

令和元年6月12日現在

機関番号：10107  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2016～2018  
 課題番号：16K10121  
 研究課題名(和文)ニコチンによる表皮アセチルコリン受容体の活性化は掌蹠膿疱症の発症に関与するのか？  
 研究課題名(英文)The relationship between nicotine-induced epidermal acetylcholine receptor activation and the pathogenesis of palmoplantar pustulosis.

研究代表者  
 岸部 麻里(Kishibe, Mari)  
 旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：90431410  
 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)：掌蹠膿疱症の病態と喫煙の関連性について、ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化が表皮の恒常性と炎症反応にどのような影響を与えるか、ニコチン長期暴露したヒト表皮角化細胞とヒト汗腺細胞を用いて検討した。ニコチン長期刺激は、表皮のバリア機能形成に関わる分子の発現を抑制した。さらに、TNF- $\alpha$  反応性前炎症性サイトカインの産生を増加させ、炎症反応を増強させる可能性が明らかになった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

煙草に含まれるニコチンによって表皮角化細胞および汗腺細胞に発現するニコチン酸アセチルコリン受容体(nAChR)が活性化されます。長期間、活性化状態が続くと、細胞同士を接着する分子が低下し、抗菌活性物質なども低下します。一方、炎症を誘導するサイトカインの発現は、炎症刺激により増強することがわかりました。これは、ストレスやニコチンによって活性化されるnAChR経路が、掌蹠膿疱症を代表とする炎症性皮膚疾患の発症および増悪に関連する可能性を示していると考えられます。nAChR受容体を標的とした創薬が期待されません。また、ストレスの回避や禁煙が、疾患の発症と悪化の予防に繋がる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Smoking is widely known to exacerbate the morbidity and the disease severity of the inflammatory skin diseases such as palmoplantar pustulosis. Nicotine, a main component of tobacco, activates nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). We speculated that nicotine can influence the activation and/or expression of nAChRs, and further promote aberrant homeostasis in palmoplantar skin and sweat glands. First, differentiated normal human epidermal keratinocytes and a human sweat gland cell line NCL-SG3 cells were exposed to pathological doses of nicotine from 24 to 96 hours. Prolonged nicotine exposure decreased adhesion molecules in keratinocytes, but not in sweat gland cells. Next, cells were stimulated with TNF- $\alpha$  after nicotine treatment, and then PPP-associated inflammatory cytokines were analyzed. Pretreatment of nicotine significantly increased TNF- $\alpha$ -induced IL-6 and IL-8 in keratinocytes. Nicotine exposure might enhance inflammatory responses in the epidermis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：掌蹠膿疱症 ニコチン 喫煙 ニコチン性アセチルコリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

掌蹠膿疱症 (PPP) は、掌蹠の無菌性膿疱を主体とし、寛解・増悪を繰り返すうちに鱗屑を伴う紅斑性局面を来す難治性の慢性炎症性皮膚疾患である。治療に抵抗性を示し、長期経過をたどる例をしばしば経験し、患者の QOL を損なう。PPP の病因として、喫煙、病巣感染、金属アレルギーなどが指摘されてきた。特に、喫煙歴を有する PPP の割合は 85.5% と高く、特に女性は 93.8% と著明に高率であることが示されている。その機序として、血中 TNF- $\alpha$  の上昇を誘導するなど諸説あるが、十分な検討はなされていない。

タバコの主成分であるニコチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の薬理的アゴニストとして機能する。nAChR は、神経系以外の表皮や掌蹠に豊富なエクリン汗腺・エクリン汗管などの組織でも発現することが明らかにされている。この受容体は 5 つの  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットから構成され、その組み合わせによってサブタイプが形成される。表皮では  $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  サブタイプなどが発現している。

過去に PPP と nAChR の関連についての検討はわずかである。Hagforsen らは、PPP 患者 42% の血清中に抗 nAChR 抗体を検出し、真皮乳頭層の血管内皮細胞に陽性所見を認めることを報告した (Hagforsen et al. *Acta Derm Venereol* 82:2002)。さらに、PPP 患者、健常喫煙者、健常非喫煙者の掌蹠皮膚を採取し、免疫染色にて nAChR の発現について検討したところ、健常者では  $\alpha 3$ nAChR と  $\alpha 7$ nAChR は、表皮では顆粒層表面に陽性であり、エクリン腺およびエクリン汗管に強陽性、血管内皮にも陽性を示すのに対し、PPP では表皮内汗管と顆粒層での  $\alpha 7$ nAChR の発現パターンは変化しており、 $\alpha 3$ nAChR の発現を顆粒球に認めた (Hagforsen et al. *Br J Dermatol* 146:2002)。しかし、nAChR に対する抗体や受容体の発現変化が PPP の発症にどのように関わるかは依然不明のままである。

## 2. 研究の目的

申請者らのグループでは、細菌感染を合併した皮膚創傷治癒において、ニコチン刺激とストレスによって誘導されたアセチルコリンが  $\alpha 7$ nAChR を活性化し、これが Toll-like receptor 2 (TLR2) のシグナル経路を抑制することで、炎症性サイトカインの誘導と抗菌ペプチドの産生が損なわれ、創傷治癒の遅延と易感染症を引き起こすことを明らかにした (Kishibe M, et al. *Int Immunopharmacol*. 2015)。 $\alpha 7$ nAChR の活性化は抗炎症効果を有する反面、炎症の悪化を引き起こすことが報告されており、炎症前のニコチン暴露によって後に生じる炎症が増悪する可能性が示唆されている。さらに  $\alpha 7$ nAChR と発現部位が一致する抗菌ペプチドと KLKs は、PPP でみられる異常な角層剝離と表皮内汗管の閉塞、それに続発する無菌性膿疱の形成に関わる可能性がある (Kaneko et al. *J Dermatol Sci* 67:2012)。

本研究では、ニコチンが表皮もしくは汗腺・汗管に発現する nAChR を活性化することで、炎症性サイトカイン、抗菌ペプチド、KLKs の発現に影響し、PPP の病態形成もしくは疾患の増悪に関与する可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 正常ヒト表皮角化細胞および汗管細胞におけるニコチン刺激後の nAChR の発現検討

過去の報告では、PPP 患者、健常喫煙者、健常非喫煙者の掌蹠皮膚における nAChR の発現には差がみられる。健常者の  $\alpha 7$ nAChR は、表皮では顆粒層表面とエクリン腺およびエクリン汗管に強陽性を示すが、PPP では表皮内汗管と顆粒層の発現パターンは変化している。ニコチン刺激による受容体の発現変化が予想されることから、培養ヒト表皮角化細胞とヒト汗管細胞における nAChR の発現変化を解析する。

#### a. 正常ヒト表皮角化細胞におけるニコチン刺激後の nAChR の発現解析

正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を低カルシウムと高カルシウム条件で培養し、0.001 ~ 1000nM のニコチンを添加する。24 時間後に培養細胞を回収し、定量的 PCR およびウエスタンブロット法、免疫染色を行い、 $\alpha 3$ nAChR および  $\alpha 7$ nAChR の発現に変化がみられるか解析する。

#### b. 正常ヒト汗管細胞におけるニコチン刺激後の nAChR の発現解析

ヒト汗管細胞 (NCL-SG3) を 0.001 ~ 1000nM のニコチンで刺激し、24 時間後に培養細胞を回収し、定量的 PCR およびウエスタンブロット法、免疫染色を行い、 $\alpha 3$ nAChR および  $\alpha 7$ nAChR の発現に変化がみられるか解析する。

### 2. 正常ヒト表皮角化細胞におけるニコチン刺激後の前炎症性サイトカインの発現解析

PPP の病態形成には表皮内汗管の閉塞、血清 TNF- $\alpha$  および IL-17 の上昇、表皮ケラチノサイトからの IL-6、IL-8、抗菌ペプチド (dermcidin, cathelicidin) の産生促進などが膿疱形成に関わるとされている。ニコチン刺激が、ヒト表皮角化細胞からの炎症性サイトカインの産生に影響を与えるか検討する。

#### a. 正常ヒト表皮角化細胞におけるニコチン刺激後の前炎症性サイトカインの発現解析

上記 1a と同様の実験系において、ニコチン刺激後の培養上清と細胞を回収し、培養細胞から産生されるサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-6、IL-8、IL-17、IL-22 等) に変化がみられ

るか RT-PCR、ELISA 法により解析する。

### 3. ニコチン長期暴露が、TNF- $\alpha$ 誘導性炎症反応に及ぼす影響についての検討

7nAChR の活性化は炎症の悪化を引き起こすことが報告されている。動物実験では、ニコチン前投与後にアジュバント誘導性自己免疫性関節炎を起こすと、ニコチン処置のない群に比べ有意に炎症性サイトカインの産生が増加し関節炎が悪化する (Yu et al. *Arthritis & Rheumatism* 63: 2011)。このことは、炎症前のニコチン暴露は、後に生じる炎症を増悪させる可能性を示唆している。表皮角化細胞においても同様の現象がみられるか検討する。

## 4. 研究成果

1. NHEKs と NCL-SG3 をニコチン 0.001-1000nM で 96 時間刺激し、3nAChR および 7nAChR の発現に変化がみられるか、RT-PCR、ウエスタンブロット法、細胞染色により解析を行った。NHEKs と NCL-SG3 の両者において、3nAChR および 7nAChR の発現は、mRNA レベルと蛋白レベルともにニコチン刺激による影響は見られないことを確認した。

過去の報告によると、喫煙者の血中ニコチン濃度は、10-100nM とされることから、以下の実験ではこの濃度を用いた。

2. NHEKs と NCL-SG3 をニコチン 10nM、100nM で 96 時間刺激し、細胞間接着分子、表皮分化マーカー、抗菌ペプチドの発現が変化するか、RT-PCR 法および細胞染色により解析した。ニコチン暴露 96 時間後、NHEKs におけるタイトジャンクション構成分子 (Occludin, Claudin-23, ZO-1)、コルネオデスモシン構成分子 (desmoglein 1, Corneodesmosin)、抗菌ペプチド (Cathelicidin、 $\alpha$ -defensin-2) の発現が有意に低下した。さらに、カリクレイン関連ペプチドの発現も低下していたが、セリンプロテアーゼインヒビターである LEKTI の発現は上昇しており、タンパク分解酵素の活性に変化を生じている可能性が考えられた。一方、NCL-SG3 では、変化がみられないことがわかった。以上から、ニコチン長期暴露は、表皮角化細胞におけるホメオスターシスを変化させるが、汗腺細胞では同様の作用はみられないことがわかった。

3. NHEKs と NCL-SG3 をニコチン 10nM、100nM で 96 時間刺激し、サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17 等) の産生に変化がみられるか RT-PCR、ELISA 法により解析を行った。ニコチン刺激後のみでは、サイトカイン産生に変化を生じないことがわかった。

4. ニコチン長期暴露が、TNF- $\alpha$  誘導性炎症反応を増強するか検討を行った。NHEKs を高 Ca 培地に 10nM もしくは 100nM のニコチンを添加し、72 時間培養した。72 時間後、TNF- $\alpha$  を添加し、その 2、6、8 時間後に培養細胞と上清を回収した。コントロールは、ニコチン前処置のない TNF- $\alpha$  刺激のみを使用した。また、NCL-SG3 も同様に、培地に 10nM もしくは 100nM のニコチンを添加し、72 時間培養した後、TNF- $\alpha$  を添加し、培養細胞と上清を回収した。培養細胞のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17 等) の発現を定量的 RT-PCR で、培養上清を ELISA にて解析した

その結果、ニコチン前処理群の表皮ケラチノサイトでは、有意に IL-6、IL-8 の発現が mRNA およびタンパクレベルで上昇することがわかった。このことから、長期ニコチン暴露は表皮ケラチノサイトにおける TNF- $\alpha$  誘導性炎症を増強させると考えた。一方、汗腺細胞においては、ニコチン長期暴露後の TNF- $\alpha$  刺激は、IL-6、IL-8 の mRNA の変化がみられなかったが、培養上清中には上昇した。以上の結果から、ニコチン長期暴露後の TNF- $\alpha$  刺激は、汗腺細胞のサイトカインの産生を誘導しないが、放出を促進する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Kishibe M, Murakami M, Kurosu T, Shibuya T, Saito N, Igawa I, Uehara J, Honma M, Radek KA, Ishida-Yamamoto A. Impact of nicotine treatment on cultured human sweat gland cells. The 73th Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology (Japan)、2016 年 12 月。

2. Kishibe M, Murakami M, Saito N, Honma M, Radek KA, Ishida-Yamamoto A. Prolonged nicotine exposure altered homeostasis in cultured human keratinocytes. The 75th Annual Meeting of Society of Investigative Dermatology (USA) 2017 年 5 月。

3. 岸部麻里、山本明美. Prolonged nicotine exposure altered homeostasis in epidermal keratinocytes. 第 30 回表皮細胞研究会 (名古屋) 2017 年 11 月。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

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：村上正基  
ローマ字氏名：MASAMOTO MURAKAMI

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。