

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591654

研究課題名(和文)ステロイドによる表皮細胞と血管内皮細胞におけるカベオリン1発現調節

研究課題名(英文)The effects of glucocorticoid on the expression of caveolin-1 in skin-related cells.

研究代表者

窪田 泰夫 (KUBOTA, YASUO)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10126047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚病の治療にも用いられるステロイド製剤の、皮膚構成細胞に対する新たな作用を見いだした。ステロイドは人工的に培養したヒト及びウシ由来の血管内皮細胞において、カベオリン-1と呼ばれる分子の遺伝子とタンパク質を誘導した。この作用は他の主な皮膚構成細胞である角化細胞・線維芽細胞では見られなかった。ステロイドによってカベオリン-1が増加した内皮細胞では、内皮成長因子刺激に対する反応性が著しく低下していた。実験動物であるラットにステロイドを投与したところ、血管内皮において実際にカベオリン-1のタンパク質が多く検出された。以上今回の研究により、ステロイド製剤の皮膚細胞に対する新たな作用機序が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of glucocorticoid agents that are frequently used in clinic at dermatology, by using cultured skin-related cells as a model. When vascular endothelial cells derived from humans or cows were treated with glucocorticoids, the expression levels of a key signal regulating molecule termed caveolin-1 were markedly up-regulated at the levels of protein and mRNA. Glucocorticoids were without effect for keratinocytes and fibroblasts, two other major skin component cells. We then explored the effects of glucocorticoids on signaling responses of endothelial cells for stimulation with vascular endothelial growth factor. Markedly attenuated responses were obtained in glucocorticoids-treated cells, which were counteracted by gene knockdown of caveolin-1. Similar observations were obtained in living animals. Thus, our study uncovered previously unidentified effects of glucocorticoids on dermatological cells, in which induction of caveolin-1 plays a key role.

研究分野：皮膚の炎症と血管新生

キーワード：カベオリン 皮膚 ステロイド 血管内皮細胞 VEGF シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

糖質ステロイド製剤は治療薬として皮膚科領域でも幅広く用いられている。その作用は核内受容体である糖質グルココルチコイド受容体 (GR) の活性化と GR の支配下にある遺伝子の発現調節を介してもたらされるが、その分子機作には未だに不明な点が多い。皮膚を構成する細胞は細胞膜に存在する受容体によってさまざまな刺激を感知し、細胞内情報伝達系分子の活性調節を介してその効果を発現する。近年の研究によって、細胞膜における受容体シグナルの強度は脂質ミクロドメインであるカベオラと、カベオラ構成タンパク質であるカベオリン - 1 (caveolin-1、以下 cav-1) によって大きく調節されることが分かってきた。皮膚は血管に富む臓器であることから、血管内皮成長因子 (VEGF) の受容体シグナルがとりわけ重要である。

2. 研究の目的

本研究では糖質ステロイドが皮膚を構成する細胞群において cav-1 発現に変化を生じるか否か検討することを第一の目的とした。第二にその機序を検討した。さらに第三の目的として糖質ステロイドによる cav-1 発現調節が細胞の刺激に対する応答反応にどのように影響するかを、特に VEGF に注目して検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

血管内皮細胞：ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (BAEC) 及びヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC)

角化細胞：HaCaT 細胞

線維芽細胞：正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF)

(2) タンパク質発現レベル解析・リン酸化レベル解析

ウェスタンブロット法

(3) カベオラ分画単離

ショ糖密度遠心勾配法

(4) 遺伝子ノックダウン

siRNA の一過性強制導入 (導入試薬：LipofectAMINE2000、ライフサイエンステクノロジーズ社)

(5) 一酸化窒素 (NO) 産生能

高感度グリース試薬アッセイによる亜硝酸イオン濃度測定

(6) Rac1 活性

GST アガロースによる沈降アッセイ

(7) 細胞遊走能測定

Boyden チャンバーアッセイ法

(8) 内皮細胞管腔形成能

HUVEC と NHDF の共培養と、CD31 染色による内皮細胞同定 (クラボウ社)

(9) 動物実験

動物：雄性ラット (八週齢)

免疫染色：抗 vWF 抗体 (内皮細胞)

TO-PRO-3 試薬 (細胞核)

4. 研究成果

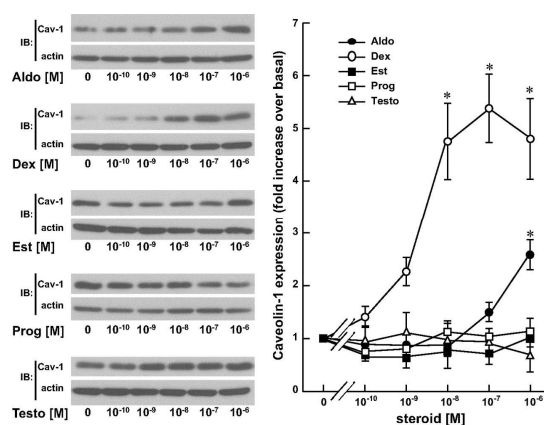
(1) 研究の主な成果

培養細胞における、糖質ステロイドの cav-1 発現に対する効果

まず糖質ステロイドの代表として力価の高いデキサメサゾンを用い、皮膚に関連する細胞種での cav-1 発現レベルへの効果を検討した。BAEC・HUVEC・HaCaT・NHDF の全てにおいて、無刺激の状態では有意な cav-1 発現を認めなかった。しかし、デキサメサゾンによって発現レベルの変化を認められたのは内皮細胞である BAEC と HUVEC のみであった。BAEC においては、デキサメサゾンは時間・用量依存的に cav-1 の誘導をもたらした。タンパク質レベルでの時間経過を見た結果を図 1 として示す。かかる誘導効果は GR アンタゴニストの RU486 にて阻害されたことから、核内受容体 GR を介した反応であると考えられた。また、鉱質ステロイドであるアルドステロンは弱いながらも cav-1 発現を有意に高めたが、性ステロイドであるアンドロゲン・プロゲステロン・エストロゲンには効果を認めなかった。以上より、糖質ステロイド (及び弱いながらも鉱質ステロイド) は、内皮細胞において特異的に cav-1 を誘導することが分かった。

図 1

**Effects of various steroids on caveolin-1 protein abundance in BAEC. Shown are the results of immunoblot assays using lysates derived from BAEC treated with various steroid hormones (Aldo, aldosterone; Dex, dexamethasone; Est, 17 $\beta$ -estradiol; Prog, progesterone; Testo, testosterone).**



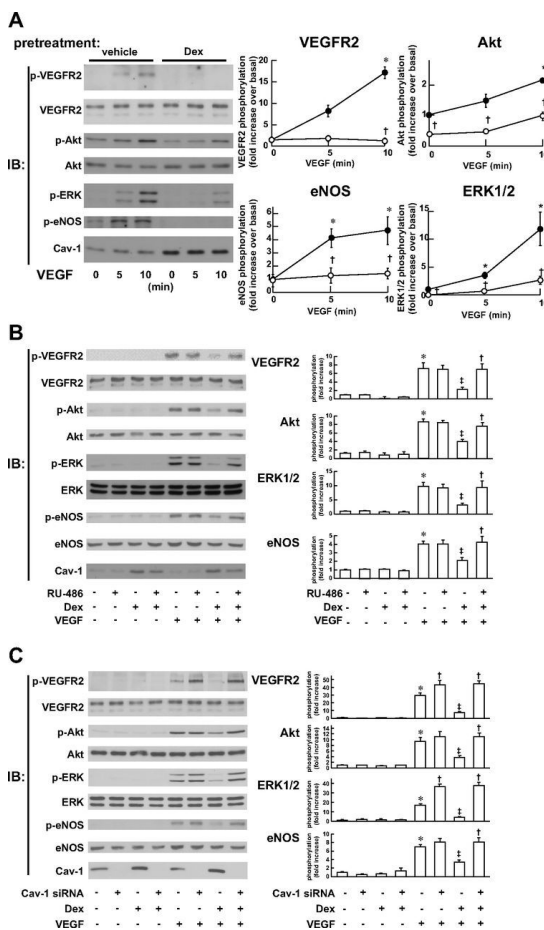
培養内皮細胞における、糖質ステロイドの VEGF シグナリングに対する効果

次に、デキサメサゾン前処理による cav-1 誘導が、内皮細胞の代表的な受容体リガンドである VEGF への反応性に与える影響について検討した。デキサメサゾン前処理細胞において、VEGF 刺激に対する a) VEGF 受容体反応 b) タンパク質リン酸化反応 (キナーゼ

Akt・キナーゼ ERK1/2・内皮型 NO 合成酵素) c) NO 産生能 d) G タンパク質活性化能 (Rac1) e) 細胞遊走能 f) 管腔形成能の全てが減弱していた。cav-1 に特異的な siRNA の導入によってかかる VEGF 反応の減弱が観察されなくなったことから、デキサメサゾンが cav-1 誘導を介して VEGF 反応を阻害していたことが証明された (図 2)。

図 2

Effects of dexamethasone, RU-486 and caveolin-1 specific small interfering (si)RNA on VEGF-elicited phosphorylation responses in BAEC. A: results of a protein immunoblot assay analyzed in cell lysates derived from BAEC treated with Dex followed by VEGF.



#### 実験動物での検討

ラットにおいてデキサメサゾンを経口投与して、内皮における cav-1 誘導が実際に観察されるかを検討した。ラットの皮膚血管は摘出が困難であったことから、肺動脈・大動脈で実験を行った。結果、両血管ともに、内皮特異的に cav-1 タンパク質発現の増加を認めた。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

血管内皮細胞において糖質ステロイドの

cav-1 誘導とその受容体シグナルへの影響を明らかにしたのは当研究が世界初である。これまでにいくつかの培養細胞種で糖質ステロイドを含むステロイド受容体アゴニストが cav-1 を誘導することが報告されてはいたが、皮膚科領域との関連という意味では当研究が世界初である。糖質ステロイドが治療薬として最もよく用いられ、かつその副作用が問題になるのが皮膚科領域である。従って、今後糖質ステロイドの薬効をよりよく理解してその主たる作用と望ましくない作用をもたらす分子機作を検討していく過程で、当研究は大きな礎石となったと言える。

#### (3)今後の展望

in silico の検討において、マウス cav-1 の遺伝子プロモータ領域に糖質ステロイド反応領域 (GRE) が存在することが示されている (PLoS One 5: e8839, 2010)。今回検討した皮膚関連細胞種においてかかる GRE の活性をルシフェラーゼアッセイ等で検討することで、糖質ステロイドがなぜ内皮特異的に cav-1 を誘導したかが明らかになる可能性がある。VEGF は乾癬をはじめとした皮膚疾患の病態形成に深く関わっている。そこで今後病態モデルマウスでの VEGF 反応を糖質ステロイドの投与群・非投与群で検討していく必要がある。

#### 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 1 件)

Igarashi J, Hashimoto T, Kubota Y, Shoji K, Maruyama T, Sakakibara N, Takuwa Y, Ujihara Y, Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K, Yamashita T, Okamoto R, Hirano K, Kosaka H, Takata M, Konishi R, Tsukamoto I.

Involvement of S1P1 receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analog COA-Cl in cultured human vascular endothelial cells. *Pharmacol Res Perspect.* 2014 Oct;2(5):e00068. doi: 10.1002/prp2.68. Epub. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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

窪田 泰夫 (KUBOTA YASUO)  
香川大学 医学部 教授  
研究者番号：10126047

##### (2)研究分担者

五十嵐 淳介 (IGARASI JYUNSUKE)  
香川大学 医学部 准教授  
研究者番号：20346638

小坂 博昭 (KOSAKA HIROAKI)  
香川大学 医学部 教授  
研究者番号：60158897

##### (3)連携研究者

なし ( )  
研究者番号：