

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 4 日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390324
 研究課題名（和文） コネキシン、パネキシンによる皮膚炎症制御の解析—新規抗炎症外用剤の開発に向けて—
 研究課題名（英文） Analysis of regulation of inflammation on the skin: Toward development of platform for new anti-inflammatory drug
 研究代表者
 松江 弘之 (Matsue Hiroyuki)
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：10250424

研究成果の概要（和文）：

我々はコネキシンを介した細胞間情報伝達系の炎症への関与の新しい一つのメカニズムを解明した。さらに、ある薬剤の細胞障害にもその情報伝達系が関与していることを明らかにした。重金属による細胞障害にコネキシンによるヘミチャネルを介した情報伝達が関与していることを明らかにした。また、皮膚の炎症にもそれらの情報伝達系が関与していることを示唆するマウス実験結果を得ており、そのメカニズムを探求中である。

研究成果の概要（英文）：

Our research revealed a new role of Gap junction(formed by connexins)-mediated cell-cell communication, which is involved in drug-mediated cell injury. Furthermore, we found that hemichannel (also formed by connexins) mediated heavy metal-induced cell injury. Finally, our data suggested that skin inflammation is also mediated in part by Gap junction-mediated signal transductions, and further studies are required to definitely demonstrate such signaling pathways in skin inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：内科、免疫学、生体分子、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

コネキシン(Cx)は6量体を形成する膜タンパク質である。20種の遺伝子から成るファミリーを形成しており、組織特異的な発現が認められる。細胞膜上に形成された6量体はイオンやATPなどの低分子を通過させるヘミチャネルとして機能するとともに、隣接する細胞間では、ヘミチャネルはドッキングしてギャップ結合を形成し、セカンドメッセン

ジャーなどの低分子の細胞間移動を介して情報を伝達している。

2003年、Cxと3次構造は似ているが、タンパク質の1次配列に相同性のない3種の遺伝子からなるパネキシン(Px)ファミリーが、マウス、ヒトを含む脊椎動物で発見された。PxとCxによるヘテロのギャップ結合は形成されない。PxはCxを持たない下等生物にも発現しており、Pxヘミチャネル・ギャップ結合はより普

遍的な機能を担って進化上保存されていると考えられる。

Cx ギャップ結合は臓器を構成する細胞の協調的な機能調節に重要な働きをしていると考えられているが、ほとんどが *in vitro* の実験から類推された機能で、*in vivo* での生理的機能・疾患の病態への関与については、不明な点が多い。一方、生体内を移動して機能する種々の免疫・炎症細胞の Cx の機能に関しては、*in vitro* の系を用いてわれわれの報告(Matsue H et al J Immunol 176:181, 2006)を含め散発的に報告されている。しかし、*in vivo* の免疫・炎症反応におけるCxを介する情報伝達の意義は不明である。

Px に関しては、2008年9月現在、PubMedで検索すると56篇の論文しかなく、その研究は黎明期といえる。*in vitro* の機能解析に汎用されてきた Cx ヘミチャネル、ギャップ結合を閉鎖させる阻害剤は、現在では Px の機能も阻害すると考えられている。したがって、それらを用いたこれまでのCx 機能の研究の中には Px の関与が否定できないものが多く含まれている。CxまたはPx膜タンパク質が形成するヘミチャネルは、種々の刺激で細胞内外のイオンや生体低分子を移動させる。一方、隣接する細胞間でCxまたはPxヘミチャネル同士が結合しギャップ結合が形成され、分子量1.2 kD以下の分子が通過する。細胞Aが受け取った情報(I)は、Ca²⁺、IP₃、cAMP、各種活性酸素種(ROS)などのセカンドメッセンジャーに変換され、ギャップ結合を介して細胞 Bに伝達される。そのとき細胞Bは直接情報(I)を受け取る必要はない。

このような機序やまだ解明されていないCxやPxによる情報伝達とその細胞生理学的役割を解明することは、非常に複雑な炎症の新たな側面を解明することになり、皮膚炎症を含むあらゆる臓器の炎症の病態の解明と新たな制御部位を提示することになると考えられる。

2. 研究の目的

免疫・炎症反応、細胞障害に関与する組織固有細胞及び種々の免疫・炎症担当細胞が発現するコネクシン(Cx)、パネキシン(Px)膜タンパク質が形成するヘミチャネル及びギャップ結合による情報伝達が免疫・炎症反応、細胞障害をどのように制御するかを解明する。さらに、Cx、Pxを介した情報伝達の遮断による皮膚免疫・炎症反応、細胞障害の抑制メカニズムを解明し、新しい作用機序の免疫抑制剤・抗炎症剤の実用化を目指す。

3. 研究の方法

In vitro の実験では種々の培養細胞で gap junctional intercellular communication (GJIC)は蛍光色素 Lucifer Yellow (LY)の細胞内への

microinjection とその LY の隣接細胞への移行を顕微鏡下で観測し、GJIC の存在と程度を測定する。コネクシン43をノックアウトした Cx43^{-/-} と野生型の細胞で種々の機能を比較し、Cx43 の関与を検討する。また、Cx43^{-/-} の培養細胞に CD43 遺伝子を transfection させ Cx43 の機能がみられるか測定する。Western blotting, 免疫染色で Cx43 の発現のレベルを評価する。Cx43 に対する siRNA を用いて Cx43 の発現を低下させたときの機能の喪失を検討する。種々のギャップ結合阻害剤で GJIC やヘミチャネルの関与を評価する。種々の下流の情報伝達シグナルをシグナル伝達に関与するタンパクのリン酸化などで評価する。その際、特異的阻害剤を使用し、その関与を同定する。*In vivo* では、マウス耳朶に一時刺激性化学物質を塗布し、炎症を惹起させる実験系で、種々のギャップ結合阻害剤の効果とそのメカニズムを検討する。

4. 研究成果

我々は 2009 年に皮膚由来のマスト細胞の一次培養系の総説(雑誌論文14)で、その有用性を提示した。その後、マウスモデルでヒスタミン非依存性の蕁麻疹において、NLRP3 インフラマソームを介して、マスト細胞が、好中球の遊走と血管の透過性の亢進することを示す際に、皮膚由来と骨髄由来のマスト細胞の差異がないことを示した(雑誌論文13)この系における情報伝達に Px が関与するかは今後の研究課題である。共同研究者の Yao らは、アミノグリコシドによる細胞障害に Cx43 を介した細胞間コミュニケーションが関与することを報告した(雑誌論文9)。これは皮膚以外の細胞を用いたが今後、皮膚の細胞で検討する予定である。すなわち、最重症型蕁麻疹のケラチノサイトの細胞死の拡大に関与していないかを検討する予定である。重金属による細胞障害に Cx43 が関与するヘミチャネルの関与を Cx43^{+/+} と Cx43^{-/-} の線維芽細胞を用いて明らかにした(雑誌論文4)。その傷害には ROS や Jun の活性化が関与していた。また、炎症性サイトカインたとえば IL-1β や TNFα は培養細胞で Cx43 の発現を上昇させる。また、これらのサイトカインは NFκB 依存性の iNOS の発現を上昇させる。iNOS 阻害剤はこれらのサイトカインの Cx43 の発現を抑制した。Cx43 knock-out (Cx43^{-/-}) マウス由来の線維芽細胞は野生型に比べこれらのサイトカインによる iNOS の発現を増強した。ギャップジャンクションを介した炎症の新しい制御の機構を明らかにした(雑誌論文3)。また、一時刺激性皮膚炎マウスモデルでギャップ結合阻害剤の塗布が炎症を抑えるがそのメカニズムを解明中である。

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 14 件)

1. Iwasawa M.T., Togawa Y, Akita F., Kambe N., Matsue H., Yaguchi T, Nishimura K. Kerion celsi due to *Arthroderma incurvatum* infection in a Sri Lankan child: species identification and analysis of area-dependent genetic polymorphism. *Medical Mycology* 39:205-206, 2012 査読有 (DOI: 10.3109/13693786.2012.671968)
2. Ota R., Iwasawa M.T., Ohkusu K., Kambe N., Matsue H. Maximum growth temperature test for cutaneous mycobacterium chelonae predicts the efficacy of thermal therapy. *J Dermatol*: 39 205-206, 2012. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1346-8138.2011.01246.x)
3. Li K, Yao J., Sh L, Sawada N, Chi Y, Yan Q, Matsue H., Kitamura M, and Takeda M. Reciprocal regulation between proinflammatory cytokine-induced iNOS and connexin43 in bladder smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 286: 41552-41562, 2011. 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.M111.274449)
4. Fang, X., Huang, T., Zhu, Y., Yan, Q., Chi, Y., Jiang, J.X., Wang, P., Matsue, H., Kitamura, M., Yao, J. Connexin43 hemichannels contribute to cadmium-induced oxidative stress and cell injury. *Antioxidants and Redox Signaling* 14: 2427-2439, 2011. 査読有 (DOI: 10.1089/ars.2010.3150)
5. Chi Y, Li K, Yan Q, Koizumi S, Shi L, Takahashi S, Zhu Y, Matsue H., Takeda M, Kitamura M and Yao J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMPK. *J Pharmacol Exp Ther* 339:257-66, 2011. 査読有 (DOI: 10.1124/jpet.111.183020)
6. Kimura A., Kambe N., Satoh T., Togawa Y., Suehiro K., Matsue, H. Follicular keratosis and bullous formation are typical signs of extragenital lichen sclerosus. *J Dermatol* 38 834-836, 2011. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1346-8138.2010.01079.x)
7. Kambe N., Satoh T, Nakamura Y, Iwasawa M, Matsue H. Autoinflammatory diseases and the inflammasome: mechanisms of IL-1 beta activation leading to neutrophil-rich

skin disorders. *Inflammation and Regeneration* 31-1: (invited review article)72-80, 2011.(DOCなし)

8. Iwasawa M.T., Togawa Y., Kamada N., Kambe N., Matsue H., Yazawa K., Yaguchi T., Mikami Y. Lymphocutaneous Type of Nocardiosis Caused by *Nocardia vinacea* in a Patient with Polymyositis. *Mycopathologia* 172: 47-53, 2011. 査読有 (DOI: 10.1007/s11046-011-9391-0)
9. Yao, J., Huang, T., Fang, X., Chi, Y., Zhu, Y., Wan, Y., Matsue, H., Kitamura, M. Disruption of gap junctions attenuates aminoglycoside-elicited renal tubular cell injury. *Brit J Pharmacol* 160: 2055-2068, 2010. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00860.x)
10. Togawa Y., Nakamura, Y., Kamada, N., Kambe, N., Takahashi, Y., Matsue, H. Melanoma in association with acquired melanocytic nevus in Japan: A review of cases in the literature. *Int J Dermatol* 49: 1362-1367, 2010. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1365-4632.2010.04602.x)
11. Kamada N., Yoneyama K., Togawa Y., Suehiro K., Shinkai, H., Yokota, M., Matsuda K., Oda, S., Hirasawa, H., Matsue, H. Toxic epidermal necrolysis with severe hyperbilirubinemia: Complete re-epithelialization after bilirubin reduction therapies. *J Dermatol* 37: 534-536, 2010. 査読有 (DOI: 10.1111/j.1346-8138.2009.00770.x)
12. 松江弘之 (2010) 皮膚の免疫学—肥満細胞と好塩基球. 日本皮膚科学会雑誌. 120: 2171-4. 査読無 (DOCなし)
13. Nakamura, Y., Kambe, N., Saito, M., Nishikomori, R., Kim, Y.-G., Murakami, M., Núñez, G., Matsue, H. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med* 206: 査読有, 1037-1046, 2009. (DOI: 10.1084/jem.20082179)
14. Matsue H., Kambe N., Shimada S. Murine fetal skin-derived cultured mast cells: A useful tool for discovering novel functions of skin mast cells. (Review Article) *J Invest Dermatol* 129: 査読有, 1120-1125, 2009. (DOI: 10.1038/jid.2009.44)

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Satoh T, Kambe N, Matsue H (2011) Oligomerization of NLRP3 is induced downstream of cathepsin B in NLRP3-induced rapid programmed cell death
(第 40 回日本免疫学会学術集会, 11 月 27-29, 千葉市)
2. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2011) Homopolymerization of ASC using FKBP12 chimeric protein induced rapid cell death accompanied with IL-1 beta processing (41st Annual ESDR Meeting, 2011. Sep 7-10, Barcelona, Spain)
3. Kambe N, Satoh T, Matsue H. (2011) Peripheral CD14+ monocytes from early-onset sarcoidosis associated with NOD2 mutation do not show the molecular signature of NF-kappa B signaling (41st Annual ESDR Meeting, 2011. Sep 7-10, Barcelona, Spain)
4. Satoh T, Kambe N, Matsue H. (2010) Enhanced NF-kappaB activation with NLRP3 activator correlates with disease activities in cryopyrin-associated periodic syndrome. 40th Annual ESDR Meeting, September 8-11, Helsinki, Finland.
5. Satoh T, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Matsue H. (2010) Enhanced NF-kappaB activation after the stimulation with NLRP3 activator correlates with disease activities in cryopyrin-associated periodic syndrome. Autoinflammation 2010, September 2-6, Amsterdam, The Netherlands.

〔図書〕（計 1 件）

松江弘之, 大塚篤司 「肥満細胞、好塩基球」ページ 3 4 ~ 4 2. ファーストステップ皮膚免疫学 (編著: 戸倉新樹) 中外医学社 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松江 弘之 (Matsue Hiroyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10250424 (2009-2011)

(2) 研究分担者

姚 建 (Yao Jian)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号: 50303128 (2009-2011)

鎌田 憲明 (Kamada Noriaki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00334186 (2009-2010)

神戸 直智 (Kambe Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50335254 (2009-2010)

(3) 連携研究者

鎌田 憲明 (Kamada Noriaki)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00334186 (2011)

神戸 直智 (Kambe Naotomo)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50335254 (2011)