

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791162

研究課題名(和文)表皮におけるAhRの新規標的遺伝子の探索および皮膚病態との関連性の解明

研究課題名(英文)Beneficial effects of AhR ligands in keratinocytes

研究代表者

古賀 沙緒里(Koga, Saori)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：80590249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイオキシン類の受容体として知られているAhRの新規標的遺伝子の探索を行った。ヒト表皮細胞株であるHaCaT細胞を用いて検討した結果、CCL5がAhRの活性化に伴い有意に減少することが明らかになった。このCCL5の減少はmRNAおよびタンパク質レベルで認められており、AhRリガンドの濃度依存的な減少を示した。また、この効果がAhR依存的に認められることも確認した。さらに、Th1由来サイトカイン誘導性のCCL5も、AhRリガンドにより有意に減少することが明らかになった。以上より、本研究ではAhRリガンドがCCL5を抑制することにより、抗炎症効果を有する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that recognizes a large number of xenobiotics, dioxins, and some endogenous ligands. Despite numerous investigations targeting AhR ligands, the precise physiological role of AhR remains unknown. Therefore, we explored novel AhR target genes and identified CC-chemokine ligand 5 (CCL5), a key mediator in the development of inflammatory responses. AhR ligands, such as 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) and benzo[a]pyrene (BaP), significantly reduced CCL5 mRNA and protein expression in HaCaT cells. These effects were observed in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and mouse primary keratinocytes. AhR knockdown with siRNA restored CCL5 inhibition by AhR ligands. In addition, AhR ligands exhibited a dose-dependent suppression of CCL5 production induced by Th1-derived cytokines. Our findings indicate that AhR ligands would inhibit to some extent the infiltration of inflammatory cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚生理学 ダイオキシン

## 1. 研究開始当初の背景

カネミ油症は、人類がダイオキシン類・PCB類を直接摂取した史上極めて稀な事例であり、発生から40年以上が経過した今でも、ダイオキシン中毒による症状は多くの患者を苦しめている。これまでに、ダイオキシン類の毒性発現機序の要である受容体 Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) に関する研究は着実に進んでおり、AhR の同定に始まり、タンパク質構造の解明、生体内分布、さらには免疫調節機構における役割など多くの分野で注目されつつある。また、以前より、カネミ油症患者を対象にしたダイオキシン類による健康被害の把握、治療薬あるいは対処法の研究も盛んに行われている。それでもなお、油症患者においては皮膚障害を始めとする従来の症状に加えて、糖代謝異常、脂質代謝異常、肝がんまたは肺がんの増加など新たな症状が付加されつつあり、ダイオキシン類への対処法・治療法の確立が切望されている。

## 2. 研究の目的

すでに我々は、ダイオキシン類による慢性毒性の可能性が示唆されているアレルギー疾患に着目し、油症患者の血清中サイトカインおよびケモカイン濃度の測定を行った。その結果、アトピー性皮膚炎患者や接触性皮膚炎患者で高値を示すことが知られているケモカインの一部が、油症患者において有意に減少していることを明らかにしている。そこで本研究では、これらケモカインの中で、AhR の活性化により直接的に減少するものがあるか検討し、このケモカインの減少が油症患者で認められる症状と関連しているのか明らかにすることを目的とした。また、AhR が上皮組織に多く発現していることから、上皮組織の中でも最大の組織である表皮に着目し、表皮における AhR の役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

表皮細胞として、正常ヒト表皮角化細胞およびヒト表皮細胞株である HaCaT 細胞を用いた。AhR のリガンドは、タバコ煙抽出物に含まれる benzo[a]pyrene (BaP) を外因性のリガンドとして、UV 照射により生体内で発現誘導される 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) を内因性のリガンドとして用いた。

はじめに、定量的 RT-PCR により、各 AhR リガンド (BaP, FICZ) で実際に発現変動するサイトカインおよびケモカインを探索した。変動が認められた遺伝子については、ELISA を用いてタンパク質レベルでも変動するか検討した。CYP1A1 は AhR の代表的な標的遺伝子であり、AhR 活性化の指標として用いた。さらに、siRNA による AhR の knockdown 実験により、この現象が AhR を介しているのかも明らかにした。

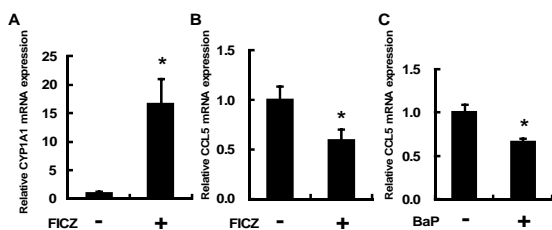
次に、同定した標的遺伝子が、皮膚を始め、生体にどのような影響を与えるのか *in vivo* で検討した。まず、マウス AhR においてもヒトと同様の現象が得られるか検討するために、マウスから表皮細胞を単離して初代培養細胞を作製し、AhR のリガンドがマウス AhR を介してケモカインの発現に影響するのか検討した。そして、血中ケモカインの発現変動の結果、マウスにどのような症状が発現するのか評価した。

さらに、上記検討と並行して、炎症状態における AhR リガンドの役割を明らかにするために、Th1 由来の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) の刺激により増加するケモカインに対しても、AhR リガンドが影響を与えるか検討した。

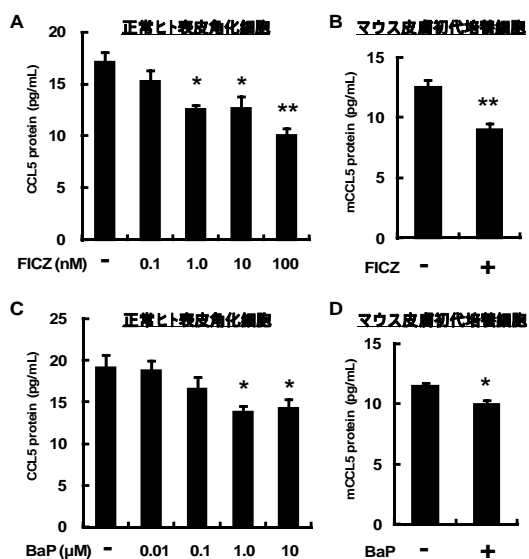
## 4. 研究成果

本研究では、まず、油症患者血清において有意に変動しているケモカインのうち、ダイオキシン受容体である AhR の活性化により直接的に変動するものがあるか検討した。

HaCaT 細胞を用いて検討した結果，CCL5/RANTES というケモカインが，FICZ または BaP による AhR の活性化に伴い有意に減少することが明らかになった (図 1)．CCL5 は炎症部位に T 細胞や好酸球などを遊走させる役割を担っている．これら AhR リガンドによる CCL5 の減少は，mRNA およびタンパク質レベルで認められた．また，濃度依存的にも時間依存的にも見られた．さらに，正常ヒト表皮角化細胞およびマウス皮膚初代培養細胞においても，AhR リガンドにより有意な CCL5 の減少が認められた (図 2)．そこで，この CCL5 の減少が AhR 依存性的か明らかにするために，AhR siRNA を用いた検討を行った．その結果，AhR リガンドによる CCL5 の減少が，AhR siRNA によって消失することが示された．したがって，CCL5 の減少は AhR 依存的に認められていることが示唆された．



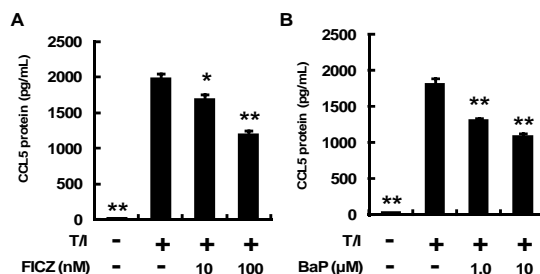
(図 1) AhR リガンドによる CCL5 の発現減少  
雑誌論文 より引用，一部改変



(図 2) 様々な表皮細胞における CCL5 抑制作用  
雑誌論文 より引用，一部改変

次に，接触性皮膚炎モデルマウスを作製し，AhR リガンドが実際に炎症軽減作用を有するのか検討した．2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) を用いて感作を行い，5 日後に惹起させた．惹起と同時に FICZ を皮内投与し，接触性皮膚炎が軽減されるか検討した結果，対照群との差は認められなかった．また，表皮，真皮，リンパ節に遊走している細胞群を FACS を用いて評価したが，対照群との違いは認められなかった．現在，これらのマウスを用いてマイクロアレイによる網羅的解析を行い，詳細な解析を進めている．

さらに，AhR リガンドが Th1 由来の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ : T/I) の刺激により増加する CCL5 を抑制できるか検討した．その結果，FICZ および BaP は濃度依存的に Th1 由来サイトカイン誘導性の CCL5 を減少させることが明らかになった (図 3)．したがって，これら AhR リガンドは抗炎症効果を有する可能性が示された．



(図 3) Th1 由来サイトカイン誘導性 CCL5 に対する AhR リガンドの効果

雑誌論文 より引用

以上より，本研究では表皮細胞において，AhR リガンドが CCL5 を抑制することにより，炎症軽減作用を有する可能性が示された．

当初の予想とは異なり，今回用いた AhR リガンドでは炎症軽減作用が期待できることが示唆された．しかしながら，*in vivo* における AhR リガンドの抗炎症作用はまだ認められていないため，部分的に CCL5 の発現抑制はできるが，炎症自体の収束をこの 1 種のケモカインのみで期待することは難しい可能性がある．今後は，網羅的解析の結果を

踏まえて、CCL5 の減少がもたらす生理作用をさらに突き詰めていきたい。

## 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 )

Morino-Koga S, Uchi H, Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, Hirata T, Furue M., Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands., Journal of Dermatological Sciences, 2013, 72(1), 9-15, 査読有り,  
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.031

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

古賀 沙緒里、内 博史、安松 真麻、古江 増隆、皮膚における AhR 内因性リガンドの役割の解明、日本薬学会第 134 年会、2014.03.27-30、熊本

古賀 沙緒里、皮膚におけるダイオキシン受容体 AhR の新規標的遺伝子の探索、平成 24 年度 厚生労働省全国油症治療斑会議、2012.06.21-22、福岡

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

古賀 沙緒里 ( KOGA, Saori )

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員

研究者番号：80590249