

Title	アクアポリンが透過するH2O2による皮膚の炎症形成機構の解明
Sub Title	Role of Aquaporin mediated H2O2 in inflammatory skin disease
Author	竹馬, 真理子(Chikuma, Mariko) 田中, 愛美( Tanaka, Manami) Glady, Azela
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>皮膚においてNADPH Oxidase(Nox)が産生する過酸化水素(H2O2)は, AQP3あるいは9を介して細胞内に取り込まれることで, 炎症形成と疾患に関与するという仮説を検証した。紫外線B(UVB)照射による皮膚炎症には表皮細胞に発現するNox1が関与していた。表皮細胞では, UVB照射により誘発されるH2O2の産生がNox1欠損によって減少しており, これに伴いp38/MAPK細胞シグナルの活性化の抑制と, 炎症性サイトカイン産生が抑制された。表皮細胞で産生された高濃度のH2O2は, AQP3を介して細胞外へ分泌されている可能性が示され, また皮膚でおこる炎症反応惹起に関与していることも示された。</p> <p>Members of NADPH oxidase (Nox) enzyme family are important sources of reactive oxygen species (ROS) and are known to be involved in several physiological functions in response to various stimuli including UV irradiation. UVB-induced ROS have been associated with inflammation, cytotoxicity, cell death, or DNA damage in human keratinocytes. However, the source and the role of UVB-induced ROS remain undefined. We found that Nox1 was involved in UVB-induced p38/MAPK activation, cytokine production, and cytotoxicity via ROS generation in keratinocytes. In vivo assay using wild-type mice, the intradermal injection of lysates from UVB-irradiated control cells, but not from UVB-irradiated Nox1 knockdown cells, induced inflammatory swelling and IL-6 production in the skin of ears. These data suggest that Nox1-mediated ROS production is required for UVB-induced cytotoxicity and inflammation through p38 activation and inflammatory cytokine production, such as IL-6.</p>
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2016 ~ 2017 課題番号 : 16K10125 研究分野 : 皮膚科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10125seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K10125seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K10125

研究課題名(和文) アクアポリンが透過するH2O2による皮膚の炎症形成機構の解明

研究課題名(英文) Role of Aquaporin mediated H2O2 in inflammatory skin disease

研究代表者

竹馬 真理子 (CHIKUMA, MARIKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：40531736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚においてNADPH Oxidase (Nox) が産生する過酸化水素(H2O2)は、AQP3あるいは9を介して細胞内に取り込まれることで、炎症形成と疾患に関与するという仮説を検証した。紫外線B(UVB)照射による皮膚炎症には表皮細胞に発現するNox1が関与していた。表皮細胞では、UVB照射により誘発されるH2O2の産生がNox1欠損によって減少しており、これに伴いp38/MAPK細胞シグナルの活性化の抑制と、炎症性サイトカイン産生が抑制された。表皮細胞で産生された高濃度のH2O2は、AQP3を介して細胞外へ分泌されている可能性が示され、また皮膚でおこる炎症反応惹起に関与していることも示された。

研究成果の概要(英文)：Members of NADPH oxidase (Nox) enzyme family are important sources of reactive oxygen species (ROS) and are known to be involved in several physiological functions in response to various stimuli including UV irradiation. UVB-induced ROS have been associated with inflammation, cytotoxicity, cell death, or DNA damage in human keratinocytes. However, the source and the role of UVB-induced ROS remain undefined. We found that Nox1 was involved in UVB-induced p38/MAPK activation, cytokine production, and cytotoxicity via ROS generation in keratinocytes. In vivo assay using wild-type mice, the intradermal injection of lysates from UVB-irradiated control cells, but not from UVB-irradiated Nox1 knockdown cells, induced inflammatory swelling and IL-6 production in the skin of ears. These data suggest that Nox1-mediated ROS production is required for UVB-induced cytotoxicity and inflammation through p38 activation and inflammatory cytokine production, such as IL-6.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚炎症 紫外線 アクアポリン NOXファミリー 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) は、主に過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、スーパーオキシド ( $O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $OH^\cdot$ )、一重項酸素 (NO) の 4 種とされている。ROS の多くは、種々の刺激 (創傷、紫外線、低酸素など) に応答してミトコンドリアの電子伝達系で産生されており、細胞の DNA、脂質、タンパク質といった重要な生体成分に損傷を与え得ることから、酸化ストレスとして、癌や生活習慣病、老化の要因の一つであるとされ、研究が進められてきた (Paulsen et al., ACS Chem Biol, 2010)。一方、細胞膜近傍では、サイトカインや増殖因子などの刺激に応答して、細胞膜に局在する NADPH Oxidase (Nox) が活性化され、 $O_2^-$  および  $H_2O_2$  が産生されている (Gough et al., Cell Death and Disease, 2011)。細胞外に産生された  $H_2O_2$  は、迅速に細胞内に取り込まれ、second messenger として特定の蛋白および細胞内シグナルに影響を与え、その下流でおこる細胞機能 (細胞増殖、分化、遊走など) を制御していることが明らかになってきている (Rhee, S.G, Science, 312:1882, 2006)。しかしながら、細胞内への  $H_2O_2$  の輸送メカニズムや、取り込まれた  $H_2O_2$  の細胞内動態は詳細に検証されておらず、最近まで、主に細胞膜を介した Diffusion (拡散) に依存して  $H_2O_2$  が取り込まれていると考えられていた。

皮膚は、真皮層の基盤となる線維芽細胞、表皮層の 90% 以上を構成する表皮細胞のほか、多様な免疫細胞から構成されている。様々な外的刺激によってこれらの恒常性が乱れ、細胞間クロストークにおけるサイトカインや生理活性物質のアンバランスが起こることにより、疾患が起こると考えられる。いくつかの炎症性疾患では、皮膚組織あるいは免疫系細胞の両方において、 $H_2O_2$  を含む ROS の増加が認められ、疾患への関与が示唆されているが、その詳細は不明であった (Bickers et al., J Invest Dermatol, 2006)。

アキアポリン (AQP) は、水分子を選択的に透過させる蛋白として 1992 年に発見された。現在まで、水や低分子化合物を透過するものも含め、哺乳類では 13 種 (AQP0-12) が同定されて

おり、水だけを透過させる AQP (0, 1, 2, 4, 5)、水とグリセリンのような非イオン性小分子を通す AQP (3, 7, 9, 10)、多様な物質透過性を有する AQP (6, 8, 11, 12) に分類されている。AQP は、腎臓や腸管など水の代謝が盛んな臓器での水透過を担うほか、細胞レベルでは、水やその他の物質輸送を介して、さらに高次の生命現象を制御することが明らかになってきており、申請者はこれまでに、様々な細胞に発現する AQP の新たな機能や、疾患との関連性を提唱してきた。

申請者はこれまでに、表皮細胞および免疫細胞の両方において、 $H_2O_2$  が AQP3 によって細胞内へ輸送され、second messenger として cell signaling を制御していること、およびその調節不全が、皮膚におけるさまざまな病態に必須であることを明らかにしてきた。たとえば T 細胞では、ケモカイン (CXCL12) 刺激により  $H_2O_2$  が細胞外に産生され、AQP3 により細胞内に取り込まれた後、Redox regulated protein を修飾 (酸化) することで、その下流の cell signaling を調節していた。AQP3 欠損 T 細胞は、CXCL12 により誘発される細胞遊走が顕著に低下しており、これに伴い、AQP3 欠損マウスではハプテン誘発接触皮膚炎反応が抑制されていた (Hara-Chikuma et al., J Exp Med, 2012)。また表皮細胞では、TNF 刺激により生成された  $H_2O_2$  が AQP3 により細胞内に取り込まれ、NF- $\kappa$ B 活性化に利用されていた。AQP3 欠損表皮細胞では、TNF 刺激により生じる細胞内  $H_2O_2$  量の増加と NF- $\kappa$ B 活性化が抑制されており、これに伴い AQP3 欠損マウスでは、NF- $\kappa$ B 活性化が発症要因の 1 つとなる乾癬発症を抑制していた。さらに、Nox2 活性化により産生された  $H_2O_2$  を AQP3 が細胞内に透過するメカニズムを探索する過程で、申請者は、Nox2 と AQP3 が複合体を形成していることを見出している (Hara-Chikuma et al., Nat Commun, 2015)。

当研究では、上述の研究を発展させ、AQP3 が細胞内へ取り込む  $H_2O_2$  の、炎症性シグナルおよび皮膚疾患形成への関与と制御メカニズムに着目して研究を進める。また炎症反応惹起の際に生じる表皮細胞と免疫細胞間のクロストークに  $H_2O_2$  が関与している可

能性を検証する。

## 2. 研究の目的

表皮細胞および免疫細胞を研究対象とし、皮膚の慢性炎症環境形成および炎症性疾患発症の過程で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が関与するcell signalingを明らかにし、その制御機序を解明する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生遺伝子としてNox1およびNox2、細胞内にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を透過する候補遺伝子としてAQP3 およびAQP9に着目し、次の3項目を検討した。

- 1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がsecond messenger として関与する炎症性cell signalingの同定、制御メカニズムの解析
- 2) そのcell signalingが関与する炎症性皮膚疾患の制御機構
- 3) 表皮細胞・免疫細胞間クロストークへのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の関与とメカニズム解析

## 3. 研究の方法

### (1) 接触皮膚炎モデル

Nox1, Nox2およびAQP9遺伝子欠損マウス(C57BL/6 genetic background)は、2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)を腹部に塗布し感作した。塗布5日後にDNFBを耳介に塗布し(チャレンジ)、24時間後の耳介浮腫をmicrometer(Mitsutoyo)により測定した。

### (2) アトピー性皮膚炎(AD)マウスモデル

マウスは、背中に卵白アルブミン(OVA, 100 mg in 100  $\mu$ l saline)を貼付し、AD症状を惹起した(1週間のうち4日間貼付、1ヶ月間)。ハプテンADモデルでは、2.5% oxazoloneを1回塗布し、1週間後から、0.1% oxazoloneを隔日塗布した(3週間)。最終貼付あるいは塗布から24時間後にTEWL測定および皮膚のサンプリングを実施し、HE染色等を実施した。

### (3) 乾癬マウスモデル

TLR7アゴニストであるimiquimod(5%, Beselna Cream; Mochida Pharmaceuticals, Tokyo)を、マウス耳介に6日間塗布し、耳介浮腫をmicrometer

(Mitsutoyo)により測定した。HE染色などにより、乾癬発症頻度を解析した。

### (4) 表皮細胞による紫外線B照射

ヒト由来表皮細胞(HaCaT)は、10% FBSを含むDMEM培地にて培養し、実験に用いた。UVB(15–100 mJ/cm<sup>2</sup>, 302 nm peak)を照射し、照射直後から24時間後までの細胞を解析に供した。

## 4. 研究成果

皮膚において、様々な刺激によりNADPH Oxidase(Nox)が産生する過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を含むROS(活性酸素)が、皮膚の炎症形成と疾患に関与していること、また、このH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の細胞内外への移動には、AQP3あるいはAQP9が関与していることを検討した。

皮膚でのNoxファミリーの発現分布を調べたところ、表皮細胞ではNox1およびNox2が、T細胞や樹状細胞、好中球など免疫細胞ではNox2が主に発現していた。ROSの炎症性皮膚疾患への関与を、マウスモデルを用いてしらべた。Nox1およびNox2欠損マウスを用い、ハプテン誘発性の接触皮膚炎モデル、アトピー性皮膚炎モデル、TLR7活性化による乾癬モデルにおける発症頻度を、野生型マウスと比較し解析したところ、すべてのモデルで野生型マウスと同程度の発症を示した。同様にAQP9欠損マウスでも、アトピー性皮膚炎と乾癬発症モデルにおいて、野生型と同程度の発症頻度を示した。これらの結果から、Nox1, Nox2, AQP9はアトピー性皮膚炎発症や乾癬発症過程には大きく寄与していないと考えられた。

他方、ROSの表皮細胞での機能を検証すべく、ROSを大量に発生する刺激である紫外線B(UVB)をマウス、および表皮細胞に照射し、細胞機能を解析した。UVB照射による皮膚炎症頻度は、Nox1欠損マウスで低減していた。表皮細胞では、UVB照射により誘発されるROS(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む)の産生がNox1欠損あるいはNox1阻害剤の投与で減少していた(図1)。

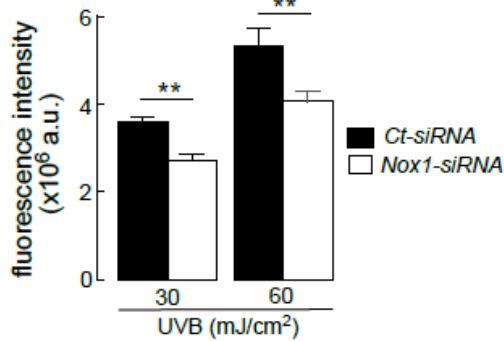


図1. 表皮細胞におけるNox1発現減少にもなうUVB誘発性ROS産生減少

これに伴い、p38/MAPK 細胞シグナルの活性化の抑制と(図2)、炎症性サイトカインであるインターロイキン6やTNF 産生の抑制が確認された(図3)。

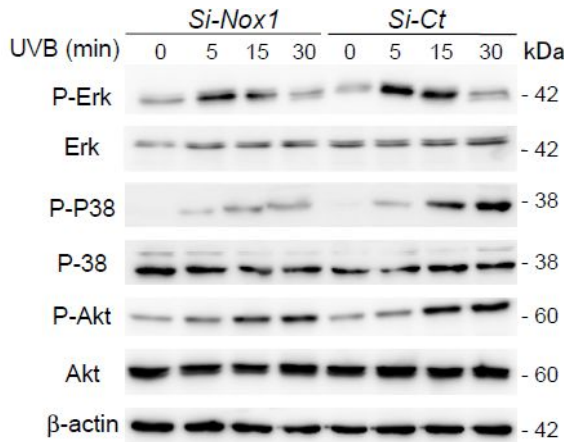


図2. 表皮細胞におけるNox1発現減少によるp38活性化の抑制

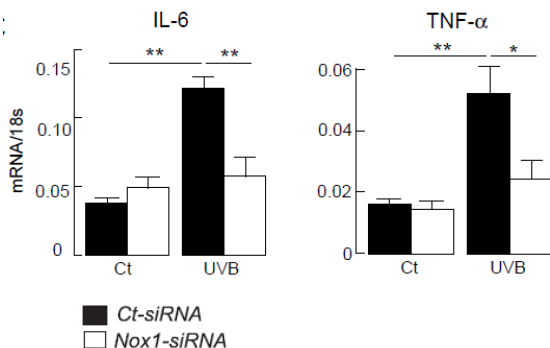


図3. 表皮細胞におけるNox1発現減少による炎症性サイトカイン産生の抑制

一連の結果から、表皮から産生された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

が細胞シグナル制御に関与していることを確認した。表皮細胞で産生された高濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞毒性は、Nox1の阻害によって減弱していた。また細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は AQP3 を介して細胞外へ分泌されている可能性が示され、皮膚でおこる炎症反応惹起に関与していることが示された。

## 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)

1. Glady A, Tanaka M, Moniaga CS, Yasui M, Hara-Chikuma M\*. Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes. Biochem. Biophys. Rep. 2018, 14:7-15.\*; 責任著者 査読有り

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.03.004>

(学会発表)(計1件)

1. Glady A, Tanaka M, Moniaga CS, Yasui M, Hara-Chikuma M. Involvement of NADPH oxidase 1 in UVB-induced cell signaling and cytotoxicity in human keratinocytes. 18<sup>th</sup> World congress of basic and clinical pharmacology, 2018年7月, 京都

(産業財産権)

出願状況(計1件)

名称: アクアポリン3(AQP3)の細胞外ドメインと特異的に結合する抗AQP3モノクローナル抗体、及びその使用

発明者: 竹馬真理子, 安井正人

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: 2017-198895号

出願年月日: 2017年10月12日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹馬 真理子 (CHIKUMA, Mariko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号: 40531736

### (2) 研究協力者

田中 愛美 (TANAKA, Manami) ・研究員

アゼラ グレディ (GLADY, Azela) ・大学院生