

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380184

研究課題名(和文)ケラチノサイトを介したランゲルハンス細胞活性化機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文)The mechanism of activation of Langerhans cells mediated by keratinocytes

研究代表者

前田 貞俊 (MAEDA, SADATOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50377694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円、(間接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハウスダストマイト抗原(HDM)は犬ケラチノサイトにおけるGM-CSFの産生を誘導し、その産生はシステインプロテアーゼ阻害薬によって阻害された。したがって、HDMによって活性化された犬ケラチノサイトにおけるGM-CSFの産生にはシステインプロテアーゼが重要であることが示された。

天然由来のシステインプロテアーゼであるパパインはNFATの核内移行を誘導した。シクロスポリンによるNFATの阻害によってGM-CSFの産生は部分的に抑制されたことから、システインプロテアーゼを介した犬ケラチノサイトにおけるGM-CSFの産生にはNFATのみならず未知のシグナル伝達系の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The results indicated that the stimulation with house dust mite antigen (HDM) induced the production of GM-CSF in canine keratinocytes, which was suppressed by a cysteine protease inhibitor. Thus, it was demonstrated that cysteine protease activity was essential for GM-CSF production in canine keratinocytes activated by HDM.

Papain that was a naturally derived cysteine protease induced nuclear translocation of NFAT. GM-CSF production was partially inhibited by blockade of NFAT with cyclosporin. These results suggest that GM-CSF production mediated by the cysteine protease is regulated not only by NFAT but also by unknown signaling pathways in canine keratinocytes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：アレルギー・ぜんそく 獣医学 トランスレーショナルリサーチ アトピー性皮膚炎 ケラチノサイト

1. 研究開始当初の背景

イヌのアトピー性皮膚炎(AD)に対する治療は、ステロイドを用いた対症療法に終始しているのが現状である。ステロイドは安価ではあるが、長期投薬によって副作用が発現する危険性が高いことから、有効性の高い新規治療薬の開発が望まれている。ADは環境抗原に対するIgEが真皮に存在する肥満細胞と結合することによって生じる慢性的な皮膚炎である。我が国においては、ADを有するイヌの約70%がハウスダストマイト(HDM)抗原に対する特異的IgEを保有している。HDM抗原特異的IgEは(1)HDM抗原の暴露、(2)抗原提示細胞によるHDM抗原の認識とリンパ球への抗原提示、(3)リンパ球の活性化を経て産生される。ADに対する治療、つまりHDM抗原特異的IgEの産生抑制を目指す場合、この一連の過程のいずれかに介入する必要がある。理想的には環境中に存在するHDM抗原の除去が最も効果的であるが、普遍的に存在するHDM抗原を完全に除去することは不可能である。したがって、HDM抗原の暴露は許しても、抗原提示細胞によるHDM抗原の認識およびリンパ球への抗原提示を人為的に制御すれば、リンパ球の活性化を防ぐことが可能となり、これはIgEの産生抑制へと繋がる。しかしながら、現在行われている研究のほとんどがすでに活性化されたリンパ球を効率的に不活化、すなわち全身的な免疫抑制を誘導させることを目標としており、皮膚免疫機能に着目したHDM抗原の認識および提示の制御による新規治療法開発の試みは皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ハウスダストマイト抗原により活性化されたケラチノサイトがランゲルハンス細胞による抗原認識および抗原提示に与える影響を明らかにし、皮膚免疫機能に着目したADに対する新たな治療概念を構築することである。

3. 研究の方法

(1)ケラチノサイトにおけるGM-CSFの産生

材料

イヌ表皮ケラチノサイトの細胞株であるCPEKとその培養液CnT-09は、CellInTEC advanced cell systemから購入した。また、無血清培地Opti-MEM I (Invitrogen)および継代培養時の細胞剥離にTrypLE Express (Invitrogen)を使用した。DPBSおよびシステインプロテアーゼ阻害剤であるTrans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butane (E-64)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO)から入手した。HDMとしてのDer fの抽出物は、Greer Laboratories (Lenoir, NC)から販売されているものを用いた。

細胞培養

5回から10回継代したCPEKを10 mLの

CnT-09に浮遊させ、37℃、5%CO₂の環境下で75 cm²フラスコ(NUNC)を用いて培養した。80%コンフルエントに達した段階で、培養液を除去し、10 mLのDPBSで細胞を洗浄した。TrypLE Expressを3 mL加えた後、5-10分間37℃下に静置して細胞を剥離した。CnT-09を7 mL加え、約80%の細胞が剥離し、浮遊したことを確認した後、細胞浮遊液を15 mL centrifuge tube(NUNC)に回収し、室温で180 G、5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞塊をCnT-09を用いて再懸濁した。再懸濁した細胞浮遊液(2×10⁴/mL)を1 mLずつ24-well plates(NUNC)に分注し、80%コンフルエントに達するまで37℃5%CO₂の条件下で培養した。その後、培養液をOpti-MEM Iに変更し、無血清下で24時間培養し、Der fの添加実験を行った。添加したDer fは主要アレルゲンであるDer f 1の含有量が明確な乾燥凍結品で、Der f 1として10 µg/dLとなるよう、DPBSで溶解した。Der f 1溶解液(0.1, 1および10 µg/mL)またはDPBSを10 µLずつ各ウェルに添加し、24または48時間培養した。プロテアーゼ阻害剤の添加実験では、DPBSで溶解したE-64溶解液をDer f 1溶解液に加えて、37℃で15分間処理した。CPEKから無血清培養液を除去し、Der f 1(10 µg/mL)およびE-64(10⁻⁷ ~ 10⁻⁹ M)を添加した培養液に変更し、37℃5%CO₂下で48時間培養した。

培養上清におけるGM-CSF濃度

CPEKをDer fまたはE-64およびDer fの存在下で24時間または48時間培養した後、培養上清を回収し、ただちに-80℃で凍結保存した。培養上清中のGM-CSF濃度はDuoSet® Canine GM-CSF ELISA kit (R&D System, Minneapolis, MN)を用いて測定した。標準曲線は、Der fまたはE-64およびDer fを加えた培養上清にキットに付属のリコンビナントイヌGM-CSFを希釈して作成した。

統計

独立した実験を3回実施し、培養上清におけるGM-CSF濃度の平均値を算出した。各Der f濃度におけるGM-CSF産生量の有意差を評価するためにTukey-KramerのHSD検定を用いた。プロテアーゼ阻害実験では、E-64を添加していないDer f添加群を対照としたDunnett検定を用いた。統計学的有意差はP < 0.01と定義した。解析には、統計ソフトJMP version 5.1.2 (SAS institute, Cary, NC)を使用した。

(2)ケラチノサイトにおけるGM-CSF産生機構の解明

材料

システインプロテアーゼであるパピンはSigma-Aldrichから入手した。

細胞培養

前述した同様の方法でOpti-MEM Iに変更し、無血清下で24時間培養したCPEKを用いた。DPBSを用いてパピンの希釈溶液を

(10^{-8} M ~ 10^{-3} M) を作製し、10 μ L を各ウェルに添加し、24 時間培養した。プロテアーゼ阻害実験では、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 を用いた。DPBS で溶解した E-64 溶解液をパパイン液に加えて、37 で 30 分間処理した。その後、パパインおよび E-64 溶解液(10^{-8} M ~ 10^{-3} M) または DPBS を各ウェルの培養液量の 1% (10 μ L) になるように加え、37 5%CO₂ 下で 24 時間培養した。

培養上清における GM-CSF 濃度

パパインまたは E-64 とパパインの存在下で 24 時間培養後、培養上清を回収し、ただちに -80 で凍結保存した。培養上清中の GM-CSF 濃度は DuoSet canine GM-CSF ELISA kit (R&D System) を用いて、前述した方法を用いて測定した。測定対象となるサンプルには、パパインのタンパク分解活性による捕捉抗体の分解を阻害する目的で E-64 (10^{-3} M) を用量比が 1% となるように加えた。

NFAT レポーター遺伝子ルシフェラーゼアッセイ

無血清培養液下で 24 時間培養した CPEK を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。50 μ L の Opti-MEM I を用いて、pGL4-luc2P- NFAT-RE-Hygro (Promega, Madison, AL) および pGL4-luc2P- Hygro (Promega) は 0.25 μ g/well となるように、pGL4-hRluc-TK (Promega) は 0.025 μ g/well となるようにそれぞれ希釈した。それぞれのベクターを Opti-MEM 50 μ L で希釈した Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 2 μ L/well と混合し、室温で 20 分間インキュベートした後、これをトランスフェクション用反応液とした。24-well plate 内の培養液を吸引し、DPBS で洗浄したのち Opti-MEM I 0.5 mL/well に交換して、トランスフェクション用反応液を 100 μ L/well 添加してベクターを導入した (37、5% CO₂、24 時間培養)。パパイン、PMA (50 μ M) およびコントロールとして希釈した DMSO を添加して、37、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。各 well を DPBS で洗浄した後に、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) のプロトコルに準じて、Passive Lysis Buffer 100 μ L/well を加えて、室温で 15 分間振盪した。回収した溶液はただちに -80 で凍結保存した。ルミノメーター用チューブ (Sarstedt) に、同 Assay System の LAR を 50 μ L ずつ加え、回収した溶液を 10 μ L を加えた後、ルミノメーター (BioOrbit) を用いて Firefly luciferase の発光強度を測定した。また、Stop & Glo Reagent 50 μ L も同様に添加し、Renilla luciferase の発光強度を測定した。相対的ルシフェラーゼ活性は各サンプルの発光強度比 (Firefly luciferase の発光強度 / Renilla luciferase の発光強度) を mock コントロールの発光強度比 (Firefly luciferase の発光強度 / Renilla luciferase の発光強度) で補正して算出し、無添加群と

PMA およびパパイン添加群で比較した。

CsA によるケラチノサイトの GM-CSF 産生抑制の検討

飢餓培養後、培養液を除去し、CsA (10^{-6} M または 10^{-7} M) または DMSO を添加した培養液に交換し、30 分間、37、5% CO₂ 下で培養した。その後、パパインまたは PMA を 10 μ L (各ウェルの培養液量の 1%) 添加した。24 時間培養後、直ちに培養上清を回収し、-80 で凍結保存した。培養上清中の GM-CSF 濃度は上述した方法で測定した。

統計

独立した実験を 3 回実施し、培養上清における GM-CSF 濃度の平均値を算出した。統計解析として、パパイン添加実験においてはパパイン無添加群を、プロテアーゼ阻害実験では、E-64 を添加していないパパイン添加群を、ルシフェラーゼアッセイについては DMSO のみを添加した群をそれぞれ対照とした Dunnett 検定を用いた。CsA 添加による GM-CSF 産生抑制実験においては、パパインまたは PMA に誘導される GM-CSF 産生に対する NFAT 核内移行阻害による抑制効果を検討するため、Tukey-Kramer の HSD 検定を用いて、全ての群間を比較した。統計学的有意差は $P < 0.05$ と定義した。解析には、統計ソフト JMP version 5.1.2 (SAS institute) を使用した。

4. 研究成果

(1) ケラチノサイトにおける GM-CSF の産生

Der f 添加によるケラチノサイトの GM-CSF 産生

培養 24 時間後における培養上清中の GM-CSF 濃度は、無添加群が 2.042 ± 2.095 pg/mL、Der f 1 添加 1 μ g/mL 群が 5.273 ± 6.371 pg/mL、Der f 1 添加 10 μ g/mL 群では 21.733 ± 18.551 pg/mL であった。培養 48 時間後において各群の培養上清中の GM-CSF 濃度は増加傾向を示し、無添加群が 5.214 ± 3.985 pg/mL、Der f 1 添加 1 μ g/mL 群では 40.156 ± 11.131 pg/mL、10 μ g/mL 群では 70.415 ± 19.169 pg/mL であった。統計解析の結果、CPEK の GM-CSF 産生は、Der f 1 の濃度および培養時間に依存して有意に増加することが明らかとなった (図 1)

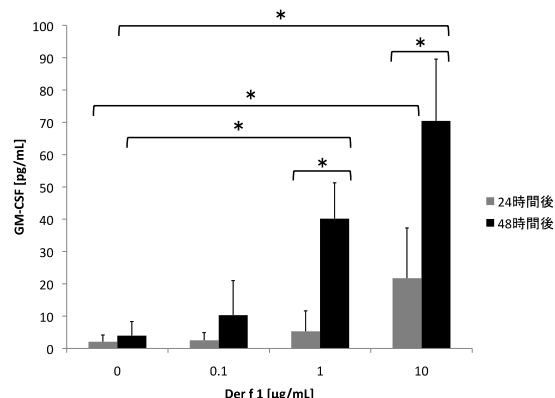


図 1 CPEK における GM-CSF の産生

システインプロテアーゼによる GM-CSF 産生の抑制

Der f 1 を介したケラチノサイトの GM-CSF 産生は、E-64 を 10^{-7} M の濃度で添加した場合のみ抑制され、 10^{-8} M 以下の濃度では対照群 (Der f 1 のみ) との有義差は認められなかった (図 2)。

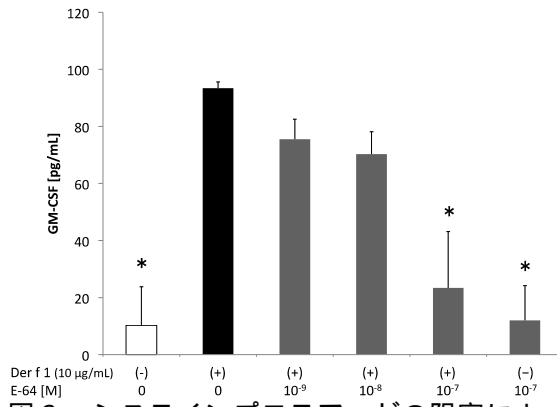


図 2 システインプロテアーゼの阻害による GM-CSF 産生の抑制

(2) ケラチノサイトにおける GM-CSF 産生機構の解明

パピンを介したケラチノサイトにおける GM-CSF 産生

培養 24 時間後における培養上清中の平均 GM-CSF 濃度は、無添加群が 12.096 ± 13.221 pg/mL で、パピリン 1 nM 群が 55.101 ± 12.918 pg/mL、5 nM 群が 125.574 ± 14.847 pg/mL、10 nM 群が 123.603 ± 21.033 pg/mL および 20 nM 群が 96.312 ± 32.009 pg/mL であった。パピリン 5nM までは用量依存性に GM-CSF 産生量が有意に増加した (図 3)。

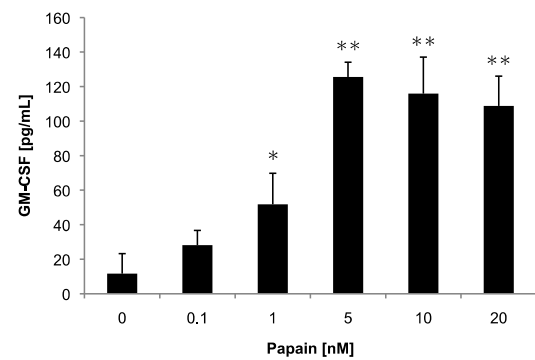


図 3 パピリンによる GM-CSF の産生

システインプロテアーゼ阻害による GM-CSF 産生の抑制

パピンを介したケラチノサイトの GM-CSF 産生は、 10^{-10} nM 以上の E-64 存在下において用量に依存して有意に抑制されることが明らかとなった (図 4)。

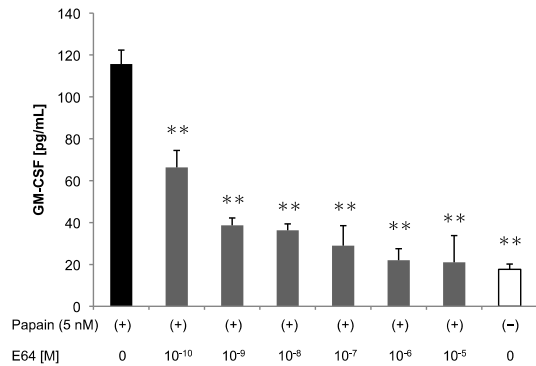


図 4 システインプロテアーゼの阻害による GM-CSF 産生の抑制

パピリンによる NFAT の核内移行

パピリン (5 nM) および PMA 添加群における相対的ルシフェラーゼ活性は、コントロール群に対して、有意に高値を示した。パピリン添加群においては、陰性対照に対して約 3.4 倍の NFAT の核内移行が認められた (図 5)。

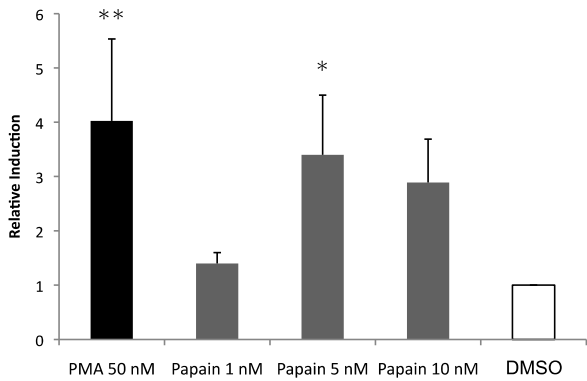


図 5 CPEK における NFAT の核内移行

CsA による GM-CSF 産生の抑制

CsA の添加によって PMA を介した GM-CSF の産生は完全に抑制されたが、パピンを介した GM-CSF 産生の抑制は部分的なものであった (図 6)。

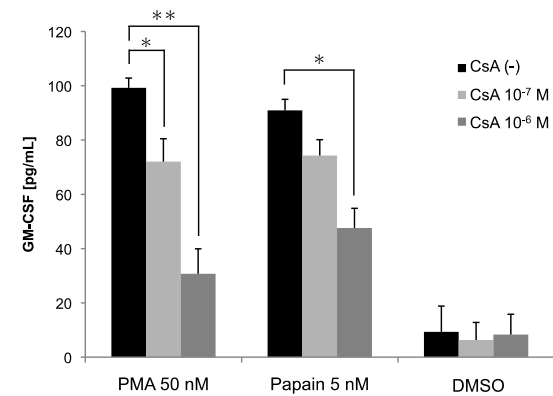


図 6 GM-CSF 産生における CsA の効果

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3件)

Involvement of nuclear factor of activated T cells in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in canine keratinocytes stimulated with a cysteine protease, Kimura, T., Sekido, M., Iio, A., Chimura, N., Shibata, S., Kamishina H., Maeda, S., Vet Dermatol, 査読有, **24**(3): 310-314, 2013. doi: 10.1111/vde.12017.

Protease-activated receptor-2 induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in canine keratinocytes, Maeda, S., Maeda, S., Ohno, K., Kaji, N., Hori, M., Fujino, Y., Tsujimoto, H., Vet Immunol Immunopathol, 査読有, **153**(1-2): 17-25, 2013. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.01.018.

Production of GM-CSF mediated by cysteine protease of Der f in canine keratinocytes, Kimura, T., Sekido, M., Chimura, N., Shibata, S., Kondo, N., Kamishina, H., Maeda, S., J Vet Med Sci, 査読有, **74**(8): 1033-1036, 2012. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0522>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 貞俊 (MAEDA SADATOSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：50377694

(2)研究分担者

神志那 弘明 (KAMISHINA HIROAKI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：50506847

西藤 公司 (NISHIFUJI KOJI)
東京農工大学・農学研究科・准教授
研究者番号：20365422

水野 拓也 (MIZUNO TAKUYA)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：90398826