

平成30年6月19日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19736

研究課題名(和文) 尋常性乾癬における細胞外ATPの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of extracellular ATP in psoriasis

研究代表者

大原 宏司(Ohara, Hiorshi)

奥羽大学・薬学部・助教

研究者番号：30629902

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)：ヒト皮膚三次元モデルにおいて細胞外ATPがEGFファミリー、PTGS2等の乾癬関連遺伝子群を発現させることを明らかにした。また、EGFファミリー受容体下流のRas-ERK経路、PI3K-Akt経路の活性化を確認した。さらに、上記経路とPTGS2の発現経路の関係性について解析を行ったところPTGS2の経時的発現が認められた。本検討により、細胞外ATPが誘導するPTGS2の発現にはRas-ERK経路またはPI3K-Akt経路が関与している可能性が示唆された。細胞外ATPによりこれらの細胞内イベントが制御されているという本研究成果は、乾癬の病態形成や治療法を考える上で重要な知見であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Author revealed that extracellular ATP expresses psoriasis-related gene cluster such as EGF family, PTGS2 and IL-33 in human skin three-dimensional model. Furthermore, author demonstrated that time-dependent activation of Ras-ERK and PI3K-Akt pathway in downstream of EGF family receptor. Author next focused these intracellular signal transduction pathways on the effect of ATP treatment on the protein expression of the PTGS2. As the result, time-dependent expression of PTGS2 by ATP treatment of human skin three-dimensional model. These results suggest that activation of Ras-ERK or PI3K-Akt pathway may be involved in ATP-induced PTGS2. It is conceivable that the finding that extracellular ATP regulates these intracellular signal transductions is important for pathogenesis and therapeutic strategy of psoriasis.

研究分野：医療薬学

キーワード：尋常性乾癬 細胞外ATP EGFファミリー PTGS2

1. 研究開始当初の背景

表皮細胞に物理的・化学的刺激が加わると ATP が細胞外に放出される。ATP は、P2 受容体を介してサイトカイン、ケモカインの産生を促すことが報告されている Danger Signal の一つである。これまでに、尋常性乾癬の悪化に見られるケプネル現象に細胞外 ATP が関与していることを予測し、細胞外 ATP がヒト表皮細胞において IL-6、IL-20 等の産生を誘導する他、STAT3 の活性化を著しく促進させることを世界に先駆けて明らかにしてきた (Ohara et al, J. Dermatol. Sci., 2010)。しかし、本成果は基底層をターゲットとしたものであり、80%を占める上層における細胞外 ATP の機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、より生体皮膚を反映した三次元モデルヒト表皮を用い、細胞外 ATP が誘導する新規バイオマーカー探索と同定により尋常性乾癬の発症・悪化メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞外 ATP が誘導する尋常性乾癬の発症・悪化に関するバイオマーカーの探索と同定

これまでの研究により確立された条件 (Ohara et al, J. Dermatol. Sci., 2010) にて三次元モデルヒト表皮細胞を ATP 処理し RNA の抽出・精製を行い DNA Microarray による網羅的遺伝子解析により尋常性乾癬におけるバイオマーカー探索・同定を行う。

(2) 尋常性乾癬の治療法を指向した本疾患の発症・悪化メカニズムの解明

対照群と比較して発現差異の認められた遺伝子のうち尋常性乾癬の発症・悪化に寄与することが予測されるバイオマーカーを同定し、定量 PCR、Immunoblot、ELISA 等によるバリデーションを行い細胞外 ATP の関与を評価し尋常性乾癬の発症・悪化メカニズムの解明を試みる。

4. 研究成果

三次元モデルヒト表皮を用い、細胞外 ATP が誘導する尋常性乾癬の発症・悪化に関する新規バイオマーカーの探索と同定を試みた。DNA microarray 法による網羅的遺伝子発現解析の結果、延べ 291 遺伝子の有意な発現上昇が認められた (図 1)。

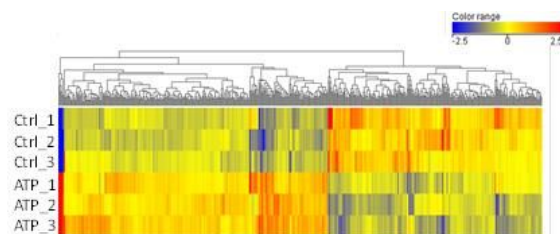


図 1. Clustering analysis of differentially expressed genes in ATP-treated 3D-NHEKs.

さらに、従来のヒト表皮基底層との比較解

析により、HB-EGF、AREG、PTGS2 および IL-33 など、三次元モデルヒト表皮において細胞外 ATP が誘導する新規遺伝子群を明らかにした。興味深いことに、従来の検討で高発現することが分かっている IL-6 の発現は、本検討において認められなかった。

今回新たに見出した遺伝子群は、皮膚における細胞増殖、免疫応答およびアレルギーに関与する因子として知られており、特に上皮成長因子(EGF)ファミリーに属する HB-EGF、AREG は表皮ケラチノサイトのオートクライン増殖因子として機能する一方、尋常性乾癬の病変部において高発現し、病態に深く関与することが報告されている。さらには、EGF 受容体の transactivation によるサイトカイン産生が明らかになっており、EGF ファミリーの炎症性疾患への寄与が分かっている。そこで次に、三次元モデルヒト表皮において EGF ファミリーが惹起する炎症性サイトカインの発現を予測し、尋常性乾癬の憎悪因子として近年注目を集めている IL-33 の誘導に着目した。qRT-PCR 法を用いて HB-EGF、AREG および IL-33 の経時的な mRNA の発現解析を行った結果、HB-EGF、AREG とともに ATP 刺激後、経時的に同一の変動を示し、有意な発現が認められた (図 2)。

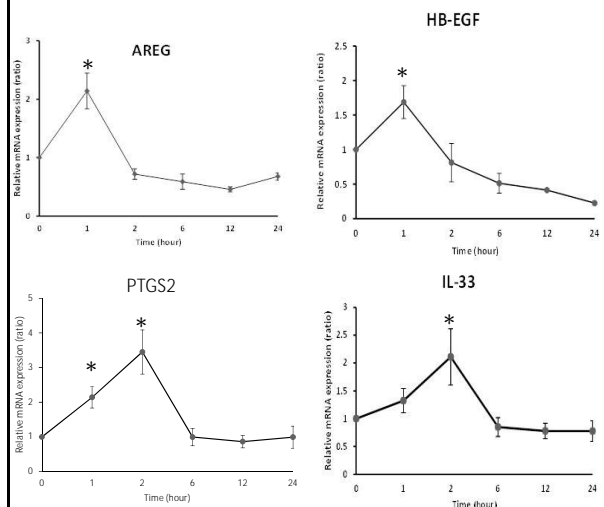


図 2. The quantitative PCR verified the augmentation of mRNA expression in ATP-stimulated 3D-NHEK. The data represent the mean ± S.D. (n=3). Dunnett's test, \*P < 0.01 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

一方、IL-33 の発現は HB-EGF および AREG の発現が消失した後に誘導されることが判明した。これらの結果は、EGF ファミリーによる IL-33 の発現誘導を引き起こす可能性を示唆するものであり、細胞外 ATP が誘導する HB-EGF、AREG および IL-33 は、尋常性乾癬の発症・悪化メカニズム解明に有用な新規バイオマーカーになり得ると考えられる。

EGF ファミリーによって IL-33 の発現を誘導することが示唆されたものの、現段階では

飽くまで現象を捉えたに過ぎず、これらの関連性の詳細は不明である。そこで次に、P2 受容体、EGF 受容体およびその下流シグナル伝達経路の解析に着手した。これまでの知見により、EGF 受容体下流において JAK-STAT 経路、Ras-ERK 経路および PI3K-Akt 経路が見出されている。そこで、細胞外 ATP 処理三次元モデルヒト表皮において活性化されるシグナル伝達経路を immunoblot 法にて確認したところ、Ras-ERK 経路および PI3K-Akt 経路で時間依存的な活性化を誘導した。一方、JAK-STAT 経路の活性化は認められなかった。以前、ヒト表皮の基底層のみをターゲットに細胞外 ATP の機能解析を行った際には主に JAK-STAT 経路の活性化を認めたことから、三次元モデルヒト表皮においては異なる経路を活性化することが明らかとなった。次いで、同法にて IL-33 および PTGS2 のタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、ATP 処理 2 時間以降において PTGS2 の発現が認められた。一方、IL-33 の発現差異を確認することはできなかった。IL-1 ファミリーに属す IL-33 は、通常、核内に恒常的に存在しており、近年、アトピー性皮膚炎や乾癬等の皮膚疾患への関与が報告されている。本検討では、ATP 処理 24 時間後における核タンパク質を試料として用いたが、mRNA の発現は処理後 2 時間でピークを示していることから、24 時間後における発現差異を捉えることができなかった可能性が考えられる。今後は詳細なタイムコースをとることでその経時的発現変化を精査していく予定である。

本検討により、PTGS2 の発現は ATP 処理後時間依存的な亢進が認められたことから、ATP が誘導する PTGS2 の発現には Ras-ERK 経路または PI3K-Akt 経路の活性化が関与している可能性が示唆された。PTGS2 は、PGE<sub>1,2</sub> 等の各プロスタノイドの産生により炎症反応や細胞増殖を惹起する作用を有しており、乾癬の発症や病態悪化への関与が指摘されている。今後は阻害剤を用いた検討により、これらの経路と PTGS2 発現の関係性を追跡していく予定である。Ras-ERK 経路および PI3K-Akt 経路の活性化には細胞増殖や細胞保護作用等が広く知られており、細胞外 ATP によりこれらの細胞内イベントが制御されているという今回の成果は、乾癬や炎症性皮膚疾患の病態形成を考える上で、重要な知見であると考えられた。

## 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 11 件)

1. 中川直人, 村井ユリ子, 小原拓, 大原宏司, 栗田幸代, Leanne Lai: 日本および米国における薬剤師の臨床試験の論文利用に関する比較調査 宮城県およびフロリダ州におけるアンケート調査 . *Jpn. J. Drug Inform.*, 19(4), 180-187 (2018). 査読あり

DOI: <https://doi.org/10.11256/jjdi.19.180>

2. 大原宏司, 倉本敬二, 松崎哲也, 松本香織, 阿部聖, 八巻智也, 伊藤鍛, 東海林徹, 早坂正孝: 含糖酸化鉄注射剤の生理食塩液希釈時とブドウ糖液希釈時における物理化学的安定性の検討. *医薬品相互作用研究*, 42(1), 37-43 (2018). 査読あり

3. Majima T., Ohara H.: Outcomes of Pharmaceutical Faculty-focused Introduction to Nursing Education for Pharmacy Students: A Questionnaire Survey. *Yakugaku Zasshi*, 138(2), 251-258 (2018). 査読あり

DOI: <https://doi.org/10.1248/yakushi.17-00167>

4. Majima T., Sasaki K., Ohara H., Takahashi N.: Eicosapentaenoic acid blocks cyclosporin A-induced pancreatic dysfunction but not immunosuppression. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 7(1), 1-5 (2017). 査読あり

DOI: 10.7324/JAPS.2017.70601

5. 武井佐和子, 大原宏司, 影山美穂, 戸張裕子, 別生伸太郎, 濱田真向, 増田多加子, 大山勝宏, 勝山壮, 井上みち子, 倉本敬二: 先発・後発輸液製剤の物理化学的性質に関する検討(第 2 報) 糖加電解質輸液(3 号液)に関する検討 . *日本注射薬臨床情報学会誌* 6, 25-35 (2017). 査読あり

6. 大原宏司, 松崎哲也, 早坂正孝: ビオチン添加末梢静脈栄養輸液における *Candida albicans* の増殖性に関する研究. *環境感染誌*, 32(1), 29-33 (2017). 査読あり

DOI: <https://doi.org/10.4058/jsei.32.29>

7. 兼平幸宗, 戸上紘平, 小林亮太, 谷本裕幸, 大原宏司, 多田均, 丁野純男: フェキソフェナジンの消化管吸収における配合薬プソイドエフェドリン及び栄養成分の影響. *応用薬理 Oyo Yakuri Pharmacometrics*, 91(3/4), 69-76 (2016). 査読あり

<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ef4oyoya&ye=2016&vo=91&issue=3%2F4>

8. 浅野二未也, 小原拓, 佐藤倫広, 大原宏司, 山口浩明, 早坂正孝, 眞野成康, 村井ユリ子: 出生児の神経管閉鎖障害リスク低下を目的とした葉酸摂取に関する地域の薬剤師の認識と推奨の割合と要因. *医薬品相互作用研究*, 40 (1-2), 14-20 (2016). 査読あり

<http://drug-interaction-research.jp/issues/40-1.html>

9. 高橋敦史, 小原拓, 大原宏司, 佐藤倫広, 浅野二未也, 小野木弘志, 早坂正孝, 佐藤博, 眞野成康, 村井ユリ子: 葉酸による出生児の神経管閉鎖障害リスク低下効果に関する薬学生の認識. *医薬品情報学会誌*, 17(4), 185-191 (2016). 査読あり  
DOI: <https://doi.org/10.11256/jjdi.17.185>

10. 武井佐和子, 大原宏司, 影山美穂, 戸張裕子, 別生伸太郎, 濱田真向, 井上みち子, 三溝和男, 倉本敬二: 先発・後発輸液製剤の物理化学的性質に関する検討. *医薬品相互作用研究*, 39(2), 9-16 (2016). 査読あり  
<http://drug-interaction-research.jp/issues/39-3.html>

11. 大原宏司, 佐藤瑛典, 小原拓, 佐藤大悟, 紺野慈, 早坂正孝, 伊藤鍛, 塩川秀樹: 病院薬剤部における東日本大震災後の防災対策. *日本病院薬剤師会雑誌*, 52(1), 53-58 (2016). 査読あり  
<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=dg4hppha&ye=2016&vo=52&issue=1>

〔学会発表〕(計15件)

1. DNA マイクロアレイ解析による正常ヒト皮膚三次元モデルにおける細胞外 ATP 誘導性免疫応答因子の探索 平成 29 年 12 月 6-9 日 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会) 小針由佳, 大原宏司, 齋藤るみ子, 早坂正孝.

2. お薬手帳の理解度および使用状況調査 イベント参加一般市民と入院患者との比較 平成 29 年 11 月 3-5 日 第 27 回日本医療薬学会 村中太郎, 中村郁子, 倉兼広樹, 清水達矢, 古川奈緒子, 遠藤孝, 澁川真由, 大原宏司, 高橋将喜, 北村哲治.

3. 郡山薬剤師会が考える無菌調剤室の共同利用と今後の課題について 平成 29 年 10 月 29 日 第 22 回福島県薬剤師学会大会 森智之, 山口仁, 阿部崇, 菅原秀樹, 持丸淳, 大原宏司.

4. キビタン健康ネットの普及に関するアンケート調査 平成 29 年 10 月 8-9 日 第 50 回日本薬剤師会学会大会 大原宏司, 菅野瑞季, 早坂正孝, 島貫英二, 町野紳.

5. 末梢静脈輸液における *Candida albicans* の増殖とピオチンの影響 平成 29 年 6 月 25 日 日本医療薬学会第 1 回フレッシュ・カンファランス 落合達也, 松崎哲也, 大原宏司, 早坂正孝.

6. お薬手帳の理解度および使用状況調査 平成 29 年 6 月 10-11 日 日本病院薬剤師会東北ブロック第 7 回学会大会 澁川真由, 大原宏司, 高橋将喜, 北村哲治, 中村郁子.

7. The role of ATP-stimulated three-dimensional normal human epidermal keratinocytes in skin inflammation revealed by DNA microarray analysis 平成 28 年 12 月 9-11 日 The 41st Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology 大原宏司, 齋藤るみ子.

8. 特発性肺線維症における細胞遊走および集積機構の解析 平成 28 年 11 月 30 日-12 月 2 日 第 39 回日本分子生物学会 齋藤捷宜, 大原宏司, 戸上紘平, 安齋凜子, 佐藤安訓, 上野明道, 多田均, 早坂正孝.

9. 福島県における NST 業務の現状調査 平成 28 年 9 月 25 日 第 21 回福島県薬剤師学会大会 黒滝 祐, 大原宏司, 早坂正孝, 塩川秀樹.

10. HPLC 法を用いたジルチアゼム製剤の半割による溶出挙動変動についての検討 平成 28 年 9 月 25 日 第 55 回日本薬学会東北支部大会 那須義行, 大原宏司, 折笠啓介, 吉田健太郎, 柏木良友, 伊藤鍛.

11. 各種メサラジン製剤の溶出挙動についての検討 平成 28 年 9 月 25 日 第 55 回日本薬学会東北支部大会 相川和憲, 大原宏司, 吉田健太郎, 柏木良友, 伊藤鍛.

12. シクロスポリン A による耐糖能異常および体重変動に対する EPA 製剤の併用効果 平成 28 年 9 月 25 日 第 55 回日本薬学会東北支部大会 名取誠也, 大原宏司, 鈴木茂太, 高橋則男, 眞島崇.

13. 細胞外 ATP と TGF- $\beta$ 1 が特発性肺線維症にみられる肺線維芽細胞の遊走能に及ぼす影響の検討 平成 28 年 9 月 25 日 第 55 回日本薬学会東北支部大会 齋藤捷宜, 大原宏司, 戸上紘平, 安齋凜子, 佐藤安訓, 上野明道, 多田均, 早坂正孝.

14. 電解質溶液希釈含糖酸化鉄注射液の pH 変動における不溶性微粒子測定 平成 28 年 9 月 17-19 日 第 26 回日本医療薬学会年会 大原宏司, 倉本敬二, 阿部聖, 松崎哲也, 伊藤鍛, 高橋将喜, 早坂正孝, 東海林徹.

15. ピオチンは末梢静脈栄養液中の *Candida albicans* を増殖させるか? 平成 28 年 5 月 21-22 日 日本病院薬剤師会東北ブロック第 6 回学会大会 松崎哲也, 大原宏司,

早坂正孝.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大原 宏司 (Ohara, Hiroshi)  
奥羽大学・薬学部・助教  
研究者番号：30629902

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )