

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15252

研究課題名（和文）低酸素シグナルによるエピジェネティック変化を介した TSLP 発現抑制機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism of TSLP suppression by hypoxia signal-induced epigenetic gene regulation

研究代表者

瀬川 良佑（Segawa, Ryosuke）

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20725296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PHD 阻害薬がアレルギー増悪化因子である TSLP の発現を抑制するメカニズムを解明することを目的とした。PHD 阻害薬は、ヒト表皮角化細胞株において HIF および HDAC を介して DUSP タンパク質の発現を誘導することを見出した。さらに、この DUSP 発現の誘導は、TSLP 発現に寄与する JNK/AP-1 シグナル伝達を抑制することも明らかとした。加えて、PHD阻害薬がマウスアレルギー感作モデルにおいて TSLP 産生を阻害することも見出した。これらの知見から、PHD阻害薬の抗アレルギー効果とその詳細な作用機序を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は皮膚の表皮の恒常性維持に重要な HIF の活性化がアレルギー性免疫応答の誘導因子である TSLP 発現を抑制する機序を解明した。これは皮膚の持つ免疫制御機構の理解につながる。また、HIF の活性化を誘導する PHD 阻害薬がアレルギー感作を抑制する作用を持つことを明らかにしており、PHD 阻害薬のアレルギー治療への応用性を示唆できた。これにより、既に腎性貧血に対して臨床応用されている PHD 阻害薬の新たな治療応用への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism by which PHD inhibitors suppress TSLP expression. PHD inhibitors induce DUSP protein expressions through HIF and HDAC activation in a human keratinocyte cell line. Induction of DUSP expression suppresses JNK/AP-1 signaling that contributes to TSLP expression. In addition, we found that PHD inhibitors inhibited TSLP production in a mouse allergic sensitization model. From these findings, we have clarified the anti-allergic effect of PHD inhibitors and its detail mechanisms of action.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：低酸素 HIF TSLP アトピー性皮膚炎 ケラチノサイト JNK PHD 阻害薬

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は10人に1人と高罹患率を持つアレルギー疾患の一つであり、かゆみや不眠による集中力の低下、外見の変貌によるうつ症状の誘発により罹患者のQOLを低下させる。アトピー性皮膚炎の発症機構は遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合っていることから未だ完全に解明できておらず、治療にはステロイド等の免疫制御薬剤による継続的な治療が主体となっている。そのため治療満足度は50%程度と高くなく、アトピー性皮膚炎を予防もしくは根本から治療する新たな方法の確立が求められている。表皮細胞から産生される Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は強いアレルギー性免疫応答の誘導作用を持ち、TSLP 産生の抑制が新たなアトピー性皮膚炎治療戦略となり得る。低酸素シグナルは酸素を利用する酵素群の活性低下に応じて生じる生体反応であり、皮膚表皮組織では血管が届かないため、特異的に低酸素シグナルが活性化し、バリアタンパク質の産生等の表皮組織の機能維持に欠かせない役割を果たしている。申請者は低酸素応答の誘導が TSLP 発現に抑制的に作用することを見出していたが、その詳細なメカニズムは不明であった。また低酸素応答の誘導により抗アレルギー作用を示すかどうかも明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では低酸素応答誘導化合物として既に臨床応用されている HIF-プロリン水酸化酵素阻害薬 (PHD 阻害薬) を利用し、PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制作用発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、マウスアレルギー感作モデルを応用し、PHD 阻害薬の抗アレルギー作用の有無について評価することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種 TSLP 発現誘導刺激に対する PHD 阻害薬の作用評価

ヒト表皮ケラチノサイト株 HaCaT において、TSLP 発現誘導刺激として、炎症性サイトカインの TNF- α 、TLR2 アゴニスト FSL-1、PAR2 受容体アゴニストを用い、各刺激に対する PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用を RT-qPCR により評価した。PHD 阻害薬は各種刺激の24時間前から処置を行った。PHD 阻害薬としては Enarodustat を用いた。

(2) siRNA ノックダウン法を用いた低酸素誘導因子 HIF1、HIF2 の TSLP 発現抑制作用への寄与の解明

HaCaT 細胞において siRNA により低酸素誘導因子 HIF1 および HIF2 を単独もしくは同時にノックダウンした。各ノックダウン条件下における PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制作用を RT-qPCR により解析した。TSLP 発現誘導刺激として FSL-1 を用いた。

(3) PHD 阻害薬処置が影響を及ぼす TSLP 発現誘導シグナル経路の同定

主要な TSLP 発現誘導に寄与する転写因子である NF- κ B および AP-1 の阻害剤処置下において、PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制作用を RT-qPCR により解析した。さらに、FSL-1 単独刺激群と FSL-1+PHD 阻害薬処置群における各種シグナル伝達因子活性化の差についてウェスタンブロット法を用いて比較検討を行った。

(4) MAPK 脱リン酸化酵素 DUSP ファミリーの発現量に対する PHD 阻害薬の影響の検討

PHD 阻害薬処置後の DUSP ファミリーの mRNA 発現量変化を RT-qPCR により網羅的に解析した。さらに、PHD 阻害薬処置により誘導がみられた DUSP については HIF1、2 のノックダウン時の発現誘導量変化の解析を行った。

(5) PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制に寄与するエピジェネティック制御因子の同定

HIF はエピジェネティックな転写制御を行うことが報告されていることから、各種エピジェネティック制御因子阻害剤処置による PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制作用への影響を RT-qPCR により解析した。また TSLP 発現抑制作用を減弱させた阻害剤については DUSP 発現誘導に対する影響も併せて解析した。

(6) 空気嚢型卵白アルブミン (OVA) アレルゲン感作モデルを用いた PHD 阻害薬の抗アレルギー作用の評価

図1のプロトコールにより空気嚢型 OVA 感作モデルを作成し、OVA と同時に PHD 阻害薬である Roxadustat もしくは Enarodustat を 0.3 mM の濃度で共処置した。処置 8 時間後の空気嚢内液を回収し、空気嚢内液中の TSLP

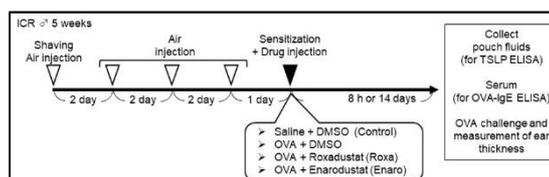


図1 空気嚢型 OVA 感作モデルのプロトコール

産生量を ELISA 法により測定した。また処置 14 日後に耳介皮内に OVA を投与することでアレルギー反応を惹起し、耳介皮膚肥厚の経時的变化を各群で測定した。さらに処置 14 日後の各群における血清中 OVA-IgE 濃度を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 各種 TSLP 発現誘導刺激に対する PHD 阻害薬の作用評価

HaCaT 細胞株において PHD 阻害薬処置が特に FSL-1 刺激による TSLP 発現誘導を有意に抑制することが明らかとなった。そこで、以降の検討では、FSL-1 刺激による TSLP 発現誘導に対する PHD 阻害薬の抑制作用機構に着目し、検討を進めた。

(2) siRNA ノックダウン法を用いた低酸素誘導因子 HIF1、HIF2 の TSLP 発現抑制作用への寄与の解明

HIF1、HIF2 の単独もしくは同時にノックダウンした条件下における PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用を検討したところ、HIF1 および HIF2 を同時にノックダウンした条件でのみ、PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用がキャンセルされた。このことから、PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制には HIF1、2 の両方が機能していることが示唆された。

(3) PHD 阻害薬処置が影響を及ぼす TSLP 発現誘導シグナル経路の同定

FSL-1 刺激による TSLP 発現誘導に寄与する転写因子として NF- κ B と AP-1 の寄与が考えられた。そこで NF- κ B 阻害剤もしくは AP-1 阻害剤処置下における PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用の変化について検討した所、AP-1 阻害剤処置下において PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用が減弱することが明らかとなった。このことから PHD 阻害薬処置が AP-1 の活性化に寄与すると考え、AP-1 活性化の上流に位置する MAPK シグナル (ERK, JNK, p38) のリン酸化に対する PHD 阻害薬処置の影響をウェスタンブロットで評価したところ、JNK のリン酸化が PHD 阻害薬処置により減弱することが明らかとなった。以上より PHD 阻害薬は FSL-1 刺激後の JNK/AP-1 経路の活性化を抑制していることが示唆された。

(4) MAPK 脱リン酸化酵素 DUSP ファミリーの発現量に対する PHD 阻害薬の影響の検討

PHD 阻害薬処置により JNK のリン酸化が抑制されたことに加え、以前の検討から PHD 阻害薬の前処置時間依存的に TSLP 発現抑制作用が増強することが示唆されていたため、JNK のリン酸化を抑制するタンパク質の発現誘導を介した作用機構を想定した。そこで JNK の脱リン酸化酵素として働く DUSP ファミリータンパク質の発現誘導に着目し、PHD 阻害薬処置による各 DUSP ファミリーの mRNA 発現変動について網羅的に解析した。その結果、DUSP1, 6 を含めるいくつかの DUSP ファミリーの遺伝子発現が PHD 阻害薬処置により上昇することが明らかとなった。さらに、これらの発現誘導は HIF1、HIF2 のノックダウンにより減弱することも明らかとなった。

(5) PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制に寄与するエピジェネティック制御因子の同定

低酸素応答誘導時には様々なエピジェネティック制御因子の活性が変動し、それにより種々の生理反応が生じることが報告されている。そこで、今回 PHD 阻害薬による TSLP 発現抑制作用に対して HDAC 阻害剤を含めた数種のエピジェネティック制御因子の阻害剤共処置の影響を評価したところ、HDAC 阻害剤 TSA 処置下で PHD 阻害薬の TSLP 発現抑制作用が減弱することが明らかとなった。さらに TSA 処置下では DUSP ファミリー遺伝子の発現誘導も抑制されることが明らかとなった。以上(1)-(5)の検討により PHD 阻害薬は HIF1、HIF2、HDAC の協働により DUSP ファミリーの発現誘導を行い、FSL-1 刺激下流の JNK/AP-1 経路を抑制することで、TSLP 発現抑制作用を発揮することが示唆された。

(6) 空気嚢型卵白アルブミン (OVA) アレルゲン感作モデルを用いた PHD 阻害薬の抗アレルギー作用の評価

空気嚢型 OVA アレルゲン感作モデルを用いて、マウス個体における TSLP 産生に対する PHD 阻害薬の効果および抗アレルギー作用の評価を行った。その結果、OVA と同時に PHD 阻害薬を共処置することで、8 時間後の空気嚢内液中の TSLP 産生量が有意に抑制されることが明らかとなった。さらに、共処置 14 日後では血清中の抗 OVA-IgE 抗体量が PHD 阻害薬処置により有意に低下し、耳介皮内への OVA 投与時の耳介肥厚も PHD 阻害薬共処置群において有意に抑制された。このことから、マウス個体においても PHD 阻害薬処置が TSLP 産生抑制作用を示すこと、さらに抗アレルギー作用を示すことが明らかとなった。今後、PHD 阻害薬処置時の皮膚免疫応答の変化の解析やアトピー性皮膚炎における治療効果を評価することを予定している。

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 Ryosuke Segawa, Takuya Kyoda, Makiko Yagisawa, Tadanobu Muramatsu, Masahiro Hiratsuka, Noriyasu Hirasawa	4. 巻 118
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors suppressed thymic stromal lymphopoietin production and allergic responses in a mouse air-pouch-type ovalbumin sensitization model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	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） 10.1016/j.intimp.2023.110127.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木澤蒔子、田代尚之、瀬川良佑、平澤典保
2. 発表標題 Analysis of the mechanism by which TSLP production is inhibited by PHD inhibitors
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------