

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：37107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20131

研究課題名（和文）機能未知タンパク質Selenbp1を標的とした新規皮膚炎治療戦略の創成

研究課題名（英文）Creation of a novel dermatitis treatment strategy with Selenbp1

研究代表者

古賀 貴之（Koga, Takayuki）

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80733279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：飲料水にメチオニンを添加することで、アレルギー性接触皮膚炎の症状が軽減されることを見出しました。しかし、その作用の強弱は使用するマウスの系統によって差があり、その系統差の原因として、メチオニン代謝産物であるジメチルグリシンの産生の多寡が影響することを見出しました。さらに、Selenbp1というタンパク質の多寡がこのジメチルグリシン産生に関係することを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果より、必須アミノ酸の一つであるメチオニンがアレルギー性皮膚炎症状を軽減したことから、日ごろの食事によってアレルギー性皮膚炎は軽減可能であることが考えられます。しかし、実際にはメチオニンを日ごろ摂取しているにも関わらずアレルギー性皮膚炎に悩まされている方も多数おられ、この食事を介したアレルギー性皮膚炎の軽減法は十分に発揮できていないことが推察されます。そのため、その軽減法を調節する何らかの因子も考慮する必要があります。この点において、Selenbp1が調節する因子として見いだされたことは新規軽減法の確立の礎となることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：The author has found that the addition of methionine to drinking water reduces the symptoms of allergic contact dermatitis. However, the strength of the effect varied depending on the strain of mice used, and the author found that the strain difference was caused by the amount of dimethylglycine, a methionine metabolite, produced. Furthermore, the author found that the amount of Selenbp1 protein is related to the production of dimethylglycine.

研究分野：衛生薬学

キーワード：アレルギー性接触皮膚炎 メチオニン ジメチルグリシン Selenbp1

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性接触皮膚炎 (Allergic contact dermatitis, ACD) は、化学物質などの原因物質 (アレルゲン) との接触により、かゆみを伴う紅斑などが惹起される皮膚疾患である。その発症機序の特徴から、ACD の発症/進行機構の治療/対処法としてアレルゲンとの接触回避が最も有効とされている。しかし、アレルゲンが身の回りに存在するなど、接触回避が不可能である場合などには、回避以外の機構に基づく対処が必要である。一般にそのような場合には医薬品などが用いられており、現在、臨床では ACD 治療にはステロイドなどの外用薬や抗ヒスタミン薬などの内服薬が汎用されている。しかし、副作用などへの忌避感情などから、より使用が簡便かつ副作用の少ない安全な治療法の確立が求められている。

筆者らは、各種皮膚炎について、経口摂取による安全かつ簡便な新規治療戦略の確立を目指した検討を行っている。その一環として実施したアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた過去の検討において、必須アミノ酸の一種であるメチオニンの恒常的な摂取がアトピー性皮膚炎を抑制することをすでに報告している。しかし、アトピー性皮膚炎以外の皮膚炎へのメチオニンの抑制作用については、不明な点が多く残されている。そこで、筆者らは化学物質 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 塗布により作成する ACD モデルマウスを用いて、メチオニンの恒常的な摂取が ACD 症状に及ぼす影響について検討を行っており、メチオニンの恒常的な摂取は、アトピー性皮膚炎同様、ACD 症状も抑制することを見出している。しかし、その抑制作用の強度にはモデル作成に用いたマウス系統により差がある、すなわち系統差があることを見出している。しかし、そのマウス系統差の機構については明らかにされていない。

2. 研究の目的

一般に、肝臓はメチオニン代謝の主要臓器であり、その機能の変化は生体でのメチオニンの生理作用発現に影響を及ぼすことが強く想定される。そこで、本研究では、上記マウス系統差は肝臓への ACD の影響の差異に起因するとの仮説を立て、ACD と肝臓機能の関係に着目した検討に基づく解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

(1) ACD モデルの作成

6 週齢雄性の各系統のマウスについて、実験 0 および 1 日目 (D0 および D1) に 0.5% DNFB 溶液を除毛した背部に塗布し (11.2 mg/kg)、DNFB への感作を行った。D5、D12 および D19 には 0.3% DNFB 溶液を右耳朶へ塗布し (6.7 mg/kg)、ACD を発症/進行させた。なお、左耳朶には右耳朶に塗布した量と同量の溶媒 (Acetone:Olive oil = 4:1) を塗布し非発症部位とした。ACD 進行度は、DNFB 塗布 24 時間後 (D6、D13 および D20) に、左右耳朶の厚さをマイクロメータ (ミットヨ) にて測定し、その差分を以て肥厚化の評価を行った。また、D20 には炎症に係る生化学的パラメータの測定を行い、ACD 進行度の評価にて行った (図 1A)。

(2) メチオニンならびにジメチルグリシンの恒常的摂取

上記の方法にて作成する ACD モデルマウスについて、メチオニンの恒常的な投与として D0 から D20 にかけて 30 mg/L のメチオニンを含む飲料水を自由摂水させた。ジメチルグリシンについても、0.3 ないし 3 mg/L の濃度について、メチオニンと同様な方法にて投与を行った。

(3) real-time PCR 法

標的遺伝子の発現量解析は real-time PCR 法にて行った。TRIzol 試薬を用いて RNA 抽出後、cDNA 合成を行い、LightCycler® 96 システム (Roche) にて、real-time PCR 測定を行った。標的遺伝子の発現量は、標準 cDNA の連続希釈液を使用して作成した各遺伝子の検量線を用いて算出した。

(4) LC-MS/MS による肝臓中メチオニン代謝産物の定量

肝臓中のメチオニンの代謝物 (ホモシステイン、システイン、タウリン、DMG) 含量は、LC-MS/MS (LCMS-8040; 島津製作所) を用いて定量した。D20 に採取した肝臓を冷生理食塩水にてホモジナイズ後、2 倍量のメタノールにて抽出操作を行い、上層 (水層) を回収した。回収後、溶媒をエバポレータにて除去し、残留物を 0.1% ギ酸に溶解させ LC-MS/MS 装置を用いて分析した。LC の操作条件は以下の通りである: カラム、Intrada Amino Acid (粒子径 3 μm, 2mm × 100mm; Imtakt, 京都); カラム温度、40 °C; サンプル温度、10 °C; 移動相、100 mM ギ酸アンモニウム含有水 (溶剤 A) および 0.1% ギ酸含有アセトニトリル; 流速、0.3mL/min。溶出プログラム (B の割合 [分]) は以下の通りである: 86% (0~3 分)、86%~0% (3~10 分)、0~86% (10~11 分)、86% (11~15 分)。質量分析は、エレクトロスプレーイオン化法により、ポジティブイオンモードの multiple reaction monitoring (MRM) にて実施した。

4. 研究成果

(1) メチオニンによる ACD 抑制作用のマウス系統差に寄与する要因の探索

筆者らは、まずマウス系統差について、メチオニンによる ACD 抑制作用が観察される系統と

観察されない系統の特定を行った(図1)。本研究で使用したマウス系統のうち、BALB/c、DBA/2 および ddY ではメチオニンの恒常的な摂取による ACD の抑制効果が観察された(以下、感受性マウス; 図 1B-D、青色)。一方、C57BL/6J や ICR では、メチオニンによる ACD 抑制効果は観察されなかった(以下、非感受性マウス; 図 1E および F、赤色)。これらの結果は、マウス特有の特徴のうち、少なくとも毛の色などの外観的特徴や inbred/outbred の遺伝的統御などには起因しないことが明らかとなった。

メチオニンは主として肝臓で代謝され、その代謝経路には、betaine-homocysteine S-methyltransferase (Bhmt)、methionine adenosyltransferase 2A (Mat2a)、methionine synthase (Mtr) など多くの酵素が関与することが知られている(図2A)。そこで筆者らは、図1で示したメチオニンの ACD 抑制作用のマウス系統差がこのメチオニン代謝経路への ACD の影響の系統差に起因するとの仮説を立て、肝メチオニン代謝酵素発現量への ACD ならびにメチオニン投与の影響の解析を行った(図2)。その結果、非感受性マウスでは、非発症コントロール(non-treated control, NTC)と比較して ACD による Bhmt 発現抑制が観察されたのに対し、ACD 抑制作用が観察された感受性マウスでは同様な発現抑制は認められなかった(図2B)。一方、その他のメチオニン代謝酵素の発現量は、感受性マウスもしくは非感受性マウスに共通した変化は観察されなかった(図2C および D)。さらに、この結果と呼応して、メチオニン代謝産物のうち、

Bhmt による代謝産物であるジメチルグリシン含量のみ、ACD による減少が非感受性マウスにおいて共通して観察された(図2E)。これらの結果より、非感受性マウスで共通して観察された ACD による Bhmt 発現抑制ならびにその結果生じるジメチルグリシンの減少は、メチオニンによる ACD 抑制作用のマウス系統差に寄与する可能性が示唆された。実際、ジメチルグリシンの投与は、非感受性マウスにおいて ACD を抑制することが確認されている(Koga et al., 2023)。

(2) ACD による肝 Bhmt 発現抑制の機構解明

次に、筆者らは ACD が肝 Bhmt 発現を抑制する機構、すなわち皮膚-肝連関に寄与する因子の探索を行った。その過程で、肝 Selenium binding protein 1 (Selenbp1) 発現量が、感受性マウスでのみ ACD によって低下することを見出した(図3A)。Selenbp はがん抑制遺伝子としての働きが報告されているが、ヒトでは SELEBP1 のみが存在するのに対し、マウスではアミノ酸配列が似た Selenbp1 と Selenbp2 が存在し、お互いに相補的に作用していると推測されているタンパク質である。

本研究で使用した DNFB 塗布に基づく ACD モデルマウス(DNFB マウス)において、耳朶、すなわち炎症部位では感受性マウス・非感受性マウス共に ACD による Selenbp1 の有意な発現抑制が観察された。一方、肝臓においては、感受性マウスでは ACD による Selenbp1 および Selenbp2 両方の発現抑制が観察されたのに対し(図3A 青色)、非感受性マウスでは Selenbp2 のみ発現が抑制され、Selenbp1 発現量は抑制されなかった(図3A 赤色)。なお、これらは他の感受性・非感

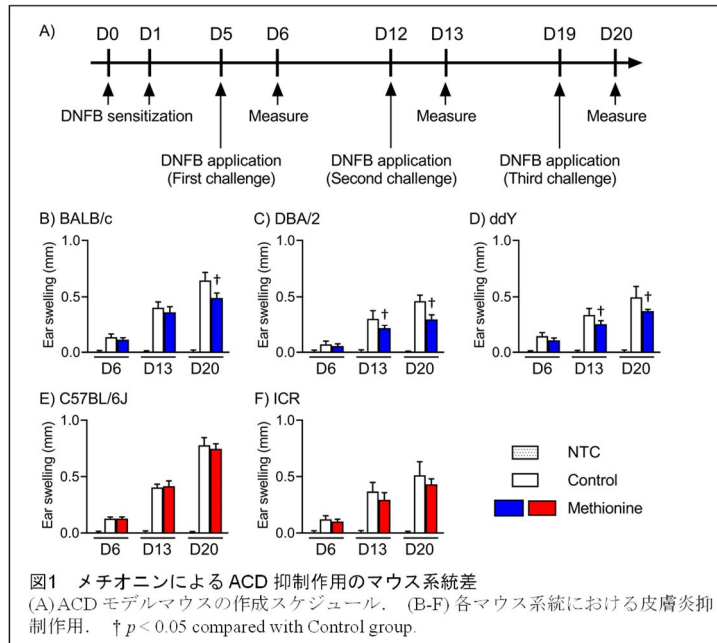


図1 メチオニンによる ACD 抑制作用のマウス系統差 (A) ACD モデルマウスの作成スケジュール。(B-F) 各マウス系統における皮膚炎抑制作用。† $p < 0.05$ compared with Control group.

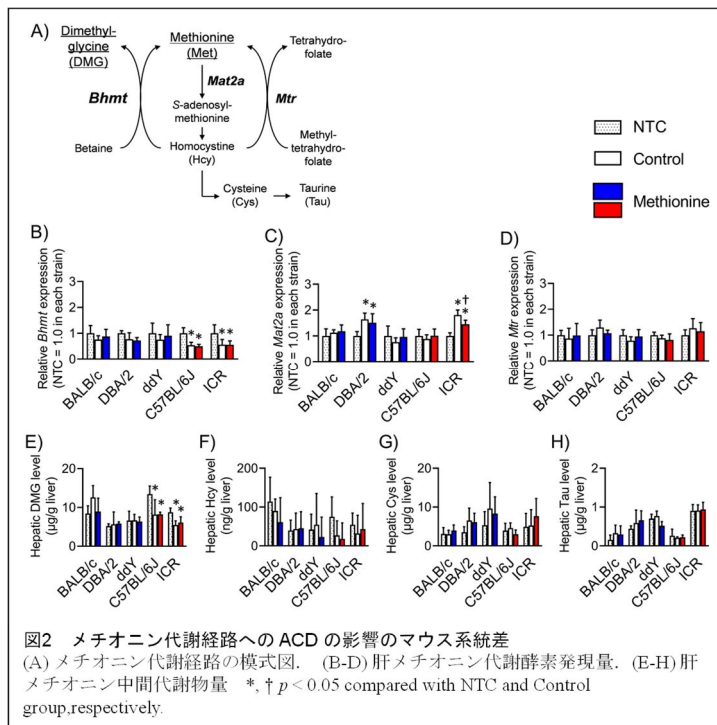


図2 メチオニン代謝経路への ACD の影響のマウス系統差 (A) メチオニン代謝経路の模式図。(B-D) 肝メチオニン代謝酵素発現量。(E-H) 肝メチオニン中間代謝物量。*、† $p < 0.05$ compared with NTC and Control group, respectively.

受性マウスにも共通の事象であることが確認されている（データ未掲載）。これらの結果より、ACDによる Selenbp1/2 発現量への影響のうち、特に「肝臓の Selenbp1 への影響のマウス系統差」は、「メチオニンによる ACD 抑制作用のマウス系統差」と関連していることが推察されたため、肝 Selenbp1 が ACD 抑制作用のマウス系統差と関連があることが強く推察された。

そこで、非感受性マウスである C57BL/6J マウスを遺伝的背景にもつ Selenbp1 欠損マウス (Selenbp1^{-/-}マウス；図中 (-/-)) を用いて、皮膚への DNFB 塗布による ACD が肝 Bhmt 発現量に及ぼす影響を観察した (図 3B)。上述の通り、C57BL/6J を含めた非感受性マウスは ACD により肝 Bhmt 発現量が低下するが (図 2B)、野生型でも同様の現象は確認された (図 3B; +/+)。一方、Selenbp1 の欠損は ACD による肝 Bhmt 発現抑制を有意に軽減した (図 3B; -/-)。これらの結果より、Selenbp1 欠損により ACD による Bhmt 発現抑制作用が消失したことから、Selenbp1 は ACD による Bhmt 発現抑制に対して、促進的に作用することが示唆された。

上述の通り、非感受性マウスでは ACD により肝 Bhmt 発現が抑制されるのに対し、感受性マウスでは Bhmt 発現抑制は観察されていない (図 2B)。感受性マウスと同様に、Selenbp1 欠損マウスにおいても ACD による Bhmt 発現抑制は観察されないことから (図 3B)、Selenbp1 欠損マウスではメチオニンによる ACD 抑制作用が観察と推測された。実際、Selenbp1 欠損マウスでは、野生型マウス (C57BL/6J; 非感受性マウス) とは異なり、メチオニンによる有意な ACD 抑制作用が観察された (図 4)。

これらの結果より、メチオニンによる ACD 抑制作用のマウス系統差は Selenbp1 を起点とした Bhmt 発現制御、およびその下流のジメチルグリシン産生抑制の系統差に起因することが示唆された。

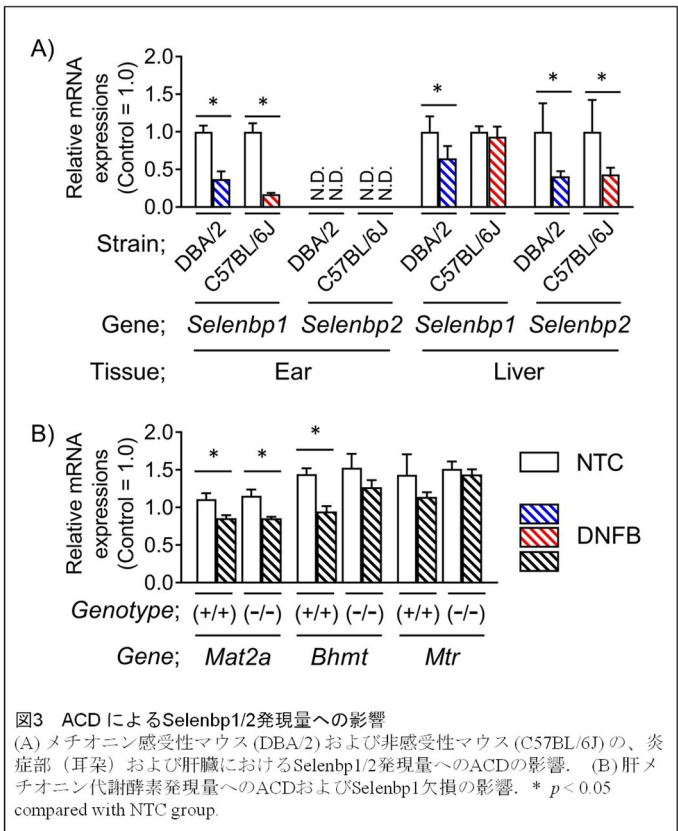


図3 ACDによるSelenbp1/2発現量への影響 (A)メチオニン感受性マウス(DBA/2)および非感受性マウス(C57BL/6J)の、炎症部(耳)および肝臓におけるSelenbp1/2発現量へのACDの影響。(B)肝メチオニン代謝酵素発現量へのACDおよびSelenbp1欠損の影響。* p < 0.05 compared with NTC group.

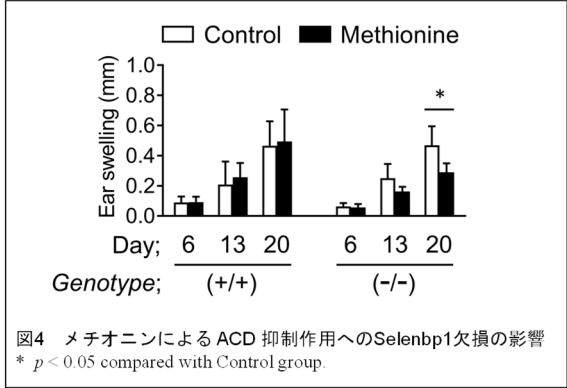


図4 メチオニンによるACD抑制作用へのSelenbp1欠損の影響 * p < 0.05 compared with Control group.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Koga Takayuki, Inoue Kie, Hirayama Fuka, Hiromura Makoto, Fujii Kiyonaga, Ishii Yuji, Hirao-Suzuki Masayo, Takeda Shuso, Toda Akihisa, Soeda Fumio	4. 巻 -
2. 論文標題 Dimethylglycine, a methionine metabolite, participates in the suppressive effect of methionine on 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene-induced dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀 貴之, 廣村 信, 宋 穎霞, 石井 祐次, 平尾 雅代, 竹田 修三, 石田 卓已, 小武家 優子, 戸田 晶久, 副田 二三夫
2. 発表標題 メチオニンによるアレルギー性皮膚炎の制御におけるSelenbp1の寄与機構の解明
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀 貴之, 廣村 信, 平尾 雅代, 竹田 修三, 石田 卓已, 石井 祐次, 小武家 優子, 戸田 晶久, 副田 二三夫
2. 発表標題 アレルギー性皮膚炎における肝メチオニン代謝酵素Bhmtの寄与の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀 貴之, 廣村 信, 宋 穎霞, 武田 知起, 石井 祐次, 石田 卓已, 小武家 優子, 副田 二三夫, 戸田 晶久
2. 発表標題 アレルギー性接触皮膚炎へのセレン結合性タンパク質1 (Selenbp1) の寄与
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀 貴之、廣村 信、宋 穎霞、石井 祐次、石田 卓巳、小武家 優子、副田 二三夫、戸田 晶久
2. 発表標題 セレン結合性タンパク質1 (Selenbp1)のアレルギー性皮膚炎重症化への寄与の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀 貴之、平山 芙蓉、石井 祐次、廣村 信、副田 二三夫、戸田 晶久
2. 発表標題 アレルギー性皮膚炎による肝臓アミノ酸代謝かく乱のマウス系統差の解析
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀 貴之、廣村 信、石井 祐次、副田 二三夫、戸田 晶久
2. 発表標題 メチオニン代謝産物によるアレルギー性皮膚炎抑制作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------