

令和元年6月13日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06550

研究課題名（和文）メカニカルストレスによる皮膚炎誘導のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of mechanical stress-induced dermatitis

研究代表者

中村 貴之（Nakamura, Yoshiyuki）

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：10804726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：テープストリッピングにより特定のサイトカイン、ケモカインの発現がケラチノサイトに誘導されることが明らかとなった。また、テープストリッピング直後にIL-1受容体を皮内注することで、それらのサイトカイン、ケモカインの発現が低下したことから、サイトカイン、ケモカイン誘導においてDAMPs (damage-associated molecular patterns)としてのIL-1の重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メカニカルストレスにより皮膚の細胞が活性化し乾癬や扁平苔癬など、様々な皮膚疾患の誘導に関わることは古くからよく知られ、臨床的にケプネル現象と呼ばれている。しかしながら、この皮膚炎誘導に関する詳細なメカニズムは明らかとなっておらず、メカニカルストレスに対する反応性を標的とする治療も確立されていない。本研究ではメカニカルストレスにおける炎症性メディエーターの放出機序を明らかにすることで、新たな治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Tape stripping induced the expressions of specific cytokines and chemokines in epidermis. Dermal injection of IL-1 receptor antagonist decreased the expression of these cytokines and chemokines. Therefore, IL-1 may be important to induce the cytokine and chemokines.

研究分野：皮膚科

キーワード：メカニカルストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレスは細胞や組織に負される物理的、力学的な力により生じる様々な刺激であり、これらの刺激を受け取り生物は恒常性を維持している (Wyatt T et al. Current opinion in cell biology. 2016)。圧迫、伸展、摩擦など様々な種類のメカニカルストレスが存在するが、それらのストレスは細胞の増殖、分化など多くの因子を制御していることが知られている。外界と接する上皮は常にメカニカルストレスに暴露されるため、皮膚はそれらのストレスに対し強く影響を受ける臓器である。メカニカルストレスによって皮膚の様々な細胞が活性化することが知られているが、どのようにして活性化するかに関する詳細な機序は未だ不明である。メカニカルストレスの中でも、特に掻破や摩擦などの刺激がアトピー性皮膚炎や乾癬の病態を大きく制御していることはよく知られており (Wahlgren CF et al. The Journal of dermatology. 1999)、これらの刺激は単に角層の除去による皮膚透過性バリアの崩壊をもたらすだけでなく、様々な炎症性メディエーターを誘導することが知られているが (Takaoka A et al. Experimental dermatology. 2007)、どのようにしてそれらのメディエーターを誘導するかという点に関しては未だ明らかになっていない。

テープストリッピングは掻破や摩擦を模倣する手技とされている。そこで、われわれはテープストリッピングを連日繰り返すメカニカルストレス誘導性皮膚炎モデルを確立し、このモデルにおいて好中球の強い表皮内浸潤が生じることを見出した。次にこのモデルにおいて好中球がどのような因子により誘導されるかを明らかにするために、表皮内の各サイトカイン、ケモカインの mRNA を測定したところ、Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現がテープストリッピングにより著増することが判明した。さらに Toll 様受容体 (Toll-like receptor:TLR) の結合分子である Myd88 の欠損マウスでは Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇がみられなかったことから、テープストリッピング後の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇は Myd88 に大きく依存することが示唆された。

Myd88 をシグナル分子として用いる主な受容体は TLR であるため、そのリガンドである PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) を豊富に含む、常在菌の関与を明らかにするため無菌マウスを用いて検証したところ、無菌マウスの Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の mRNA の発現レベルは SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育されたマウスと同程度であった。したがって、テープストリッピング後の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の mRNA の発現亢進に常在菌は関与しないことが示唆された。Myd88 をシグナル分子として用いる受容体は Toll 様受容体の他に IL-1 受容体、IL-33 受容体がある。したがって、常在菌由来の PAMPs の他に死細胞から放出される HMGB-1、IL-1 $\beta$ 、IL-33 などの DAMPs (damage-associated molecular patterns) が Myd88 を通じて細胞を活性化できる。実際にわれわれはテープストリッピング後の免疫組織染色像でケラチノサイトからの HMGB-1 の放出を確認している。したがって、テープストリッピングにより細胞死が生じ、その死細胞から放出される DAMPs がケラチノサイト、ランゲルハンス細胞などの表皮内の細胞から IL-1 $\beta$ 、CXCL-1 の産生を促し、好中球を遊走させる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究ではメカニカルストレスで誘導される皮膚炎の詳細な機序を解明し、メカニカルストレスで誘導される DAMPs (Damage-associated molecular patterns) の放出が各種皮膚疾患に与える影響を検証する。具体的には、掻破や摩擦による刺激において放出される DAMPsのうち、どの DAMPs がどの程度表皮からの IL-1 $\beta$ 、CXCL-1 の産生に寄与するか、IL-1 $\beta$ 、CXCL-1 はどの細胞から主に産生されるかを明らかにする。また、それらの DAMPs がどの程度各皮膚疾患の重症度に関与しているかをアトピー性皮膚炎および乾癬のマウスモデルを用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

Myd88 をシグナル伝達分子として用いる各 DAMPs のテープストリッピング後の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇の関与の解明するために、Myd88 をシグナル伝達分子として用いる DAMPs である HMGB-1、IL-1 $\beta$ 、IL-33 のうちどの DAMPs がどの程度テープストリッピング後の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇に関与するかを明らかとするために、培養した表皮に HMGB-1、IL-1 $\beta$ 、IL-33 を添加した後の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現および産生量をそれぞれ mRNA および ELISA による培養上清中のサイトカイン測定により検証する。また同様に、各 DAMPs を皮内注射した後の表皮の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現を比較する。さらに、テープストリッピング直後に IL-1 受容体、HMGB-1 の主要な受容体である TLR2 および 4 または IL-33 受容体アンタゴニストの皮内注射、Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現を検証する。

テープストリッピング後の表皮の Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇における表皮内各細胞の役割の解明するために、表皮内にはケラチノサイトの他、ランゲルハンス細胞、T細胞、T細胞などの免疫細胞も存在するため、それらの細胞の中でどの細胞がそれぞれのサイトカイン、ケモカインの発現上昇に寄与しているかを解明する必要がある。テープストリッピング後の表皮 Il1 $\beta$ 、Cxcl1 の発現上昇におけるこれら各細胞の役割を解明するため、テープストリッピング前後の表皮からケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、T細胞、T細胞をフローサイトメトリー法を用いてそれぞれ単離して mRNA を測定する。さらにそれぞれランゲルハンス細

胞, T細胞およびT細胞すべてを欠如する Langerin DTA マウス, TCR 欠損マウスおよび Rag 1 欠損マウスを用いてテープストリッピング後の表皮 IL1, Cxcl1 の発現上昇を検証する。

メカニカルストレスで誘導される DAMPs の放出とそれに引き続く IL1, Cxcl1 の産生が各皮膚疾患に与える影響を明らかにするために、で明らかとなった、テープストリッピング後の IL1, Cxcl1 の発現上昇に重要な DAMPs に対する受容体の欠損マウスに対して、メカニカルストレスによる皮膚炎モデルを誘導した際の重症度を検証する。またハプテンを用いた接触皮膚炎モデル および TLR7 のリガンドであるイミキモドを用いた乾癬モデルおよびそれらのモデルにテープストリッピングを加えた場合の皮膚炎の重症度も検証する。

また、ロリクリンは角質細胞の細胞膜を裏打ちする周辺帯の構成成分であり皮膚バリア機能を担う分子である。実際、ロリクリン欠損マウスは皮膚バリア機能の破綻によりメカニカルストレスに対する感受性が高いことが分かっている。これまでの実験結果からロリクリン欠損マウスでは接触皮膚炎モデルおよび乾癬モデルで皮膚炎の重症度が亢進することが分かっている。そこで、この DAMPs 受容体欠損マウスとロリクリン欠損マウスを掛け合わせ両欠損マウスを作成し、同様に各皮膚炎を誘導した際の重症度を検証することによって、メカニカルストレスにより放出される DAMPs の各皮膚炎における関与を明らかにする。

#### 4. 研究成果

Myd88 をシグナル伝達分子として用いる DAMPs である HMGB-1, IL-1, IL-33 のうちの DAMPs がどの程度テープストリッピング後の IL1, Cxcl1 の発現上昇に関与するかを明らかにするために、新生児から単離し培養した表皮に HMGB-1, IL-1, IL-33 を添加後に IL1, Cxcl1 の mRNA の発現を測定した。その結果、HMGB-1, IL-1 の添加では IL1, Cxcl1 の mRNA の発現が有意に増加したが、IL-33 の添加ではこれらのサイトカイン、ケモカインの上昇は認めなかった。また HMGB-1 と IL-1 の添加による IL1, Cxcl1 の mRNA の発現上昇の程度に顕著な差はみられなかった。さらにマウスの背部に、HMGB-1, IL-1, IL-33 を皮内注射し 4 時間後の表皮の IL1, Cxcl1 の mRNA の発現を検討したところ、in vitro の添加実験の結果と同様に HMGB-1, IL-1 は IL1, Cxcl1 の mRNA を有意に増加させたが、IL-33 による皮内注ではこれらのサイトカイン、ケモカインの発現量に変化はみられなかった。また、同様に HMGB-1 と IL-1 の皮内注による IL1, Cxcl1 の mRNA の発現上昇の程度に顕著な差はみられなかった。

以上から、Myd88 をシグナル伝達分子として用いる DAMPs である HMGB-1, IL-1, IL-33 のうち主に HMGB-1 と IL-1 がテープストリッピング後の IL1, Cxcl1 の発現上昇に関与すると考えられた。テープストリッピングにより IL-1, CXCL-1 以外に CXCL-2, CXCL-3 の発現がケラチノサイトに誘導されることが明らかとなった。

テープストリッピング後の表皮の IL1, Cxcl1, 2, 3 の発現上昇における表皮内の各細胞の役割の解明するために、テープストリッピング前後の皮膚を採取してコラゲナーゼなどの酵素により表皮細胞を単離してフローサイトメトリーで評価した。その結果、ケラチノサイトの他、ランゲルハンス細胞, T細胞, T細胞などの免疫細胞を思わせる集団が検出されたが、それらの sorting を試みたが、細胞数が不十分であり、mRNA 解析を行うことができなかった。そのため、さらなる細胞数の確保と適した条件検討が必要と思われた。

#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 石塚洋典、藤澤康弘、沖山奈緒子、渡辺玲

ローマ字氏名: Ishitsuka Yosuke, Fujisawa Yasuhiro, Okiyama Naoko, Watanabe Rei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。