

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10216

研究課題名(和文) アトピー性皮膚炎におけるバリア破綻がもたらす炎症の惹起機構の解明

研究課題名(英文) Inflammatory mechanism associated with impaired barrier function in atopic dermatitis

研究代表者

山本 真実 (YAMAMOTO, Mami)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60421062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、アトピー性皮膚炎における皮膚バリアの破綻を起点とした炎症の惹起機構の解明を目指し、インフラマゾームに着目した。乾燥状態に関連するインフラマゾームを探索したところ、NOD2が炎症の誘導に、またNLRP10が炎症の抑制に寄与する候補因子として挙げられた。特に、NOD2インフラマゾームは、皮膚バリア破綻により活性化されS100A8/A9産生を促し、p38やGATA3がリン酸化されることを通じて炎症が亢進され、アトピー性皮膚炎の病態に重要な働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の罹患者数は増加傾向にある。これまで炎症反応の抑制にはステロイド外用薬が多用されてきたが、近年、ヒト型抗ヒトIL-4/13受容体モノクローナル抗体などの生物学的製剤が開発され新たな治療選択が出てきている。本研究では、皮膚バリア障害の観点から炎症の惹起機構の解明を目的とし、さらにはその後の慢性化へと至るメカニズムの解明を目指したものであり、アトピー性皮膚炎の新たな治療法の糸口に結び付くものとする。

研究成果の概要(英文)：Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disease associated with impaired barrier function. In this study, we investigated the desiccation-associated inflammasome components and observed that the nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) may induce and the NOD-like receptor family pyrin domain containing 10 (NLRP10) may suppress inflammation. The activated NOD2 inflammasome triggers S100A9 protein synthesis, causes p38 and GATA3 phosphorylation, and promotes inflammation. These results suggest that the NOD2 inflammasome and its downstream effector S100A9 may play important roles in the pathogenesis of atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 インフラマゾーム

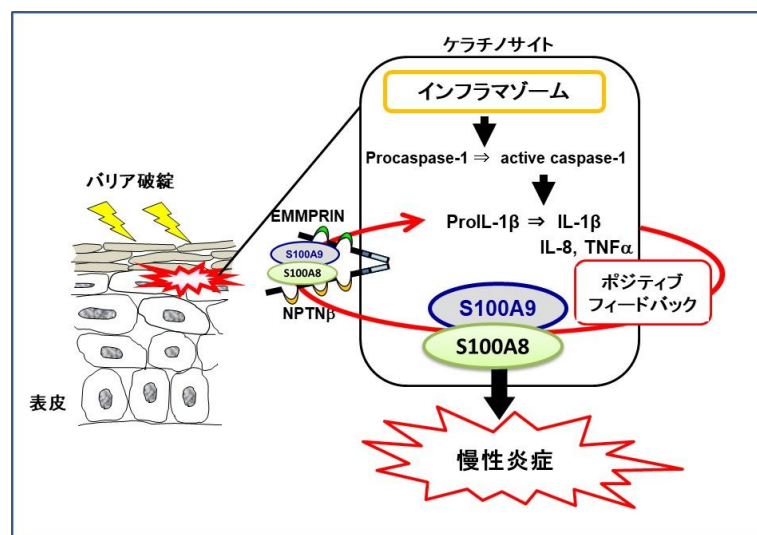
1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の原因の一つとして、フィラグリン遺伝子変異による皮膚バリアの脆弱化が報告されて以降、アトピー性皮膚炎は皮膚バリアの破綻を起点とし、その後の抗原暴露により免疫系の異常な活性化が生じるという認識が定着しつつある。我々はこれまでに、皮膚バリア破綻を引き金とする炎症の惹起機構と慢性化へのメカニズム解明がアトピー性皮膚炎の病態解明に重要であると考え検討を進めてきた。

皮膚バリアの恒常性維持には様々な要素が関与しているが、これまでに我々はフィラグリン分解による天然保湿因子 (NMF) の産生機構を明らかにし、カスパーゼ-14、カルパイン 1、プレオマイシン水解酵素が関与していることを報告した (Kamata et al, 2009)。また、表皮特異的メソトリプシンを同定し、表皮の剥離機構に寄与していること、カスパーゼ-14 とともにケラチノサイトの最終分化における脱核に関与していることも明らかにした (Yamamoto et al, 2014, Miyai et al, 2014, Nakanishi et al, 2010)。アトピー性皮膚炎では、これらのプロテアーゼの発現低下を認めることで NMF 産生低下や不全角化などがもたらされ、バリア破綻の一因となり得るものと考えられる。

このような皮膚バリア破綻を引きかねとする炎症の惹起機構として、インフラマゾームに着目した。インフラマゾームは、NOD-like receptor (NLR) family、アダプター蛋白である ASC、procaspase-1 より構成される複合体で、様々な外来性因子の刺激により活性化され、IL-1 β を産生することによって炎症反応を誘導する。NLR family には 23 種類が存在することが知られている。また、Genome-wide association study (GWAS) では、日本人のアトピー性皮膚炎患者の susceptible SNPs の一つとして、OR10A-NLRP10 SNP region (rs878860) が報告されている (Hirota et al, 2012)。

一方、我々は、炎症の慢性化に働く因子として、これまでに S100A8/A9 の存在を明らかにしてきた。共同研究者らにより、S100A8/A9 がケラチノサイトにおいて IL-8, TNF α などの炎症性サイトカインおよびケモカインを誘導し、さらにそれらの因子がケラチノサイトに働き S100A8/A9 の合成・分泌を促すポジティブフィードバック機構を形成することが報告されている (Nukui et al, 2008)。さらに我々は、この炎症性サイトカインの誘導に関わるレセプターを検証した結果、S100A9 の新規レセプターとして EMMPRIN を、S100A8 の新規レセプターとして Neuroplastin β (NPTN β) を同定した (Sakaguchi et al, 2016, Hibino et al, 2013)。S100A8, S100A9 は生体内ではヘテロダイマーを形成するといわれているが、これらの新規レセプター NPTN β 、EMMPRIIN もヘテロダイマーを形成し、細胞増殖と炎症の慢性化に寄与することが示唆された。



2. 研究の目的

本研究では、皮膚バリア破綻に起因する炎症惹起に働くインフラマゾームを同定し、炎症の慢性化に寄与する S100A8/A9 との関係性を明らかにすることによって、炎症の惹起から慢性化に至る一連のプロセスを解明し、慢性炎症性疾患の代表であるアトピー性皮膚炎の病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アトピー性皮膚炎に関与するインフラマゾームの構成要素の検証

培養ケラチノサイトにおいて、空気暴露による乾燥刺激、UV 刺激、過酸化水素刺激など、様々な刺激に伴うインフラマゾームの発現レベルについて qPCR などを用いて検討した。

上記検討の結果挙げられた乾燥状態に起因するインフラマゾームの候補因子について、培養ケラチノサイトにこれらの候補因子を発現させ、どのような細胞変化が生じるかを検証した。

アトピー性皮膚炎の皮膚組織を用いて、上記インフラマゾーム候補因子の発現を免疫染色によって検討した。また、慢性炎症性皮膚疾患の一つである尋常性乾癬についても同様に免疫染色を行い、アトピー性皮膚炎との比較を行った。

(2)アトピー性皮膚炎に関与するインフラマゾーム候補因子と S100A8, S100A9 との関係性の検討

培養ケラチノサイトにおいて、上記インフラマゾーム候補因子を siRNA で抑制した際の、乾燥刺激に伴う S100A8, S100A9 の発現レベルについて、qPCR によって検討した。また、逆にこれらの候補因子を過剰発現させた際の S100A8, S100A9 の発現レベルについても、同様の検討を行った。

(3) S100A8/A9 と NPTN β /EMMPRIN レセプターを介したシグナルの検討

培養ケラチノサイトを S100A8, S100A9 で刺激した際の GATA3 に及ぼす影響について、リン酸化 GATA3 の発現を免疫染色等によって検討した。また、アトピー性皮膚炎の皮膚組織を用いて、これらの発現や局在について検討した。

4 . 研究成果

(1)アトピー性皮膚炎に関与するインフラマゾームの構成要素の検証

アトピー性皮膚炎では乾燥と皮膚バリア障害が病態に関与することから、ケラチノサイトにおいて、空気暴露による乾燥状態に関与するインフラマゾームの構成要素について検討した。培養ケラチノサイトに乾燥刺激、UV 刺激など様々な刺激を加え、ケラチノサイトにおける 23 種類の NLR ファミリーの発現の変化を検討した結果、空気暴露による乾燥状態では NOD2 および NLRP10 の発現が特異的に亢進した。これらの発現パターンは S100A8, S100A9 の発現パターンと類似した動態を示した。そこで、NOD2 および NLRP10 各々をケラチノサイトに過剰発現させると、NLRP10 においては明らかな変化は認められなかったが、NOD2 においては細胞形態に変化を生じ、TUNEL 染色は陽性となった。NOD2 と NLRP10 を共発現させると、NOD2 による細胞へのダメージは抑制され、TUNEL による染色は認められなかった。このことから、NOD2 は炎症の誘導に、NLRP10 は炎症の抑制に寄与する可能性が示唆された。実際、NOD2 は健康皮膚ではほとんど認められないが、アトピー性皮膚炎の皮疹部では顕著に発現が亢進していた。また、NLRP10 は健康皮膚では顆粒層に局在しているが、アトピー性皮膚炎では発現が低下していた。一方、慢性炎症性皮膚疾患の一つである尋常性乾癬では、アトピー性皮膚炎に比べ NOD2 の発現は非常に僅かであり、NOD2 はアトピー性皮膚炎の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2)アトピー性皮膚炎に関与するインフラマゾーム候補因子と S100A8, S100A9 との関係性の検討

培養ケラチノサイトにおいて siRNA を用いて NOD2 をノックダウンすると、乾燥刺激後の S100A8 および S100A9 の発現は有意に抑制された。一方、NOD2 を過剰発現させると、S100A8、S100A9 の発現は亢進した。これらのことから、これらの S100 遺伝子発現はインフラマゾームの下流にある可能性が示唆された。

(3) S100A8/A9 と NPTN β /EMMPRIN レセプターを介したシグナルの検討

我々はこれまでに、培養ケラチノサイトにおいて S100A9 が EMMPRIN レセプターを介して p38 のリン酸化を促すことを報告してきた。転写因子である GATA3 は MAPK ファミリー分子である p38 を介してリン酸化されることが報告されていることから、培養ケラチノサイトを S100A8, S100A9 で刺激した際の GATA3 に及ぼす影響について検討した。その結果、培養ケラチノサイトにおいて S100A9 刺激により GATA3 がリン酸化され、リン酸化 GATA3 が核内に凝集することが確認された。また、免疫染色において健康皮膚組織では S100A9 およびリン酸化 GATA3 はほとんど認められないが、アトピー性皮膚炎の病変部組織では有棘層から顆粒層にかけて S100A9 の発現が亢進しており、その部位でリン酸化 GATA3 が核内に凝集している像が認められ

た。

これらの結果から、皮膚バリア破綻により NOD2 インフラマゾームが活性化され S100A8/A9 産生を促し、p38 や GATA3 がリン酸化されることを通じて炎症が亢進され、アトピー性皮膚炎の病態に重要な働きをしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Hiruma J, Harada K, Motoyama A, Okubo Y, Maeda T, Yamamoto M, Miyai M, Hibino T, Tsuboi R	4. 巻 45
2. 論文標題 Key component of inflammasome, NLR4, was identified in the lesional epidermis of psoriatic patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 971-977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.14478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 阪口政清、山本真実、宮井雅史、木下理恵、村田等、山本健一、森実真、岩月啓氏、許南浩、坪井良治、日比野利彦	4. 巻 67
2. 論文標題 Neuroplastin とextracellular matrix metallo-protease inducerはS100A8/A9に対する機能的な受容体であり、ケラチノサイトの増殖とアトピーの皮膚炎症の増強に関与している	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 594-598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiruma J, Harada K, Motoyama A, Okubo Y, Maeda T, Yamamoto M, Miyai M, Hibino T, Tsuboi R
2. 発表標題 The role of NLR4, a key component of inflammasome, in the pathogenesis of psoriasis
3. 学会等名 第32回表皮細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比留間淳一郎、原田和俊、大久保ゆかり、山本真実、日比野利彦、坪井良治
2. 発表標題 乾癬における特徴的インフラマソームの同定
3. 学会等名 第180回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮井雅史、山本真実、柴田道男、日比野利彦
2. 発表標題 天然保湿因子 (NMF) 産生酵素プレオマイシン水解酵素 (BH) のバリア機能における役割
3. 学会等名 第35回日本美容皮膚科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----