したシグナルが入ると、細胞内から細胞外へカリウムが流出し、細胞内カリウム濃度が低下することにより、NALP3 inflammasome が形成され、caspase-1 の活性化、成熟型 IL-1 $\beta$ 、IL-18 の生成、炎症の惹起へとつながっていくと考えられている。MSU も ATP と同様に DAMP のうちのひとつであるが、その細胞における細胞膜上の刺激受容体はいまだ発見されていないが、細胞膜コレステロール膜における食作用が

NALP3 inflammasome の形成・caspase-1 の活性化にいたるメカニズムに関与することが報告されている。

#### (2) MSU や ATP の皮膚免疫・皮膚疾患への関与の可能性

生体内で MSU が炎症を惹起する疾患として最もよく知られているのは、関節周囲に析出した場合に生じる痛風である。2003 年に Shi らが死細胞由来の細胞質成分のうち、樹状細胞のアジュバント効果が最も高い成分が尿酸結晶であることを報告している (Shi Y et al. Nature 2003)。また、MSU を皮下注射することにより、接触過敏反応が増強されることも報告されている。皮膚疾患の中では、乾癬患者の半数において、高尿酸血症が認められ、乾癬の加療により、その多くで、血中尿酸値の低下が認められることは広く知られている。これは乾癬表皮の turn over の亢進により、ヌクレオチドの代謝産物である尿酸の産生亢進が表皮で起こり、末梢血中に影響を及ぼした結果と推測されている。この尿酸は、生体内で飽和濃度を超えると、容易に結晶化することが知られている。事実、Goldman らは偏光顕微鏡などを用いて、乾癬の表皮内に MSU が存在することをすでに報告している (Goldman M:Am J Dermatopathol 1981)。一方で、ATP と皮膚疾患についての研究はこれまでのところ、まだない。細胞が死んだり壊れたりした場合に細胞内から ATP が確実に放出されていることを考えると、広範囲熱傷や広範囲の皮膚切除術後など物理的障害や炎症が皮膚に広範囲に生ずると大量の ATP などの danger signal が血流にはいり、発熱等の症状を呈するのではないかと予想される。実際、こうした患者では細菌感染がなくても発熱することは臨床的に経験することであるが、これらの原因についても詳細は未だ不明であり、ATP などの関与が疑われる。同時に、蜂窩織炎や壊死性筋膜炎などの皮膚の細菌感染に伴う病態においても、感染のみならず、それに伴う組織破壊が発熱などの患者の全身状態に寄与している可能性がある。我々のプレリミナリーなデータではあるが、乾癬などの皮膚疾患に対し、光線療法中の患者数例全てにおいて、narrow band UVB 照射により血中 ATP 濃度の上昇が確認できている。

#### (3) MSU や ATP がランゲルハンス細胞に作用する可能性について

まず、MSU や ATP がランゲルハンス細胞に作用するためには NALP3 inflammasome を形成するためのサブユニットを有する必要がある。これについては、我々はすでに、reverse transcriptive PCR を用いて mRNA レベルで NALP3・immunoblot を用いて蛋白レベルで caspase1 と ASC を有することを確認している。また、LC の MSU 取り込み

像を *in vivo/in vitro* の両方で確認している。また、ATP の細胞膜レセプター P2X7 は LC における存在はすでに報告されている。よって、LC は MSU や ATP に対する刺激応答性をもっていると考えられる。なお、プレリミナリーな data ではあるが、MSU の LC における作用が P2 受容体拮抗薬により阻害されることも確認しており、作用経路に ATP と同様に P2 受容体の関与があるのではないかと予想できている。

## 2. 研究の目的

尿酸結晶(MSU)やアデノシン三リン酸(ATP)は細胞破壊に由来し、炎症を惹起する物質(danger signal)として知られる。細胞にシグナルが入ると、NALP3 inflammasome が形成され、成熟型 IL-1 $\beta$ 、IL-18 が生成され、炎症が惹起される。皮膚疾患と MSU や ATP に関する研究はまだない。しかし、皮膚は常に紫外線照射などの外的刺激を受けており、表皮細胞から ATP や MSU が生じていると容易に想像される。本研究では、皮膚免疫の中心的役割を担う皮膚樹状細胞(langerhans cell (LC))におけるこれらの作用を解析し、皮膚免疫・疾患における役割を解明する。具体的には、細胞に普遍的に存在する核酸(の代謝産物)であり、死細胞・アポトーシス細胞・障害細胞から放出される MSU と ATP のランゲルハンス細胞への作用とその作用メカニズムを明らかにすることである。そのため、MSU と ATP を LC と共培養し、細胞培養上清中に産生されたサイトカイン、ケモカインを測定する。また、共培養された LC の所属リンパ節への遊走への影響の検討・抗原提示能への影響、さらには遊走後のリンパ節における Th1・Th2・Th17・Treg 分化誘導の検討を行う。

## 3. 研究の方法

BALB/c マウスの皮膚から我々の研究室で行われている I-A 抗原を用いた panning 法によって LC を単離し、suspension を作成する。種々の濃度の MSU・ATP を加えて共培養を行い、NALP3 inflammasome の系を介して産生される cytokine (IL-18, IL-1  $\square$ , IL-33) や Th1/Th2/Th17/Treg の分化誘導に関与する cytokine・chemokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-23, IL-27, IL-10, TGF- $\beta$ ) の産生に対する影響を検討する。また、MHC-class II や共刺激分子

(CD40, CD80, CD86, CD54) の発現に対する影響を検討する。さらに、刺激された LC を回収し、CFSE にて染色を行った後に、マウスの food pad に皮下注射し、所属リンパ節へ遊走する LC 数を FACS にて測定する。その上で、MSU・ATP 存在下にて培養した LC が分化誘導する memory T 細胞の形質 (Th1, Th2, Th17, Treg など) について DO. 11. 10 (OVA 特異的 T cell receptor を発現する T 細胞を有す

る BALB/c マウス) を用いて検討する。

## 4. 研究成果

LC と MSU を共培養したところ、LC が MSU を多数貪食している像が電子顕微鏡にて確認された。LC は NALP-3 mRNA と ASC 蛋白、活性型 caspase-1 を有していることを、RT-PCR と免疫プロットにより確認した。MSU 刺激により、LC 細胞表面の MHC-class II・CD80・CD86・CD40 分子の発現は影響を受けず、また、IL-1  $\beta$  産生促進も認められなかったが、MSU は LC からの IL-18 分泌を有意に促進した。分泌促進された IL-18 の bioactivity は bioassay により確認した。IL-18 は LC のリンパ節への遊走を促進することが知られているため、次に MSU 刺激が LC のリンパ節への遊走が促進するかを検討した。まず、LC が IL-18 受容体  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖蛋白を有することをフローサイトメトリーと免疫プロット法により確認した。ランゲルハンス細胞 (LC) を単離し cell suspension を作成、尿酸結晶や ATP  $\gamma$ S で刺激された LC を回収し、CFSE にて染色後に、マウスの food pad に皮下注射し、所属リンパ節へ遊走する LC 数を FACS にて測定評価した。その結果、尿酸結晶と ATP  $\gamma$  いずれの刺激群においても無刺激群と比較して、優位に CFSE 陽性 LC 細胞数は多かった。よって、尿酸結晶や ATP  $\gamma$ S 刺激により、LC の所属リンパ節への遊走が促進されていることが示された。このメカニズムとして、樹状細胞一般においては、maturation に伴いその細胞表面に発現される CCR7 や CXCR4 といった細胞表面分子がリンパ管に発現している CCL21 や CXCL12 と interaction することが重要であることが報告されているため、LC においても同様であるかを、尿酸結晶と ATP  $\gamma$  それぞれで LC を刺激後にフローサイトメトリーにて評価を行ったところ、それらの分子の発現上昇が認められた。一方で、*in vivo* における影響を評価するために、表皮に感作物質とともに尿酸結晶あるいは ATP  $\gamma$ S を塗布し、それによる CHS 反応の変化を観察し評価したところ、反応の増幅が認められたために、皮膚免疫応答は増幅されることは明らかであることを確認した。その詳しいメカニズムなどについては現在モデルを考察し検討中である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川嶋 智彦 (KAWASHIMA TOMOHIKO)  
公益財団法人沖中記念成人病研究所・その他  
他部局等・研究員  
研究者番号：3 0 4 3 1 8 5 2

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：