

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461688

研究課題名(和文)環境化学物質レセプターAhRによる皮膚炎誘導のメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of role of aryl hydrocarbon receptor for pathophysiology of atopic dermatitis

研究代表者

小川 英作(OGAWA, Eisaku)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：20451586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：AhR とアトピー性皮膚炎の関連の機序を解き明かすことにより、疾患予防や新規治療法を見出すことを目的に研究を行った。in vitro、in vivoにて、AhRが表皮で活性化した表皮を用いて検討をした。AhRが表皮で過剰に活性化すると、TSLPやIL33が増加すると同時に、Th2反応に強く関連する抗原提示細胞の樹状細胞が増加し、関連サイトカインが増えることが示された。ヒトサンプルを用いて、解析を行ったところ、環境因子に関わる因子やアトピー性皮膚炎の病態に関わるTslpなどのサイトカインについて検討したところ、AhRに関連する因子が上昇していた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism how to induce inflammation in atopic dermatitis, I focused aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway. I seeked candidates which are induced under AhR activation by using previous transgenic mouse model and AhR-overexpressed cultured keratinocyte. So I identified increasing expression of interleukin-33 (IL-33) and thymic stromal lymphopoietin (TSLP), which were both related in atopic dermatitis recently. I observed increase expression of IL-33 and TSLP in cultured keratinocyte after the addition of AhR activator. These data suggest that AhR activation induced expression of IL-33 and TSLP in keratinocyte.

Taken together, AhR activation might induce early inflammation like atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：AhR アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

1 アトピー性皮膚炎の患者は多い。

アトピー性皮膚炎は、そう痒を伴う皮疹が左右対側性に全身に生じ、慢性の経過を辿る。小児の 10%前後がアトピー性皮膚炎に罹患しており、発症メカニズムの解明や治療法・予防法の開発は大変重要である。

2 アトピー性皮膚炎の病態は多様な因子に支配されている。

アトピー性皮膚炎の病態に関してはこれまで様々な議論されてきたが、アレルギーや免疫機序の面から説明されることが多かった。最近、表皮細胞が角化する際に誘導されるフィラグリンが原因遺伝子の 1 つとして同定された。フィラグリンの変異は、皮膚のバリア機構の破綻をまねき、外界からの多量の抗原に曝されるためアレルギーが誘導される。実際のアトピー性皮膚炎の病態には、アレルギーやバリアー異常など様々な要因が絡んでいると思われる。

一方、環境汚染がアトピー性皮膚炎の病態に関与しているのではないかと従来より予想されてきた。新興国では工業化の進展に伴い、アトピー性皮膚炎の罹患率が急速に上昇している。工業化に伴って外界へ放出された化学物質が生体へ何らかの影響を引き起こしアトピー性皮膚炎を引き起こしているのではないとも思われる。表皮細胞は外界に直接接し、様々な刺激に反応してサイトカインを産生し放出することが知られている。表皮細胞から放出されたサイトカインは、innate immunity (自然免疫) を担当する樹状細胞やマスト細胞を活性化し、さらに adaptive immunity (獲得免疫) を担当する T 細胞を活性化する。環境からの化学物質によって表皮が刺激を受けた結果、樹状細胞やマスト細胞に変化が生じる、さらに T 細胞にも変化が及んで皮膚炎を引き起こすのではないかと私たちは考えた。

3 AhR はアトピー性皮膚炎類似の症状を惹起する。

そこで私たちは、芳香族化合物に対する細胞内レセプターである AhR (aryl hydrocarbon receptor) に着目することにした。細胞が芳香族化合物に曝されると、AhR が芳香族化合物が結合して活性化して核へ移行して転写因子として働き、芳香族化合物を分解する酵素などが誘導される。

つまり皮膚が環境からの化学物質に曝される状態では、AhR が過剰に活性化していることになる。AhR が過剰に活性化することで表皮から産生されるサイトカインが変化することが、アトピー性皮膚炎の病態の背景にあるのではないかと私たちは考えた。表皮で AhR が過剰に活性化した遺伝子導入マウスでは強いそう痒を伴う皮膚炎が生じることはこのことを裏打ちしている。私たちは in vitro で、AhR で活性化した際に表皮細胞

でおこる変化をマイクロアレイ法で解析を行ったが、さまざまな分子の発現に変化が生じていた。多数のサイトカインの発現が変化していたが、特に Th2 反応の惹起に関わる TSLP、IL33 の発現が上昇することを見出している。このことは、アトピー性皮膚炎の病態を考える上で興味深い。芳香族化合物の受容体であり転写因子である AhR が過剰に活性化することで、そのシグナルの下流の TSLP と IL33 等の分子が活性化し、Th2 優位の炎症が惹起される、という仮説を私たちは立てた。アトピー性皮膚炎は社会的に大きな問題である。現在、AhR によって表皮細胞にどのような変化が生じるのか、またどのような形で皮膚炎につながるのか、解析を進めている。この解析を進め AhR とアトピー性皮膚炎の関連の機序が解き明かすことで、アトピー性皮膚炎の予防や新規の治療法の開発につながる重要な情報が得られると考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

AhR とアトピー性皮膚炎の関連の機序を解き明かすことにより、疾患予防や新規治療法を見出すこと。

3. 研究の方法

AhR によって表皮での産生が変化する液性因子の検索

AhR が表皮で過剰に活性化したマウスでは、アトピー性皮膚炎に類似し、血中に IL-4、IL-5 といった Th2 型のサイトカイン濃度が上昇する。これは、AhR によって表皮から分泌される液性因子の質、量が変化するためではないかと思われた。活性化型 AhR を表皮細胞に過剰発現させて、表皮で産生される液性因子の変化を DNA microarray を用いて網羅的に調べる。私たちは既に、AhR によって Th2 型サイトカインである TSLP と IL-33 の発現量が増加することを明らかにしている。さらに AhR によって制御される他のサイトカインやケモカインを検索する。AhR の過剰発現で発現が変化した分子は、AhR agonists によっても同様の変化が生じるか検討する。また、siRNA を用いた AhR knockdown や AhR antagonists で過剰発現と反対の変化がみられるか検討する。AhR によってアレルギーを引き起こされる過程で、表皮細胞で産生される分子を明らかにする。

AhR によって TSLP などが誘導される分子メカニズムの解析

AhR は転写因子なので、TSLP などの転写制御領域に結合して産生を制御している可能性が考えられる。そこで、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイを用いて、AhR のゲノムへの結合を解析する。このプロセスを通じて、AhR によって TSLP などの分子の発現が制御される分子メカニズムを明らかにする。

AhR マウスを用いた in vivo 解析：表皮での液性因子産生と免疫細胞数の変化

AhR によって in vitro で誘導される分子は in vivo でも同様に制御されているのかを明らかにするため、AhR マウスの表皮で TSLP や IL-33 の他、の解析で見出した分子の発現が変化しているか免疫染色で解析する。

AhR マウスは、環境からの化学物質が皮膚に過剰な反応を引き起した場合を反映している。AhR マウスの表皮で発現が変化している分子は、環境汚染と強い関連をもったものである可能性が非常に高いものと思われる。さらに AhR マウスの皮膚の状態をより明らかにするため、樹状細胞と T 細胞の状態を免疫染色で解析する。

表皮が産生する分子による樹状細胞の成熟制御の解析

通常、T 細胞は樹状細胞の制御を介して、分化の方向性が制御されている。この点を踏まえると、AhR が過剰に活性化した表皮細胞は、樹状細胞の性質を変化させることで Th2 への分化などを変化させていることが想定される。この点を in vitro で解析するため、AhR による表皮細胞の分泌物と樹状細胞の関連を検討する。FACS を用いて樹状細胞の活性化を調べるとともに、Th2 を誘導する際に樹状細胞に発現するサイトカイン量に着目する。このプロセスで、表皮細胞による樹状細胞の制御機構を解析する。

AhR マウスを用いた in vivo 解析：AhR agonists 塗布による皮膚炎の誘発 AhR が活性化することで、皮膚にアレルギーが生じるのかという点をより明らかにするため、AhR agonists を皮膚に外用し皮膚炎が誘発されるか、表皮で TSLP の発現は上昇しているか、皮膚に浸潤する T 細胞は Th2 にシフトにシフトしているかといった点を免疫組織学的に検討する。さらに AhR antagonist を添加することで逆に炎症を抑制できるか検討を図る。

ヒトのアトピー性皮膚炎での AhR の役割の解析

ヒトのアトピー性皮膚炎でもこれまでの実験結果と同様のものが存在するのであろうかを明らかにするため、アトピー性皮膚炎の皮膚での AhR の発現を免疫染色で解析する。さらに、アトピー性皮膚炎で AhR の活性が上昇しているのか明らかにするため、AhR の下流で制御されている分子の発現変化を調べる。AhR は転写因子なので AhR の活性を調べるためには、AhR 自体の発現量ではなく、AhR によって転写が制御されている分子の発現量を調べることが理に適っているであろう。そこで、AhR によって転写誘導される CYP1A1 のアトピー性皮膚炎での発現量を免疫染色を行い解析する。

4. 研究成果

初年度は、in vitro にて、マウス培養表皮細胞を用いた解析を中心に行った。AhR を活性化もしくは抑制させることにより、変化した因子の中に、TSLP や IL33 というアトピー性皮膚炎で変化するサイトカインを認めた。免疫担当細胞についても樹状細胞が関与していることを見出した

次年度、in vivo にて、AhR が表皮で活性化したトランスジェニックマウスを用いて検討をした。免疫染色にて、TSLP や IL33 が上昇していることがわかった。樹状細胞も真皮に多数浸潤していることがわかった。このマウスの皮膚のサンプルより RNA を抽出し、定量的 PCR 法で解析をした。そうすると、Th2 反応時に上昇するサイトカインである、IL4、IL5、IL13 の上昇を認めた。つまり、AhR が表皮で過剰に活性化すると、TSLP や IL33 が増加すると同時に、Th2 反応に強く関連する抗原提示細胞の樹状細胞が増加し、関連サイトカインが増えることが示された。

最終年度は、主に、ヒトサンプルを用いて、解析を行った。アトピー性皮膚炎患者と健康人からそれぞれ皮膚サンプルを手に入れた。そして、Cyp1a1 など環境因子に関わる因子やアトピー性皮膚炎の病態に関わる Tslp などのサイトカインについて、免疫染色を用いて発現解析した。解析途中ではあるが、AhR に関連する因子は上昇していた。

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 10件)

1. Y Takazawa, T Edamitsu, K Maeno, E Ogawa, H Uhara, S Kawachi, K Ito, R Okuyama. 5-Hydroxymethylcytosine as a putative marker for erosive adenomatosis of the nipple. J Dermatol. (this article in press) (査読有り)

2. Y Takazawa, E Ogawa, R Saito, R Uchiyama, S Ikawa, H Uhara, R Okuyama. Notch down-regulation in regenerated epidermis contributes to enhanced expression of interleukin-36 and suppression of keratinocyte differentiation during wound healing. J Dermatol Sci. 79(1):10-9, 2015 (査読有り)

3. Y Kuniwa, J Li, M Wang, C Sun, JE Lee, RF Wang, HY Wang. Identification of DRG-1 As a Melanoma-Associated Antigen Recognized by CD4+ Th1 Cells. PLoS One. 10(5):e0124094. 2015. (査読あり)

4. K Sakaizawa, A Ashida, A Uchiyama, T Ito, Y Fujisawa, D Ogata, S Matsushita, K Fuji,

S Fukushima, Y Shibayama, N Hatta, T Takenouchi, J Uehara, R Okuyama, N Yamazaki, H Uhara. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci.*: S0923-1811(15)30031-1. 2015. (査読あり)

5.Y Takazawa, Y Kiniwa, E Ogawa, A Uchiyama, A Ashida, H Uhara, Y Goto, R Okuyama. Toll-like receptor 4 signaling promotes the migration of human melanoma cells. *Tohoku J Exp Med.* 234(1):57-65,2014 (査読有り)

6.M Iwade, E Ogawa, H Koga, F Mizuno, K Koike, K Matsumoto, R Okuyama. Generalised acanthosis nigricans in childhood with short stature associated with poor response to growth hormone provocation. *Acta Derm Venereol.* 94(4):486-7,2014 (査読有り)

7.Y Mikoshiba, E Ogawa, R Uchiyama, A Uchiyama, H Uhara, R Okuyama. 5-Hydroxymethylcytosine is a useful marker to differentiate between dermatofibrosarcoma protuberans and dermatofibroma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014 [Epub ahead of print] (査読有り)

8.R Uchiyama, H Uhara, A Uchiyama, E Ogawa, Y Takazawa, A Ashida, H Koga, K Hayashi, Y Kiniwa, R Okuyama. 5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. *J Dermatol Sci.* 73(2):161-3,2014 (査読有り)

9.A Ashida, H Murata, A Ohashi, E Ogawa, H Uhara, R Okuyama. A case of hypocomplementemic urticarial vasculitis with a high serum level of rheumatoid factor. *Australas J Dermatol* 54(3):e62-3,2013 (査読有り)

10.Y Ishikawa, M Hosogane, R Okuyama, S Aoyama, I Onoyama, K Nakayama K, K Nakayama. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth-differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* 32(15):11921-32,2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計 1件)

1.T Hidaka, E Ogawa (他6名、2番目), Aryl hydrocarbon receptor activation at

keratinocyte leads to atopic dermatitis-like lesion via artemin induction
the 45th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research
2015/9/9
Rotterdam, The Netherlands

〔図書〕(計 1件)

1.小川英作 他. TNF- 阻害薬を投与中に掌蹠膿疱症様皮疹を生じた乾癬の2例. *Visual Dermatology.* vol.13 No.3 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川英作 (OGAWA, Eisaku)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 20451586

(2)研究分担者

木庭幸子 (KINIWA, Yukiko)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部付属病院)・講師
研究者番号: 20436893

奥山隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 80292332