

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01531

研究課題名(和文)皮膚バリアー制御メカニズムの分子薬理学的研究

研究課題名(英文)Molecular pharmacological analysis of skin barrier regulatory mechanisms

研究代表者

成宮 周(narumiya, shuh)

京都大学・医学研究科・寄附講座教員

研究者番号：70144350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々の皮膚は、外来物質の侵入や内部水分の蒸散を防止するバリアー機能を有し、その破綻はアトピー性皮膚炎等を惹起する。本研究では、ヒト角化細胞でフィラグリン発現を指標として皮膚バリアー機能を促進する化合物を探索、それらの作用機序を解析した。成果として、リゾフォスファチジン酸(LPA)が受容体LPAR1とLPAR5に働き、G12/13-Rho-ROCK-SRF経路を介してバリアー機能を亢進すること、LPAは、また、表皮創傷治癒に関わる角化細胞集団をも誘導すること、を明らかにし、Aryl Hydrocarbon Receptorに働き新規の機序で角化細胞分化を起こす一群の化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、皮膚バリアーの調節機序としてLPA-Rho経路と新規のAhR経路を同定したことに意義がある。Rho経路は物理的刺激に伴う表皮形成のシグナルとして提唱されてきており、今回の発見は表皮分化について統一的な理解を促進する。また、AhRは、コールタールの皮膚外用薬としての標的であるが、dioxin受容体でもあり、その活性化は一方で皮膚炎症を起こすなど潜在的な毒性のため治療標的としては敬遠されている。本研究で、既存のAhRリガンド活性や炎症惹起を伴わず、皮膚バリアーを亢進する一群の化合物が発見されたことは、AhR研究に新規の視点を導入しその作用の選択的応用に途を拓くものと言える

研究成果の概要(英文)：The skin barrier protects the body from water loss, allergens and pathogens.

In this study, we used cultured normal human epidermal keratinocytes, and screened compounds for promotion of skin barrier with induction of a skin barrier protein, filaggrin (FLG) as a parameter. We then extended these in vitro findings to in vivo models. We found, lysophosphatidic acid (LPA) acts on its receptors, LPAR1 and LPAR5, to mobilize G12/13-Rho-ROCK-SRF pathway, and promote skin barrier function through keratinocyte maturation, and LPA, in addition, induces differentiation of keratinocyte into a separate population involved in skin wound healing. We further found, a class of compounds that induce keratinocyte maturation for barrier function through acting aryl hydrocarbon receptor (AhR), but, unlike conventional AhR ligands such as FICZ and TCDD, are weak or negligible in classic AhR ligand activity such as CYP1A1 induction and apparently without proinflammatory activity.

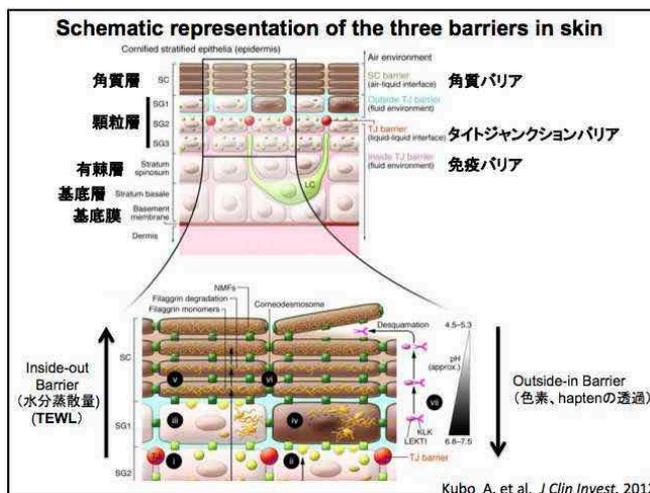
研究分野：薬理学

キーワード：皮膚バリアー アトピー性皮膚炎 角化細胞 フィラグリン lysophosphatidic acid Rhoシグナル  
アarylヒドロカーボン受容体 創傷治癒

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚は、多層扁平上皮と呼ばれ基底層で生じた角化細胞 (keratinocyte) が有棘層から顆粒層を経る過程で分化し、これが角質層に至って細胞膜を失い、最上部では cornified envelope (CE) と呼ばれるケラチンを主体とした多数の蛋白質と脂質が cross-link された不溶性の膜を形成している (右図参照)<sup>1</sup>。このような皮膚の構造は、体表の保護に必要な機械的な強靱性に加え、外来物質が体内に侵入するのを防いだり、内部の水分が自由に蒸散したりするのを防ぐバリアー機能を有している。前者を Outside-In バリアー、後者を Inside-Out バリアーと称する。これらのバリアー機能は、一つには顆粒層角化細胞間に形成される tight junction にもよるが、重要なのは角質層で形成される上記 CE を含む角質バリアーである (皮膚バリアーとしてはこれらの他、一旦侵入した外来性抗原に対する免疫反応を介達するランゲルハンス細胞がつくる免疫バリアーがあるが、ここでは説明を略す)。角質バリアーの重要性は、CE を形成する involucrin, envoplakin, periplakin など欠損するマウス<sup>2</sup>や cross-linking を触媒する trans-glutaminase の欠損マウス<sup>3</sup>が、皮膚バリアーの障害を示すことから明らかである。これらバリアー機能の障害は、水分蒸散による皮膚の乾燥化や外来抗原の侵入によるアレルギーの惹起に繋がることが予想されていたが、ヒトでこれが証明されたのが、角質バリアー蛋白質の一つフィラグリン (filaggrin, FLG) の変異がアトピー性皮膚炎の発症の原因であることを明らかにした疫学研究であった<sup>4</sup>。この発見は、ついで、FLG の変異の無いアトピー患者でも皮膚での FLG 発現が低下していることの発見<sup>5</sup>につながり、現在では、この低下は、アトピー発症に働く IL-4 などの Th2 サイトカインが惹起し、Th2 炎症と FLG 低下は vicious cycle を形成して、病気の進展に至ると理解されている。FLG は、10 から 12 個の単位がつながった分子量 350K の前駆体 profilaggrin として顆粒層角化細胞で合成され、これが keratohyalin 顆粒内で分解を受け、単量体 FLG となる。FLG は、ケラチンファイバーを束化するほか、さらにアミノ酸レベルまで分解され、角質層で天然保湿因子 (natural moisture factor) として水分保持に働く<sup>6</sup>。ここで述べた角化細胞のバリアー機能の獲得は、角化細胞が有棘層から顆粒層へと分化していく過程で起こるが、この分化がどのように制御されているかの知見は乏しい。これまでのところ、角化細胞分化、即ち、皮膚形成は、幹細胞レベルで分化の方向付けされた細胞が細胞外基質や細胞間接着、stiffness などの環境の物理的要素に反応して自律的に行われるとの見方が一般的である<sup>7</sup>。例えば、実験的にも、マウス皮膚角化細胞の培養系で mM 濃度のカルシウム添加で分化誘導おこることが古くから知られているが、これもカルシウムが引き金を引く自律的な分化誘導プログラムによると解されている。一方、皮膚を創傷治癒モデルに供した場合、いくつかの物質が角化細胞の移動と分化を促進して欠損部の補填を行うこと、これらの多くが G 蛋白質共役受容体(GPCR)に働く物質であることが知られている<sup>8,9</sup>。また、FLG の低下がアトピーの発症を招来することから、FLG 誘導物質の探索が進められ、例えば、コールタールが核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AHR)を介して FLG 誘導をおこすことなどが報告<sup>10</sup>されている。これらの事実は、様々な生理活性物質が各々の受容体を介して角化細胞に働いて分化を起こす能力を有することを示唆するが、それらの活性が角化細胞の分



細胞間に形成される tight junction にもよるが、重要なのは角質層で形成される上記 CE を含む角質バリアーである (皮膚バリアーとしてはこれらの他、一旦侵入した外来性抗原に対する免疫反応を介達するランゲルハンス細胞がつくる免疫バリアーがあるが、ここでは説明を略す)。角質バリアーの重要性は、CE を形成する involucrin, envoplakin, periplakin など欠損するマウス<sup>2</sup>や cross-linking を触媒する trans-glutaminase の欠損マウス<sup>3</sup>が、皮膚バリアーの障害を示すことから明らかである。これらバリアー機能の障害は、水分蒸散による皮膚の乾燥化や外来抗原の侵入によるアレルギーの惹起に繋がることが予想されていたが、ヒトでこれが証明されたのが、角質バリアー蛋白質の一つフィラグリン (filaggrin, FLG) の変異がアトピー性皮膚炎の発症の原因であることを明らかにした疫学研究であった<sup>4</sup>。この発見は、ついで、FLG の変異の無いアトピー患者でも皮膚での FLG 発現が低下していることの発見<sup>5</sup>につながり、現在では、この低下は、アトピー発症に働く IL-4 などの Th2 サイトカインが惹起し、Th2 炎症と FLG 低下は vicious cycle を形成して、病気の進展に至ると理解されている。FLG は、10 から 12 個の単位がつながった分子量 350K の前駆体 profilaggrin として顆粒層角化細胞で合成され、これが keratohyalin 顆粒内で分解を受け、単量体 FLG となる。FLG は、ケラチンファイバーを束化するほか、さらにアミノ酸レベルまで分解され、角質層で天然保湿因子 (natural moisture factor) として水分保持に働く<sup>6</sup>。ここで述べた角化細胞のバリアー機能の獲得は、角化細胞が有棘層から顆粒層へと分化していく過程で起こるが、この分化がどのように制御されているかの知見は乏しい。これまでのところ、角化細胞分化、即ち、皮膚形成は、幹細胞レベルで分化の方向付けされた細胞が細胞外基質や細胞間接着、stiffness などの環境の物理的要素に反応して自律的に行われるとの見方が一般的である<sup>7</sup>。例えば、実験的にも、マウス皮膚角化細胞の培養系で mM 濃度のカルシウム添加で分化誘導おこることが古くから知られているが、これもカルシウムが引き金を引く自律的な分化誘導プログラムによると解されている。一方、皮膚を創傷治癒モデルに供した場合、いくつかの物質が角化細胞の移動と分化を促進して欠損部の補填を行うこと、これらの多くが G 蛋白質共役受容体(GPCR)に働く物質であることが知られている<sup>8,9</sup>。また、FLG の低下がアトピーの発症を招来することから、FLG 誘導物質の探索が進められ、例えば、コールタールが核内受容体 aryl hydrocarbon receptor (AHR)を介して FLG 誘導をおこすことなどが報告<sup>10</sup>されている。これらの事実は、様々な生理活性物質が各々の受容体を介して角化細胞に働いて分化を起こす能力を有することを示唆するが、それらの活性が角化細胞の分

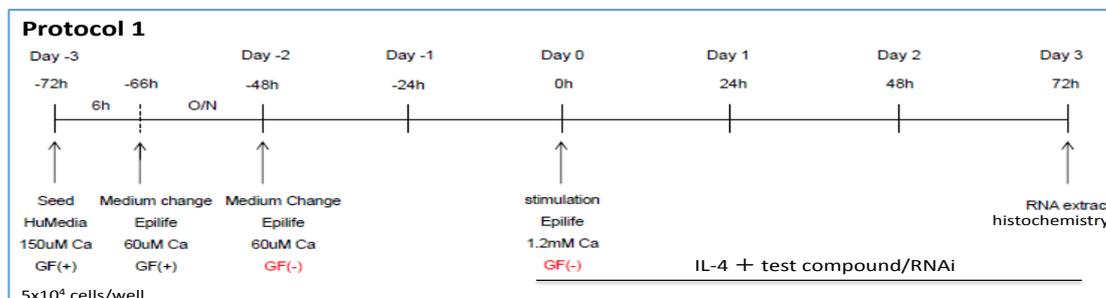
化段階のどこで発揮されるのか、全体としてどのような遺伝子発現パターンを呈するのか、発生での分化とどう関係し、どのような生理・病理状況で働くかは不明である[文献:1) Kubo et al. (2012) J Clin Invest, 122, 440-7. 2) Sevilla et al. (2007) J Cell Biol, 179, 1599-612. 3) Matsuki et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA, 95, 1044-9. 4) Palmer et al. (2006) Nat Genet 38, 441-6. 5) Howell et al. (2007) J Allergy Clin Immunol, 120, 150-5. 6) Kabashima (2013) J Dermatol Sci, 70, 3-11. 7) Lane et al. (2014) Nat Biotech 32, 795-803. 8) Lichte et al. (2008) J. Invest Dermatol, 128, 1487-98. 9) Liu et al. (2014) J Exp Med, 211, 1063-78. 10) Van den Bogaard et al. (2013) J Clin Invest 123, 917-27.]。

## 2. 研究の目的

上記背景の下、本研究では、培養ヒト表皮角化細胞 (NHEK) に発現する受容体を系統的に同定、バリア蛋白質, FLG, 発現を指標として角化細胞分化に働く薬物や新規化合物を探索し、その作用をトランスクリプトーム手法によって解析し、NHEK 細胞でのバリア機能制御機構を解明、これをマウス個体で実証し、ヒトへの外挿を図ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、① NHEK 細胞の受容体発現プロフィールの同定と被験化合物の選定、② 被験化合物の FLG 誘導活性物質の検討、③ 前記検討で見いだされた FLG 誘導物質の NHEK での遺伝子発現シグネチャーの同定、④ 誘導物質の遺伝子発現に至るシグナル伝達経路の同定、⑤ 誘導物質/誘導系の角化細胞分化への関与の検討、⑥ ヒト皮膚 3 次元培養系での検討、⑦ 上記誘導物質の生体マウス皮膚のバリア機能での有効性の検討の順序で研究を実施した。②での被験化合物の FLG 誘導の assay は、NHEK 細胞を用い、アトピー性皮膚炎の環境を再現するために Th2 サイトカインである IL-4 存在下で行う Protocol-1 (下図)を主として用いた。誘導時間は、被験薬物により、添加後 5 日後 (120 時間) までの観察も行った。

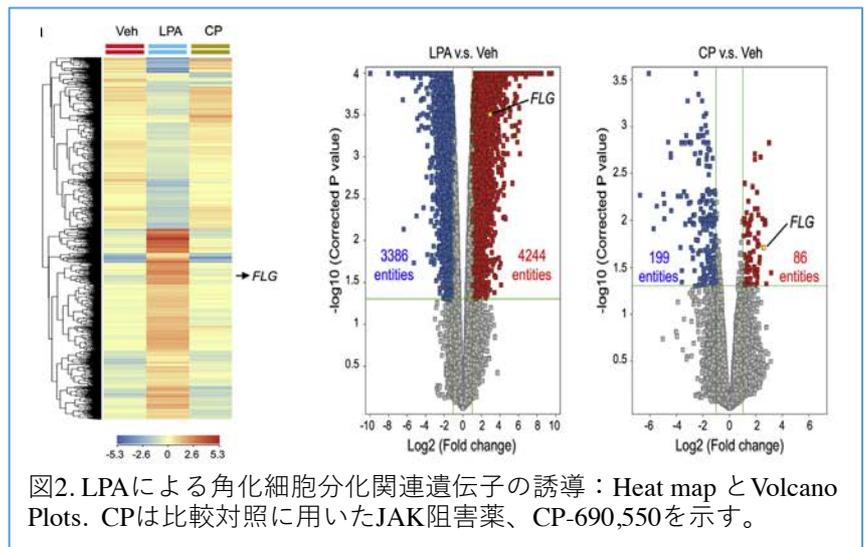
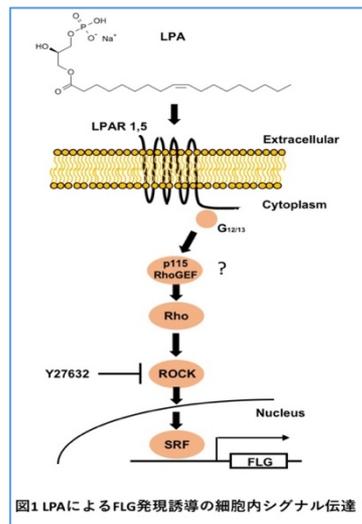


## 4. 研究成果

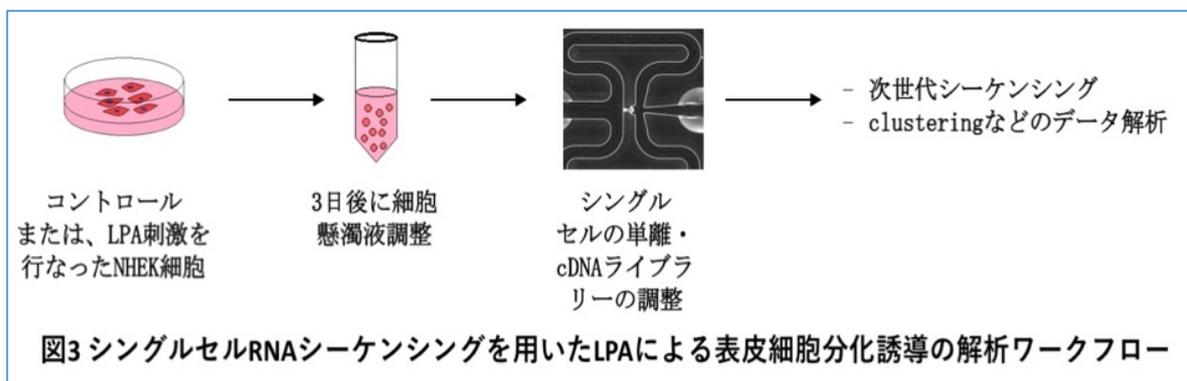
### ① LPA による表皮分化促進作用と分子作用機序の解明

本研究では、NHEK 細胞で発現されている G 蛋白質連関受容体 (GPCR) を GPCR Array を用いて系統的に探索し 119 種の GPCR を同定、その中から発現が高く細胞内情報伝達を異にする受容体 3 種、LPAR1, P2Y1, ADRB2、を選択し、それぞれのアゴニストを用いて、アトピー状態を模した IL-4 添加下での NHEK 細胞での FLG 誘導活性を検討した。その結果、NHEK でリゾフォスファチジン酸 (LPA) が LPA 受容体 LPAR1 と LPAR5 に働き、G<sub>12/13</sub>-Rho-ROCK-SRF 経路を介して FLG のみならず、様々なバリア蛋白質を誘導して角化細胞の分化に働くことを見いだした(図 1)。この LPA 作用は、*in vitro* で、皮膚分化に関わる多彩な遺伝子発現を誘導し、比較対象であるアトピー性皮膚炎治療薬として使用されている JAK 阻害薬より遥かに強力であった (図 2)。かつ、ヒト皮膚の 3 次元培養系でも FLG 誘導に伴う皮膚分化・肥厚を促進した。また、LPA を塗布することにより、正常マウス皮膚で角化細胞分化の促進と dry skin モデルで

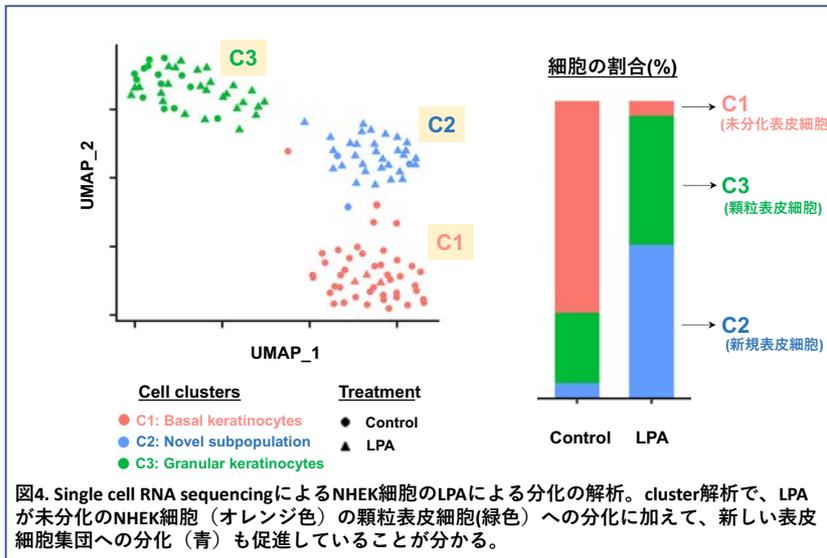
のバリアー機能亢進を認めた。以上の研究成果は、論文として発表した (Sumitomo *et al.*, *J Invest Derm*, 139, 1010-1022, 2019)。



② シングルセルRNAシーケンシングを用いたLPAによる新規表皮細胞集団の分化誘導の解析  
 上述したように、本研究では、LPAがNHEK細胞を基底層の性質を有する状態からFLGを発現する顆粒細胞への成熟分化を促進することを見出し、論文を発表した。その後、LPA添加後のNHEKを免疫細胞化学で調べたところ、免疫染色で確認できるFLG陽性細胞表皮顆粒細胞は全体の約4割にすぎず、約6割の細胞がFLGを発現しない正体不明の細胞集団に分化していることが判明した。この集団のidentityを解明するため、ついで、本研究に、シングルセルRNAシーケンシング(scRNA-seq)技術を取り入れ、LPA添加時に見られるNHEK細胞の分化過程の同定を試みた(図3)。

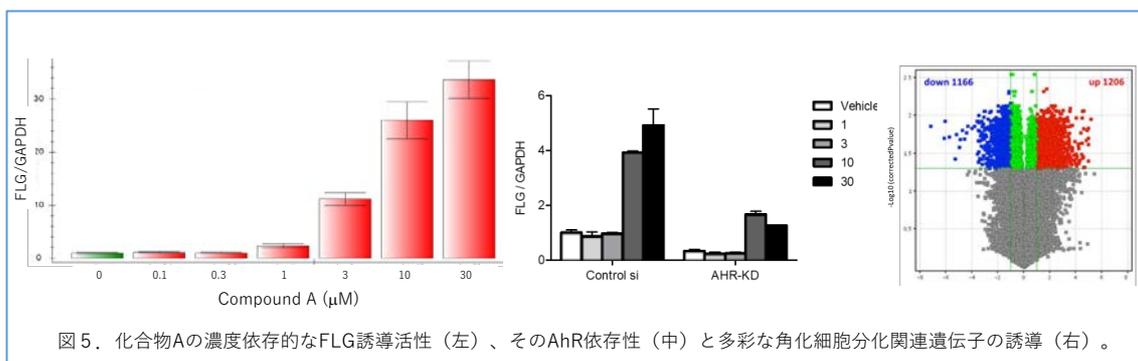


その結果、NHEKにLPA添加により、controlの未分化表皮細胞と全く異なる2つの細胞集団に分化していることがcluster解析により判明し、また、pseudo-time解析でこれらが別々の経路で分化していることが判明した(図4)。一つの細胞集団は上記研究成果で報告した通りの表皮顆粒細胞の特徴をもつが、もう一つの細胞集団は既存のマーカー分子を発現せず、THBS1の遺伝子発現を特徴とし、新規の表皮細胞のサブタイプであることが示唆された。*in vitro*による詳細な解析の結果、THBS1陽性表皮細胞の分化誘導には、表皮顆粒細胞の分化誘導よりも、高いLPAの濃度が必要であることがわかった。さらに、*in vivo*の組織免疫染色検討の結果、THBS1発現表皮細胞は正常のマウス皮膚では見られないが、損傷を受けた表皮に特異的に出現することが分かり、表皮の創傷治癒に関わっている可能性が示唆された。本研究の研究成果は現在論文作成中である (Siriwach *et al.*, manuscript in preparation)。



### ③ AHRを活性化する新規低分子化合物A及び誘導体の皮膚分化誘導

研究当初の背景に述べたように、一部の欧州諸国でアトピー性皮膚炎(AD)の治療薬として使用されてきたコールタールが Aryl Hydrocarbon receptor (AHR) に働き FLG を誘導し皮膚恒常性維持に働くと報告されている。AHR は生体外物質(xenobiotics)である芳香族炭化水素の受容体として発見され、炭化水素の代謝酵素であるチトクローム P-450 群を誘導する分子として有名であるが、免疫 T 細胞などの分化誘導にも関わるなどその作用は多彩である。コールタールが AhR を介して皮膚バリアの強化に働くことが報告されている一方で、高毒性を示すダイオキシンや環境汚染物質が皮膚の AhR に働き皮膚炎症を起こすことが報告されており、AhR の働きは、リガンドの種類によって異なり、一様でなく、この分子的根拠は不明のままである。本研究では、FLG 誘導物質探索の経緯で AhR に働いて FLG 誘導を起こすのみならず、強力な皮膚分化角化細胞分化を誘導する低分子化合物 A を同定した(図 5)。



この化合物は他の AHR リガンドと比べダイオキシン作用の指標の一つである炭化水素の代謝酵素 CYP1A1 の誘導活性は低く、AHR リガンドとして特異的な性質を示す。さらに、より選択的に FLG 誘導を行う化合物を得るために、約 20 種類の compound A の誘導体を有機化学合成により作成し、スクリーニングを行った。その結果、compound A と比較して、FLG の発現誘導を保持したまま、CYP1A1 をほとんど誘導しない誘導体 compound A1 を見出した。本研究は、誘導体合成のため、予定より遅延したが、現在、合成した誘導体をケミカルツールとして使い、これまでの RNA sequencing の data を利用した皮膚での保護作用に特化した AhR に発する転写ネットワークの解析、ツール化合物の免疫細胞に対する作用検討を実施しており、特許性の検討と論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sumitomo A, Siriwach R, Thumkeo D, Ito K, Nakagawa R, Tanaka N, Tanabe K, Watanabe A, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Honda T, Kabashima K, Aoki J, Narumiya S.	4. 巻 139
2. 論文標題 LPA Induces Keratinocyte Differentiation and Promotes Skin Barrier Function through the LPAR1/LPAR5-RHO-ROCK-SRF Axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1010-1022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.10.034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田邊滉平、Thumkeo Dean, 成宮周
2. 発表標題 リゾホスファチジン酸(LPA)によるヒト表皮細胞の分化誘導及び皮膚バリア機能の促進
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会, 神戸
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Tanabe, Dean Thumkeo, Ratklao Siriwach, Junken Aoki, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid facilitates human keratinocyte differentiation through the LPAR1/LPAR5-Rho-ROCK-SRF axis and promotes skin barrier function
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊滉平、Thumkeo Dean, Siriwach Ratklao, 青木淳賢、成宮周
2. 発表標題 ヒト表皮細胞のバリア機能におけるリゾホスファチジン酸(LPA)の役割解明
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会, 広島
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid facilitates human keratinocyte differentiation through the LPAR1/LPAR5-Rho-ROCK-SRF axis and promotes skin barrier function
3. 学会等名 第3回 京都皮膚基礎研究会, 京都
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ratklae Siriwach, Akiko Sumitomo, Kentaro Ito, Kohei Tanabe, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid induces Filaggrin expression and promotes skin barrier function in human keratinocyte
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会, 大阪
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口牧郎、Thumkeo Dean、成宮周
2. 発表標題 New compounds for atopic dermatitis promote selective AHR-induced Filaggrin transcription in NHEK cells
3. 学会等名 日本薬理学会近畿支部会 第138回、オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ngo Quynh Anh、Ratklae Siriwach、Thumkeo Dean、坂本智子、渡辺亮、成宮周
2. 発表標題 Identify molecular mechanism of LPA on epidermal differentiation with single cell RNA sequencing
3. 学会等名 京都大学メディカルイノベーション卓越大学院プログラム・医薬系研究交流サロン、京都
4. 発表年 2020年

