

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659532

研究課題名(和文)絶対定量質量分析法を用いた汗のプロテオーム解析によるアトピー性皮膚炎の病態解明

研究課題名(英文)Analyses of eccrine sweat reveal pathogenesis of atopic dermatitis

研究代表者

佐山 浩二 (Sayama, Koi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80187286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：健常人から汗を回収した。脱塩、凍結乾燥で濃縮後、フィルターを通して滅菌した。汗サンプルを培養ヒト角化細胞に添加したところ、JNK, p38, ERK, NF- κ Bの経路が活性化され、IL-8, TNF- α を産生した。刺激物質の成分を検討したところIL-1 α , β であった。これらの反応は抗IL-1 receptor抗体でブロックされた。さらに痒みに関連するサイトカインであるIL-31も同様に汗中に産生されていた。

研究成果の概要(英文)：Eccrine sweat was collected from the arms of healthy volunteers after exercise, and levels of proinflammatory cytokines in the sweat were quantified by ELISA. We detected the presence of IL-1 α , IL-1 β , and high levels of IL-31 in sweat samples. To investigate whether sweat activates keratinocytes, normal human keratinocytes were stimulated with concentrated sweat. Western blot analysis demonstrated the activation of NF- κ B, ERK, and JNK signaling in sweat-stimulated keratinocytes. Real-time PCR using total RNA and ELISA analysis of supernatants showed the upregulation of IL-8 and IL-1 β by sweat. Furthermore, pretreatment with IL-1R antagonist blocked sweat-stimulated cytokine production and signal activation, indicating that bioactive IL-1 is a major factor in the activation of keratinocytes by sweat.

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：アトピー性皮膚炎 汗 角化細胞 バリア異常 IL-1 IL-31

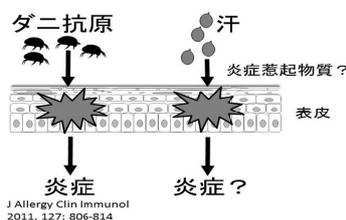
1. 研究開始当初の背景

エクリン汗によりアトピー性皮膚炎が増悪し、またオムツかぶれ等の湿疹、汗疹が起こるが、物理的な刺激以外にはそのメカニズムは解明されていない。一方、アトピー性皮膚炎では発汗が低下しており、汗が角層水分量の重要な構成因子であることを考えると、発汗の低下もアトピー性皮膚炎を増悪させると考えられる。

一方、汗の成分に関しては解析がすすんでいない。アトピー性皮膚炎においては汗の成分に対する IgE を介した型アレルギーが存在することが明らかとなっているが、その抗原の特定には至っていない。また、エクリン汗には抗菌ペプチド (cathelicidin/LL-37, dermacidin) が含まれていることが知られており (J Immunol. 2004;172:3070-7)、アトピー性皮膚炎の病態に関わっている。また、掌蹠膿疱症の水疱内容には抗菌ペプチドなどのエクリン汗成分が含まれおり、膿疱形成にも重要な役割を果たす (J Invest Dermatol. 2010;130:2010-6)。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、表皮角化細胞が病原体を認識し、サイトカインおよび抗菌ペプチド hBD1-3, LL-37 を産生することを明らかにしており (Eur J Immunol. 2005;35:1886-95)、独自の表皮自然免疫の領域を展開してきた。さらに、アトピー性皮膚炎の重要な増悪因子であるダニ抗原が IgE 非依存性に表皮角化細胞を直接活性化することを見いだした (J Allergy Clin Immunol 2011, 127: 806-814)。そこで、我々は汗には表皮角化細胞を直接刺激する物質が含まれており、アトピー性皮膚炎の増悪に関与しているのではないかと考えた。



1) 汗中のタンパクを解析する手法自体が確立されていないので、まず、健常人の汗を用いて解析法を確立する。

2) アトピー性皮膚炎患者汗中には正常人と比較して炎症起因物質が多い可能性があり、正常人と比較定量する。また、新たな炎症起因物質の同定も試みる。

3. 研究の方法

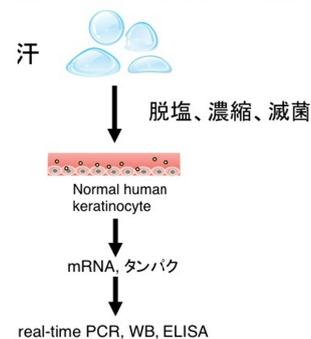
入浴後、あるいは運動時の汗を健常人ボランティア、アトピー性皮膚炎患者 (増悪、寛解期) から回収した。キムワイプを体幹あるいは、上肢にまきその上をサランラップで覆う。一定時間ののち、キムワイプをコニカルチューブ中で遠心し、汗を回収した。ただちにタンパク分解酵素阻害剤を添加し、-80 保存した。細胞刺激用には、回収後 Sephadex-G10 カラムで脱塩後、凍結乾燥し濃縮する。再融解後、タンパク濃度を測定し 0.45 μm のフィルター濾過後、分注し、-80 保存した。

回収した汗を培養ヒト角化細胞に添加してサイトカイン産生を ELISA, mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。

4. 研究成果

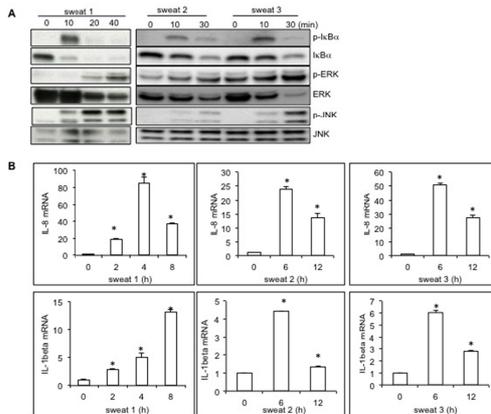
11人の健常人から運動後の汗を効率よく回収して脱塩、濃縮、滅菌することができた。さらに、培養角化細胞に添加して刺激する実験系を確立することができた。

汗で培養ヒト角化細胞を刺激



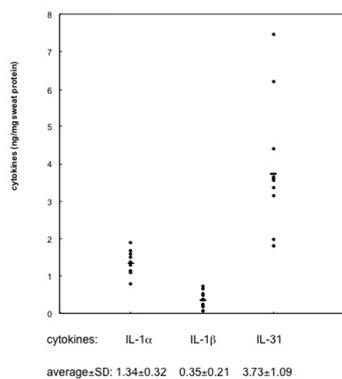
汗で角化細胞を刺激して細胞抽出液を用いて NF-κB 経路、ERK 経路、JNK 経路の活性化を Western blotting で検討した。その結果、汗は角化細胞の NF-κB 経路、ERK 経路、JNK 経路のタンパクを 10 分以内にリン酸化しており、汗は角化細胞を刺激することが明らかになった (図 A)。

さらに IL-8, IL-1beta の産生を RT-PCR、ELISA で検討した。その結果、IL-8 産生、IL-1beta 産生も 6 時間から促進していることが明らかになった (図 B)。



ついで汗中の刺激物質を検討するために回収した汗中のサイトカインを ELISA にて検討した。

その結果汗中には IL-1alpha, IL-1beta, IL-31 が多量に含まれていることが明らかになった (図)。これらのサイトカイン濃度はばらつきがあり、汗中のタンパク濃度に依存していることから、タンパク濃度で補正した。その結果、IL-1alpha, IL-1beta, IL-31 はそれぞれ 1.34 and 0.35 ng/mg sweat protein, 3.73 ng/mg sweat protein であった。



次に角化細胞を刺激する物質が IL-1alpha, IL-1beta であることを確認するために抗 IL-1 受容体抗体を角化細胞の培養液に添加して汗の刺激作用を阻害できるかどうか検討した。

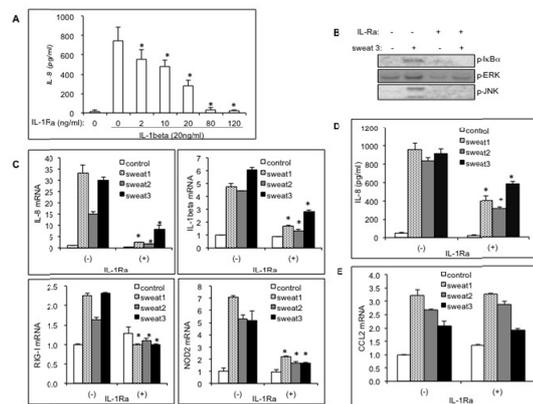
まず阻害抗体の効果を検討した。その結果阻害抗体を 80ng/ml 添加すると IL-1beta による IL-8 の産生をほぼ完全に抑制することができた (図 A)。そこで次に細胞内シグナル

の活性化を検討した。阻害抗体の添加により NF-kB 経路、ERK 経路、JNK 経路の活性化は抑制された (図 B)。

さらに汗による IL-8 発現、IL-1beta 発現、RIG-I 発現、NOD2 発現を RT-PCR で検討した。IL-1 受容体阻害抗体の添加により発現は抑制された (図 C)。

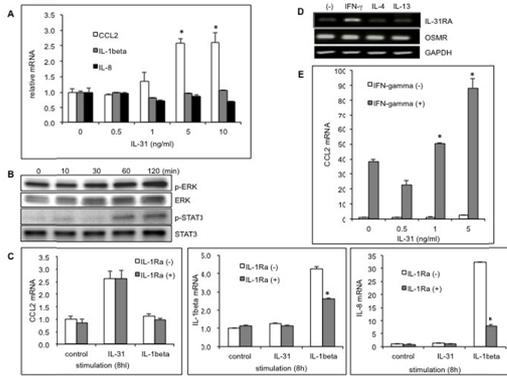
汗により IL-8 の産生は ELISA で検討した。汗による IL-8 の産生は IL-1 受容体阻害抗体の添加により抑制された (図 D)。

ケモカインである CCL2 の発現は阻害抗体の添加では抑制されなかった (図 E)。

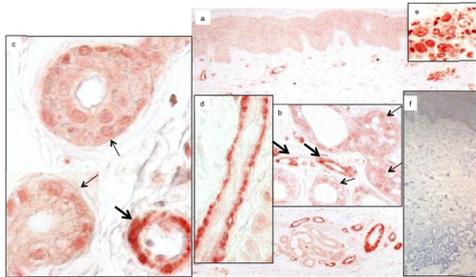


次に汗中に IL-31 が含まれていることから IL-31 で角化細胞を刺激した。IL-31 刺激で CCL2 の発現が増強した (図 A)。さらに、IL-31 刺激で ERK の経路、STAT3 の経路が活性化された (図 B)。CCL2 の発現、IL-1beta の発現、IL-8 の発現は RT-PCR で検討した。IL-31 によるこれらの反応は IL-1 受容体阻害抗体の添加では抑制されなかった (図 C)。また、角化細胞を IFN-gamma, IL-4, IL-13 で刺激後 IL-31RA, OSMR の発現を RT-PCR で検討した (図 D)。角化細胞を IFN-gamma で刺激後 IL-31 で刺激し CCL-2 の発現を RT-PCR で検討した。その結果 IFN-gamma と IL-31 は CCL-2 発現に関して相乗的な作用があることが明らかとなった (図 E)。

これらのことから角化細胞は汗中に含まれる IL-31 によって刺激され CCL-2 の産生を誘導し、さらにこの反応は IFN-gamma で作用が増強することが明らかになった。これらの反応は IL-1 による刺激とは別の経路によるものと考えられる。



汗中に IL-31 が存在していることから皮膚における IL-31 の発現を免疫組織学的に検討した(図)。その結果 IL-31 は表皮角化細胞で発現していることが明らかになった。さらに、エクリン腺でも発現がみられ、特に導管部分に発現が強く見られた。IL-31 の由来はエクリン腺由来および一部は表皮角化細胞由来であると考えられる。

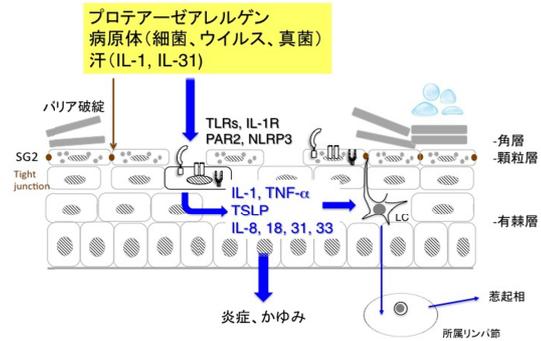


考察

アトピー性皮膚炎では汗をかかないとの報告もあるが、一方汗はダニ抗原と同様にアトピー性皮膚炎の増悪因子として知られている。しかし、健康な皮膚は発汗により皮膚炎を起こさない。アトピー性皮膚炎ではフィラグリン異常などによりバリア破綻していると考えられる。バリア破綻した状態では汗は容易に角化細胞に到達し、直接活性化していると考えられる。汗による角化細胞の刺激で角化細胞は IL-1, IL-8, CCL2 を産生する。汗中の起炎物質が角化細胞を活性化して、炎症を惹起していると考えられる。汗中の角化細胞を活性化する物質として IL-1alpha, IL-1beta, IL-31 を同定した。IL-31 は痒みに関連する主要なサイトカインであり、汗による痒みは汗中の IL-31 を介したものである可能性が高い。

アトピー性皮膚炎などのバリア破綻した状態ではダニ抗原、花粉を初めとするプロテアーゼアレルゲン、病原体(細菌、ウイルス、真菌)汗(IL-1alpha, IL-1beta, IL-31)が直接表皮角化細胞のTLR, IL-1R, PAR2, NLRP3を活性化して各種サイトカインを産生させて炎症に関わっていると考えられる(図)。

表皮角化細胞からみたアレルギー



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 1件)

1. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K

Eccrine sweat contains IL-1 α , IL-1 β and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal.

PLoS One. 2013;8(7):e67666. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

1. Okazaki H, Dai H, Murakami M, Hanakawa Y, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K
Eccrine sweat stimulates the release of IL-8 via IL-1 from epidermal keratinocytes as danger signal.

International Investigative Dermatology, Edinburgh, UK, May 8-11 2013.

〔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〕

ホームページ等...なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐山 浩二 (Sayama, Koji)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80187286