

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659293

研究課題名(和文) 緑膿菌由来セラミダーゼによる三次元培養正常ヒトケラチノサイトの免疫応答の解明

研究課題名(英文) Effect of *Pseudomonas aeruginosa*-derived neutral ceramidase on immunological responses of three-dimensionally cultured human primary keratinocytes

研究代表者

岩淵 和久 (Iwabuchi, Kazuhisa)

順天堂大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：10184897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎は、緑膿菌由来セラミダーゼ(PaCDase)によって分解・減少し、増悪することが示唆されているが、その分子機構は明らかになっていない。そこで、本研究ではヒト表皮スキンシートを用いて、PaCDaseによるケラチノサイトの免疫応答について検討した。

3次元培養正常ヒトケラチノサイトはPaCDaseによってTNF- α やIL-8など様々な遺伝子の発現レベルを上昇させた。セラミド代謝産物の中では、sphingosine-1-phosphate (S1P)がケラチノサイトからTNF- α の産生を引き起こし、TNF- α によってIL-8など様々なサイトカイン産生が誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A *Pseudomonas aeruginosa*-derived neutral ceramidase (PaCDase) isolated from a patient with atopic dermatitis was shown to effectively degrade ceramide. The ceramide metabolite sphingosine-1-phosphate (S1P) stimulated the production of inflammatory mediators such as TNF and IL-8 from three-dimensionally cultured human primary keratinocytes (3D keratinocytes). PaCDase induced the production of TNF and IL-8, and this production was dependent on ceramidase enzymatic activity. S1P enhanced the gene expression of TNF and IL-8, and this enhancement was inhibited by a sphingosine kinase inhibitor and an S1P receptor antagonist. The TNF-binding antibody infliximab suppressed the PaCDase-induced upregulation of IL-8 mRNA but not of TNF mRNA. These findings suggest that, 3D keratinocytes produce S1P from sphingosine, which is produced through the hydrolysis of ceramide by PaCDase, and then S1P induced TNF production from these cells, resulted in production of IL-8.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：アトピー性皮膚炎 緑膿菌 セラミダーゼ ケラチノサイト スフィンゴシン1リン酸 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

セラミドは皮膚における主要な細胞間脂質成分であり、皮膚の保湿能やバリア機能に重要な役割を果たしている。アトピー性皮膚炎(AD)患者の皮膚角層ではセラミド含量が減少しており(J Invest Dermatol. 96: 523-6, 1991.)、このことが乾燥皮膚ならびに角層のバリア機能異常の原因の一つとして考えられ、AD の特徴とされている。これまでに、AD 患者の皮膚においてセラミダーゼ活性が高頻度に検出され、AD 患者からセラミダーゼ産生菌の緑膿菌が分離されている(Biochem J 362: 619-26, 2002)。アトピーモデルマウスは AD の発症と共に皮膚でのセラミダーゼ活性が上昇し、セラミド含量が著明に低下する(British J Dermatol 144:12-8, 2001)。この様にバクテリアが産生するセラミダーゼが AD 患者における皮膚セラミドを分解し、バリア機能が低下させ、AD の増悪に関与することが指摘されている。しかしながら、セラミド代謝産物が痒みに関わる免疫応答にどのように関わっているかは不明である。

セラミドはセラミダーゼによって脂肪酸とスフィンゴシンに分解される。脂肪酸はケラチノサイトや病原微生物の栄養分として取り込まれるが、スフィンゴシンはさらに代謝されてスフィンゴシ 1 リン酸(S1P)を産生する。S1P はケラチノサイトの遊走因子となり(J Biol Chem 279:38471-9, 2004)、ラミニン 5 の合成を高める(British J Dermatol 151:961-70, 2004)。近年、S1P が TNF- α 産生などの炎症性サイトカイン産生に重要な役割を果たすことが報告されている(Biochimie, 92:707-15, 2010)。TNF- α はバリア機能に関与する様々な分子の生合成を抑制することで AD を増悪させ、痒みを生じることが指摘されている(Immunol Rev. 242:233-46, 2011)。また、ラミニン 5 には AD における痒み発生の重要な要因である神経突起伸長活性がある(J Biol Chem. 280: 14370-7, 2005)。しかしながら、セラミド分解産物によるケラチノサイトの免疫応答への影響は分かっていない。特に、ケラチノサイトが顆粒細胞へと分化し角質層を形成する分化過程のケラチノサイトを起点とする痒み発生における S1P 等のセラミド分解産物の役割は不明である。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎(AD)患者では、角層のセラミド含量の減少がバリア機能異常の原因の一つと考えられている。AD 患者皮膚にセラミダ

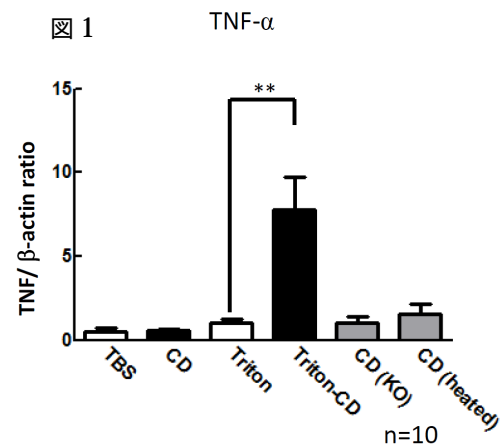
ーゼ産生菌が高頻度に検出され、セラミダーゼ活性が高いとの報告がある。セラミダーゼで生じるセラミド代謝産物は様々な生物活性を示すが、これら代謝産物が分化過程にあるケラチノサイトの痒みに関わる免疫応答にどのように影響するかは不明である。三次元培養ケラチノサイトは正常に分化し、バリア機能をもった角質層を形成する。そこでこの点に着目し、三次元培養ケラチノサイトのバリア機能を傷害する実験系を作成し、AD 患者由来緑膿菌由来セラミダーゼによる三次元初代培養ヒト正常ケラチノサイトの痒みに関わる免疫応答に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

ヒト三次元培養表皮細胞を、緑膿菌由来のセラミダーゼまたはセラミド代謝産物を 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液を含んだニトロセルロース膜を角質層の上ののせて一定時間培養した。培養後、ケラチノサイトから RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析と定量的リアルタイム PCR 解析を行う。変動が認められた分子がどの分化段階で発現が変化しているかを、*in situ* hybridization 法と免疫組織染色を行った。

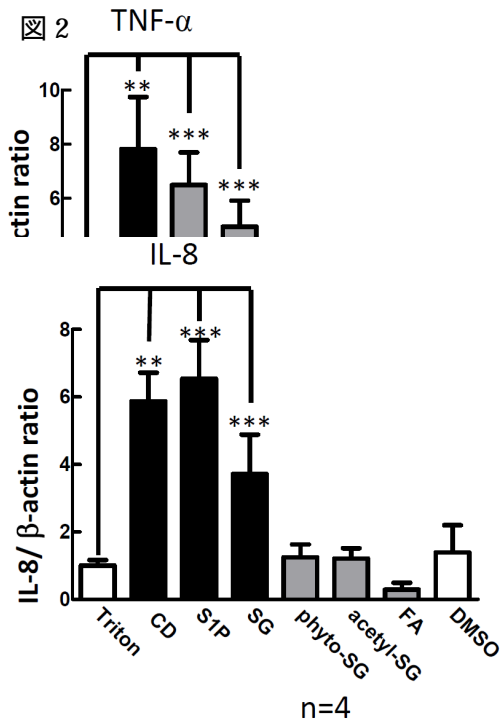
4. 研究成果

ヒト三次元培養ケラチノサイトは正常に分化し、バリア機能をもった角質層を形成する。この点に着目し、バリア機能をもった三次元培養ケラチノサイト(3D ケラチノサイト)を用いて、角層の透過性を亢進する Triton X100 存在・非存在下で、AD 患者由来緑膿菌由来セラミダーゼを作用させた。角層を破壊する溶液としては、各種界面活性剤がある。そこで、ニトロセ



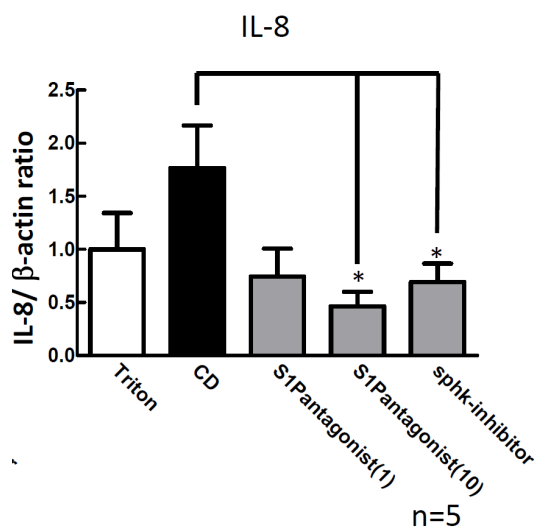
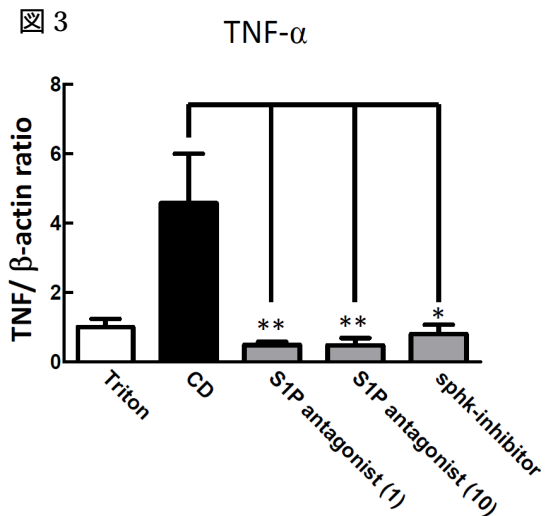
ルロースフィルターに反応液を湿らせて角質の上に乗せて、24 時間後に反応を見ると、ケラチノサイトは緑膿菌由来セラミダーゼ特異的に

TMF- 遺伝子発現を上昇させた(図 1)。この反応は、Triton 非存在下では起こらなかったことから、角層が Triton で障害を受けることで、セラミダーゼが作用してケラチノサイトは反応したと考えられた。また、セラミド分解活性のないセラミダーゼ変異株(KO)や熱処理することで酵素活性を失わせたセラミダーゼ(heated)では TMF- 発現の誘導は起こらなかったことから、3Dケラチノサイトからの TMF- 産生は、セラミド分解産物によると考えられた。セラミドはセラミダーゼによって、脂肪酸とスフィンゴシンに分解される。そこで、セラミド分解物について検討を行ったところ、スフィンゴシン(SG)とS1Pは3DケラチノサイトのTMF- と IL-8 の遺伝子発現上昇を示した(図 2)。

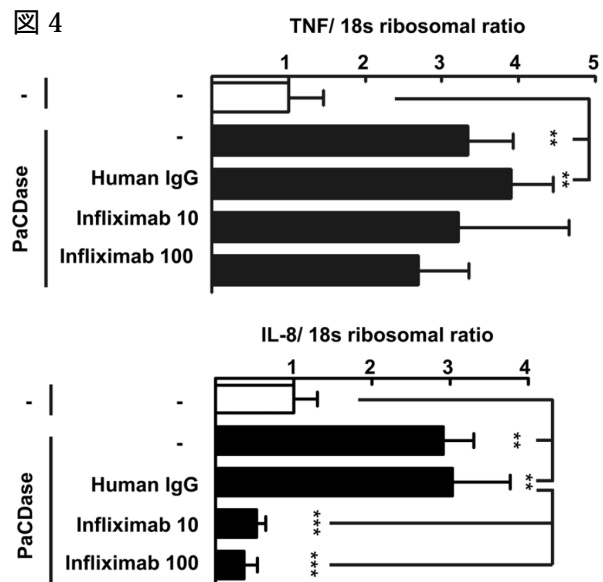


したがって、セラミダーゼによって角層セラミドが分解されると、スフィンゴシンがケラチノサイトで S1P となり、ケラチノサイトに炎症応答を誘導すると考えられた。

セラミダーゼによって 3D ケラチノサイトのどの様な遺伝子発現が変化するかについて DNA マイクロアレイ解析をしたところ、TMF- や IL-8 だけではなく、痒みを誘発することが報告されている Endothelin-1 などの炎症性のサイトカインやケモカイン遺伝子の発現が上昇することが分かった。また、S1P 合成酵素阻害剤や S1P 受容体アンタゴニストはセラミダーゼによる TMF- や IL-8 産生を有意に阻害した(図 3)ことから、セラミダーゼによる TMF- や IL-8 の産生は S1P が 3D ケラチノサイトの S1P 受容体を介して行われることが分かった。興味深いことには、TMF- が受容体に結合することを抑制すること生物活性を抑制する remicade は、セラミダーゼによる TMF-



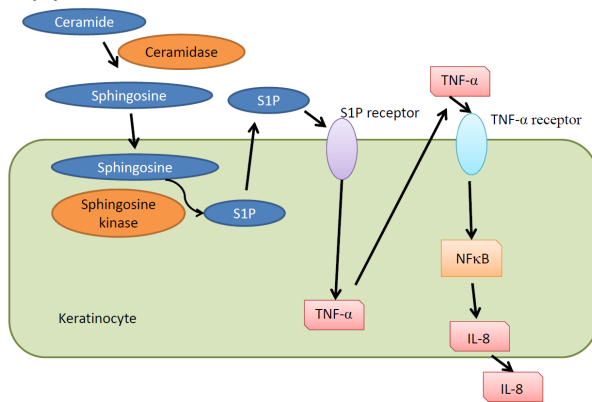
発現は抑制せずに IL-8 発現を抑制した(図 4)。さらに、TMF- 刺激によって起こる遺



伝子発現を仲介する NF- κ B 活性を阻害する curcumin は TNF- α 発現は抑制しないが、IL-8 発現を有意に抑制した。実際、セラミダーゼや S1P 刺激によって 3D ケラチノサイトの NF- κ B はリン酸化され、それにとは逆に IL-8 量は減少した。TNF- α 刺激により NF- κ B のリン酸化と IL-8 の減少が知られていることから、セラミダーゼや S1P 刺激による 3D ケラチノサイトからの IL-8 産生はケラチノサイトで産生された TNF- α が自らの TNF- α 受容体を介して行われたと考えられた。

以上の結果から、AD の角層において、緑膿菌が産生するセラミダーゼがセラミドを分解すると、スフィンゴシンがケラチノサイトにおいて S1P に変換される、S1P は S1P 受容体を介してケラチノサイトを刺激する(図 5)。そして、

図 5



S1P 刺激によってケラチノサイトは TNF- α を産生し、TNF- α が細胞外へと放出された後、TNF- α 受容体を介してケラチノサイトは IL-8 等の炎症性サイトカインやケモカインを産生すると考えられた。

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 7 件)

1. Kina K, Masuda H, Nakayama H, Iwahara C, Nagatsuka Y, Hirabayashi Y, Ogawa H, Takamori K, and Iwabuchi K: The novel neutrophil differentiation marker phosphatidylglucoside is involved in Fas-dependent apoptosis. *Inflammation and Regeneration* 32: 213-221, 2012
2. Watanabe K, Iwahara C, Nakayama H, Iwabuchi K, Matsukawa T, Yokoyama K,

Yamaguchi K, Kamiyama Y and Inada E. Sevoflurane Suppresses TNF- α -Induced Inflammatory Responses in Small Airway Epithelial Cells under Anoxia/Reoxygenation Conditions. *Bri. J Anaesth.* 110(4): 637-45, 2013.

3. Nakayama H, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. GSL-enriched membrane microdomains in innate immune responses. *Arch. Immun. et Therap. Exp.* 61(3):217-28, 2013
 4. Oizumi A, Nakayama H, Okino N, Iwahara C, Kina K, Matsumoto R, Ogawa H, Takamori K, Ito M, Suga Y, Iwabuchi K. Pseudomonas-derived ceramidase induces production of inflammatory mediators from human keratinocytes via sphingosine-1-phosphate. *PLoS One* 10.1371/journal.pone.0089402, 2014
 5. Nakayama H, Iwabuchi K: Glycosphingolipid-Receptor Interactions in the Innate Immune Responses. *Glycoscience: Biology and Medicine in press.*
 6. Iwabuchi K. Involvement of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in inflammatory responses. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *in press*
 7. Ekyalongo R, Nakayama H, Kina K, Kaga N, Iwabuchi K. Organization and functions of glycolipid-enriched microdomains in phagocytes. *BBA (Molecular and Cell Biology of Lipids)* 2014, *in press*
- [学会発表](計 0 件)
1. 大泉亜美、岩原知博、喜納勝成、須賀康、沖野望、伊東信、小川秀興、高森建二、岩淵和久.: 緑膿菌由来セラミダーゼによる三次元培養表皮シート・ケラチノサイトのサイトカイン産生機構について。

第54回日本脂質生化学会大会、福岡、6
月、2012

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/nurs/research/profile_12.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩淵和久 (IWABUCHI, Kazuhisa)

順天堂大学 大学院医療看護学研究科・教授

研究者番号：10184897

(2) 研究分担者

須賀 康 (SUGA, Yasushi)

順天堂大学 大学院医学研究科・教授

研究者番号：90245738