

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860899

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎の慢性炎症におけるS100A8/A9と新規レセプターの役割解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of S100A8/A9 and its novel receptors in chronic inflammation in atopic dermatitis

研究代表者

山本 真実 (YAMAMOTO, Mami)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60421062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎における皮膚バリア破綻後の炎症の慢性化にS100A8/A9が重要と考えた。S100A8は新規レセプターとしてneuroplastin- を介して細胞増殖の作用を、S100A9はEMMPRINを介して炎症作用を示したが、S100A8/A9ヘテロダイマーに対しこれらレセプターもヘテロダイマーとして機能し、細胞増殖と炎症の慢性化に寄与することでアトピー性皮膚炎の病態に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported a positive feedback loop between S100A8/A9 and proinflammatory cytokines mediated by extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), an S100A9 receptor. Therefore, we assumed that S100A8/A9 plays an important role in the chronic inflammation that arises from barrier disruption in atopic dermatitis. In this study, we identified neuroplastin- (NPTN) as a novel S100A8 receptor. The S100A8-NPTN signal activated keratinocyte proliferation, while the S100A9-EMMPRIN signaling pathway induced skin inflammation. NPTN and EMMPRIN formed homodimers and a heterodimer. S100A8 and S100A9 were strongly expressed and co-localized with these receptors in the lesional skin of atopic dermatitis. These results indicate that NPTN and EMMPRIN form a functional heterodimeric receptor for S100A8/A9 and play a critical role in atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 S100A8/A9

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎にフィラグリン遺伝子変異の関与が報告されて以降、皮膚バリア異常がアトピー性皮膚炎の原因として注目されるようになった。研究代表者らは、皮膚バリアの脆弱化とそれを引きがねとする炎症の惹起と慢性化に着目し、そのメカニズム解明がアトピー性皮膚炎の病態解明に重要であると考えた。

これまでに、皮膚の慢性炎症に関わる因子について検討してきた結果、共同研究者らにより、S100A8/A9 がケラチノサイトに対し、IL-8 や TNF α をはじめとした一連の特異的な炎症性サイトカインおよびケモカインの発現を誘導し、かつ、これらの誘導された因子がさらにケラチノサイトに作用すると S100A8/A9 の発現を誘導するというポジティブフィードバックの現象を見出した。このことから、S100A8/A9 が炎症の慢性化に関与しているのではないかと考えた。そこで、S100A8/A9 の炎症性サイトカイン誘導に関わるレセプターについて検討した結果、S100A9 の新規レセプターとして EMMPRIN を同定することができた。また、S100A8 の新規レセプターとして Neuropilin (NPTN) を同定した。

さらに、S100A8/A9 により誘導される TNF α はフィラグリンやカスパーゼ-14 の発現を抑制することが報告されている。カスパーゼ-14 は表皮特異的に発現しており、研究代表者らはこれまでに、カスパーゼ-14 がフィラグリンから天然保湿因子への分解過程に関与していること、また、カスパーゼ-14 の前駆体・活性化体各々を特異的に定量できる ELISA 系を開発し、アトピー性皮膚炎では無疹部でもカスパーゼ-14 が有意に低下していることを報告した。さらに、カスパーゼ-14 が表皮の最終分化におけるケラチノサイトの脱核にも関与することを報告した。すなわち、カスパーゼ-14 の発現低下は不全角化の原因の一つとなり得ると考えられる。S100A8/A9 により誘導される TNF α をはじめとする一連の炎症因子によりもたらされる負のスパイラルによるカスパーゼ-14 の発現低下は不全角化をもたらす、バリア破綻に直結してくると考えられる。

以上のことから、S100A8/A9 は皮膚バリア破綻によってもたらされる炎症の慢性化に重要な役割を果たしていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、S100A8/A9 と新規レセプターの相互作用を明らかにすることで、皮膚バリア破綻に起因する炎症の慢性化に至るメカニズムを解明し、慢性炎症性皮膚疾患の代表であるアトピー性皮膚炎の病態解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ケラチノサイトにおける S100A8, S100A9 とそれらのレセプターの発現の検証

増殖期、分化後、空気暴露による分化刺激、Ca²⁺刺激などの状態別に、培養ケラチノサイトにおける S100A8, S100A9, NPTN, EMMPRIN の発現レベルについて qPCR などで検討した。

(2) S100A8/A9 とそのレセプターの信号系の解析

S100A8-NPTN, S100A9-EMMPRIN の反応が細胞内のどのアダプター蛋白と作用するのか、細胞内ドメインとの相互作用を免疫沈降反応で検討した。

MAPK を中心に、リン酸化抗体を用いて信号系がどのように影響を受けているか、S100 蛋白刺激、レセプター分子のノックダウン、アダプター分子のノックダウンについてウエスタンブロットで検討した。

(3) S100A8, S100A9 とその新規レセプター NPTN, EMMPRIN の相互作用の検討

ケラチノサイトにおける NPTN, EMMPRIN の発現を siRNA で抑制し、S100A8, S100A9 で刺激した際の細胞増殖の変化をフローサイトメーターで比較した。

生体内では S100A8/A9 はヘテロダイマーとして安定していると考えられていることから、レセプターについてもオリゴマー形成しているのか、免疫沈降法や proximity ligation assay で検討した。

(4) S100A8, S100A9 および NPTN, EMMPRIN の局在の検討

S100A8, S100A9 および NPTN, EMMPRIN の局在について、アトピー性皮膚炎の皮膚組織を用いて免疫染色にて同定し、正常と比較を行った。

S100A8, S100A9 と NPTN, EMMPRIN の相互作用をアトピー性皮膚炎の皮膚組織を用いて、proximity ligation assay にて確認した。

培養ケラチノサイトにおける NPTN と EMMPRIN の局在についても共焦点顕微鏡にて検討した。

(5) S100A8 トランスジェニックマウスを用いた薬剤刺激による検証

インボルクリンプロモーターでドライブした S100A8 が表皮特異的に過剰発現している S100A8 トランスジェニックマウスを用い、

SDS、TNCF 等の薬剤を塗布することで、炎症の持続や皮膚組織の肥厚の変化について、増殖マーカーである Ki-67 染色などにより検証した。

4. 研究成果

(1) 培養ケラチノサイトにおける S100A8, S100A9 とそれらのレセプターの発現の検証

培養ケラチノサイトにおける S100A8, S100A9, NPTN, EMMPRIN の mRNA、蛋白レベルでの発現について、増殖期や分化刺激などの状態別に検討した結果、S100A8 および S100A9 は、分化刺激により発現亢進が認められた (図 1)。また、EMMPRIN は Ca²⁺による分化刺激で発現の亢進が認められたのに対し、NPTN は様々な状況下においてほぼ一定に NPTNβ を主として発現が認められた。NPTN は NPTNβ と NPTNα の 2 つのバリエーションが存在するが、S100A8 は NPTNβ とのみ相互作用が確認されている。

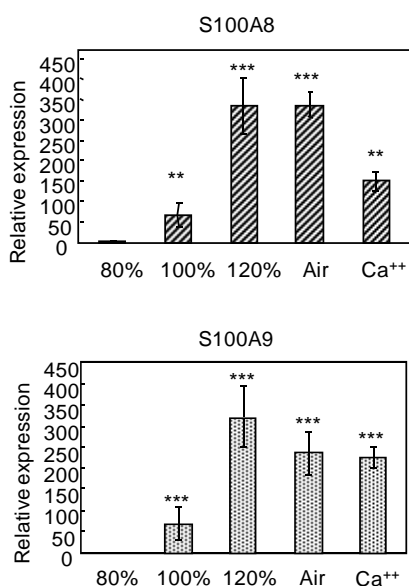


図 1 培養ケラチノサイトにおける S100A8, S100A9 の発現

(2) S100A8/A9 の NPTN/EMMPRIN を介する信号系

EMMPRIN と NPTN の細胞質ドメインには TRAF 結合配列が存在し、さらに NPTN では SH3 ドメインが存在することから、NPTN および EMMPRIN の細胞質ドメインと結合するアダプター蛋白を検討した。その結果、EMMPRIN は TRAF2 と、NPTN は GRB2 と結合が認められた。さらに、培養ケラチノサイトにおいて S100A8/A9 刺激を行うと ERK および p38 のリ

ン酸化が認められたが、NPTN を siRNA で抑制することにより、S100A8/A9 により誘導される ERK のリン酸化が抑制され、一方、EMMPRIN の発現を抑制すると p38 のリン酸化が抑制された。また、GRB2 を抑制すると ERK のリン酸化が抑制され、TRAF2 を抑制すると p38 のリン酸化が抑制された。

このことから、ケラチノサイトにおいて S100A8/A9 刺激によりもたらされる細胞増殖や炎症のシグナルは、NPTN および EMMPRIN をレセプターとし、GRB2 および TRAF2 を介していることが示唆された。

(3) S100A8, S100A9 とその新規レセプター NPTN, EMMPRIN の相互作用の検討

ケラチノサイトに S100A8 を添加し 24 時間培養した際に、NPTN, EMMPRIN を siRNA でノックダウンした場合での細胞増殖能の違いを検討した。その結果、各レセプターを単独でノックダウンした場合においても、S100A8 刺激による細胞増殖は抑制されたが、ダブルノックダウンした場合は、ケラチノサイトの増殖抑制が顕著であった。また、S100A9 および S100A8/A9 による刺激でも同様の結果が得られた。

そこで、S100A8, S100A9 は生体内でヘテロダイマーを形成し安定化すると推定されていることから、これらのレセプターもオリゴマーを形成するかどうか検討したところ、NPTNβ および EMMPRIN はホモダイマーおよびヘテロダイマーを形成することが示された。また、NPTN を抑制することで、S100A8, S100A9, S100A8/A9 刺激により誘導される CXCL1, TNFα, IL-8 などの炎症性サイトカインが抑制され、EMMPRIN の発現を抑制した際にも、同様の結果が得られた。

このことから、S100A8/A9 ヘテロダイマーのレセプターとして NPTNβ/EMMPRIN ヘテロダイマーは機能し、炎症性サイトカインの誘導やケラチノサイトの増殖に働く可能性が示唆された。

(4) S100A8, S100A9, および NPTN, EMMPRIN の局在

S100A8, S100A9, NPTN, EMMPRIN の局在を免疫染色で検討した結果、健常皮膚やアトピー性皮膚炎の無疹部ではこれらの発現はほとんど認められなかったが、アトピー性皮膚炎の皮疹部では、表皮上層に S100A8, S100A9 の発現が強く認められた。また、同部位に NPTN, EMMPRIN の発現も認められ、NPTN は基底層にも発現が確認された。S100A8/A9 ヘテロダイマーを認識する抗体でも、表皮上層に強い染色性が確認された。

さらに、proximity ligation assay によりリガンドとレセプターの相互作用を検討したところ、NPTN と S100A8, S100A8/A9 は顆粒層と基底層において相互作用を認め、NPTN と

S100A9も顆粒層で相互作用が認められた。また、EMMPRINはS100A8、S100A9と顆粒層で、S100A8/A9とは基底層も含め相互作用が認められた。NPTN、EMMPRINレセプター同士の相互作用も、アトピー性皮膚炎において基底層から表皮上層で確認され、表皮下層での反応は特に表皮肥厚部位で認められた。さらに、培養ケラチノサイトにおいても、NPTNβとEMMPRINは細胞膜上で共発現を示していることが共焦点顕微鏡にて確認された。

(5) S100A8 トランスジェニックマウスを用いた薬剤刺激による検証

S100A8はNPTNβに結合しGRB2を介した信号伝達を行うことから、炎症に伴う細胞増殖に関与するのではないかと考え、表皮特異的にS100A8を過剰発現しているトランスジェニック(Tg)マウスを用いて検証を行った。

SDSを4日間連続塗布した場合、wild typeのマウスでは炎症に伴う耳の肥厚はわずかであったが、S100A8 Tgマウスでは96時間をピークに強い反応が認められた。また、TNCBで感作の後、5日目に再刺激にて炎症惹起したところ、刺激後72時間まで徐々に耳の肥厚が強くなり、その後wild typeでは炎症が収束に向かったが、S100A8 Tgマウスでは耳の肥厚が続き、炎症の遷延化が認められた(図2)。

皮膚組織染色でも、S100A8 TgマウスではTNCB刺激により表皮肥厚が認められ、Ki-67染色陽性の細胞が基底層において顕著に増加していることが確認された。

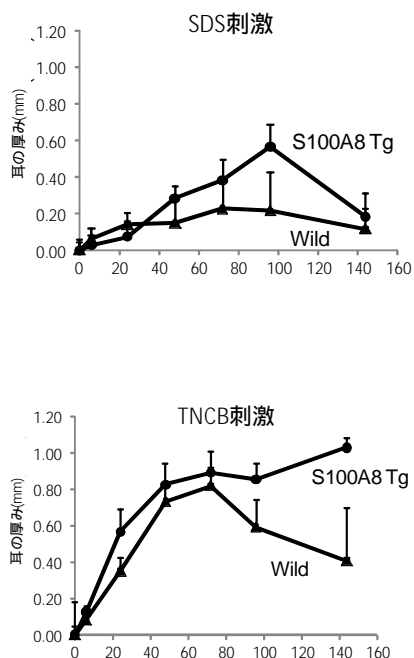


図2 S100A8 Tgマウスを用いた薬剤刺激の結果

以上の結果から、S100A8、S100A9はNPTNβ、EMMPRINを介して各々の機能を有し、またS100A8/A9ヘテロダイマーのレセプターとしてNPTNβ/EMMPRINもヘテロダイマーとして機能し、細胞増殖と炎症の慢性化に寄与することによりアトピー性皮膚炎の病態に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

なお、上記の成果はJ Invest Dermatol誌(Sakaguchi, Yamamoto, et al. (2016))に発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sakaguchi M, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, Murata H, Kinoshita R, Winarsa Ruma IM, Putranto EW, Inoue Y, Morizane S, Huh NH, Tsuboi R, Hibino T: Identification of an S100A8 receptor neuroplastin-β and its heterodimer formation with EMMPRIN. J Invest Dermatol (2016) 136: 2240-2250, doi: 10.1016/j.jid.2016.06.617 査読有

山本真実: アトピー性皮膚炎におけるS100A8/A9と新規レセプターの役割解明. アレルギーの臨床 (2015) 35: 958-961 査読無

Yamamoto-Tanaka M, Motoyama A, Miyai M, Matsunaga Y, Matsuda J, Tsuboi R, Hibino T: Mesotrypsin and caspase-14 participate in prosaposin processing: potential relevance to epidermal permeability barrier formation. J Biol Chem (2014) 289: 20026-20038, doi: 10.1074/jbc.M113.543421 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

山本真実、宮井雅史、比留間潤一郎、阪口政清、山西治代、坪井良治、日比野利彦: インフラマゾームの構成要素であるNOD2は乾燥状態に反応し、炎症を誘導する。第115回日本皮膚科学会総会、2016年6月4日、京都

Yamamoto M, Miyai M, Yamanishi H, Sakaguchi M, Hiruma J, Tsuboi R, Hibino T: NOD2 inflammasome is associated with inflammatory and immune reactions in atopic dermatitis. The 75th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 14, 2016, Scottsdale, Arizona

Yamamoto-Tanaka M, Miyai M, Sawane M, Yamanishi H, Sakaguchi M, Tsuboi R, Hibino T: Mechanism of S100A9 induction in the skin with atopic

dermatitis - involvement of NOD2 inflammasome activation -. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec 11, 2015, Okayama, Japan

Yamamoto-Tanaka M, Sakaguchi M, Miyai M, Hiruma J, Hibino T, Tsuboi R: The role of inflammasome in atopic dermatitis. 第 29 回表皮細胞研究会, 2015 年 11 月 14 日, 佐賀

田中(山本)真実、坪井良治、日比野利彦: 表皮角化細胞の脱核には複数の経路が関与する 皮膚バリア機能形成における関与 . 第 174 回東京医科大学医学会総会, 2014 年 11 月 1 日, 東京

Yamamoto-Tanaka M, Sakaguchi M, Miyai M, Motoyama A, Tsuboi R, Hibino T: S100A8/A9 promotes concomitant inflammation and proliferation via distinctive receptor oligomerization-potential relevance to atopic dermatitis. The 73rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 9, 2014, Albuquerque, New Mexico

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 真実 (YAMAMOTO, Mami)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60421062