

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461662

研究課題名(和文) 表皮角化細胞のPPAR 低下は、アトピー性皮膚炎の誘導と悪循環に関与する。

研究課題名(英文) Depressed PPARalpha is involved in the pathogenesis of atopic dermatitis

研究代表者

波多野 豊 (Hatano, Yutaka)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80336263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：PPAR α の合成リガンドは、培養表皮角化細胞の単層培養系と重層培養系において、アレルギー性炎症に関与するTARCとRANTESの発現を低下させ、分化関連分子であるフィラグリンの発現と、抗菌ペプチドであるLL-37とHBD3の発現を増強した。一方、PPAR γ とPPAR δ の合成リガンドの単層培養系を用いた検討では、TARCとRANTESの発現低下作用とLL-37とHBD3の発現増強作用を認めたが、フィラグリンの発現を低下させた。これらの結果は、アトピー性皮膚炎で認めるPPAR α 低下は、アレルギー性炎症と皮膚バリア機能低下の両者に直接関与し、両者を直接制御する治療標的となり得ることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：A synthetic ligand for PPAR α , Wy14643, downregulated the expressions of TARC and RANTES, which were important chemokines in allergic inflammation of atopic dermatitis (AD), upregulated those of filaggrin, an important epidermal differentiation-related molecule, and upregulated those of anti-microbial peptides, LL-37 and HBD3. On the other hands, PPAR γ and PPAR δ ligands, GW0742 and ciglitazone, respectively, downregulated the expressions of filaggrin, while they downregulated those of TARC and RANTES and upregulated those of LL-37 and HBD3 as in the case of PPAR α ligand. These results suggest that downregulation of PPAR α in AD is directly involved in both allergic inflammation and cutaneous barrier dysfunction in the pathogenesis of AD and, thereby, could be a therapeutic target accounting for both aspects.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 PPAR

1. 研究開始当初の背景

(1) アトピー性皮膚炎 (以下、AD) の病態の特徴のひとつは、皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両側面が互いに影響し合う悪循環を形成していることであり、両者を同時に制御し得る因子として peroxisome proliferators-activated receptor (以下、PPAR) α に注目している。

(2) PPARs は、核内ホルモン受容体に属し、種々の生体反応の転写因子として注目されている。PPAR α 、PPAR β/δ 、及び PPAR γ の3つのサブタイプを有し、マクロファージなどの炎症細胞や脂肪細胞を含む多くの細胞での発現が認められる。皮膚では、これらの受容体からのシグナルが、表皮分化を誘導し、脂質合成を高めることなどにより、皮膚バリア機能に対し正の方向に作用するだけでなく、マウスを用いた刺激性皮膚炎やアレルギー性接触皮膚炎モデルにおいて抗炎症作用を示すことが知られている (図1)。抗炎症作用の機序は明確でなかったが、我々は、PPAR α の合成リガンドが、培養表皮角化細胞におけるケモカイン (AD の重症度と関連する thymus and activation-regulated chemokine ; TARC) の発現を抑制するとの予備的な結果を得た。

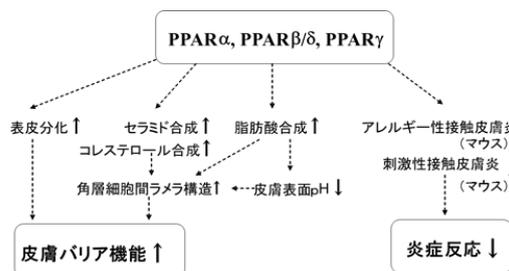


図1 PPARsの活性化による透過性バリア機能亢進作用と抗炎症作用のまとめ

(3) 我々の研究などから、AD の表皮では、PPARs のサブタイプのうち PPAR α が低下していることや、PPAR α の合成リガンドの塗布が、マウスの AD 様皮膚炎モデルにおいて、皮膚炎の発症予防や治療効果を有するのみでなく、治療後の皮膚バリア機能保持においても優れた効果を示すことが示された。最近、我々は、表皮角化細胞の単層培養系と3次元培養系において、PPARs のサブタイプのうち PPAR α の発現のみが、皮膚バリア機能低下刺激と Th2 サイトカインのいずれによっても低下することや、PPAR α をノックダウンした培養表皮角化細胞 (単層) では、TARC などのケモカインの発現が亢進するのみでなく、皮膚バリア構築に重要な分化関連因子のトランスグルタミナーゼ1やロリクリンの発現が低下することを見出した。これらの知見は、表皮角化細胞での PPAR α の低下は、皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両者に関与する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

表皮角化細胞における PPAR α の低下が、皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両者に直接影響し得る因子として、両者の悪循環に関与しており、その制御が皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症とを同時に標的とする治療法となり得ると考えた。そこで、本研究では、PPAR α の活性化が、表皮角化細胞における、皮膚アレルギー性炎症、皮膚透過性バリア、及び抗菌バリアに関連する機能にどのような影響を与えるかを検討した。

3. 研究の方法

培養表皮角化細胞におけるアレルギー性炎症、透過性バリア、及び抗菌バリアに関連する機能に対する、PPAR α の合成リガンドの影響を検討した。

(1) 表皮角化細胞の培養は、単層培養系と重層培養系の両者で検討した。正常ヒト表皮角化細胞又はヒト表皮角化細胞の細胞株である HaCaT 細胞を使用した。

アレルギー性炎症関連の機能は、AD の病態における重要性が報告されている TARC と RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) の発現を解析して評価した。透過性バリア関連の機能として、表皮分化関連分子である、インボルクリン、ロリクリン及びフィラグリンの発現を評価した。抗菌バリア機能として、抗菌ペプチドの human β defensin (HBD)3 と LL-37 の発現を解析した。TARC と RANTES の発現は、TNF α と IFN γ の刺激により誘導した。

(2) 分子の mRNA 発現は、リアルタイム PCR 法で解析し、細胞上清の蛋白レベルは、ELISA 法で解析した。

(3) PPAR α の合成リガンドは、Wy14643 を用いた。PPAR α 合成リガンドで認めた影響の特異性を知るために、PPAR β/δ 及び PPAR γ の合成リガンドによる影響も検討した。PPAR β/δ の合成リガンドとして、GW0742 を、PPAR γ の合成リガンドとして ciglitazone を用いた。

4. 研究成果

(1) TARC と RANTES の発現に対する影響

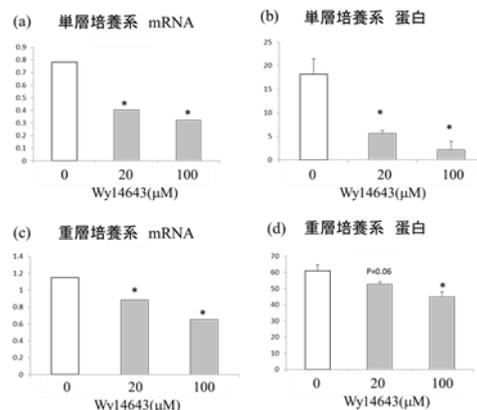


図1: Wy14643のTARCの発現に対する影響

Wy14643 は、単層培養系と重層培養系の両者において、濃度依存性に TARC (図 1) と RANTES (図 2) の発現を、mRNA と蛋白の両レベルで抑制した。

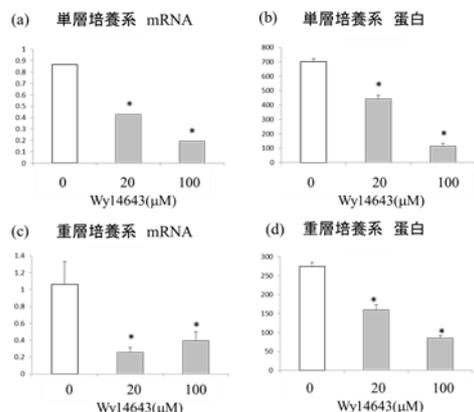


図2: Wy14643のRANTESの発現に対する影響

一方、GW0742 と ciglitazone においても、単層培養系における解析で、GW0742 においては蛋白レベルのみで、ciglitazone においては mRNA と蛋白の両レベルにおいて、TARC と RANTES 発現の抑制効果を認めた。(図 3)

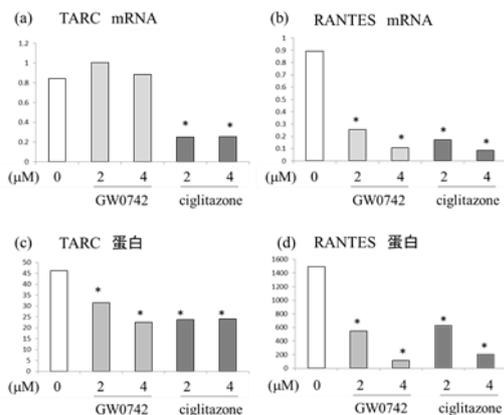


図3: GW0742とciglitazoneの培養表皮角化細胞(単層培養系)におけるTARCとRANTESの発現に対する影響

(2) フィラグリン・ロリクリン・インボルクリンの発現に対する影響

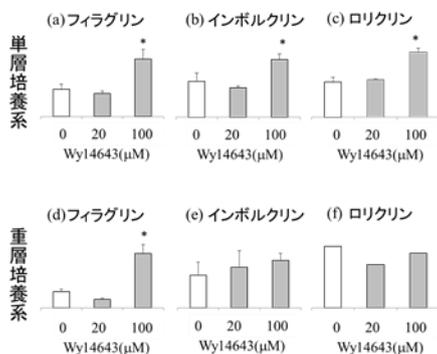


図4: Wy14643のフィラグリン・インボルクリン・ロリクリンのmRNA発現に対する影響

Wy14643 は、単層培養系では、検討した3つの分化関連分子の発現を亢進した。一方、重層培養系では、フィラグリンのみの亢進作用を認めた(図 4)。

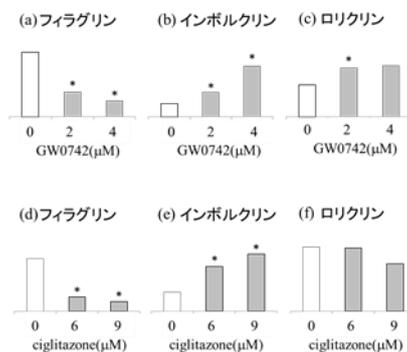


図5: GW0742とciglitazoneのフィラグリン・インボルクリン・ロリクリンのmRNA発現に対する影響(単層培養系)

GW0742 と ciglitazone は、単層培養系において、インボルクリンの発現を増強させたが、フィラグリンの発現を低下させた。重層培養系では検討していない(図 5)。

(3) 抗菌ペプチドの発現に対する影響

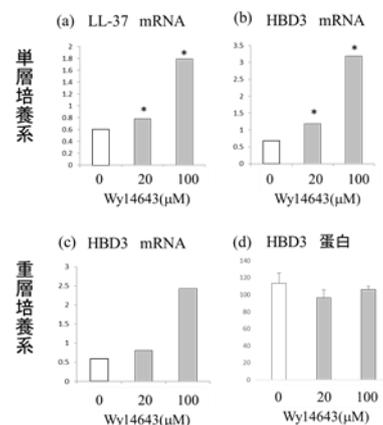


図6: Wy14643のLL-37とHBD3の発現に対する影響

単層培養系では、LL-37 と HBD3 の mRNA は両者とも検出できたが、培養上清中の蛋白レベルでは両者共に検出できなかった。重層培養系では、LL-37 の mRNA の発現は、明確に且つ安定的に検出出来なかったが、HBD3 の発現は、mRNA と培養上清中の蛋白の両者の発現を検出出来た。

Wy14643 は、単層培養系での LL-37 と HBD3、重層培養系での HBD3 の mRNA の発現をいずれも濃度依存性に増強した。一方、重層培養系における培養上清中の HBD3 の蛋白レベルに影響を与えなかった。(図 6)

GW0742 と ciglitazone も、単層培養系において、LL-37 と HBD3 の mRNA の発現を濃度依存性に増強させた。重層培養系での検討や培養上清中の蛋白レベルでの解析は行っていない。(図 7)

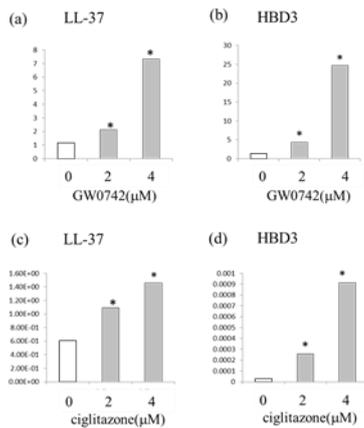


図7: GW0742とciglitazoneのLL-37とHBD3のmRNA発現に対する影響(単層培養系)

(4) まとめと今後の展望

<まとめ>

- ① ADのアレルギー性炎症の側面において重要なケモカインである TARC と RANTES の発現は、PPAR α の合成リガンドである Wy14643 によって低下した。この結果は、PPAR α の低下が、アレルギー性炎症を増強する方向に作用することを示唆する。一方、PPAR β/δ の合成リガンドである GW0742 と PPAR γ の合成リガンドである ciglitazone においても TARC と RANTES の発現低下作用を認め、PPAR α 特異的な作用ではないことが示唆された。
- ② 表皮分化関連分子の検討では、Wy14643 は、単層培養系においては検討した全ての分化関連分子の発現を増強した。この結果は、PPAR α からのシグナルが表皮分化、則ち皮膚透過性バリア機能の構築に重要であり、PPAR α の発現低下は、皮膚バリア機能を低下させる方向に作用することを示唆する。一方、重層培養系では、Wy14643 はフィラグリンのみの発現を増強した。この結果は、PPAR α の機能は、表皮の分化度に影響を受けることを示唆する。興味深いことに、GW0742 と ciglitazone は、インボルクリンの発現を増強したが、フィラグリンの発現を低下させた。この結果は、PPARs の3つのサブタイプのうち、PPAR α の低下が最も皮膚透過性バリア機能を傷害し得る因子であることを示唆する。
- ③ 抗菌ペプチドの検討では、Wy14643、GW0742 及び ciglitazone はいずれも LL-37 と HBD3 の発現を増強した。この結果は、PPARs の3つのサブタイプからのシグナルはいずれも抗菌バリア構築に重要な因子であり、その低下は抗菌バリアを低下させることを示唆する。一方、本研究では、蛋白分泌への影響は検出出来ず未確認である。蛋白分泌を促す因子を実験系に付加して検討するなど今後の課題である。

以上①から③より、PPAR α の低下は、AD の病態において重要なアレルギー性炎症、皮膚透

過性バリア機能低下及び抗菌バリア機能低下に同時に関与し、これは他のサブタイプに見られない特徴であることが示唆された。

<今後の展望>

PPAR α の低下を標的とすることで、AD の病態解明や、AD のアレルギー性炎症と皮膚バリア機能の両側面を同時に制御する治療法の開発に繋がる可能性がある。更に、他の皮膚疾患における PPARs の発現パターンを検討することにより、AD の病態の特異点の解明のみならず、他の皮膚疾患の病態解明や新規治療法の開発にも繋がる新しい病態概念の構築に寄与する可能性がある。

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2件)

①Zhang W, Sakai T, Fujiwara S, Hatano Y: Wy14643, an agonist for PPAR α , down-regulates expression of TARC and RANTES in cultured human keratinocytes. *Exp Dermatol*, 26(5):457-459, 2017. 査読有

②Hatano Y: New insight into the pathogenesis of atopic dermatitis from analysis of the mutual association between permeability barrier dysfunction and allergic inflammation. *Dermatologica Sinica* 33(2):74-77, 2015. 査読無

[学会発表] (計3件)

①Zhang W, Sakai T, Hatano Y, Fujiwara S: Wy14643, a PPAR α agonist, down-regulates expressions of TARC and RANTES and up-regulates those of filaggrin in cultured human keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 11, Okayama Convention Center, Okayama-ken, Okayama-shi, 2015

②波多野豊: アトピー性皮膚炎の病態 如何にしてアトピー性皮膚炎になるのか? ~我々の研究から~. 第67回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 10月18日, 長崎ブリックホール, 長崎県長崎市, 2015 (ワークショップ)

③ Hatano Y: Why do patients with atopic dermatitis exhibit predisposition to atopic dermatitis? ~possible pathways from barrier-related gene abnormalities into emergence of atopic dermatitis~.

The 5th Annual Symposium of Pan
Asian-Pacific Skin Barrier Research
Society, November 22, Tainan, Taiwan, 2014
(招請講演)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 豊 (HATANO Yutaka)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：80336263

(2) 研究分担者 無し

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小林 隆志 (KOBAYASHI Takashi)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：30380520