

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670034

研究課題名(和文)短・中鎖脂肪酸によるTSLP産生誘導機構に関わる未知受容体の同定

研究課題名(英文)Mechanism of short- and medium-chain fatty acid-induced TSLP production

研究代表者

平澤 典保 (Hirasawa, Noriyasu)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80181155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)は上皮細胞が産生し、免疫応答のタイプを決定するサイトカインである。本研究では、ある種の低・中鎖脂肪酸がTSLP産生誘導能が強く、特に吉草酸(VA)ならびにイソ吉草酸が強い活性を示すことを見いだした、これらの作用発現には既知の短・中鎖脂肪酸受容体や嗅覚受容体は寄与しない可能性と、ERK、RhoキナーゼおよびNF- κ Bの活性化経路が関与することが示唆された。VAにはHDAC阻害作用があるものの、HDAC阻害活性とTSLP産生の強さとは相関しなかった。以上の結果から、VAならびにイソ吉草酸は未知の受容機構によりTSLP産生を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is known as a master cytokine which is produced by, mainly, epithelial cells and induces allergic responses. In this study, we found that short- and medium-chain fatty acids, especially valeric acid (VA) and isovaleric acid, induced TSLP production in mouse keratinocyte cell line PAM212 cells. Pharmacological analysis suggested that VA-induced TSLP production was not mediated by FFAR2/3 and olfactory receptors. ERK, Rho kinase and NF- κ B pathways were involved in the VA-induced TSLP production. We found that VA increased the acetylation of histone H4. Although histone-deacetylase (HDAC) inhibitor trichostatin A and sodium butyrate also induced TSLP production, there was no relationship between TSLP-producing activity and HDAC-inhibitory activity. These results suggested that short- and medium-chain fatty acids including VA induced TSLP production through a novel recognition mechanism.

研究分野：医療薬学

キーワード：短鎖脂肪酸 アレルギー サイトカイン ヒストンアセチル化 受容体

1. 研究開始当初の背景

ある種の抗原に対してアレルギーが誘発されるかどうかの決定は、従来考えられていた抗原提示細胞やリンパ球ではなく、バリア機能を担う上皮細胞が担当していることが明らかにされ、上皮細胞が産生し、免疫応答の方向を決定するサイトカインとして thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が同定された。代表者は、アレルギーを増悪化する環境中の化学物質を探索する過程において、いくつかの化学物質は抗原非特異的に TSLP の産生を誘導し、他の外来抗原に対するアレルギーの誘発に寄与していることを見出した。これらの化学物質の中で、天然由来の石鹸などにも含まれるある種の低・中鎖脂肪酸が特に TSLP 産生誘導能が強いことをマウス耳介塗布モデルおよびマウス上皮細胞株 PAM212 を用いた細胞系で見いだした。TSLP 産生誘導能は脂肪酸鎖の長さによって増減し、何らかの G 蛋白質連関受容体を介した反応であると考えられた。これまでに同定されている脂肪酸受容体 (FFAR1-3, GPR120, GPR84) は本細胞ではほとんど発現しておらず、新たな脂肪酸受容体を介したものである可能性が高い。皮膚ケラチノサイトのサイトカイン産生に対する低・中鎖脂肪酸の作用はこれまで報告がなく、その受容機構の解明、アレルギー炎症における役割を明確にすることは、特にアトピー性皮膚炎など皮膚において進展するアレルギー性疾患の新しい病因、並びに治療概念の確立に発展することが強く期待される。

2. 研究の目的

本研究は、種々類似化合物、並びにシグナル阻害薬を用いて、皮膚ケラチノサイトにおける短・中鎖脂肪酸による TSLP 産生に関わる受容体、受容機構を解析し、その薬理学的特徴を明らかにする。これによりアトピー性皮膚炎の新しい発症、増悪化機構、ならびに

新たな治療標的を提唱する。

3. 研究の方法

マウスケラチノサイト細胞株 PAM212 細胞を用いた。PAM212 細胞 (Dr .S .H .Yuspa (NIH, USA) より供与) を用いた。

PAM212 細胞 1×10^5 cells/ml となるように 10%FBS-MEM に懸濁した。6, 12 あるいは 24- well cluster dish に播種し、種々の化合物で刺激した。培養液中の TSLP 量は ELISA (R&D Systems) で測定し、TSLP mRNA レベルは Real-time PCR (Takara) で解析した。NF- κ B のレポーター遺伝子アッセイは、Pathdirect pNF- κ B Luc Plasmid (Stratagene) を用い、Dual-luciferase reporter Assay System (Promega) により実施した。アセチル化ヒストンの検出は抗 acetyl-histone H4 (Upstate) を用いて Western blot 法により検出した。

4. 研究成果

1. 低・中鎖脂肪酸および類似化合物の TSLP 産生誘導作用

マウスケラチノサイト株 PAM212 細胞を低・中鎖飽和脂肪酸である酢酸 (C2)、プロパン酸 (C3)、ブチル酸 (C4)、ペンタン酸 (Valeric Acid (VA), C5)、ヘキサン酸 (C6)、ヘプタン酸 (C7)、オクタン酸 (C8)、ノナン酸 (C9)、デカン酸 (C10) およびドデカン酸 (C12) で刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。その結果、ブチル酸ならびに VA に TSLP 産生誘導活性が認められた (図 1A)。VA の作用は濃度依存的で、1 mM 以上で TSLP 産生を誘導した (図 1B)。

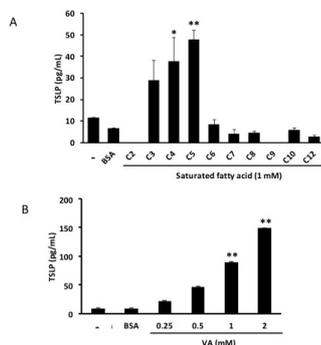


図1. 飽和脂肪酸による TSLP 産生 (A) マウスケラチノサイト細胞株 PAM212 細胞を種々の炭素鎖の飽和脂肪酸で刺激し、24 時間後の培養上清中の TSLP 量を測定した。(B) Valeric acid(C5)の濃度依存性。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

次に、最も活性が強かった VA と構造が類似する化合物について同様に TSLP 産生誘導活性を評価したところ、イソ吉草酸 (isovaleric acid, isoVA)に同程度の活性が認められたが、図 2A に示すその他の構造類似化合物には活性は見られなかった(図 2B)。

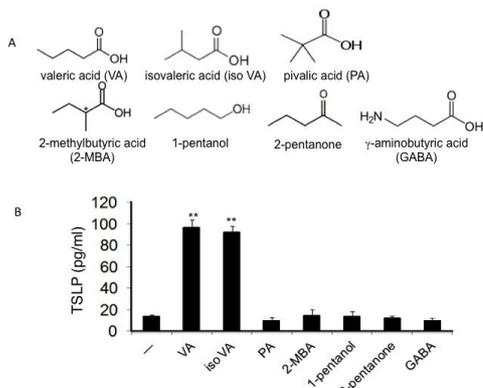


図2. VA 類似化合物の TSLP 産生誘導作用 (A) 類似化合物の構造。(B) 各化合物 2mM で 24 時間刺激したときの TSLP 産生量。(** $P < 0.01$)

2. FFAR2/3 作動薬の効果

短鎖脂肪酸受容体としては FFAR2(GPR43) ならびに FFAR3(GPR41), 中鎖脂肪酸受容体として GPR84 ならびに FFAR1 (GPR40)が報告されている。そこでまず、FFAR2 に対してアゴニスト作用を示す tigric acid ならびに angelic acid、FFAR3 のアゴニスト 2-methylbutyric acid (MBA)、FFAR3 のアンタゴニスト 3-hydroxybutyric acid (HB)(図 3A)の効果を検討した。その結果、FFAR2 のア

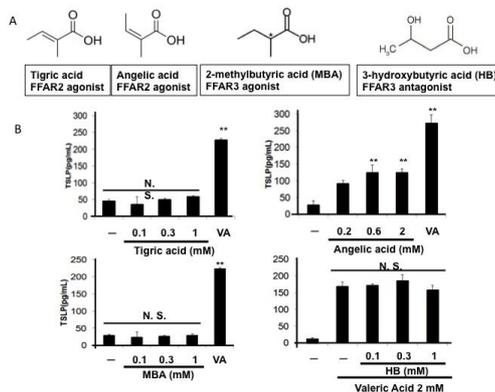


図3. FFAR2 および 3 のアゴニスト、アンタゴニストの作用

(A) 用いた FFAR2 および 3 のアゴニスト、アンタゴニストの構造式。(B) 各種濃度の FFAR2/3 のアゴニストあるいは 2mMVA 存在下で FFAR3 アンタゴニストを加えた場合の TSLP 産生量。

ゴニストには全く活性がなく、FFAR3 アゴニスト angelic acid にはわずかに TSLP 産生が認められた。しかし FFAR3 拮抗薬である HB によって VA の TSLP 産生は抑制されなかった(図 3B)。従って、VA は FFAR2/3 を介して TSLP 産生を誘導する可能性は極めて小さいと考えられる。

また GPR40 アゴニスト troglitazone, GW9508 や GPR84 のアゴニスト 3,3'-diindolylmethane にも TSLP 産生誘導活性は認められなかった。なお、ケラチノサイトに発現量が多い AhR のアゴニスト -naphthoflavone 刺激では高濃度でわずかに TSLP 産生が認められた(図 4)。

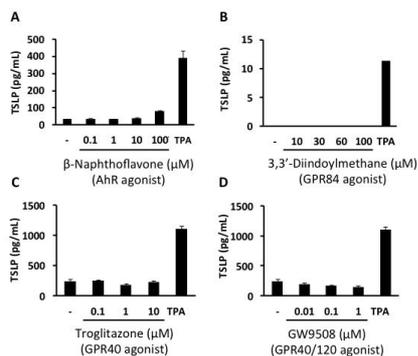


図4. GPR40, GPR84, AhR アゴニストの作用 各種刺激薬で PAM212 細胞を刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。

3. VA による TSLP 産生機構

まず、化学的刺激が TSLP 産生を誘導する可能性を明らかにするために、化学的刺激でケラチノサイトから分泌される ATP の(0.01 - 1 mM)で PAM212 細胞を刺激した場合には TSLP 産生は認められなかった(data not shown)。また、抗酸化剤である N-acetylcysteine は抑制作用を示さず、非特異的な酸化ストレスが引き金になっているとは考えにくい(図 5D)。MAP kinase 阻害薬 (ERK 活性化阻害薬 U0126, 1 μ M、p38MAPK 阻害薬 SB203580、10 μ M、JNK 阻害薬 SP600125, 30 μ M)並びに PI3K 阻害薬 wortmannin (100 nM)の効果を検討したところ、U0126 のみが抑制作用を示し(図 5A)、その作用は濃度依存的だった(図 5B)。また PKC 阻害薬である Gö6976 も濃度依存的に抑制作用を示し(図 5C)、VA による TSLP 産生には ERK ならびに PKC が関与していることが示唆された。

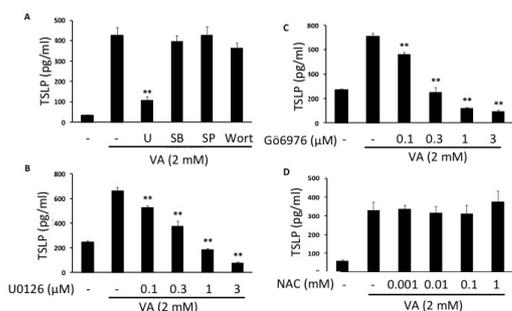


図 5 . VA による TSLP 産生に対する、各種阻害薬の効果。各種阻害薬を VA とともに添加し、24 時間培養後の TSLP 産生量に対する効果を評価した。 (**P<0.01)

4. NF- κ B の関与

VA による TSLP 産生に NF- κ B が関与しているかどうか明らかにするために、IKK の阻害薬 TPCA-1 の効果を検討した。その結果、TPCA-1 は濃度依存的に TSLP 産生を抑制した(図 6A)。NF- κ B のコンセンサスサイトを含むレポーター遺伝子アッセイにより VA は NF- κ B の転写活性を増加させることが示唆された(図 6B)。

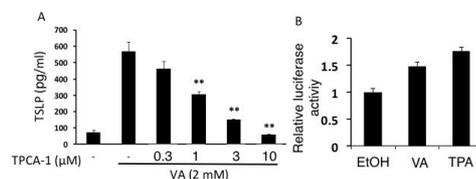


図 6 . VA による TSLP 産生における NF- κ B の関与 (A) VA による TSLP 産生に対する IKK 阻害薬 TPCA-1 の効果 (**P<0.01)。 (B) NF- κ B 転写活性に対する VA の効果 (レポーター遺伝子アッセイ)。

5. RhoK の関与

RHO-Rho kinase の関与について解析するために、Rho kinase 阻害薬 Y27632 の効果を検討した。その結果 Y27632 30 μ M は VA および IsoVA による TSLP 産生を抑制した。また、VA による TSLP mRNA 量の増大も Y27632 は抑制した。さらに、Rho-Rho kinase を活性化することが知られている TNF- α による TSLP 産生も Y27632 は抑制作用を示すことが確認された(図 7)。

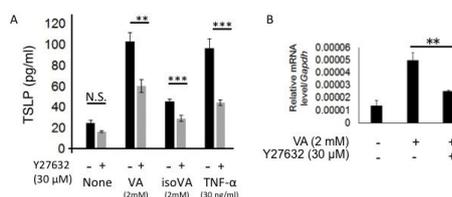


図 7 . Rho kinase 阻害薬 Y27632 の効果。 Y27632 の VA による TSLP 産生 (A) および TSLP mRNA 発現 (B) に対する効果。

6. HDAC の関与

短鎖脂肪酸のナトリウム塩 sodium butyrate はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を抑制し、細胞分化などに影響を及ぼすことが知られている。そこで、VA に HDAC 阻害作用があるかどうか、また HDAC 阻害薬に TSLP 産生誘導作用があるか検討した。HDAC 阻害作用を持つ化合物として trichostatin A (TSA) ならびに炭素数 4 のブタン酸 (C4) を用いた。TSA ならびに C4 には明確な HDAC 阻害作用を示し、ヒストン H4 のアセチル化の増大が認められた。C4 ほどではないものの、炭素数 3 のプロパン酸 (C3) や VA ならびに isoVA にも HDAC 阻害活性が認められた。MBA ならびに TSLP 産生を弱く誘導する angelic

acidには活性が認められなかった(図8)。また、ここで用いた濃度のTSAにもVAと同程度のTSLP産生活性が認められた。これらの結果から、少なくともVAならびにisoVAにはHDAC阻害活性があることが示唆されたが、その強さとTSLP産生誘導能は一致しなかった。

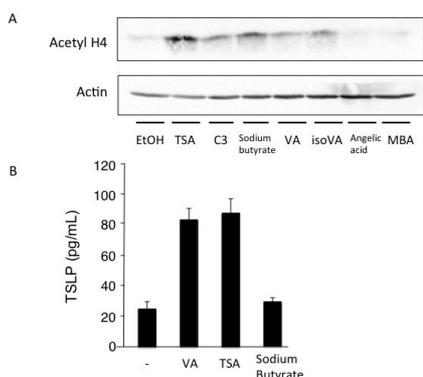


図8. ヒストンアセチル化酵素阻害薬のTSLP産生誘導作用
低鎖脂肪酸ならびに類似化合物、HDAC阻害薬TSAのヒストンH4のアセチル化増大作用(A)とTSLP産生誘導(B)。

7. 嗅覚受容体Olf1rの寄与について

VA並びにisoVAは臭気があり、嗅覚受容体を刺激する。ヒトではすでにこれらの嗅覚受容体の一部が明らかにされている。IsoVAを認識するヒトの嗅覚受容体のマウスホモログとしてolf1r 749, 746, 745, 558, 641などがある。これらの遺伝子発現と、PAM212細胞を用いたマイクロアレイ法により網羅的にケラチノサイトに発現しているOlf1rを検索し、発現が高いと考えられたものについてReal-time PCRで解析したところ、いずれの発現も極めて小さいことが明らかに成った(data not shown)。また、ヒトにおいてヘキサノ酸の嗅覚受容体をブロックすることが知られているambercoreの効果を検討したが、TSLP産生は抑制されなかった(図9)。

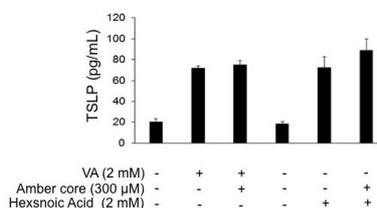


図9. Olf1r拮抗薬の作用
Olf1r拮抗薬のVAによるTSLP産生に対する効果。

8. Dexamethasoneの効果

VAによるTSLP産生に対するdexamethasoneの効果を検討した。その結果10-100nMで濃度依存的な抑制作用を示した。

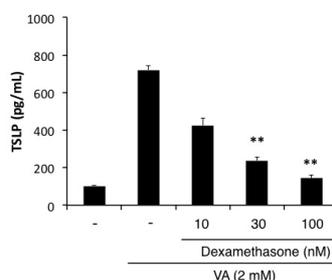


図10. DexamethasoneのTSLP産生抑制作用
DexamethasoneのVAによるTSLP産生に対する効果(**P<0.01)。

以上の結果から、短鎖・中鎖脂肪酸のうち特にVAならびにisoVAにTSLP産生誘導活性が認められ、その作用は構造のわずかな違いを認識して生じるものであることが明らかに成った。また、その作用機構の一つとしてHDAC阻害作用もあることが示唆されたが、それだけではTSLP産生誘導作用を説明できず、既知の脂肪酸受容体とは異なる受容体の関与が強く示唆された。

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7件)

- 1) T. Sato, H. Hayashi, M. Hiratsuka, N. Hirasawa N. Glucocorticoids decrease the production of glucagon-like peptide-1 at the transcriptional level in intestinal L-cells. **Mol. Cell. Endocrinol.** 406:60-67 (2015) (doi:10.1016/j.mce.2015.02.014. 査

- 読あり)
- 2) S. Asakawa, Y. Kishimoto, T. Takano, K. Okita, S. Takakuwa, T. Sato, M. Hiratsuka, O. Takeuchi, N. Hirasawa. Nickel ions selectively inhibit lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production by decreasing its mRNA stability. **PLoS One** 10, e0119428 (2015) (doi: 10.1371/journal.pone.0119428. 査読あり)
 - 3) Segawa, R. and Hirasawa, N. Exacerbation of allergic diseases by chemicals: Role of thymic stromal lymphopoietin. **J. Pharmacol. Sci.** 124: 301-306 (2014) (doi: 10.1254/jphs.13R16CP 査読あり)
 - 4) R. Segawa, S. Yamashita, N. Mizuno, M. Shiraki, T. Hatayama, N. Satou, M. Hiratsuka, M. Hide, N. Hirasawa. Identification of a cell line producing high levels of TSLP: Advantages for screening of anti-allergic drugs. **J. Immunol. Methods** 402: 9-14 (2014) (doi: 10.1016/j.jim.2013.10.012. 査読あり)
 - 5) Y. Ohsawa and N. Hirasawa. The role of histamine H1 and H4 receptors in atopic dermatitis; from basic research to clinical study. **Allergology International**. 63: 533-542 (2014) (doi: 10.2332/allergolint.13-RA-0675. 査読あり)
 - 6) S. S. Das, H. Hayashi, T. Sato, R. Yamada, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. Regulation of dipeptidyl peptidase IV in adipocytes by glucose. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Target and Therapy** 24:185-194 (2014) (doi: 10.2147/DMSO.S62610. 査読あり)
 - 7) H. Hayashi, R. Yamada, S. S. Das, T. Sato, A. Takahashi, M. Hiratsuka, N. Hirasawa. Glucagon-like peptide-1 production in the GLUTag cell line is impaired by free fatty acids via endoplasmic reticulum stress. **Metabolism** 63:800-811 (2014) (doi: 10.1016/j.metabol.2014.02.012. 査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 瀬川良佑、重枝健一、平澤典保
PAM212 細胞における TNF- α による TSLP 産生に対する EGFR シグナルの関与
第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15-18 日、京都)

- 2) 董江旭、瀬川良佑、畑山昂大、白木美香、森下由加里、平澤典保
上皮による TSLP 産生に対するニコチンの抑制作用機構の解析
第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15-18 日、京都)
- 3) 白木美香、瀬川良佑、山下紗緒里、米澤貴之、車炳允、禹濟泰、平澤典保
TSLP 産生抑制化合物の探索とその作用メカニズムの解析
日本薬学会第 53 回東北支部大会(2014 年 10 月 5 日、いわき)
- 4) 平澤典保 化学物質とアレルギー
NIHS 特別講演会 (2014 年 7 月 14 日、東京)
- 5) 白木美香、瀬川良佑、山下紗緒里、米澤貴之、車炳允、禹濟泰、平澤典保 .
恒常的 TSLP 産生細胞を用いた TSLP 産生阻害化合物の探索 日本薬学会第 134 年会(2014 年 3 月 27-30 日、熊本)
- 6) 平澤典保 ステロイドの作用機序 アトピー性皮膚炎研究会第 19 回シンポジウム招待講演(2014 年 2 月 2 日、広島)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 抗アレルギー剤

発明者 : 平澤典保

権利者 : 平澤典保

種類 : 特許

番号 : 特願 2015-72034

出願年月日 : 2015 年 3 月 31 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平澤 典保 (HIRASAWA, Noriyasu)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号 : 80181155