

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860387

研究課題名(和文) 表皮角化細胞における神経反発因子の産生機構の解明と新規止痒法の開発

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of nerve repulsion factors in normal epidermal keratinocytes: implication of application to intractable itch in atopic dermatitis

研究代表者

根木 治 (Negi, Osamu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40648531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：痒みの難治化の鍵となる神経反発因子Sema3Aの発現制御機構を分子レベルで解明すると共に、内在性Sema3Aの発現を促進する化合物を探索し、ADやドライスキンの新規止痒薬を開発することを目的として研究を行った。本研究では、ROR γ アゴニスト(コレステロール硫酸やSR1078等)でNHEKを刺激したとき、アゴニストの濃度依存的にSema3A発現が促進されることを明らかにした。ROR γ siRNAでROR γ の発現を抑制すると、Sema3A mRNA発現も有意に抑制された。これらの結果は、ROR γ がSema3Aの発現調節に関与する転写因子の一つであることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the ability of ROR γ to induce endogenous Sema3A in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs). This study found that the endogenous ROR γ agonist cholesterol sulfate and ROR γ agonist SR1078 dose-dependently upregulated Sema3A expression. However, ROR γ inverse agonist SR1001 dose-dependently inhibited Sema3A expression in cultured NHEKs. In contrast, the ROR γ inverse agonist ursolic acid had no effect on Sema3A expression in the NHEKs. Taken together, these findings suggest that an ROR γ agonist may be useful as a topical antipruritic treatment of skin diseases with peripheral itch sensitization involving epidermal hyperinnervation, such as AD, by inducing endogenous Sema3A expression.

研究分野：皮膚科学

キーワード：神経反発因子 かゆみ 表皮角化細胞 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

正常な皮膚バリアは、外界からの種々の刺激から身体を防御し、適度な水分を体内に保持させる役割を持つ。アトピー性皮膚炎(AD)ではバリア機能が破綻した結果、容易に外界の刺激を受けることとなり、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性の痒みを引き起こす。痒みは強い搔破行動と湿疹の増悪をもたらし、患者のQOLを著しく障害する。しかし、それらを制御する方法は解明されておらず、幅広い視点に立った病因解明と新規止痒治療薬の開発が切望されている。

通常、健康な皮膚の知覚神経線維は表皮-真皮境界部に収束している。先行研究ではアセトンでバリアを破壊した急性ドライスキンマウスモデルやADモデルNC/Ngaマウスの皮膚において、神経伸長因子(神経成長因子[NGF], アンフィレギュリン)の発現増加と、神経線維を退縮させる神経反発因子(セマフォリン 3A [Sema3A], アノスミン-1)の発現減少を見出し[図 1]、それにより多数の神経線維が表皮内で増生することを報告した(Tominaga et al., *Exp Rev Dermatol*, 2010, 5: 197-212) [図 2]。

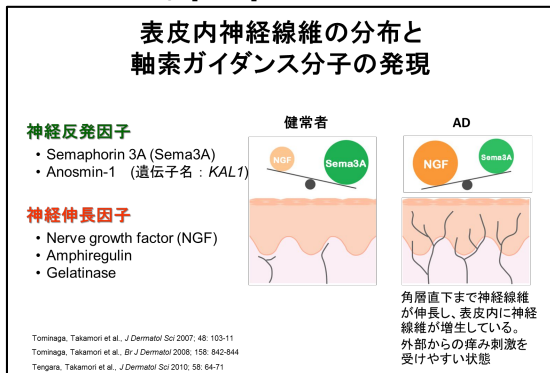


図 1. 表皮内神経線維の分布と軸索ガイダンス分子の発現バランス

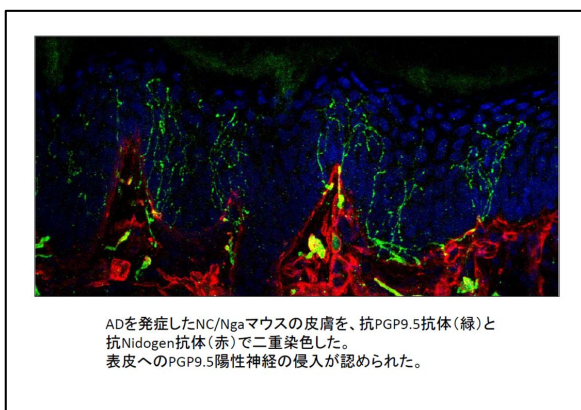


図 2. ADモデルマウス (NC/Nga) の皮膚における表皮内神経線維の増生

神経線維の伸長は起痒刺激の受容増加につながり、さらに搔破のような外部刺激は知覚神経を興奮させ、痒みを増悪させる。AD病変部に対する紫外線療法は Sema3A 発現を正常化させると共に痒みを抑制し (Kamo et al., *J Dermatol Sci*, 2011, 62: 91-97) [図 3]、

リコンビナント Sema3A を配合した軟膏(以下、Sema3A 軟膏)はADモデルNC/Ngaマウスの搔破行動を抑制、皮膚炎も改善した (Negi et al., *J Dermatol Sci*, 2012, 66: 37-43)。カルマン症候群の原因遺伝子 *KAL1* によってコードされる神経反発因子 anosmin-1 の発現も、AD患者の皮膚では減少していた (Tengara et al., *J Dermatol Sci*, 2011, 58: 64-71)。以上の結果は、神経反発因子が表皮内神経侵入を伴う難治性の痒みの治療標的になることを強く示唆する成果であった。

神経伸長因子である amphiregulin のトランスジェニックマウス (Chung et al., *J Invest Dermatol*, 2005, 124: 1134-1140) やADのNC/Ngaマウス (Tominaga et al., *J Dermatol Sci*, 2007, 46: 199-210) では、上皮バリア形成に重要な細胞接着因子 (E-カドヘリン、ZO-1, -2) の発現減少が報告されている。バリア機能の破綻による表皮内への神経線維の侵入・伸長は、a) 神経伸長因子と神経反発因子のバランスの乱れ; b) 上皮バリア形成に關与する細胞接着因子の発現低下; c) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) による表皮-真皮境界部にある基底膜の分解 (Tominaga et al., *J Invest Dermatol*, 2011, 131: 2105-2112) などが關与すると考えられる。興味深いことに、角膜線維芽細胞における Sema3A 発現増加は、細胞接着因子 (E-, N-カドヘリン、ZO-1、オクルディン、クラウディン) の発現を増加させる (Ko et al., *Biochem Biophys Res Com*, 2010, 396: 781-786)。しかし、皮膚のバリア破綻と神経反発因子の発現減少の関連性については不明である。

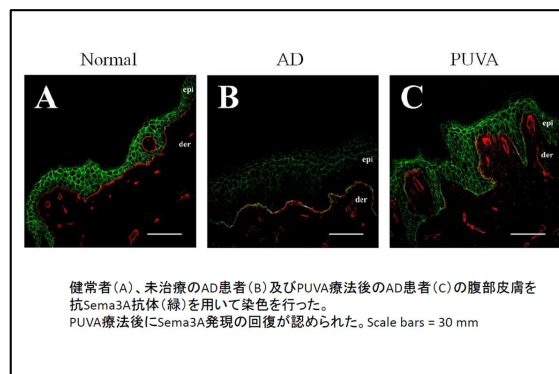


図 3. Psolaren-ultraviolet A (PUVA) 療法前後のADにおける Sema3A 発現の変化

2. 研究の目的

本研究の目的は痒みの難治化の鍵となる神経反発因子 Sema3A の発現制御機構を分子レベルで解明すると共に、内在性 Sema3A の発現を促進する化合物を探索し、ADやドライスキンの新規止痒薬を開発することにある。

3. 研究の方法

(1) 表皮角化細胞の培養

正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)は0.15 mM CaCl₂の存在下で、KGM-Gold Single Quots を添加した KBM-Gold を用いて、37 °C, 5% CO₂ 存在下で培養した。細胞、培地及び添加剤は全て Lonza(Basel, Switzerland)から購入した。

(2) Real-time PCR による遺伝子発現解析

RLT buffer を加えて細胞を溶解後、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、total RNA を抽出した。逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit(Takara, Shiga, Japan)を用いた。定量 Real-time PCR は SYBR Premix Ex Taq を使用し、Applied Biosystems Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で解析した。内在性コントロールとしてリボソームタンパク質 S18 を用いた。

(3) ELISA による Sema3A タンパク質の定量

Sema3A タンパク質の定量にはヒト Sema3A ELISA キット (Uscn Life Science, Wuhan, China) を用いた。希釈した NHEK の培養上清を Sema3A ELISA キットの 96 well マイクロプレートにアプライし、37 °C で2時間反応させた。その後、Sema3A のビオチン化抗体(検出試薬 A)を加えて37 °C で1時間反応させ、プレートを3回洗浄後、さらに Horseradish Peroxidase 標識ストレプトアビジン(検出試薬 B)を加えて37 °C で30分間反応させた。その後、プレートを5回洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン基質溶液を添加し、37 °C で25分反応後、反応停止液を加えて、波長 450 nm で吸光度を測定した。Sema3A 標準液の吸光度から検量線を作成し、培養上清中の Sema3A 濃度を求めた。

(4) Sema3A mRNA 発現に対するレチノイド関連オーファン受容体(ROR)及びのアゴニスト及びアンタゴニストの影響

プレコンフルエントの NHEK にレチノイド関連オーファン受容体(ROR)のアゴニストであるコレステロール硫酸を添加し、培養を継続した。添加 96 時間後に培養上清ならびに total RNA を回収した。Total RNA は逆転写反応後、定量 Real-time PCR で Sema3A mRNA 発現を確認した。培養上清中へ分泌された Sema3A は ELISA 法で定量した。

同様に、プレコンフルエントの NHEK に ROR 及びのアゴニストである SR1078、ROR 及びのアゴニストである SR1001、または ROR のアンタゴニストであるウルソール酸を添加し、培養を継続した。48 時間後に total RNA を抽出し、逆転写反応後、定量 Real-time PCR で Sema3A mRNA 発現を解析した。コレステロール硫酸と SR1001 は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から、SR1078 は Calbiochem(Darmstadt, Germany) から購入した。

ウルソール酸は東京化成工業(Tokyo, Japan)から購入した。

(5) siRNA による ROR のノックダウンが Sema3A mRNA 発現に及ぼす影響

プレコンフルエントの NHEK を PBS で洗浄後、抗菌剤無添加の KBM-Gold に置換し、40 nM siGENOME SMARTpool human ROR または control siRNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)をトランスフェクションした。トランスフェクション試薬は Lipofectamine RNAi Max(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を使用した。トランスフェクションの48時間後、total RNA を抽出、逆転写反応後、定量 Real-time PCR で ROR 及び Sema3A の mRNA 発現を解析した。

(6) 統計処理

全ての統計解析は統計ソフト GraphPad Prism 5(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。2 群間の有意差検定は Student's t-test、それ以外は Dunnett's multiple comparison test を用い、P<0.05 以下を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

Sema3A の発現に関与する遺伝子プロモーター領域をクローニングし、塩基配列解析後、転写因子結合予測プログラム P-Match を用いて、転写因子結合配列の検索を行った結果、候補転写因子の一つとして ROR が同定された(未発表データ)。ROR は Sema3F の転写調節因子であり、ROR -Sema3F 経路の不活性化が乳がんの発生と増悪に関与することが報告されている(Xiong et al., Cancer Res, 2012, 72: 1728-1739)。興味深いことに ROR は表皮角化細胞の分化誘導因子として機能することや(Strott and Higashi, J Lipid Res, 2003, 44: 1268-1278)、フィラグリニン等の遺伝子発現に関与することが報告されている(Hanyu et al., Biochem Biophys Res Commun, 2012, 428: 99-104)。そこで、本研究では培養ヒト表皮角化細胞を用いて、Sema3A の発現制御メカニズムにおける ROR の関与について解析した。

(1) NHEK における Sema3A 発現に及ぼす内在性 ROR アゴニストであるコレステロール硫酸の作用

コレステロール硫酸は表皮の最終分化に伴い、コレステロールを原料にコレステロールスルホトランスフェラーゼによって合成される。コレステロール硫酸は ROR のアゴニストとして機能することが知られている(Solt and Burris, Endocrinol Metab, 2012, 23: 619-627)。そこで、Sema3A の発現調節における ROR の役割を明らかにするため、コレステロール硫酸が NHEK における Sema3A の発現に及ぼす影響を調べた。NHEK に 0, 10, 20,

40, 80, 100 μM のコレステロール硫酸を添加し、96 時間後の *Sema3A* mRNA 発現を定量 Real-time PCR で解析した。その結果、コレステロール硫酸の濃度依存的に最大 7.6 倍 (100 μM , $P < 0.001$) *Sema3A* mRNA 発現が促進された[図 4]。

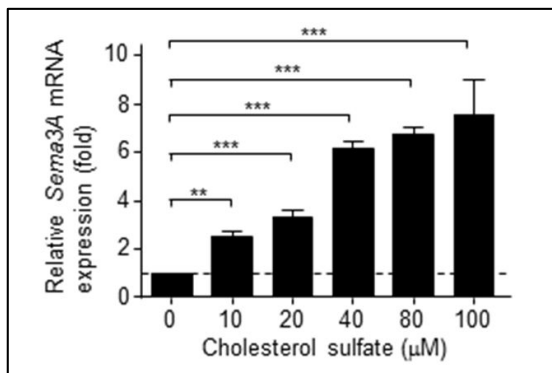


図 4. コレステロール硫酸の濃度依存的に NHEK における *Sema3A* mRNA 発現が増加する

同様にコレステロール硫酸を添加し 96 時間後の培養上清中の *Sema3A* を ELISA 法で定量した結果、濃度依存的に培地中への *Sema3A* の分泌増加が認められた ($P < 0.001$) [図 5]。

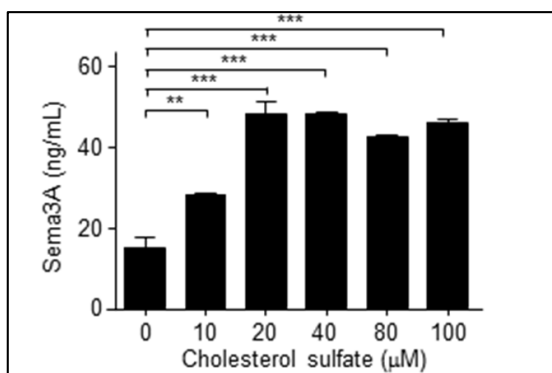


図 5. コレステロール硫酸の濃度依存的に培地中への *Sema3A* の分泌が増加する

(2) NHEK における *Sema3A* mRNA 発現に及ぼす ROR / アゴニストならびにインバースアゴニストの作用

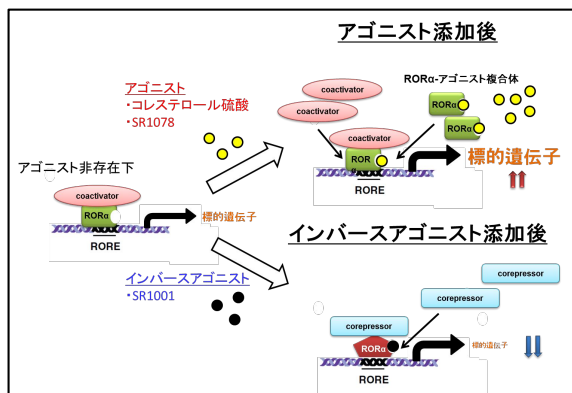


図 6. アゴニストならびにアンタゴニストによる ROR の活性化及び不活性化のメカニズム

ROR ファミリーは核内受容体の一種で、 $\text{ROR}\alpha$ 、 $\text{ROR}\beta$ 、 $\text{ROR}\gamma$ の 3 種類から成る。ROR はアゴニストが存在しない状態でもコアクチベーターが結合しており、標的遺伝子の ROR エlement に結合することで、標的遺伝子の発現を恒常的に活性化している (Solt and Burris, *Endocrinol Metab*, 2012, 23: 619-627)。ROR にアゴニストが結合すると、多数のコアクチベーターが会合し、標的遺伝子の発現が増大すると考えられている。一方、インバースアゴニストが結合すると、ROR の立体構造が変化し、コアクチベーターが解離、代わりにコリプレッサーが結合することで、標的遺伝子の発現が抑制される。[図 6]

現在、ROR 特異的な合成アゴニストが存在しないため、ROR α 及び β の両方に作用するアゴニストならびにインバースアゴニストを用いて、ROR による *Sema3A* の発現調節機構を詳細に検討した。NHEK に ROR α / β のアゴニストである SR1078 を 0, 0.5, 1 μM 添加し、48 時間後に total RNA を抽出、定量 Real-time PCR で *Sema3A* mRNA 発現を解析した。その結果、SR1078 の濃度依存的に *Sema3A* の発現が最大 3.4 倍 ($P < 0.001$) 増加した[図 7a]。一方、ROR α / β のインバースアゴニストである SR1001 を 0, 5, 10, 20 μM 添加 48 時間後の *Sema3A* mRNA 発現は濃度依存的に最大 44%まで抑制された ($P < 0.001$) [図 7b]。

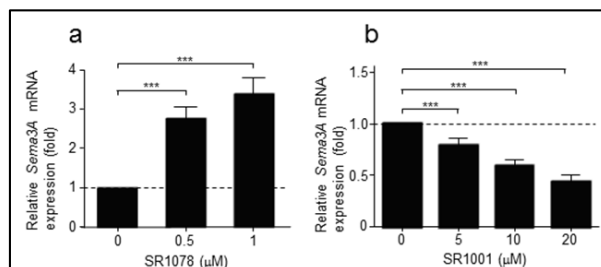


図 7. ROR α / β アゴニスト SR1078 ならびに ROR α / β インバースアゴニスト SR1001 が NHEK における *Sema3A* mRNA 発現に及ぼす影響

SR1078 及び SR1001 は ROR α と ROR β の両者に作用することから、ROR 特異的インバースアゴニストであるウルソール酸を用いて同様の解析を行った。NHEK にウルソール酸を 0, 0.5, 1 μM 添加 48 時間後の *Sema3A* mRNA 発現は全く変化しなかった[図 8]。以上の結果から、ROR は *Sema3A* の発現調節に関与しないと考えられた。今後、ROR 特異的インバースアゴニスト SR3335 の作用も併せて解析する必要がある。

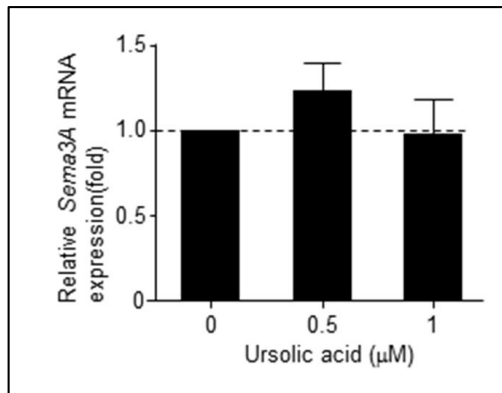


図 8 . ROR インバーサゴニストのウルソール酸が NHEK における *Sema3A* mRNA 発現に及ぼす影響

(3) NHEK における *Sema3A* mRNA 発現に対する siROR の影響

Sema3A の発現制御に ROR が関与していることを証明するために、ROR siRNA を用いて、NHEK における ROR の発現をノックダウンした時の *Sema3A* mRNA の発現変化を解析した。ROR siRNA により、ROR mRNA の発現は 20%以下まで抑制され ($P < 0.001$)、*Sema3A* mRNA の発現も約 25%まで抑制された ($P < 0.001$) [図 8]。このことは、ROR が *Sema3A* の発現調節に重要な役割を果たすことを強く示唆した。

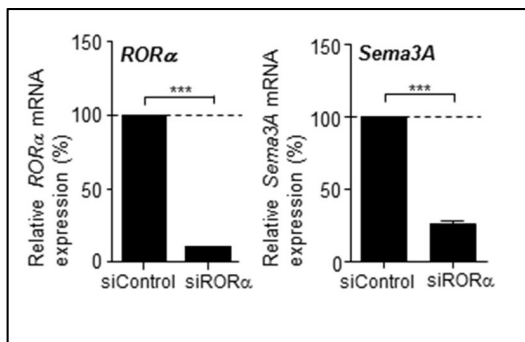


図 8 . ROR のノックダウンにより *Sema3A* mRNA 発現は抑制される

(まとめ)

本研究は痒みの難治化の鍵となる神経反発因子 *Sema3A* に着眼し、ROR が *Sema3A* の発現制御に関与する転写因子の一つであることを明らかにした。ROR アゴニスト(コレステロール硫酸や SR1078 等)で NHEK を刺激したとき、アゴニストの濃度依存的に *Sema3A* 発現が促進されることが明らかとなった。ROR siRNA で ROR の発現を抑制すると、*Sema3A* mRNA 発現も有意に抑制された。これらの結果は、ROR が *Sema3A* の発現調節に関与する転写因子の一つであることを強く示唆した。

本研究で ROR アゴニストとして用いたコレステロール硫酸はフィラグリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ等の表皮分化に重要な役割を持つタンパク質の遺伝

子発現を促進することが報告されている (Strott and Higashi, J Lipid Res, 2003, 44: 1268-1278)。コレステロール硫酸は ROR

のアゴニストとして機能するだけでなく、転写因子 AP-1 の一種である JunD, Fra-1, Fra-2 の発現を増やすとの報告もある (Hanley et al, J Lipid Res, 2001, 42: 390-398)。一方で表皮の角層剥離に関わるセリンプロテアーゼ活性を阻害するため、マウスの皮膚にコレステロール硫酸を連日塗布すると角層が厚くなることが知られている (Sato et al, J Invest Dermatol, 111: 189-193)。ROR アゴニストは *Sema3A* 発現を誘導することから、今後は AD モデルマウス及びドライスキンモデルマウスを作成し、ROR アゴニストを配合した軟膏を病変部に塗布し、病態改善効果を確認する試験を行う予定である。また、現在、ヒト *Sema3A* 遺伝子のプロモーター領域のクローニングと解析が既に終了しており、最終段階としてクロマチン免疫沈降による転写因子結合アッセイを行っている。今後、これらの試験結果は早急に論文化する予定である。

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)

Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, Azumi Sakaguchi, Yoshie Umehara, Osamu Negi, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori. Retinoid-related orphan receptor α is involved in induction of semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci, 79: 84-86, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.03.015.

[学会発表](計 2 件)

Yayoi Kamata, Yoshie Umehara, Mitsutoshi Tominaga, Osamu Negi, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori: Inhibitory factors of semaphorin 3A expression in human epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015.12.11, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

鎌田弥生、坂口安澄、梅原芳恵、根木治、富永光俊、小川秀興、高森建二: ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬による表皮角化細胞における軸索ガイダンス分子の発現調節. 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 2015.11.21, 島根県民会館(島根県松江市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

根木 治 (NEGI , Osamu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 4 0 6 4 8 5 3 1

(2)研究協力者

鎌田 弥生 (KAMATA , Yayoi)

順天堂大学・大学院医学研究科・

非常勤助教

研究者番号： 0 0 4 1 0 0 3 5