

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860968

研究課題名(和文) 接触過敏におけるASK1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ASK1 in contact hypersensitivity

研究代表者

水上 潤哉 (Mizukami, Junya)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：30421051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：接触過敏は遅延型過敏反応であり、感作相におけるハプテンへの反応と惹起相において反復される反応により引き起こされる。私たちはASK1が接触過敏反応を促進し、惹起相でのASK1の抑制が接触過敏反応を低下させることを示した。接触過敏反応で重要な役割をもつサイトカインであるIL-17の産生が、ASK1活性化阻害により感作されたリンパ球細胞において強く抑制されることを明らかにした。これらの結果から、ASK1は接触過敏反応における惹起相により関係し、IL-17の産生に寄与することや、ASK1がアレルギー性接触皮膚炎や他のIL-17関連炎症性疾患の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Contact hypersensitivity is a form of delayed-type hypersensitivity triggered by the response to reactive haptens (sensitization) and subsequent challenge (elicitation). Here, we show that ASK1 promotes CHS and that suppression of ASK1 during the elicitation phase is sufficient to attenuate CHS. The reduced response was concomitant with the strong inhibition of production of IL-17, a cytokine that plays an important role in CHS and other inflammatory diseases, from sensitized lymph node cells. These results suggest that ASK1 is relevant to the overall CHS response during the elicitation phase and that ASK1 may be a promising therapeutic target for allergic contact dermatitis and other IL-17-related inflammatory diseases.

研究分野：皮膚科

キーワード：ASK1 IL-17 contact hypersensitivity stress response

1. 研究開始当初の背景

皮膚の炎症は外的・内的要因により、自然免疫や獲得免疫機構を介した免疫応答により引き起こされる。しかしながら、外的刺激に対するストレス感受機構と炎症性皮膚疾患との関連性は十分には解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、ストレス応答分子 ASK1 に着目し、ASK1 欠損マウスや chemical genetic approach を用いたノックインマウス (ASK1ASKA マウス)、時期特異的な ASK1 発現マウスなどを用いて接触過敏における ASK1 の機能解析を行い、これらの実験系に新規 ASK1 活性阻害剤を投与して接触皮膚炎の治療薬の開発を目指すことを研究目的とした。

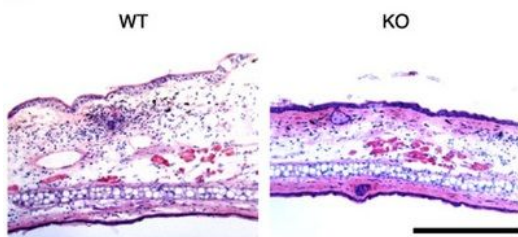
3. 研究の方法

接触過敏反応 (Contact hypersensitivity: CHS) マウスモデルにおける ASK1 の機能解析のため、ASK1 欠損マウスを用いた。またノックインマウスである ASK1ASKA マウスの作製および ASK1 欠損マウスを用いた実験は、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室の一條秀憲教授の協力を得て行った。

4. 研究成果

(1)ASK1 欠損マウスでは接触過敏反応が低下する。

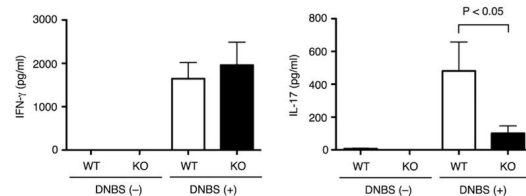
私たちは DNFB を用いて野生型 (WT) マウスと ASK1 欠損マウスの接触過敏に対する反応を比較したところ、ASK1 欠損マウスでは接触過敏反応が減弱していた。



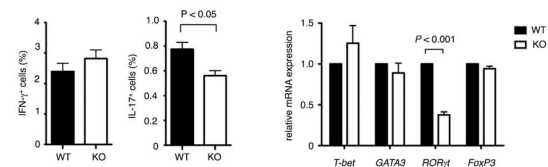
FITC を用いた接触過敏反応においても、ASK1 欠損マウスは WT マウスと比較して接触過敏反応は減弱していた。表皮におけるランゲルハンス細胞の発生や形態学的な異常は ASK1 欠損マウスでは見られなかった。また FITC を用いたランゲルハンス細胞の所属リンパ節への遊走能を検討したところ、ASK1 欠損マウスと WT マウスでは特に差が見られなかった。以上より、ASK1 は感作相における表皮や真皮の樹状細胞の機能には関与しないことが示唆された。

(2) ASK1 欠損マウスでは IL-17 産生細胞が減少している。

接触過敏反応で重要な細胞であるリンパ球での ASK1 の機能を検討した。DNFB 感作後のリンパ球数は ASK1 欠損マウスと WT マウスでは差がみられなかった。しかしながら、DNFB で感作され、特異的に分化増殖したリンパ球に、DNFB と同等の抗原基をもつ DNBS を投与したところ、刺激依存的に産生される IFN- γ に差は見られなかったが、IL-17 は ASK1 欠損マウス由来のリンパ球細胞では低下していた。



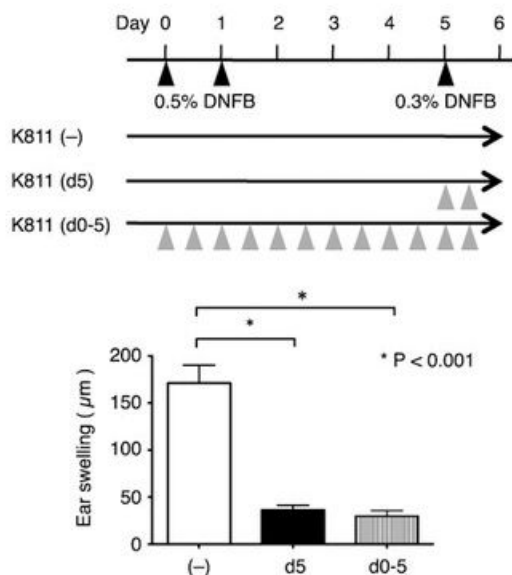
IL-17 産生リンパ球細胞の割合を、DNBS でチャレンジ刺激のない DNFB 感作相で ASK1 欠損マウスと WT マウスで差があるかを検討した。細胞内サイトカイン染色を行い、FACS で検討したところ、ASK1 欠損マウスでは IL-17 陽性リンパ球細胞の割合が低下していた。また IL-17 産生リンパ球細胞に分化させる転写因子である ROR γ T の発現も ASK1 欠損マウスリンパ球細胞では低下していた。以上より、ASK1 欠損マウスでの接触過敏反応の減弱は、少なくとも感作相での IL-17 産生リンパ球細胞の分化の減少によることが示唆された。



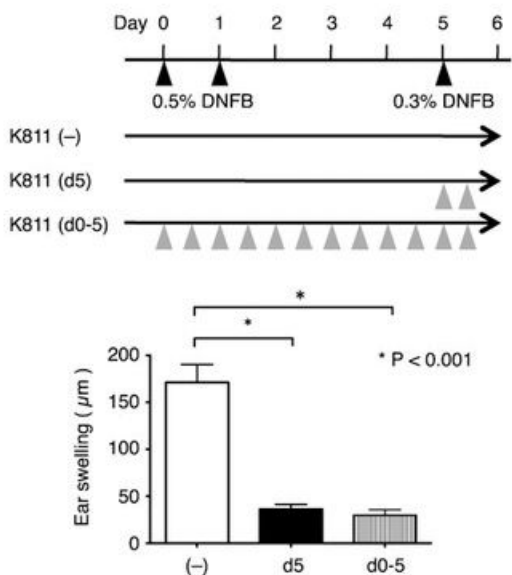
(3) 惹起相における ASK1 活性化の選択的抑制は接触過敏反応を減弱する。

化学遺伝学的アプローチである ASKA を使用し、PP1 を用いて薬理的に選択的に ASK1 の活性化をコントロールすることができる

ASKAASK1 マウスを作製した。1 Na-PP1 を用いた惹起相のみの ASK1 活性化の選択的阻害は ASK1 欠損マウスと同様に、強い接触過敏反応の抑制がみられた。



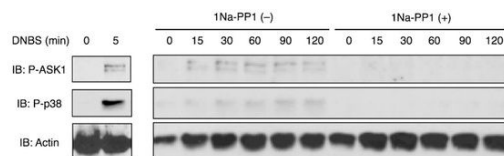
しかし感作相のみの 1Na-PP1 の投与では接触過敏反応の減弱は見られなかったことから、惹起相での ASK1 の活性化阻害が接触過敏反応の減弱に必要であることが示された。そこで ASK1 の阻害薬である K811 を用いて、感作相と惹起相の活性化阻害、惹起相のみの活性化阻害を用いて検討したところ、同等に接触過敏反応の減弱がみられたことから、ASK1 の惹起相での活性化が、感作相の活性化と比較して接触過敏反応により強く関連すること



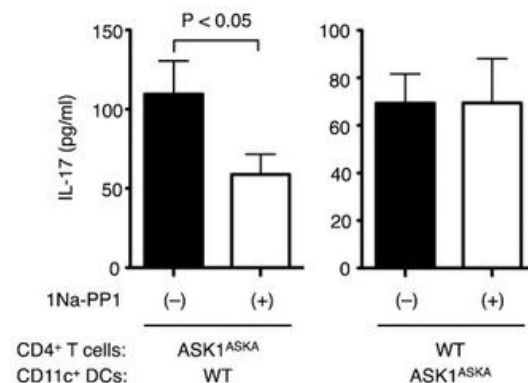
が示唆された。

(4) 感作された CD4+リンパ球細胞の ASK1 の活性化が IL-17 産生に必要なである。

どの細胞の ASK1 活性化が IL-17 産生を制御するか検討した。DNBS で刺激をうけると ASK1 依存的な p38 の活性化がみられた。



PP1 投与により ASK1 の活性化を阻害しておくと p38 の活性化も抑制された。また ASK1 の活性化は刺激依存的な細胞増殖には寄与しないことが示唆された。また様々な細胞種を検討したところ、ASK1 依存的な IL-17 産生は CD8+には影響なく、CD4+リンパ球において関わることが明らかとなった。



以上より、私たちは ASK1 が接触過敏反応を促進し、惹起相での ASK1 の抑制が接触過敏反応を低下させることを示した。接触過敏反応や他の炎症性疾患で重要な役割をもつサイトカインである IL-17 の産生が、感作されたリンパ節から強く抑制されることが関係することを明らかにした。これらの結果から、ASK1 は接触過敏反応における惹起相により関係することや ASK1 がアレルギー性接触皮膚炎や他の IL-17 関連炎症性疾患の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

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 1 件)

Mizukami J, Sato T, Camps M, Ji H, Rueckle T, Swinnen D, Tsuboi R, Takeda K, Ichijo H. ASK1 promotes the contact hypersensitivity response through IL-17 production. Scientific Reports 査読：有 2014 Apr 16;4:4714. doi: 10.1038/srep04714.

〔学会発表〕(計 1 件)

Junya Mizukami, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo, Ryoji Tsuboi: "ASK1 plays a critical role in the elicitation phase of contact hypersensitivity response through promotion of IL-17 production." The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. 20130911-0913. Kanagawa, Yokohama

〔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

水上 潤哉 (Junya Mizukami)
東京医科大学・医学部・兼任助教
研究者番号：30421051

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：