

ヒト表皮角化細胞における細胞外 ATP の機能解析

東北大学大学院薬学研究科
医療薬科学専攻

大原 宏司

略語一覧

本文中並びに図表中に以下の略語を用いた。

ADP	adenosine 5'-diphosphate
AMP	adenosine 5'-monophosphate
ATF	activating transcription factor
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATP _γ S	adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
BSA	bovine serum albumin
CCL	CC chemokine ligand
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CXCL	CXC chemokine ligand
CXCR	CXC chemokine receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRO	growth related oncogene
ICAM	intercellular adhesion molecule-
IFN- γ	interferon-gamma
I κ B	inhibitor of kappa B
IL	interleukin
JAK	janus kinase
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NHEK	normal human epidermal keratinocyte
PBS	phosphate buffered saline
PPADS	pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	signal transducers and activators transcription
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
UTP	uridine 5'-triphosphate
VEGF	vascular endothelial growth factor

目次

第1章 緒言	1
第2章 NHEKsにおいてATP刺激により誘導される免疫応答因子の探索	
2-1 序論	7
2-2 ATP刺激により誘導される免疫応答因子の同定	7
2-3 ATP誘導性免疫応答因子のタンパク質レベルにおける発現解析	14
2-4 結語	20
第3章 NHEKsにおいてATP刺激により活性化されるSTAT3のリン酸化機構の解明	
3-1 序論	21
3-2 ATP刺激により亢進するリン酸化STAT3の経時変化解析	21
3-3 ATP誘導性サイトカインによるSTAT3のリン酸化機構の解析	23
3-4 結語	27
第4章 総括	28
第5章 実験方法	29
謝辞	41
引用文献	42
発表論文リスト	51

第1章 緒言

生体の最外を形成する表皮細胞は、外界から体内を保護するだけでなく、紫外線や真菌、バクテリアによる暴露のほか、物理的あるいは化学的刺激などの様々な環境刺激に対し、サイトカインやケモカイン及びプロスタグランジン類などの前炎症性メディエータを産生することにより、皮膚の創傷治癒や免疫応答において重要な役割を担っている⁽¹⁻⁶⁾。通常、表皮細胞にかかる傷の修復が完了すると、表皮増殖および免疫応答は停止し、定常状態へと戻る。しかしながら、このバランスが崩壊することにより表皮過形成が起こり、乾癬という炎症性皮膚疾患が発症することがある (Fig. 1)。

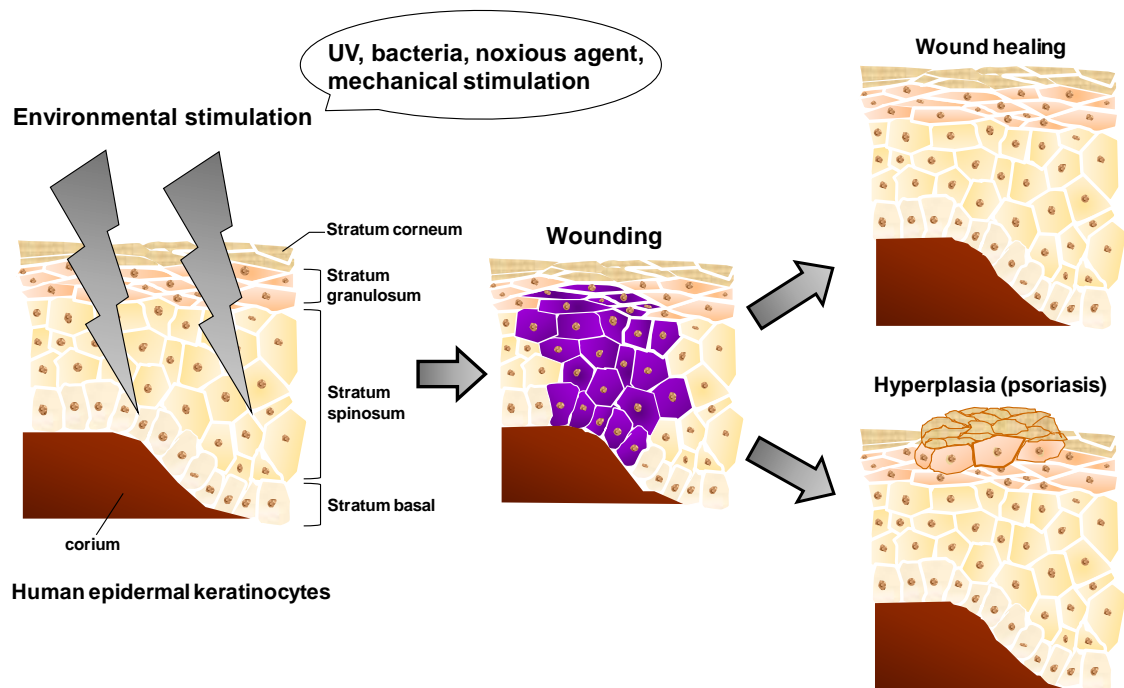


Fig. 1 Wound healing or hyperplasia of epidermis following exposure to environmental stimulation in human epidermal keratinocytes.

乾癬は、健康な皮膚との境目が明確な赤みを帯びた皮膚の盛り上がり(皮疹)と剥がれた角質(鱗屑)が現れる表皮増殖異常と病変部における免疫細胞の浸潤や血管新生の亢進が特徴の慢性炎症性疾患であり、白人を中心として世界人口の約2~3%に影響を及ぼしているとされる⁽⁷⁾。また、本皮膚疾患は非感染性であり、内臓への障害性は無い。発症部位は個々により様々であり、頭皮、肘、膝など摩擦の多いところに発症することがわかっている。また、乾癬患者の皮膚にひっかく、な

らびに摩擦などの物理的刺激を与えると、乾癬症状が悪化することがわかっており、この現象はケブネル現象と呼ばれている。さらに、これまでの知見により、乾癬病変部においてIL-6、IL-8/CXCL8、IL-20サブファミリー、IL-20受容体複合体およびCCLまたはCXCLケモカイン類とその受容体の高発現が報告されている⁽⁸⁻¹⁵⁾。これらの炎症性サイトカインやケモカイン類は、多くの炎症性皮膚疾患にも影響を及ぼしているが、2005年、Sanoらは、乾癬病変部に特異的に高発現する因子として、signal transducers and activators transcription 3 (STAT3)の活性化体であるリン酸化STAT3の存在を見出した⁽¹⁶⁾。

STAT3は、転写因子の一つであり、その活性化（リン酸化）は、種々の受容体が活性化されることにより作動するチロシンキナーゼを介した反応によりなされ、例えば、非受容体型チロシンキナーゼであるJanus kinase (JAK)の活性化に関連するサイトカイン受容体やGタンパク質共役型受容体、または表皮増殖因子受容体のような受容体型チロシンキナーゼを介した細胞内イベントとして広く知られている^(11, 17-20)。サイトカイン類や増殖因子は、各受容体に作用した後、チロシンキナーゼを活性化させることにより、STAT3の705番目のチロシン (tyr705)にリン酸基を付加する。リン酸化を受けたSTAT3は、互いのリン酸化チロシン残基を有するSrc homology 2 (SH2)ドメインにおける相互作用により二量体を形成し、核内へと移行後、本転写因子が制御する遺伝子に結合する⁽²¹⁾。その後、さらに727番目のセリン (ser727)にリン酸化を受けることにより、その制御下にある遺伝子、すなわちCyclin D1、c-Myc、I κ B- α 、TGF- α 、VEGF、ICAM-1、Bcl-xLなどを発現させ、細胞増殖、血管新生および抗アポトーシス作用や免疫応答の惹起などを調節している^(16, 22-24)。

このように様々な細胞過程を制御するSTAT3は、皮膚においては細胞周期や創傷治癒に貢献している。通常、傷の治癒が完了した後、リン酸化STAT3は不活性型に戻り、表皮増殖は停止する。しかしながら、乾癬病変部においては、サイトカインやケモカイン類の高発現、およびSTAT3のリン酸化の亢進により、表皮増殖の過剰な反応が表皮過形成を引き起こしていると考えられる。

また、乾癬病変部におけるこれまでの知見を踏まえ、乾癬の悪化に見られるケブネル現象の予測メカニズムについて、Fig. 2に示した。これは、まず乾癬患者の皮膚にひっかく、または摩擦などの物理的刺激が加わると、何らかの原因でサイトカイン・ケモカインが産生され、これらによるSTAT3

のリン酸化、およびケモカインによる血管新生から表皮過形成が起こり、乾癬症状に悪循環が生じるといものである。乾癬病変部において、これらサイトカインやケモカインの発現が起こる原因は明らかとはなっていないが、皮膚への傷害や刺激が乾癬の発症や悪化の原因になっていることが推察される。

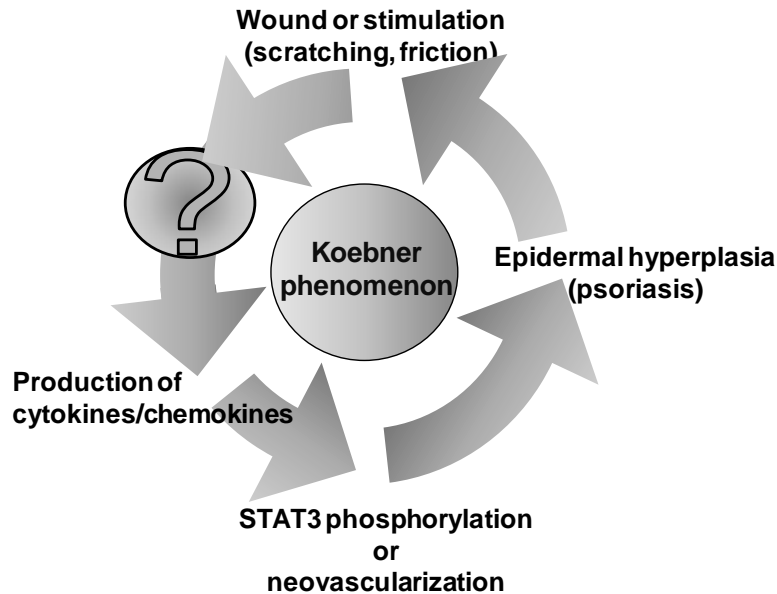


Fig. 2 Predictive mechanism of koebner phenomenon in psoriasis.

さて、最近、表皮細胞に物理的的刺激または有害物質による化学的的刺激が加わると、生体の活動および生理機能を維持するために必須な化学伝達物質であるアデノシン三リン酸 (ATP)が細胞外に放出されることが報告された^(25, 26) (Fig. 3)。そればかりか、このように様々な細胞組織へのストレスや傷害に伴って細胞外に放出されたATPは、近傍の免疫細胞に作用することにより、サイトカインやケモカイン類の産生を促すことが報告されており、danger signalの一つとして、免疫、アレルギー、炎症反応などにおける役割に注目が寄せられている⁽²⁷⁻³¹⁾。

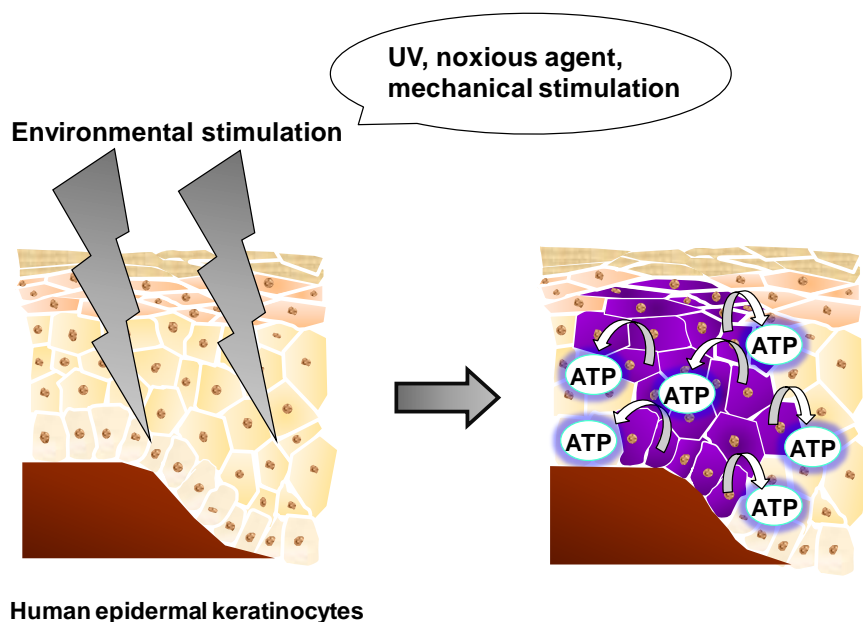


Fig. 3 ATP release following exposure to environmental stimulation in human epidermal keratinocytes.

ATPは、小胞、担体または細胞膜チャネルを介して細胞外へ放出され⁽³²⁻³⁴⁾、細胞表面に発現する種々のプリン作動性受容体のうち、P2受容体を介して細胞内へシグナルを伝達する (Fig. 4)。プリン作動性受容体には、ヌクレオシドであるアデノシンが作用するP1受容体とATPを含むヌクレオチド類が作用するP2受容体に大別される。P2受容体は、陽イオンチャネル内蔵型のP2X受容体と、膜7回貫通Gタンパク質共役型のP2Y受容体の二つのファミリーに大別される⁽³⁵⁾。P2X受容体には、P2X₁、P2X₂、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆およびP2X₇のサブタイプがあり、ホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成している。細胞外のヌクレオチド類がP2X受容体に作用すると、細胞内へのカルシウムの流入が起こり、これにより細胞内シグナル伝達を調節している。

一方、P2Y受容体には、G_qタンパク質共役型のP2Y₁、P2Y₂、P2Y₄およびP2Y₆受容体、G_iタンパク質共役型のP2Y₁₂、P2Y₁₃およびP2Y₁₄受容体と、G_qとG_s両タンパク質が共役するP2Y₁₁受容体が存在する^(28, 36, 37)。G_qタンパク質が共役するP2Y受容体にATPなどのヌクレオチド類が作用すると、膜付随のホスホリパーゼC (PLC)の活性化により、ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂)がイノシトール三リン酸 (IP₃)とジアシルグリセロール (DAG)に加水分解される。生成したIP₃は小胞体からカルシウムを放出させ、またDAGはプロテインキナーゼC (PKC)の活性化を介して標的タンパク

質をリン酸化することで細胞内シグナル伝達を調節している。G_sタンパク質の共役するP2Y受容体の場合は、アデニル酸シクラーゼ (AC)の活性化によりATPからサイクリックAMP (cAMP)が生成し、これがプロテインキナーゼA (PKA)の活性化を介して、標的タンパク質をリン酸化する。逆に、G_iタンパク質共役型P2Y受容体の刺激は、ACの活性化を阻害し、cAMPの産生を抑制する。このように、P2受容体は、複数の経路を介して細胞外ATP由来のシグナルを細胞内に伝達し、様々な細胞機能の調節に関与している。

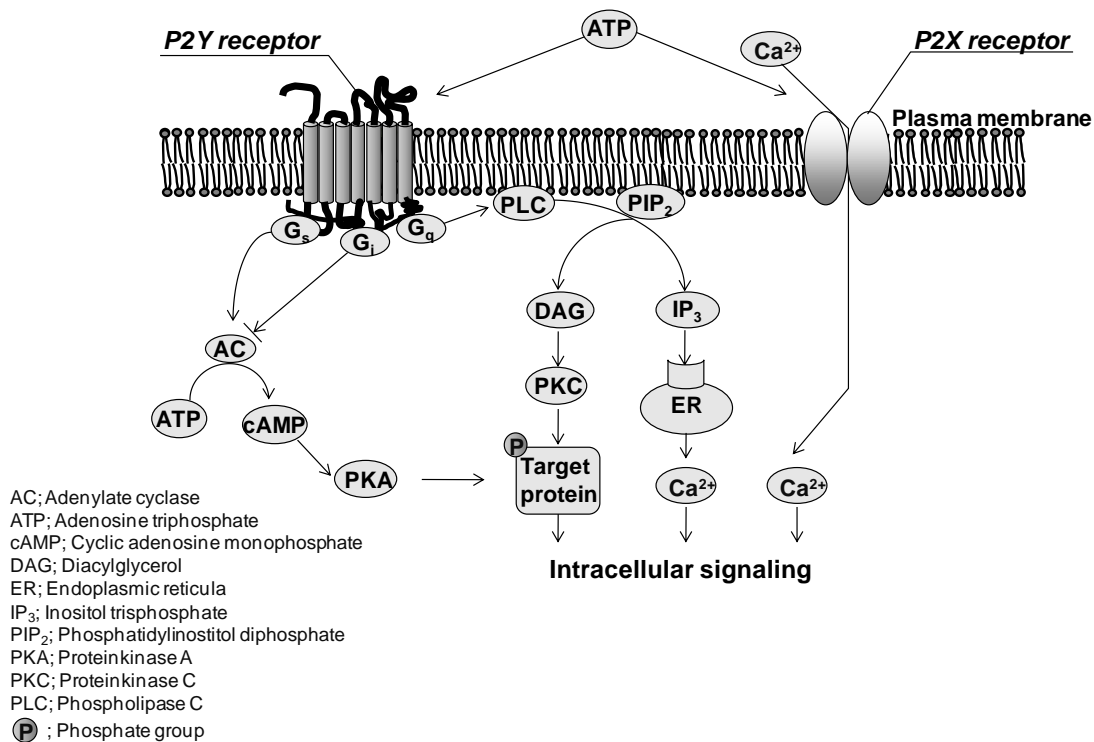


Fig. 4 Schematic diagram of P2X and P2Y receptor signaling pathway.

表皮細胞においては、P2X₁、P2X₃、P2X₄、P2X₅、P2X₆、P2X₇受容体およびP2Y₁、P2Y₂、P2Y₄、P2Y₆、P2Y₁₁、P2Y₁₂、P2Y₁₃受容体の発現が確認されており⁽³⁸⁾、これまでに、細胞外ATPが表皮細胞の増殖、分化、アポトーシスや、細胞間情報伝達に関与することが報告されている^(26, 29, 39-41)。さらに最近、細胞外ATPが、表皮細胞において炎症性サイトカインの一つであるIL-6の産生を誘導することが明らかになった^(42, 43)。また、樹状細胞^(31, 44)、表皮ランゲルハンス細胞⁽⁴⁵⁾、肥満細胞⁽⁴⁶⁾などの免疫細胞や皮膚繊維芽細胞⁽⁴⁷⁾および皮膚微小血管内皮細胞⁽³⁰⁾のような皮膚に存在する

様々な細胞においても、細胞外ATP刺激によって免疫応答因子の産生を促進することが報告されている。これらのことから、表皮細胞から放出されるATPは、皮膚の恒常性維持や免疫、炎症やアレルギー反応において重要な役割を担っているものと考えられる。以上より、皮膚に外的刺激が加わった際、細胞外にATPの放出が起こっていることが推測されることから、乾癬の悪化因子の一つとして、ATPが関与している可能性が予想された (Fig. 5)。

これまでの知見により、細胞外ATPは、表皮細胞においてIL-6の産生を亢進することが明らかとなっているが、ATPに誘導されるIL-6が乾癬の発症や悪化に重要なSTAT3のリン酸化を引き起こすかどうかについては議論されていない。さらに、ATPが誘導するサイトカインが

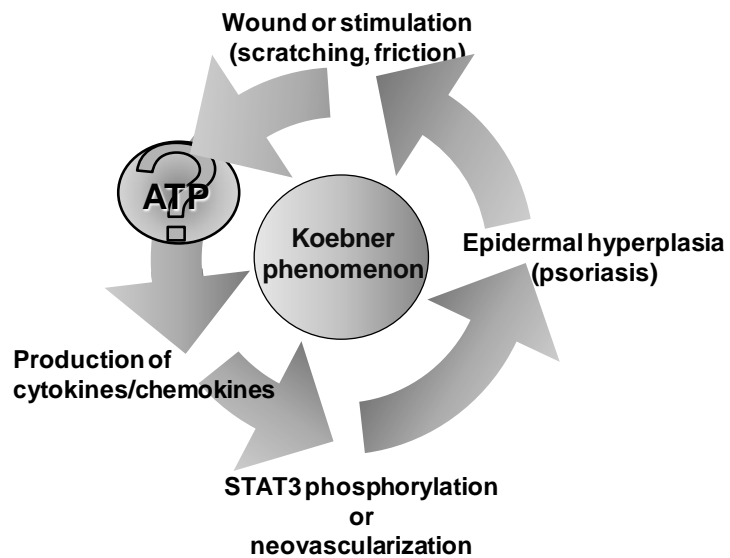


Fig. 5 Possibility that extracellular ATP becomes the aggravation factor of psoriasis .

IL-6特異的であるかどうか、その標的となる免疫応答因子の全容は未だ十分に解明されているとは言えない。これらのことから、表皮における細胞外ATPの生理的意義を明らかにすることは、炎症性皮膚疾患や皮膚の恒常性維持機構を理解するうえで重要であると考えられた。そこで今回、細胞外ATPが表皮細胞に作用した際に誘導される免疫応答因子を探索するとともに、それらの機能を解析し、乾癬の病態及び表皮におけるATPの生理的役割を明らかにすることを目的として、本研究に着手した。

第2章 NHEKsにおいてATP刺激により誘導される免疫応答因子の探索

2-1 序論

先にも述べたように、細胞外 ATP は、表皮細胞表面に発現する P2 受容体を介して、炎症性サイトカインである IL-6 の産生を誘導する^(42, 43)。一方、Interferon- γ (IFN- γ)で刺激した培養ヒト表皮細胞に ATP を添加すると、CCL2、CCL5 および IL-8/CXCL8 の産生が亢進する一方、CXCL9、CXCL10、CXCL11 の産生が抑制されることも報告されており、ATP 刺激がケモカインの一部の産生をも調節していることが明らかになっている⁽³⁸⁾。これらの事実は、ヒト表皮細胞における細胞外 ATP が、皮膚免疫応答に関連する重要な役割を担っていることを示唆している。しかしながら、前述のサイトカインやケモカイン類のほか、細胞外 ATP の誘導する免疫応答因子の全容は未だ明確とは言えない。

そこで、アレルギー性皮膚疾患や表皮細胞における恒常性維持や皮膚免疫における細胞外 ATP の役割を理解することを目指し、DNA マイクロアレイを用いて、細胞外 ATP によって誘導される免疫応答因子の網羅的な遺伝子発現解析を行うこととした。また、発現に変動の認められた遺伝子に関して、定量 RT-PCR 法、ELISA およびウエスタンブロット法を用いて、それらの発現量を追跡することとした。

2-2 ATP刺激により誘導される免疫応答因子の同定

ATP を含む細胞外ヌクレオチド類が P2 受容体に作用すると、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する^(26, 43)。そこでまず、細胞内カルシウム濃度の変化を指標として、ATP の細胞応答性を評価し、これにより以後の実験に用いる至適な ATP 濃度を検討した。なお、本検討は東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座皮膚科学分野 相場節也 先生らによって行われたものである。

ロットの異なる7つの NHEKs を用いて、10 μ M、100 μ M、1 mM、10 mM、100 mM の ATP によりそれぞれ刺激し、蛍光カルシウムイオン検出試薬である Fura-2 を用いて細胞内カルシウムイオン濃度を測定した。Fura-2 は、励起波長 340 および 380 nm、蛍光波長約 510 nm で測定できる蛍光カルシウム検出試薬であり、分子中のカルボキシル基にカルシウムイオンが結合すると、340 nm の光によって励起される蛍光強度 (340 nm/510 nm)が増大し、逆に 380 nm の光によって励起される蛍光強度 (380 nm/510 nm)は低下する。よって、340 nm および 380 nm の両波長の光によって励起されたときの 510 nm の蛍光強度比 (340 nm/510 nm)/(380 nm/510 nm)は、細胞内カルシウムイオン濃度と相関することから、これにより測定が可能となる。Fig. 6 に示したように、いずれのロットの NHEKs においても ATP 濃度 10 μ M により細胞内カルシウムイオンの上昇が認められ、100 μ M のときに最大となることが判った。また、1 mM 以上の ATP 添加による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は 100 μ M に比較して低いことから、以後の実験では最大反応を惹起する 100 μ M の ATP を用いることとした。

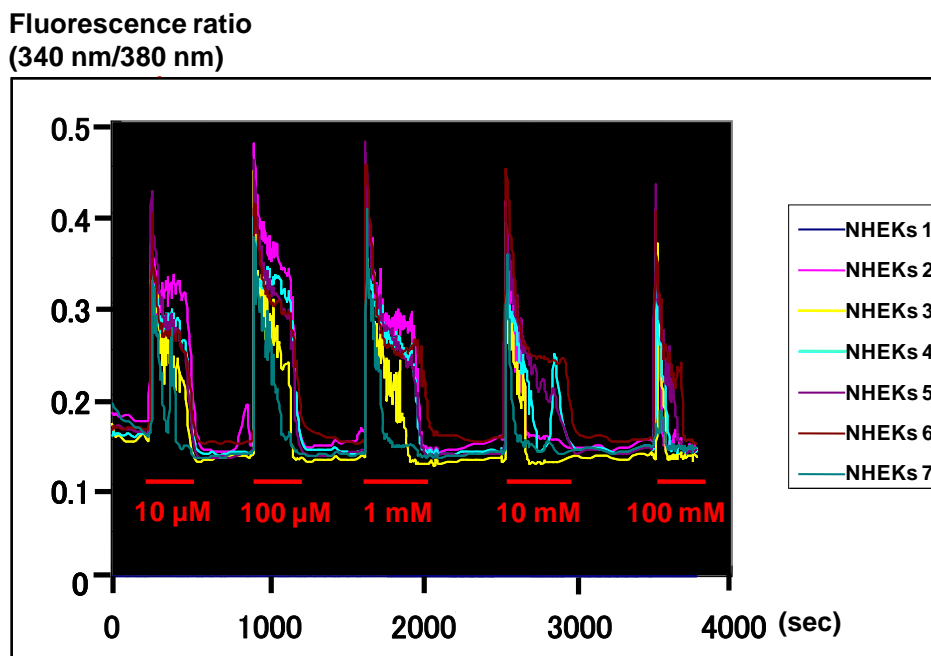


Fig. 6 Increase of intracellular calcium concentration in ATP-stimulated NHEKs.

Increases in intracellular calcium in NHEKs of seven strains were monitored by ratiometric Fura-2 fluorescence (340 nm/380 nm). The maximum intracellular calcium increase was observed when cells were stimulated with 100 μ M.

次に、細胞外 ATP の皮膚免疫における役割の解明を目的として、ATP (100 μ M) で 1 時間刺激、または未処理の NHEKs における DNA マイクロアレイ解析を行った。なお、発現変動の認められた遺伝子の絞り込みは、Fig. 7 に示した戦略にて行った。

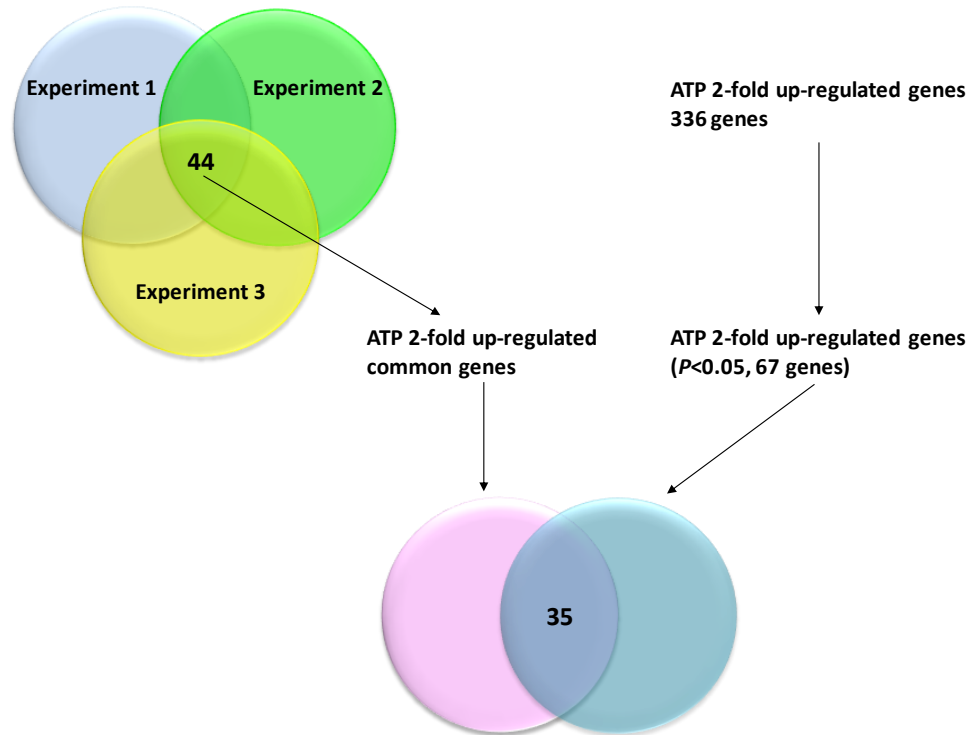


Fig. 7 Identification strategy of up-regulated genes by extracellular ATP in NHEKs.

まず、同じ実験を 3 回繰り返し行い、mRNA 発現量の平均値が未処理群と比較して 2 倍以上増加した遺伝子 336 個を選択した。次に、これらに対して Paired Student's *t*-test を行い、有意差 ($P<0.05$) の認められた遺伝子 67 個を抽出した。一方、3 回の実験全てに共通して未処理群の 2 倍以上発現が増加した遺伝子 44 個を抽出し、これらと先の 67 個のうち、共通する遺伝子 35 個を抽出した。3 回いずれの実験においても 2 倍以上発現が増加し、かつ有意差 ($P<0.05$) の認められた合計 35 個の遺伝子リストを Table 1 にまとめた。これら 35 個の遺伝子につき、Gene Ontology (GO) データベース (<http://www.geneontology.org/>) を用いて、遺伝子の機能を分類した。各 GO term において選定された遺伝子は、Fischer's exact test による統計解析を行って有意差 ($P<0.05$) の認められたもの、すなわち、各 GO term に分類される遺伝子群の存在が偶然ではないと判断されたものとした。

Table 1. List of genes significantly up-regulated by ATP-stimulated NHEKs.

Description	Gene Symbol	Genbank	Ratio Average	P-value
Nuclear receptor subfamily 4A3	NR4A3	NM_173198	52.440	0.01
Nuclear receptor subfamily 4A1	NR4A1	NM_002135	49.328	0.00377
Interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	NM_000600	31.527	0.00293
Nuclear receptor subfamily 4A2	NR4A2	NM_006186	18.561	0.0107
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	FOSB	NM_006732	14.454	0.0224
Activating transcription factor 3	ATF3	NM_004024	12.071	0.00327
Dual specificity phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	10.902	0.00168
	BG950086	BG950086	6.941	0.0125
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	NM_002090	5.880	0.0094
Regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	NM_002923	5.395	0.00537
V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	NM_005252	4.709	0.0308
CDNA clone IMAGE:4689481	BC022398	BC022398	4.679	0.00173
Forkhead box A1	FOXA1	NM_004496	4.664	0.0199
Interleukin 20	IL20	NM_018724	4.656	0.0472
Serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	NM_005627	4.557	0.0403
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	NM_005204	4.511	0.000538
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	NM_002089	4.481	0.00044
SNF1-like kinase	SNF1LK	NM_173354	4.072	0.0435
Neural precursor cell expressed	NEDD9	NM_006403	3.495	0.00124
Hypothetical gene	LOC400573	BC063383	3.296	0.000304
Cbp/p300-interacting transactivator	CITED2	NM_006079	3.111	8.54E-05
CDNA clone IMAGE:4557810	AK131023	AK131023	3.030	0.00114
Hyaluronan and proteoglycan link protein 4	HAPLN4	NM_023002	3.024	0.0123
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	NM_001511	2.944	0.00492
ATG9 autophagy related 9 homolog B	NOS3AS	NM_173681	2.857	0.0103
TSC22 domain family, member 1	TSC22D1	NM_183422	2.799	0.000213
keratin pseudogene	LOC339240	NR_001443	2.782	0.0127
Endothelin 1	EDN1	NM_001955	2.712	2.31E-07
AF079535 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	THC2338704		2.662	0.0126
Q9L015 (Q9L015) KHG/KDPG aldolase	THC2376764		2.498	0.0409
GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	NM_005261	2.475	0.00141
	Unknown		2.463	0.000133
Rho family GTPase 3	RND3	NM_005168	2.453	0.00319
	Unknown		2.372	0.0437
Mov10l1, Moloney leukemia virus 10-like 1	MOV10L1	NM_018995	2.351	0.0495

その結果、inflammatory response (GO: 6954)、immune response (GO: 6955)および defense response (GO: 6952)など、免疫応答に関与する遺伝子が ATP 刺激により上昇することが判明した (Table 2)。そればかりか、これらの GO term に含まれる遺伝子として、既に報告のある *IL-6* をはじめ^(42, 43)、新たに *IL-20*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3*、*GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle* (*GEM*)、ならびに *V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue* (*V-fos*)などの免疫応答因子が誘導されることを見出した (Table 3)。

Table 2. Gene Ontology analysis of genes significantly up-regulated by ATP-stimulated NHEKs.

GO term	Genes in the Category	<i>p</i> -value
GO:7582: physiological process	22	0.040000
GO:50794: regulation of cellular process	16	0.000030
GO:50789: regulation of biological process	16	0.000086
GO:51244: regulation of cellular physiological process	15	0.000059
GO:50791: regulation of physiological process	15	0.000094
GO:7165: signal transduction	14	0.000040
GO:7154: cell communication	14	0.000533
GO:31323: regulation of cellular metabolism	12	0.000211
GO:19222: regulation of metabolism	12	0.000297
GO:7275: development	11	0.000489
GO:6950: response to stress	10	0.000002
GO:50896: response to stimulus	10	0.000986
GO:7166: cell surface receptor linked signal transduction	9	0.000115
GO:19219: regulation of nucleobase	9	0.008960
GO:50874: organismal physiological process	8	0.009560
GO:6355: regulation of transcription, DNA-dependent	8	0.017800
GO:6351: transcription, DNA-dependent	8	0.020400
GO:45449: regulation of transcription	8	0.025400
GO:6350: transcription	8	0.031800
GO:9613: response to pest, pathogen or parasite	7	0.000004
GO:43207: response to external biotic stimulus	7	0.000007
GO:9605: response to external stimulus	7	0.000098
GO:6955: immune response	7	0.000210
GO:6952: defense response	7	0.000373
GO:9607: response to biotic stimulus	7	0.000475
GO:7242: intracellular signaling cascade	7	0.003300
GO:43412: biopolymer modification	7	0.022000
GO:6954: inflammatory response	6	0.000001
GO:9611: response to wounding	6	0.000038
GO:7186: G-protein coupled receptor protein signaling pathway	6	0.000509
GO:7049: cell cycle	6	0.001910
GO:6793: phosphorus metabolism	6	0.002740
GO:6796: phosphate metabolism	6	0.002740
GO:48523: negative regulation of cellular process	6	0.004290
GO:48519: negative regulation of biological process	6	0.006230

さらに、同定された 35 個の遺伝子群の中に、cAMP response element binding protein (CREB)/ATF ファミリーに属する *ATF3* が認められた。本遺伝子は、Table 2 においては GO: 50794、50789、31323、19219、6350 に含まれ、幅広い機能を有する転写活性因子の一つであり、ストレスに応答して誘導されることが広く知られている^(48, 49)。2007 年、Gilchrist らによるシステム生物学的

手法を用いた解析により、本転写因子は Toll 様受容体 4 (TLR4)を介して活性化したマウスマクロファージにおいて、Rel (NF- κ B の構成因子)と共に IL-6 および IL-12p40 のプロモーター領域に結合することにより、これらの転写を抑制することが明らかにされた⁽⁵⁰⁾。この報告以来、TLR を介した免疫応答に対する ATF3 の機能解析が進展し、本転写因子が TLR を介した免疫応答において負の調節因子として振舞うことは、疑いようのないものになってきている^(51, 52)。表皮細胞には TLR2 および TLR4 が発現しており^(53, 54)、本受容体を介したサイトカインやケモカインの産生は、生体防御反応において重要な役割を担っているものと思われる。これらのことから、ATF3 は、表皮細胞における TLR4 を介するシグナルに対して同様に機能することが推察されたため、今後、本転写因子を免疫応答因子の一つとして扱うこととした。

また、今回 ATP 刺激により新たに発現が見出された IL-20 は、mRNA レベルで皮膚や気管に低レベルで発現していることが判っており、その機能として IL-20 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、表皮形成の異常により、出生後数日のうちに死に至るなどの現象から、皮膚の形態形成やその維持に重要な役割を担っていることが明らかとなっている⁽¹⁹⁾。また、本サイトカインは TNF- α などの産生による免疫応答の惹起、さらには IL-6 と同様にチロシンキナーゼである Janus kinase (JAK)を介した STAT3 のリン酸化により表皮増殖を促し、創傷治癒や皮膚の恒常性維持に貢献しているものと考えられる^(11, 19)。一方、CXCL1、CXCL2 および CXCL3 はそれぞれ白血球の動員作用を有しており、細胞や組織に傷害や炎症が起こると産生される。血管内の白血球は、細胞表面に発現する膜 7 回貫通 G タンパク共役型受容体である CXCR2 を介してケモカイン産生部位に集まり、血管内皮細胞層に接着する。次に、血管内皮細胞の間を通り抜け、血管外へと遊走した後、傷や炎症部位に到達して抗原を攻撃することにより、創傷治癒や免疫応答に重要な役割を果たす。さらに、血管内皮細胞にも CXCR2 が発現しており、本受容体を介した血管新生が報告されている^(55, 56)。一方、GEM と V-fos は免疫応答因子に分類されているものの、これらは様々なシグナル伝達に関与しており、かつ非常に多くの機能を発揮するため、本研究における解析対象として取り扱わないこととした。以上のように、今回、IL-6、IL-20、CXCL1、CXCL2、CXCL3 および ATF3 に着目し、研究を進めることとした。

Table 3. Immune response genes significantly up-regulated in ATP-stimulated NHEKs.

Description	Gene Symbol	Genbank	Ratio				<i>p</i> -value
			Exp 1	Exp 2	Exp 3	Average	
Interleukin 6	IL6	NM_000600	28.128	24.105	46.218	31.527	0.00293
Activating transcription factor 3	ATF3	NM_004024	15.966	12.907	8.534	12.071	0.00327
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	NM_002090	3.811	7.122	7.491	5.880	0.0094
V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene	FOS	NM_005252	6.325	2.574	6.416	4.709	0.0308
Interleukin 20	IL20	NM_018724	3.005	3.505	9.585	4.656	0.0472
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	NM_002089	3.637	4.646	5.324	4.481	0.0194
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	NM_001511	2.249	3.246	3.497	2.944	0.00492
GTP binding protein	GEM	NM_005261	2.496	2.964	2.050	2.475	0.00141

次に、これまでに同定された ATP により誘導される *IL-6*、*IL-20*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3* および *ATF3* の mRNA 発現の DNA マイクロアレイのバリデーションおよび経時変化につき、TaqMan probe を用いた定量 RT-PCR 法を用いて解析することとした。すなわち ATP (100 μ M) 刺激後 0、0.5、1、1.5、2、3、6、12、24 時間における mRNA の発現を解析したところ、いずれの免疫応答因子も ATP 刺激 30 分後において有意に発現誘導された。この変化は約 1 時間後に最大となり、2 時間後以降は時間の経過に伴って減弱した (Fig. 8)。本検討結果は、DNA マイクロアレイの結果を裏付けるものとなった。さらに、今回 ATP により誘導されたサイトカインやケモカイン類は、免疫応答の惹起や創傷治癒に関与するのみならず、尋常性乾癬の発症や悪化にも密接に関与することも報告されているうえ、アレルギーを惹起する因子として作用することも考えられ、炎症性皮膚疾患との関連から興味深い。

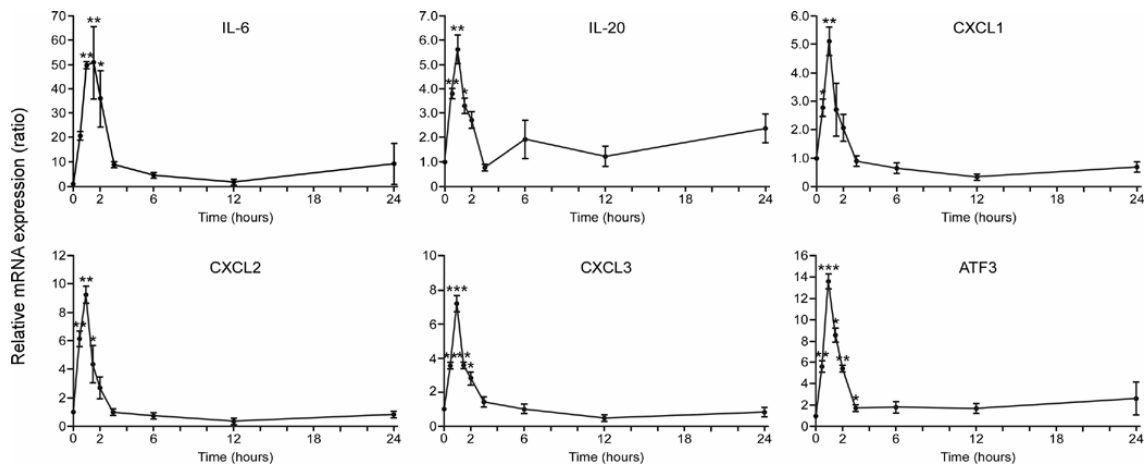


Fig. 8 The quantitative real-time RT-PCR verified the augmentation of mRNA expression of the 6 genes in ATP-stimulated NHEKs suggested by DNA microarray.

NHEKs were treated with 100 μ M of ATP for different time periods. Total RNA was extracted at the indicated times and IL-6, IL-20, CXCL1, CXCL2, CXCL3 and ATF3 mRNA were examined by quantitative real-time RT-PCR. The mRNA expression by ATP-stimulated NHEKs was normalized using that of GAPDH. The ratio was demonstrated by the normalized mRNA expression by ATP-stimulated NHEKs divided by that of control cells (time 0). The data represent the mean \pm S.E.M. (n=3). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

2-3 ATP誘導性免疫応答因子のタンパク質レベルにおける発現解析

遺伝子情報をもとに、最終産物であるタンパク質を予測できるものの、mRNAレベルとタンパク質レベルに相関が認められないこともあり、それだけでは種々の細胞内イベントを理解することは困難である。そこで、前節においてATP刺激によりmRNA発現が顕著に増加したIL-6、IL-20、CXCL1につき、100 μ M ATP刺激後の時間依存的なタンパク質の産生量を測定することとした。また、CXCL2、CXCL3はそれぞれCXCL1と90%および86%と高いアミノ酸配列の相同性を有し、作用受容体ならびにその機能が類似することから^(57, 58)、今回、CXCL1のみを測定の対象とした。

Fig. 9 に結果を示したが、IL-6 および IL-20 において時間依存的な産生の亢進が認められた。さらに、IL-20 は ATP 刺激後 6 時間以降に産生されるのに対し、IL-6 は 1 時間以降に産生が認められ、早い段階で産生されることが明らかとなった (Fig. 9A, B)。また、CXCL1 は未処理群においても時間依存的な産生が認められ、ATP 刺激による mRNA の誘導にも関わらず、その産生におい

て有意な差は認められなかった (Fig. 9C)。

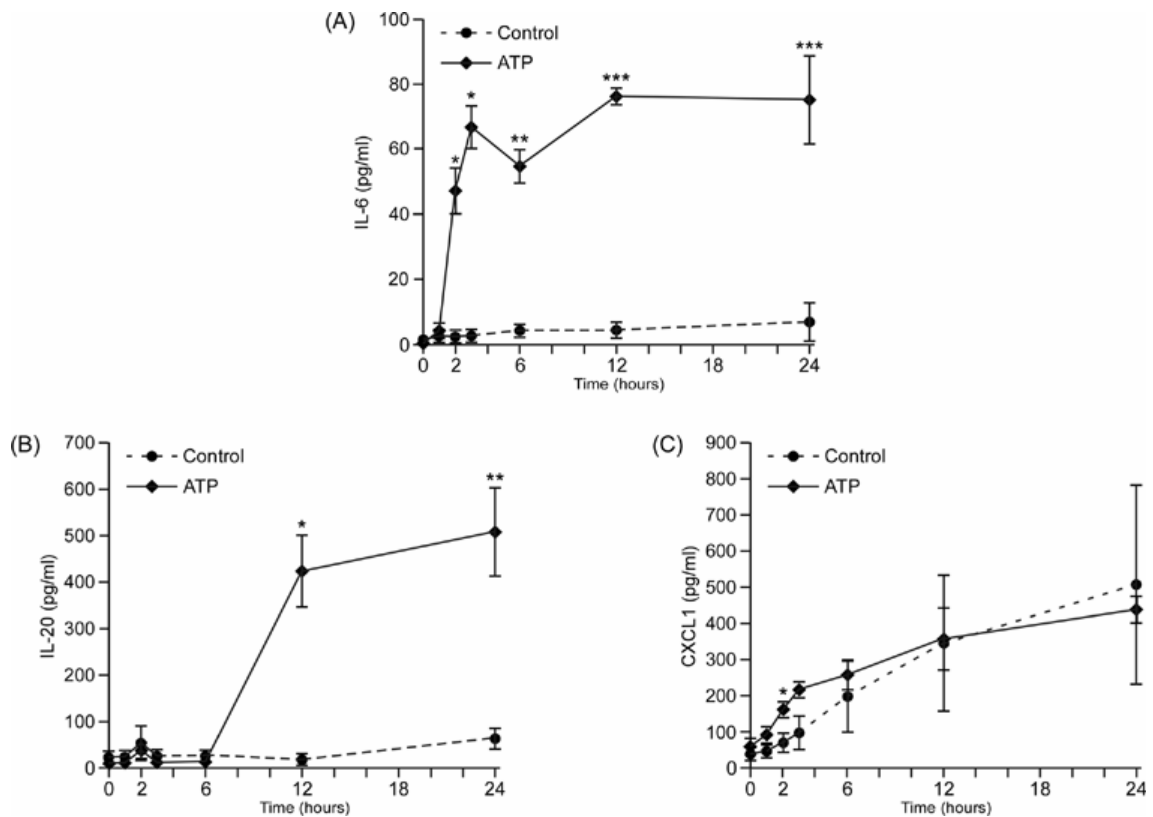


Fig. 9 Time-dependent for the production of IL-6, IL-20 and CXCL1 on ATP-stimulated NHEKs.

NHEKs were cultured in the presence or absence of 100 μ M of ATP for indicated time periods. After culture, IL-6 (A), IL-20(B) and CXCL1(C) in the culture supernatant were measured by ELISA. Results are expressed as picograms/ml and represent the mean \pm S.E.M. (n=3). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated (Control).

続いて、顕著な産生が認められたIL-6およびIL-20の産生に関し、ATP濃度依存性を検討した。

その結果、両サイトカインともに10 μ Mと低濃度からの産生が認められ、特に100 μ Mおよび300 μ Mで有意な産生亢進が認められた (Fig. 10A, B)。

次に、これら免疫応答因子の発現が、P2受容体を介した反応に由来することを確認するため、サイトカインやケモカインの産生に対するP2受容体のアゴニストである細胞外ヌクレオチド類やP2受容体アンタゴニストの効果を調べることにした。なお、ヌクレオチド類として、エクトヌクレオチダーゼ(ヌクレオチド加水分解酵素)による加水分解耐性を有するATP γ S、およびATPの加水分解産物であるADP、ならびにP2Y₂受容体を介して表皮細胞増殖を促すUTP^(29, 39)を用いた。

その結果、ATP刺激による24時間後の培養上清においてIL-6およびIL-20の顕著な産生亢進が

認められた。さらに、ATP γ S
およびADPにおいてもATP
刺激群と同様、両サイトカイン
の有意な産生が認められ
た (Fig. 11A, B)。また、
CXCL1の産生は先の検討
結果同様、未処理群にお

いても顕著な産生が認められ、
差は認められなかった (Fig.
11C)。ATP刺激24時間後に
おけるIL-6の産生量は、未処
理群の約36倍、IL-20におい

ては約6.4倍であった。興味深いことに、IL-20の産生量 (693.3 ± 47.6 pg/ml)はIL-6の産生量
(57.3 ± 8.3 pg/ml)の約10倍であった。また、UTPはヒト不死化表皮細胞株HaCaT⁽⁵⁹⁾においてIL-6
産生を促進することが報告されているものの⁽⁴³⁾、本検討においてはIL-6およびIL-20の産生はほと
んど影響されなかった (Fig. 11A, B)。NHEKsとHaCaTにはUTPの作用受容体であるP2Y₂、P2Y₄
およびP2Y₆受容体が発現しており⁽³⁹⁾、UTPによるサイトカインの産生亢進が認められなかったとい
う本検討結果は、サイトカイン産生におけるP2Y受容体の制御が両者において異なることを示唆し、
両表皮細胞のATPにおける応答性の特徴を知るうえで非常に興味深いものであった。

次に、非選択的P2X/P2Y受容体アンタゴニストであるPPADS (0.1 mM、1 mM)、ならびに広範囲
なP2受容体アンタゴニストのsuramin (0.1 mM、1 mM)を用いて、IL-6、IL-20およびCXCL1の産生
阻害につき検討を加えた。その結果、両アンタゴニストともにIL-6、IL-20およびCXCL1の産生を阻
害した (Fig. 11A, B, C)。また、IL-20およびCXCL1の産生阻害は0.1 mM PPADSでは認められず、
1 mM PPADSにおいて有意な阻害を呈した (Fig. 11B, C)。

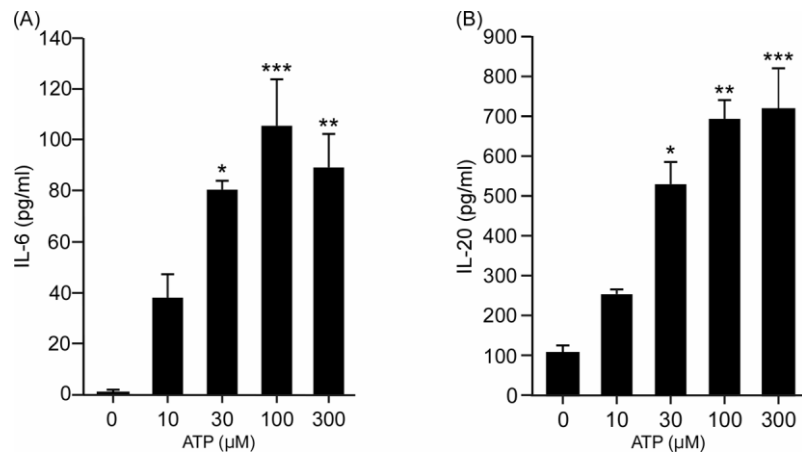


Fig. 10 Concentration-dependent for the release of IL-6 and IL-20 from ATP-stimulated NHEKs

NHEKs were stimulated with a various concentration of ATP for 24 h. The culture supernatants were measured for IL-6 (A) and IL-20 (B) by ELISA. Results are expressed as picograms/ml and represent the mean \pm S.E.M. (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated (concentration 0 μ M).

また、P2受容体アンタゴニストによってCXCL1の産生抑制が認められたという本検討結果は、未処理群におけるCXCL1の産生がP2受容体を介した反応であることを示唆するものであった (Fig. 11C)。

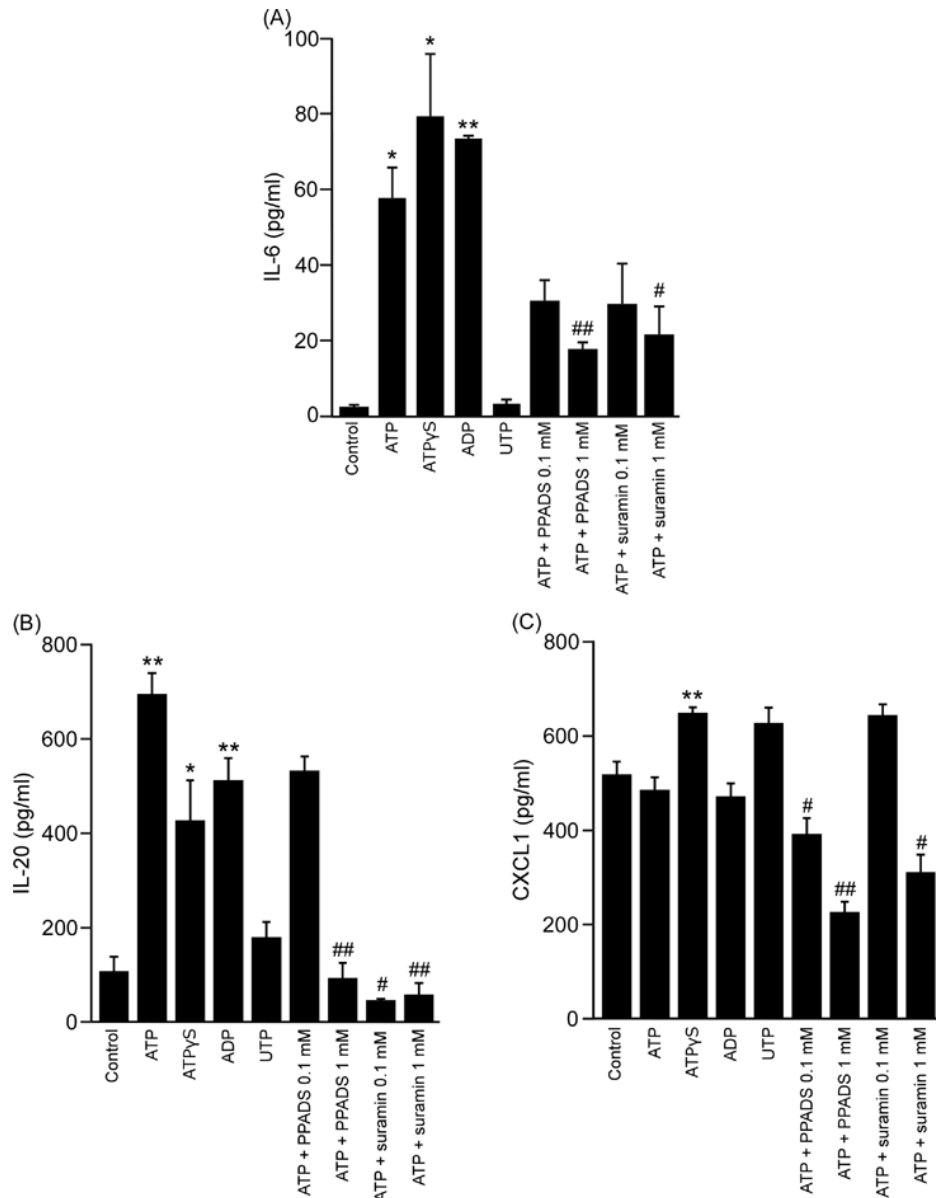


Fig. 11 Extracellular nucleotides augmented the production of IL-6, IL-20 and CXCL1 in NHEKs. NHEKs were stimulated with 100 μ M of ATP, ATP γ S, ADP or UTP for 24 h. After culture, IL-6 (A), IL-20 (B), and CXCL1 (C) in the culture supernatants were measured by ELISA. To examine the effects of P2 receptor agonists, ATP-stimulated NHEKs were treated with 0.1 mM and 1.0 mM of P2 receptor antagonist suramin or PPADS 15 min before and during ATP treatment. The data are the mean \pm S.E.M. (n=3). * P <0.05, ** P <0.01 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated (Control). # P <0.01 and ## P <0.001 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were treated with 100 μ M of ATP.

2006年、Seiffertらは皮膚微小血管内皮細胞において、基底状態においてもサイトカインやケモカインが産生することを報告しており、その要因として内因性のATP放出の影響が指摘されており⁽³⁰⁾、この現象は基底状態のNHEKsにおいても報告されている⁽²⁹⁾。また、本現象に関する検討として、培養NHEKsにおける培養液中のATP濃度を0、0.5、1、4、8、24時間において経時的に測定したところ、ATP放出の時間依存性は見られず、その傾向は不均一であったものの、培養液のみのATP濃度と比較して約20~40 pmol/mlの幅でATPの放出が認められた（データ非掲載）。これらのことから、本ケモカインの産生は培養過程で生じた内因性のATPがP2受容体を介した反応であり、よって外因性のATP刺激の影響がほとんど観測されていない可能性が考えられた。これらの結果から、ATPをはじめ、細胞外ヌクレオチド類によるサイトカインやケモカインの産生亢進は、P2受容体を介す反応に由来することが示唆された。

ここで、NHEKsにおいてUTP刺激によるIL-6、IL-20の産生が認められないことから、その作用受容体であるP2Y₂、P2Y₄、P2Y₆受容体の寄与は低いと考えられた。また、ATP γ SはこれまでにP2Y₁₂およびP2Y₁₃受容体に対する活性は報告されていないこと、さらに、本検討においてATP γ S添加によりサイトカインやケモカインの産生亢進が認められたことから、これら受容体の関与も低いものと考えられる。さらに2007年、Inoueらの詳細な検討では、NHEKsにおいてP2Y₁受容体に特異的なアンタゴニスト（A3P5PS）は、IL-6の産生阻害に対して影響しないため、本受容体の寄与も低いものと思われる⁽⁴²⁾。一方、IL-6とIL-20の産生に高い効果を示したADPは、P2Y₁、P2Y₁₁ならびにP2Y₁₂、P2Y₁₃受容体のアゴニストであることが知られている^(28, 60, 61)。そればかりか、PPADSはP2Y₁₁受容体に対して拮抗作用を持たないことから⁽⁴²⁾、サイトカインやケモカインの産生阻害効果がsuraminに比較して弱い可能性が考えられる。以上のことから、今回観測されたATP刺激によるサイトカインやケモカインの産生亢進においては、P2Y₁₁受容体の寄与が最も高いものと推察された。P2Y₁₁受容体は、唯一Gsタンパク質が共役する特徴を有していることから、cAMPの産生を介したシグナル伝達経路によるサイトカイン、ケモカインの生合成経路が考えられた。すなわち、増大したcAMPはPKAの活性化を介して、その標的タンパク質であるCREBをリン酸化する。さらに、リン酸化を受けたCREBは核内へと移行した後、プロモーター領域の一つであるCRE（cAMP responsive

element)に結合することにより、サイトカインやケモカインのmRNAの転写を調節していることが推察された。さらに、樹状細胞や皮膚微小血管内皮細胞において、本受容体を介する細胞の成熟化やサイトカイン産生が、免疫応答に重要な役割を果たしているものと考えられており^(30, 62, 63)、今回の結果と考え併せると興味深い。

引き続き、ATP 刺激が発現亢進することが初めて明らかとなった ATF3 のタンパク質レベルにおける発現のタイミングを精査するため、その発現変動を経時的に追跡することとした。ATP 刺激後、0、0.5、1、2、4、8、12、24 時間における ATF3 の発現解析を行ったところ、ATF3 の発現は、ATP 刺激 1 時間から 4 時間後に亢進し、以降、時間の経過とともに徐々に減弱する傾向が認められた (Fig. 12A, B)。このことから、細胞外 ATP によるシグナルは、刺激開始後約 1 時間で ATF3 のタンパク質合成レベルに達することが明らかとなった。

ATF3 は、様々なストレスによって誘導される転写因子であり、細胞周期や細胞保護、またはアポ

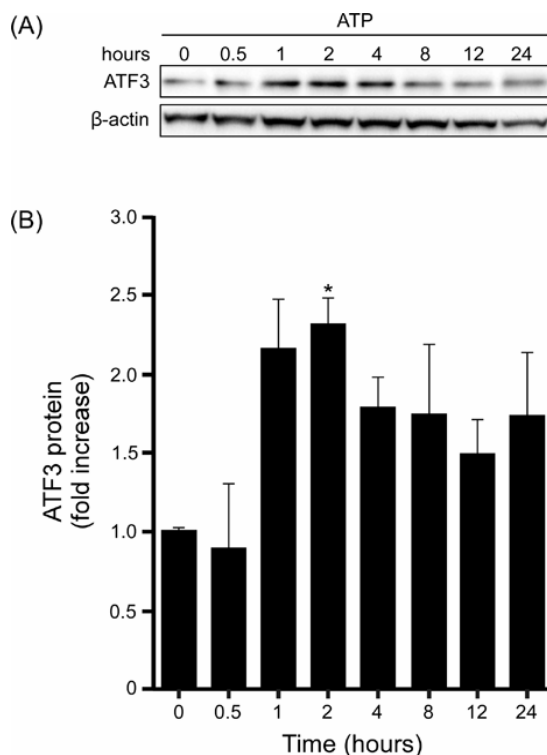


Fig. 12 Extracellular ATP induced ATF3 expression.

NHEKs were stimulated with 100 μ M of ATP for indicated time periods. (A) A representative western blotting from three independent experiments is shown. (B) The ATF3/ β -actin ratios were determined as fold increase compared with control (time 0). The intensity of the corresponding ATF3 bands was analyzed using densitometry. The data are the mean \pm S.E.M. (n=3). * P <0.05 indicates a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

トーシスなどの多くの細胞内イベントに関与している^(48, 49)。そればかりか、最近、TLR2/6 ヘテロ二量体、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 および TLR9 などの TLR シグナルを介する炎症反応において、負の調節因子として機能する可能性が示唆された⁽⁵⁰⁻⁵²⁾。NHEKs においては TLR2 および TLR4 が発現しており^(53, 54)、細胞外 ATP により誘導される ATF3 は、免疫応答を抑制することも考えられることから、ヒト表皮における本転写因子の機能に興味を持たれる。

2-4 結語

ATP刺激したNHEKs中の遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、免疫応答因子として既に報告されている*IL-6*のほか、新たに*IL-20*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3*、*ATF3*、*V-fos*および*GEM*のmRNAの発現が亢進されることが明らかとなった。これらにつき、定量RT-PCRによって発現変動を精査したところ、いずれの遺伝子もATP刺激後30分から1時間以内に誘導が認められ、本検討結果はDNAマイクロアレイの結果を裏付けるものとなった。

次に、種々の細胞外ヌクレオチドによって刺激した24時間後のNHEKsの培養液中の上記免疫応答因子につき、ELISAにより産生量を測定した。その結果、UTPでは*IL-6*および*IL-20*の産生に変化は見られないものの、ATP、ATP γ SおよびADP刺激によって、*IL-6*、*IL-20*の産生が有意に増加することを確認した。そればかりか、*IL-6*、*IL-20*および*CXCL1*の産生は、P2受容体アンタゴニストにより阻害されたことから、これらサイトカインやケモカインはP2受容体を介するシグナルに基づいて産生されることが示唆された。

さらに、細胞外ATP刺激によって*ATF3*のmRNAおよびタンパク質の発現が亢進することを今回初めて明らかにした。さらに、そのタンパク質の発現は1時間程度と比較的早い段階から認められた。したがって、本転写因子は、定常状態においても細胞内に内在しており、ストレスやそれに伴って生じる細胞外ATP刺激に速やかに応答することが推察された。

第3章 NHEKsにおいてATP刺激により活性化されるSTAT3のリン酸化機構の解明

3-1 序論

第2章の結果から、細胞外ATP刺激は、NHEKsにおいてIL-6とIL-20の産生を促進することが明らかとなった。ヒト表皮細胞にはIL-6およびIL-20受容体が発現しており^(64, 65)、これらのサイトカインは、パラクリンまたはオートクリン作用により、各々の受容体を介してJAKを活性化させることにより、STAT3をリン酸化することが知られている^(12, 13, 19, 66)。これらサイトカインによるSTAT3のリン酸化反応経路はJAK-STAT経路と呼ばれ、STAT3による標的遺伝子の発現に重要な役割を担っている。

皮膚においてSTAT3は、細胞増殖作用を有すCyclin D1やVEGFなどを発現させることによって、表皮の細胞周期や創傷治癒において重要な役割を果たしている⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾。しかしながら、最近、炎症性皮膚疾患の一つである尋常性乾癬病変部においてそのリン酸化が亢進していることが明らかにされたことから、乾癬の発症や悪化に密接に関与している可能性が指摘されている^(7, 16)。さらに、同病変部において免疫細胞の浸潤、IL-6やIL-20サブファミリーとその受容体が高発現していること^(8, 9, 11-13)を併せ考えると、ATP刺激によりヒト表皮細胞で産生されたIL-6やIL-20が、STAT3のリン酸化に関与しているものと考えられた。そこで、本章では、ATP刺激したNHEKsにおけるSTAT3のリン酸化を精査するとともに、その機構を明らかにすることを企てた。

3-2 ATP刺激により亢進するリン酸化STAT3の経時変化解析

まず、ATP (100 μ M)刺激したNHEKs中のリン酸化STAT3の経時変化につき、ウェスタンブロット解析により検討した。その結果、ATP刺激後1時間から2時間(第一相)でリン酸化STAT3の発現亢進が認められ(約79 kDa)、4時間から8時間において一旦減弱した後、12時間から24時間後(第二相)に再度リン酸化が亢進する二相性の変動が認められた(Fig. 13A, B)。リン酸化反

応の亢進が二相性の挙動を示すことについて、その詳細な機構は不明であるが、NHEKs における STAT3 のリン酸化は、細胞外 ATP によって複雑に調節されていることが示唆された。

また、乾癬の発症や悪化に重要な STAT3 のリン酸化が、細胞外 ATP によって亢進を受けるといふ本検討結果は、皮膚への傷や物理的刺激を受けた際に放出される ATP がケブネル現象に関与している可能性を示唆するものであった。

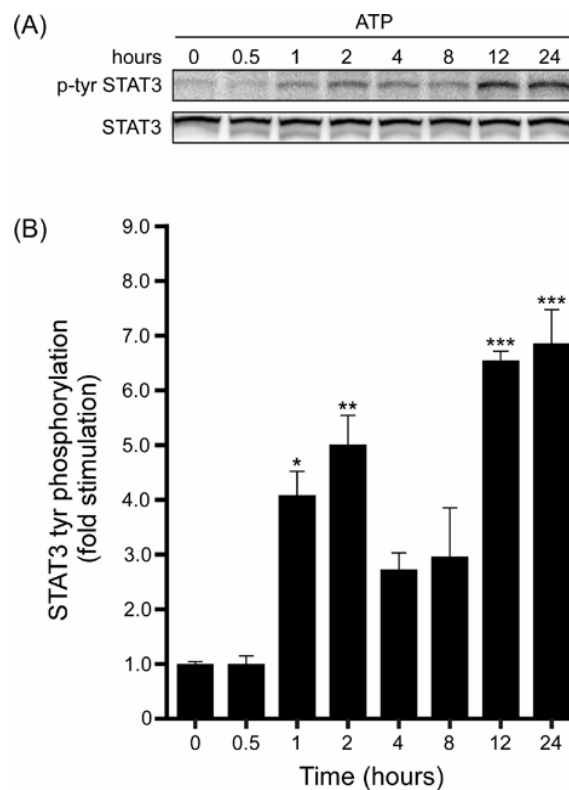


Fig. 13 Extracellular ATP induced biphasic activation of STAT3 in NHEKs.

NHEKs were stimulated with 100 μM of ATP for indicated time periods. (A) A representative western blotting from three independent experiments was demonstrated. (B) The phospho-STAT3/total STAT3 ratios were determined as fold stimulation compared with time 0. The intensity of the corresponding phospho-STAT3 bands was analyzed using densitometry and the data from three experiments were summarized and presented as the mean ± S.E.M. (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

3-3 ATP誘導性サイトカインによるSTAT3のリン酸化機構の解析

前節で、ATP (100 μ M)刺激したNHEKsにおいてSTAT3のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。また、Fig. 9A, Bに示したように、先の検討においてIL-6はATP刺激後1時間から2時間にかけて産生が認められること、これに対しIL-20は12時間から24時間において産生されることから、第一相目のリン酸化はIL-6に由来する反応であることが予想された。また、第二相目のリン酸化に関しては、12時間から24時間において両サイトカインともに十分な産生が認められることから、これら二つのサイトカインに起因することが推察された。

そこでまず、第一相目のリン酸化反応経路の解明を目的としてIL-6に対する中和抗体およびsuraminを用い、STAT3のリン酸化阻害における経時変化について、ウエスタンブロットにて検討することとした。

本検討に用いた anti-IL-6 antibody (anti-IL-6)の濃度設定は第 5 章の記述に従って行い、5 μ g/ml とした。また、suramin の濃度はサイトカイン、ケモカインの産生を顕著に抑制した 1 mM とした。Fig. 14A に結果を示したが、先の検討同様、STAT3 のリン酸化は ATP 刺激後 1 時間から亢進が認められ、4 時間で一旦減弱し、8 時間以降再度リン酸化の亢進を起こす二相性を示した。一方、anti-IL-6 で処理した際のリン酸化は、第二相目に対して抑制が認められたものの、第一相目においては影響しなかった。また、この反応は suramin によっていずれの時間においても阻害された。Fig. 14B, C には ATP 単独、または ATP とコントロール抗体 (IgG)、anti-IL-6 および suramin それぞれを添加した 2 時間後の STAT3 のリン酸化の発現をウエスタンブロットを用いて解析した結果を示した。ATP 単独刺激群、IgG を添加した ATP 刺激群において、未処理群に対して約 3 倍のリン酸化の亢進が認められた。また、anti-IL-6 を添加した ATP 刺激群において、STAT3 のリン酸化の亢進は抑制されず、他の刺激群と同等のリン酸化の亢進が認められた。これに対し、suramin を添加した ATP 刺激群において、ATP 単独刺激群と比較して、リン酸化 STAT3 の発現は約 29%まで低下した。

これらの結果から、第一相目のリン酸化はIL-6によるパラクリン作用ではなく、P2受容体を直接

介した反応である可能性が推察された。最近、ラット皮質星状細胞において、細胞外ATP刺激により、P2受容体/extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1/2)を介したSTAT3のリン酸化反応経路が報告された⁽⁷⁰⁾。mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属するERK1/2は、様々な刺激に応じて核内へと蓄積した後、STAT3などの標的核基質に作用することにより、その制御下にある遺伝子を発現させることで細胞増殖や分化を担っている^(71, 72)。これらのことから、星状細胞においてERK1/2は、P2XおよびP2Y受容体と共役しSTAT3のリン酸化を亢進することにより細胞周期を調節していると考えられている。本検討において、第一相目のSTAT3のリン酸化反応がP2受容体を介している可能性が示唆されたことから、NHEKsにおいても同様の経路の存在が予想された

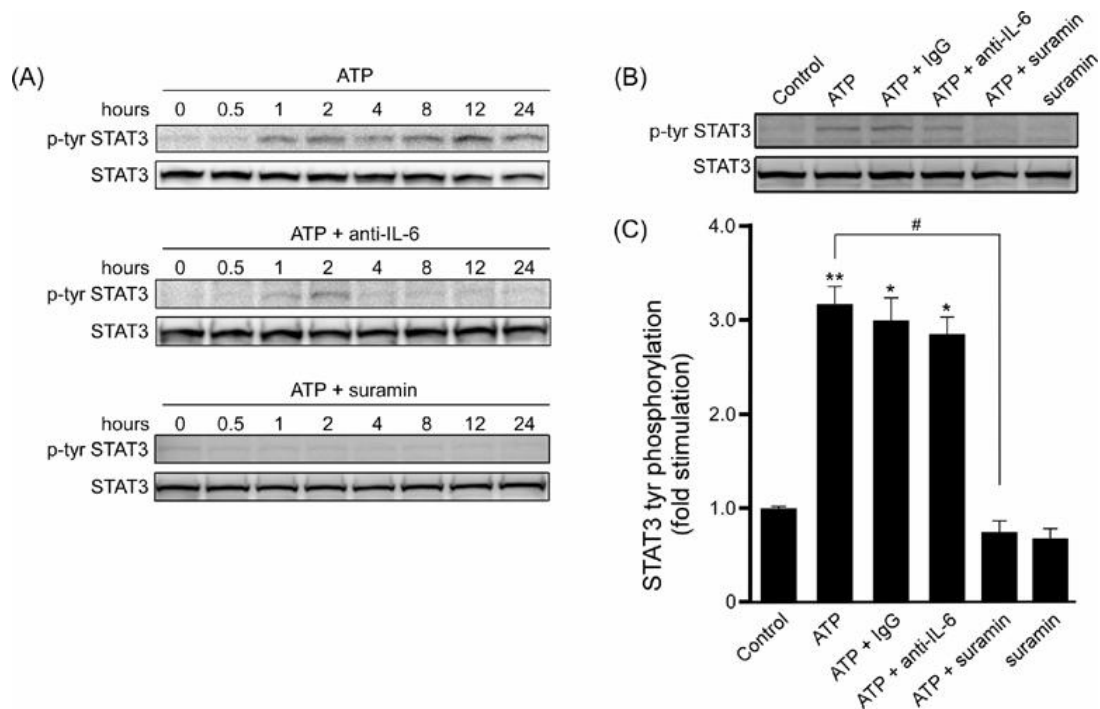
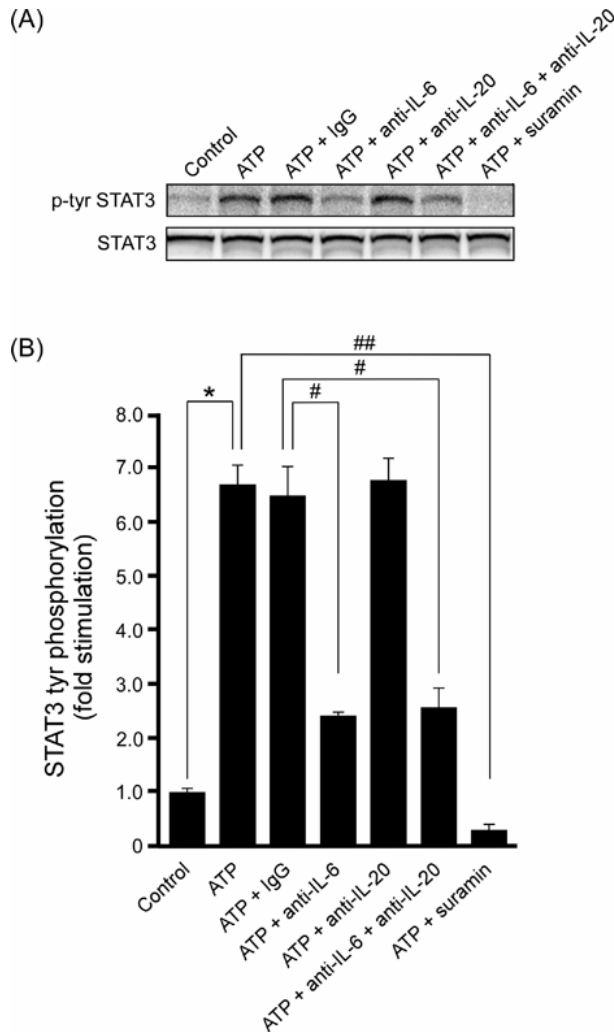


Fig. 14 Effects of anti-IL-6 antibody or P2 receptor antagonist, suramin on phosphorylation of STAT3 in NHEKs.

NHEKs were stimulated with 100 μ M of ATP in the presence or absence of anti-IL-6 or suramin for 2 h. (A) A representative western blotting from three independent experiments was demonstrated. (B) NHEKs were stimulated with 100 μ M of ATP in the presence or absence of anti-IL-6, IgG or suramin for 2 h. (C) The intensity of the corresponding phospho-STAT3 and total STAT3 bands was analyzed using densitometry. The data expressed as fold stimulation compared with non-treated were summarized from three independent experiments and presented as the mean \pm S.E.M. (n=3) * P <0.05, ** P <0.01 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated. # P <0.01 indicates a statistically significant difference in comparison to cells that were treated with 100 μ M of ATP.

次に、第二相目のリン酸化反応機構の解明を企てた。本リン酸化反応は、細胞外 ATP によって産生された IL-6 や IL-20 がパラクリン作用によって伝達したシグナルに基づく可能性が考えられた。そこで、STAT3 のリン酸化に対するこれらのサイトカインの寄与を確認するため、IL-6 および IL-20 の中和抗体 (anti-IL-6、anti-IL-20)、および suramin を添加し、ATP (100 μ M)刺激 24 時間後の



NHEKs 内の STAT3 のリン酸化につき、ウエスタンブロット解析を行った。

その結果、ATP単独刺激群ならびにIgG (5 μ g/mL)を添加したATP刺激群において、未処理群に対して約6.5倍の有意なリン酸化STAT3の発現上昇が認められた。これに対し、suramin (1 mM)を添加すると、ATP単独刺激群と比較して、リン酸化STAT3の発現は約7.7%まで低下した。また、anti-IL-6 (5 μ g/mL)を添加するとリン酸化STAT3の発現は有意に低下し、その発現量は (ATP + IgG) 群と比較して約37%であった。続いて、anti-IL-6とanti-IL-20を同時に添加した際、リン酸化STAT3の発現は約40%まで低下したものの、

Fig. 15 Only anti-IL-6, but not anti-IL-20 significantly suppressed phosphorylation of STAT3 in NHEKs stimulated with ATP for 24 h.

(A) A representative western blotting from three independent experiments is shown. (B) The intensity of the corresponding phospho-STAT3 and total STAT3 bands was analyzed using densitometry. The ratio of the densitometry intensity for phospho-STAT3/total STAT3 was calculated for each treatment. The data expressed as fold stimulation compared with non-treated control were summarized from three independent experiments and presented as the mean \pm S.E.M. (n=3). * P <0.01 indicates a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated. # P <0.01 and ## P <0.005 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were treated with 100 μ M of ATP, or 100 μ M of ATP and IgG.

anti-IL-20 (5 µg/mL)のみを添加したとき、STAT3 のリン酸化に対する抑制は認められなかった (Fig. 15A、B)。

これらの結果から、NHEKs における細胞外 ATP 刺激による STAT3 のリン酸化には、ATP によって産生される IL-6 が関与していることが示唆され、したがって ATP 誘導性 IL-6 による JAK-STAT 経路の関与が推察された。ATP 刺激によって IL-20 の産生が亢進するにも関わらず、anti-IL-20 添加により STAT3 におけるリン酸化の亢進が抑制されなかったという本結果は、予想に反するものであった。しかしながら、ごく最近、表皮の基底層を構成する NHEKs において、IL-20 受容体複合体、すなわち IL-20 受容体 α および IL-22 受容体 $\alpha 1$ の発現レベルが低いことが報告された⁽¹³⁾。このことから、NHEKs においては IL-6 受容体を介した STAT3 のリン酸化反応経路が主流となり、IL-20 の寄与は小さいものと考えられた。このため、anti-IL-6 を用いることで反応が抑制され、anti-IL-20 では抑制が認められないという結果に繋がることが推察された。

以上のことから、NHEKs における STAT3 のリン酸化反応の亢進は、細胞外 ATP が誘導する IL-6 に依存的な反応であることが明らかとなった。

3-4 結語

本研究において、ATP刺激により、NHEKsにおいてSTAT3のリン酸化が亢進されることを初めて見出した。ATP刺激によるSTAT3のリン酸化レベルを経時的に追跡したところ、その変動は二相性を示すことが判った。第一相目のリン酸化については、IL-6受容体に依存しないP2受容体を介した直接的なSTAT3のリン酸化経路が関与する可能性が示唆された。一方、第二相目のリン酸化においては、ATP誘導性IL-6によるJAK-STAT経路の関与が示唆され、これらの結果は、STAT3のリン酸化反応を含む尋常性乾癬の発症、または悪化（ケブネル現象）の原因や機序の解明に有益な情報をもたらすものと考えられた。

第4章 総括

これまで、乾癬病変部においてサイトカインやケモカインの高発現、あるいはSTAT3のリン酸化が亢進している原因は不明であったが、今回、細胞外ATP刺激がIL-6、IL-20、CXCL1、CXCL2、CXCL3、ATF3、V-fosおよびGEMを誘導することが判明し、さらに、乾癬の発症、悪化の引き金となるSTAT3のリン酸化が、NHEKsにおいて細胞外ATPが誘導するIL-6依存的に起こることが明らかとなった。

本研究において、傷害や物理的刺激によって放出される細胞外ATPは、IL-6、IL-20、CXCL1、CXCL2、CXCL3などのサイトカインやケモカインを産生させることが明らかとなり、それらは、STAT3のリン酸化や血管新生を引き起こすことにより、乾癬の悪化に見られるケブネル現象に関与しているという新たなモデルが想定された (Fig. 16)。

このように、細胞外ATPは、今回示した様々な免疫応答因子を誘導することにより、皮膚の恒常性維持および炎症性皮膚疾患において重要な役割を担うものであり、本研究の成果は、乾癬をはじめ様々な炎症性皮膚疾患の発症機序やその治療法を考えるうえで大いに役立つものと期待される。

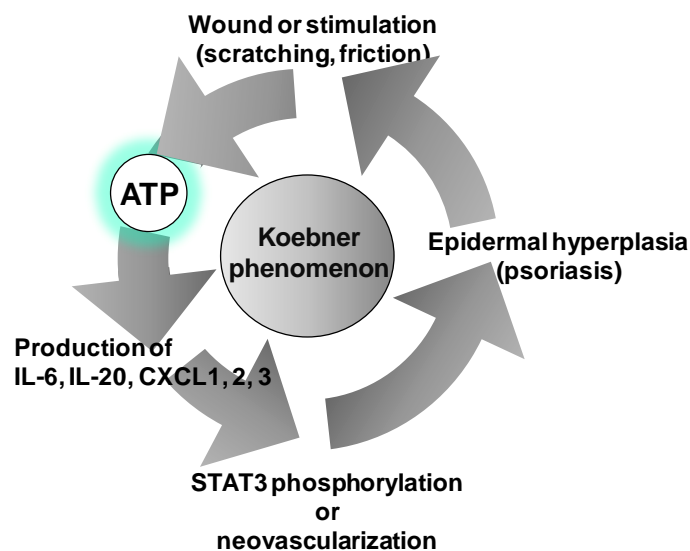


Fig. 16 Schematic diagram of aggravation of psoriasis by extracellular ATP.

第5章 実験方法

下記に示した「%」は断りのない限り「w/v」を示す。

5-1 試薬

試薬は主に特級試薬を購入した。ATPはGE Healthcare (UK Ltd, Buckinghamshire, England)より購入した。ATP γ S、ADP、UTP、suramin、PPADSはSigma-Aldrich (St Louis, MO)から購入した。Monoclonal anti-human IL-6 antibody、anti-human IL-20 antibody及びELISA kit (Quantikine^R)はR&D systems (Minneapolis, MN)より購入した。

5-2 各種共通実験

細胞培養及び培養条件

NHEKsはKurabo (Osaka, Japan)より購入した新生児包皮細胞を使用した。NHEKsの培養は75 cm²フラスコを用い、表皮角化細胞基礎培地 (HuMedia-KB2; Kurabo)に10 μ g/mL インスリン、0.1 ng/mL ヒト組換え型上皮成長因子、0.4% (v/v) ウシ脳下垂体抽出液、0.5 μ g/mL ハイドロコチゾン、50 μ g/mL ゲンタマイシン、50 ng/mL アンフォテリシン Bを添加して調製した表皮角化細胞増殖用無血清培地 (HuMedia-KG2)を用いて5% CO₂、37°C 飽和水蒸気圧下で行った。培地は細胞密度が低いときは1日置きに交換し、細胞密度が約40%以上に到達した際、毎日交換した。継代は80~90% コンフルエントな状態で0.025% トリプシン/0.01% EDTAとトリプシン中和液 (10% FBSを含むHEPES緩衝液)を用いて行い、実験には第三継代の細胞を使用した。

また、実験を行うにあたり、HuMedia-KG2に含まれるハイドロコチゾンはNHEKsにおける免疫修飾活性に影響を与えることが知られていることから⁽¹⁾、これを避けるために実験を行う24時間前にハイドロコチゾンのみを除いたHuMedia-KG2に置換した。24時間後、新しい同培養液に交換

し、各実験に移行した。

RNA抽出

培養細胞からのTotal RNAの分離および抽出はRNeasy Mini kit (Qiagen, Santa Clarita, CA)を用いて行った。操作手順についてはメーカーから供与されたプロトコールに従い、抽出したTotal RNAはOD260により定量した。また、Total RNAはRNA 6000 Nano KitおよびAgilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いて、純度ならびにRNA Integrity Number (RIN)の測定を行った。RINとはRNAの分解度を評価するための基準であり、その分解度を1~10段階に分類することでRNAの品質確認を行い、実験の再現性を高めることができるとして近年多用されている。この値が高いほどRNAの非分解状態を示しており、今回、RINが9以上のRNAを実験に用いることとした。また、Total RNA溶液は-80°Cにて保存した。

DNAマイクロアレイ解析

DNAマイクロアレイの実験方法の記述において、「コントロール」は「ATP未処理NHEKs」を示す。

DNAマイクロアレイは一色法を用いて、以下のように行った。なお、DNAマイクロアレイに用いるTotal RNAは、コントロールまたはATP (100 μ M)刺激1時間後のものを使用した。また、抽出・精製したTotal RNAを用いた二本鎖cDNA合成およびCyanine-3 (Cy3)標識cRNA合成にはCyanine-3 using Quick Kit (Agilent Technologies)を使用した。

<二本鎖cDNAの合成とCy3標識cRNA増幅および合成>

鋳型RNAよりT7-based RNA増幅法を用いてCy3標識cRNAの増幅および合成を行った。はじめに、T7-promoter primerおよび鋳型RNA、内部標準となるアデノウイルス由来のinternal controlを65°Cで10分間変性させた。反応系を以下に示す。

Total RNA	500 ng
T7-promoter primer	1.2 μ L
Internal control (3rd Dilution)	5.0 μ L
Distilled Water (Invitrogen)	variable

Total	11.5 μ L
-------	--------------

次にcDNA合成Master Mixtureを以下のように調製し、前述の反応液に8.5 μ L加え、計20 μ Lとし40°Cで2時間インキュベートし、MMLV-RT*を失活させて二本鎖cDNAの合成を終了した。

5 \times First strand buffer	4.0 μ L
100 mM DTT	2.0 μ L
10 mM dNTP	5.0 μ L
MMLV-RT*	1.0 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L

Total	8.5 μ L
-------	-------------

*MMLV-RT; Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcription enzyme

続いて合成した二本鎖cDNAを鋳型とし、蛍光色素であるCy3-CTPを含む反応液、すなわちTranscription Master Mixを以下のように調製し、前述の反応液に60 μ L加え、計80 μ Lとし遮光下、40°Cで2時間インキュベートした (*in vitro* transcription reaction)。

Distilled Water (Invitrogen)	15.3 μ L
4 \times Transcription buffer	20.0 μ L
100 mM DTT	6.0 μ L
NTP	8.0 μ L
50% Polyethylene glycol	6.4 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
Inorganic pyrophosphatase	0.6 μ L
T7 RNA polymerase	0.8 μ L
Cy3-CTP	2.4 μ L
<hr/>	
Total	60.0 μ L

増幅および合成が終了したCy3標識cRNAはRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて精製し、30 μ LのRNase free water (Invitrogen, Carlsbad, CA)で抽出した。その後、260 nmおよび550 nmにおける吸光度の測定、ならびにBioanalyzerで分析を行い、Cy3標識cRNAの収量が1.65 μ g以上、Cy3の取込量が9 pmol/ μ g以上であることを確認した。

<ハイブリダイゼーション、洗浄およびスキャニング>

1.5 μ gのCy3標識cRNAにBlocking agent、Fragmentation Buffer (Agilent Technologies)を加え、遮光下60°Cで30分間インキュベートを行い、100 bp程度に断片化した。その後、界面活性剤 (Gene Expression Buffer HI-RPM; Agilent technologies)を加えて反応を停止させ、スピンドウンして直ちにハイブリダイゼーションに使用した。

ハイブリダイズはマイクロアレイスライド (44K Whole Human Genome*; Agilent technologies)を用いて65°Cで17時間行い、終了後直ちに洗浄し乾燥させた。洗浄などのプロトコールはメーカーから供与されたものに従った。

洗浄、乾燥が終了したマイクロアレイスライドは、Agilent DNA Microarray Scannerを用いてスキャンした。また、得られたTiff画像からFeature Extraction version 9.5.3 (Agilent technologies)を用いて、バックグラウンド減算などを行い、最終的なシグナル強度 (Processed Signal)を算出した。

*44K Whole Human Genome; Probe数45,015個 (うち41,000個が生物学的Probe)

<DNAマイクロアレイ解析方法>

DNAマイクロアレイから得られたデータは、GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent technologies)を用いて解析した。

(A) Normalization (正規化)

本マイクロアレイ実験は前述したCy3を使用する一色法を用い、解析はGeneSpring GX 7.3.1を使用したNormalizationを行った。詳細は以下①~③の通りである。

① Data Transformation; Set measurements less than 0.01 to 0.01

マイクロアレイで得られる蛍光強度の値は幅が広いいため、対数変換 (\log_2 や \log_{10} など)して使用する。よって、負の値がある場合に解析できなくなる。そこで、本操作ではバックグラウンド減算で生じた生物学的に意味のない値を引き上げることにより、蛍光強度の値が0.01以下のものを0.01に置き換えた。

② Per Chip; Normalize to 75th percentile

マイクロアレイで得られる蛍光強度シグナルは、Cy3を励起させて得られるシグナルである。従って、試薬のロット差やRNA抽出、洗浄などに起因する実験誤差が発生し、シグナル強度が異なる場合がある。本操作は、このシグナル強度の系統的な誤差を補正し、生物学的変動を抽出することを目的として行った。

今回用いたWholeタイプのマイクロアレイでは、搭載されている遺伝子Probe数と比較して、実験

に用いたサンプルで真に発現している遺伝子が少ない場合がある。この場合、発現していない遺伝子Probeがシグナル強度の低い領域に多数存在することで中央値に影響を与える。本実験では、その影響を回避するために、メーカーから提供されたControl probe (4105個)を除く全probeの75%の値で全probeを除算し、補正值を得た。

③ Per Chip; Normalize to Control Samples

本実験においては、ATP刺激したNHEKsサンプルに対し、明確なコントロールサンプルがあるため、②で行った補正後のNormalized値で全てのNormalized値を除算した。この操作において、コントロールサンプル全てのNormalized値は1になる。よって、ATP刺激NHEKsサンプルのNormalized値が1より大きければコントロールサンプルよりも発現が高く、小さければ発現が低いということになる。

(B) Quality Control (QC)

Normalizationの後、QCを行った。マイクロアレイでは数多くの遺伝子Probeが存在するため、信頼できないNormalized値を多く含む場合、ノイズとなって解析結果に影響を与えることがある。従って、QCが解析結果の信頼性に大きな影響を与える。本実験では、以下の二段階でQCを行った。

① 信頼できないサンプルの除去

本実験においては、コントロール、ATP刺激各3回の繰り返し実験を行った。その中でクオリティが低いと考えられるものを外す作業を、ヒストグラムやBox-plotの確認により行った。しかしながら、Normalizationが適用されていると値の補正が入ってしまい、実験データの真のクオリティが不明確になるため、補正前の値 (Raw値)を使用して行った。

②信頼できない遺伝子の除去

サンプルにおける全ての遺伝子ProbeのNormalized値が同程度の負荷で信頼できるとは限らず、

前述の通り、Normalized値において信頼できない遺伝子Probeが多く含まれているとノイズの原因になる。しかし、QCの条件を厳しく設定すると網羅的に解析するマイクロアレイの利点を欠くことや、生物学的遺伝子を解析対象から外してしまうことに繋がるため、そのリスクを考える必要がある。そこで、本実験においては信頼できない遺伝子の除去を行った。この操作により、本実験においては生物学的遺伝子41,000個のうち37,129個を解析対象とした。

(C) Comparative Analysis

補正およびQC終了後の遺伝子Probeの解析は以下のように行った。今後、特に記載しない限り、解析にはNormalized値を使用し、レプリケートのあるサンプルでは得られたNormalized値を平均化して解析に使用した。詳細は以下①~③の通りである。

① Fold Changeによる比較解析

ATP刺激NHEKsサンプルのNormalized値がコントロールサンプルのNormalized値、1に対して何倍増減（または変化なし）しているかを比較解析し、その発現が2倍以上増加したものに着目し、データを抽出した。

② 有意差による比較解析

本実験では、コントロールに対する比較解析であるためPaired Student's *t*-testを使用した。すなわち、Normalized値の平均が1であるという帰無仮説が真である可能性を示し、コントロールに対して有意差x%で発現した遺伝子であることを示す。

③ 生物学的解釈

コントロールに対して発現差、有意差の認められた遺伝子に関しては、生物学的解釈をするために公的データベースを用いた解析を行った。以下に使用したデータベースを示す。

Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)

定量RT-PCR

Total RNAに対する逆転写反応は、TaKaRa RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 (Takara, Otsu, Japan)を用いて行った。すなわち、反応溶液を以下のように調製し、反応は42°Cで45分、99°Cで5分を1サイクルで行い、その後 4°C に急冷してcDNAを合成した。

Total RNA	1.0 µg
25 mM MgCl ₂	4.0 µL
10 × PCR buffer	2.0 µL
Oligo dT-adopter primer	1.0 µL
10 mM dNTP mixture	2.0 µL
RNase inhibitor	0.5 µL
AMV reverse transcriptase	1.0 µL
RNase-free water	variable
<hr/>	
Total	20.0 µL

続いて、得られたcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行った。本反応は、Mx 3000P Real Time Quantitative PCR System (Stratagene, Santa Clara, CA)を使用した。すなわち、反応溶液を以下のように調製し、反応条件として95°C で2分の熱変性を行った後、95°C で5秒、60°C で20秒の反応を40サイクル行い、4°C に急冷した。

RNase free water	9.825 μ L
20 μ M Forward primer	0.5 μ L
20 μ M Reverse primer	0.5 μ L
2 μ M Reference Dye	0.375 μ L
5 μ M TaqMan probe	0.3 μ L
2 \times Brilliant II Fast QPCR Master Mix	12.5 μ L
cDNA	1.0 μ L
<hr/>	
Total	25.0 μ L

mRNAの発現レベルは、 $\Delta\Delta$ Ct法⁽⁷³⁾を用いてそれぞれの遺伝子、時間においてGAPDHで標準化を行い算出した。

また、標的遺伝子の各プライマー及びTaqMan probeの設計はPrimer Express 1.0 softwareで行い (PCR product size: 50-150 bp; primer size: 15-25 bp; Tm: 58°C to 60°C)、SIGMA GENOSYS (Ishikari, Japan)より購入したものを使用した。以下に各プライマーおよびTaqMan probeを示す。

Specific primers used for the quantitative RT-PCR

Transcript	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATC-3'	5'-GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'
IL-20	5'-TTCTGCAATGGATGGAGGAG-3'	5'-TGAAGACTGGAGCTTTGACCTCG-3'
CXCL1	5'-AAGGAGGCCCTGCCCTTATAG-3'	5'-ATTAGGCACAATCCAGGTGGC-3'
CXCL2	5'-GGTTTGCAGATATTCTCTAGTCATTTG-3'	5'-TGGATTCCTCAGCCTCTATCAC-3'
CXCL3	5'-ATTATCTCACATTATGTGTTCAAC-3'	5'-ATTAACAAGGCATTATGCC-3'
ATF3	5'-GGAAGAGCTGAGGTTTGCCA-3'	5'-TGAAGTATTCCAGCGCAGAG-3'
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'

TaqMan probes used for the quantitative RT-PCR

Transcript	TaqMan probe
IL-6	5'-(FAM)-CAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA-(TAMRA)-3'
IL-20	5'-(FAM)-AATAGGAGGAAAGTGATGCTGCTGCTAAGA-(TAMRA)-3'
CXCL1	5'-(FAM)-ACAGAAGAGGAAAGAGAGACACAGCTGCA-(TAMRA)-3'
CXCL2	5'-(FAM)-TCTTCGTGATGACATATCACATGTCAGCCA-(TAMRA)-3'
CXCL3	5'-(FAM)-GCTGAAGTTTCCCTTAGACATTTTATGTCT-(TAMRA)-3'
ATF3	5'-(FAM)-AGAACAAGCACCTCTGCCACCGGA-(TAMRA)-3'
GAPDH	5'-(FAM)-TGGCAAATTCATGGCACCGTCA-(TAMRA)-3'

ELISA

細胞を6ウェルプレートに 3.0×10^4 cells/wellの密度で2 mLのHuMedia-KG2に播種し、3日間培養した後、4日目にヒドロコチゾンを除いたHuMedia-KG2に置換した。24時間後、新しい同培地に交換しATP、ATP γ S、ADP、UTPをそれぞれ100 μ M添加した後、24時間インキュベーションした。24時間後、培養上清を回収し室温、1100 \times g、3分間遠心後、上清を-30°Cにて保存した。

経時変化の検討においては、同操作にて細胞を播種、培養後100 μ M ATPで0、1、2、3、6、12、24時間インキュベーションした。各時間において培養上清を回収し室温、1100 \times g、3分間遠心後、上清を-30°Cにて保存した。

ATP濃度依存性の検討は、同操作にて細胞を播種、培養後0、10、30、100、300 (μ M)のATPをそれぞれ添加し、24時間インキュベーションした。その後培養上清を回収し、室温、1100 \times g、3分間遠心後、上清を-30°Cにて保存した。

阻害実験の検討においては、同操作にて細胞を播種、培養後、非選択的P2受容体アンタゴニスト、PPADS (0.1 mM、1 mM)及び広範囲なP2受容体アンタゴニスト、suramin (0.1 mM、1 mM)をそれぞれの濃度で加え、15分間プレインキュベーションした後、100 μ M ATPを添加して24時間インキュベーションした。24時間後、培養上清を回収し室温、1100 \times g、3分間遠心後、上清を-30°Cにて保存した。

IL-6、IL-20およびCXCL1の測定は、メーカーから供与されたプロトコールに従って行った。

タンパク質調製とウエスタンブロット解析

NHEKsよりタンパク質を調製した。すなわち、細胞を1 mM バナジウム酸塩 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を含む氷冷phosphate buffered saline (PBS)にて二回洗浄後、細胞可溶化液 (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)、10% SDS、20% グリセロール、1 × プロテアーゼインヒビターカクテル (Complete, Mini; Roche, Basel, Switzerland)、0.2% ブロモフェノールブルー)を添加し、スクレイパーにて細胞を可溶化した。次に1.5 mLエッペンドルフチューブに移し15秒間ボルテックスした後、100°Cで5分間加熱した。4°C、15,000 × g、5分間遠心した後、上清を新しい1.5 mLエッペンドルフチューブに移し、-80°Cにて保存した。タンパク定量はBSAをスタンダードとし、BCA protein assay (Thermo Scientific, Rockford, IL)を用いて行った。

調製したタンパク質25 µg/laneに対して2-メルカプトエタノールを終濃度10%になるように添加し、100°C で5分間インキュベートしてタンパク質を変性させた後、10-20% ポリアクリルアミドゲル (ATTO, Tokyo, Japan)にて20 mA/gelで80分間泳動した。次に、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad, Hercules, CA)に100 Vで1時間転写した後、5% nonfat dried milk (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)を含む1 × TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1% Tween 20)で室温にて1時間振盪し、ブロッキングした。続いて1 × TBSTにて5分間1回洗浄した。一次抗体は、5% BSAを含む1 × TBSTで1000倍希釈したphospho-tyr705-STAT3 antibody、及びtotal STAT3 antibody (Cell Signaling Technology)、ならびにCan Get Signal Solution 1 (TOYOBO, Osaka, Japan)で1000倍希釈したAnti-ATF3 (ATLAS, Stockholm, Sweden)、Anti-β-Actin (mouse) (Sigma-Aldrich)を加えて4°Cで一晩反応させた。

1 × TBSTにて15分間3回洗浄後、二次抗体にはCan Get Signal Solution 2 (TOYOBO)で2000倍希釈したAnti-rabbit IgG, HRP-linked AntibodyまたはAnti-mouse HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology)を用いて室温で1時間反応させた。1 × TBSTで10分間3回洗浄後、基質としてLumiGLO^R chemiluminescent reagent (Cell Signaling Technology)を加えて化学発光させ、LAS-1000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)にて検出した。マーカーとしてBiotinylated Protein Ladder Detection Pack (Cell Signaling Technology)を用いた。

サイトカインの生理活性中和実験

同操作にて細胞を播種、培養後、Monoclonal anti-human IL-6 antibody、anti-human IL-20 antibody (R&D systems)及びnon-immunized control antibody (IgG) (Sigma-Aldrich) を終濃度5 µg/mLとしてそれぞれ添加し、15分間プレインキュベーションした。次に、100 µM ATPを添加して各時間でインキュベーションした後、先に述べた操作でタンパク質を回収し、-80°Cにて保存した。ウエスタンブロットによるリン酸化STAT3の検出は、前述の実験操作に従って行った。

また、今回の実験で使用した抗体濃度の設定は、メーカーから供与されたデータシートを基に行い、IL-6およびIL-20の生理活性を100%中和すると考えられる濃度として5 µg/mLを選択した。

統計解析

DNAマイクロアレイを除く各実験で得られたデータは、mean ± S.E.M.で表した。また、二群間の統計解析に基づく差異は、Student's *t*-test (両側)によって決定した。二群間以上、すなわち多群間における統計解析における差異は、Dunnet's multiple comparison testによって決定した。また、 $P < 0.05$ は統計学的に有意であると見なした。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野 教授 眞野成康 先生に謹んで感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、有益な御指導、御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 教授 平澤典保 先生、東北大学大学院薬学研究科 細胞情報薬学分野 准教授 守屋孝洋 先生に謹んで感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座皮膚科学分野 教授 相場節也 先生、同准教授（現信州大学医学部皮膚科学講座 教授）奥山隆平 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益な御指導、御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野 准教授 島田美樹 先生に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御指導、御助言を賜りました東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座皮膚科学分野の皆様へ心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多大なるご協力を賜りました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野の皆様並びに東北大学病院薬剤部の皆様へ心より感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり、終始温かい目で見守り、また心の支えとなってくれた家族、母 ヒロ、妻 由美子、長男 光貴に心から感謝致します。

引用文献

- 1 Kirnbauer R., Kock A., Neuner P., Förster E., Krutmann J., Urbanski A., Schauer E., Ansel J. C., Schwarz T., Luger T. A. Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 484-489 (1991).
- 2 Urbanski A., Schwarz T., Neuner P., Krutmann J., Kirnbauer R., Kock A., Luger T.A. Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 808-811 (1990).
- 3 Kondo S., Kono T., Sauder D.N., McKenzie R.C. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 690-694 (1993).
- 4 Kawakami M., Kaneko N., Anada H., Terai C., Okada Y. Measurement of interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- α levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*, **121**, 440-448 (1997).
- 5 Kabashima K., Miyachi Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. *J. Dermatol. Sci.*, **34**, 177-184 (2004).
- 6 Ishibashi Y., Sugita T., Nishikawa A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to malassezia yeasts. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, **48**, 400-409 (2006).
- 7 Sano S., Chan K.S., DiGiovanni J., Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J. Dermatol. Sci.* **50**, 1-14 (2008).
- 8 Grossman M.R., Krueger J., Yourish D., Granelli-Piperno A., Murphy P.D., May T.L., Kupper S.T., Sehgal B.P., Gottlieb B.A. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6367-6371 (1989).
- 9 Romer J., Hasselager E., Norby L.P., Steiniche T., Clausen T.J., Kragballe K. Epidermal

- overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine A or calcipotriol. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 1306-1311 (2003).
- 10 Nickoloff J.B., Xin H., Nestle O.F., Qin J-Z. The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin. Dermatol.*, **25**, 568-573 (2007).
- 11 Kunz S., Wolk K., Witte E., Witte K., Doecke W-D., Volk H-D., Sterry W., Asadullah K., Sabat R. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp. Dermatol.*, **15**, 991-1004 (2006).
- 12 Stenderup K., Rosada C., Worsaae A., Clausen T.J., Dam N.T. Interleukin-20 as a target in psoriasis treatment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1110**, 368-381 (2007).
- 13 Sa M.S., Valdez A.P., Wu J., Jung K., Zhong F., Hall L., Kasman I., Winer J., Modrusan Z., Danilenko M.D., Ouyang W. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol.*, **178**, 2229-2240 (2007).
- 14 Nukui T., Ehama R., Sakaguchi M., Sonogawa H., Katagiri C., Hibino T., Huh N-H. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J. Cell. Biochem.*, **104**, 453-464 (2008).
- 15 Wolk K., Haugen S.H., Xu W., Witte E., Waggie K., Anderson M., Baur E., Witte K., Warszawska K., Philipp S., Johnson-Leger C., Volk H-D., Sterry W., Sabat R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *J. Mol. Med.*, **87**, 523-536 (2009).
- 16 Sano S., Chan S.K., Carbajal S., Clifford J., Peavey M., Kiguchi K., Itami S., Nickoloff J.B., DiGiovaani J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. med.*, **11**, 43-49 (2005).
- 17 Zhong Z., Wen Z., Darnell Jr E.J. STAT3: a STAT family member activated by tyrosine

- phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, **264**, 95-98 (1994).
- 18 Heinrich C.P., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L., Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, **334**, 297-314 (1998).
- 19 Blumberg H., Conklin D., Xu W.F., Grossmann A., Brender T., Carollo S., Eagan M., Foster D., Haldeman A.B., Hammond A., Haugen H., Jelinek L., Kelly D.J., Madden K., Maurer F.M., Parrish-Novak J., Prunkard D., Sexson S., Sprecher C., Waggle K., West J., Whitmore E.T., Yao L., Kuechle K.M., Dale A.B., Chandrasekher A.Y. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, **104**, 9-19 (2001).
- 20 Levy D. E., Darnell J. E. Jr. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 651-662 (2002).
- 21 Bromberg J., Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, **19**, 2468-2473 (2000).
- 22 Jonathan N. W. N. Barker. The pathophysiology of psoriasis. *SCIENCE & PRACTICE*, **338**, 227-230 (1991).
- 23 Wrone-Smith T., Johnson T., Nelson B., Boise H.L., Thompson B.C., Nueiez G., Nickoloff J.B. Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo. *Am. J. Pathol.*, **146**, 1079-1088 (1995).
- 24 Sano S., Chan S.K., Kira M., Kataoka K., Takagi S., Tarutani M., Itami S., Kiguchi K., Yokoi M., Sugasawa K., Mori T., Hanaoka F., Takeda J., DiGiovanni J. Signal transducer and activator of transcription 3 is a key regulator of keratinocyte survival and proliferation following UV irradiation. *Cancer Res.*, **65**, 5720-5729 (2005).
- 25 Mizumoto N., Mummert E.M., Shalhevet D., Takashima A. Keratinocyte ATP release assay for testing skin-irritating potentials of structurally diverse chemicals. *J. Invest.*

- Dermatol.*, **121**, 1066-1072 (2003).
- 26 Koizumi S., Fujishita K., Inoue K., Shigemoto-Mogami Y., Tsuda M., Inoue K. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y₂ receptor activation. *Biochem. J.*, **380**, 329-338 (2004).
- 27 Ferrari D., Chiozzi P., Falzoni S., Susino D.M., Melchiorri L., Baricordi R.O., Di Virgilio F. Extracellular ATP triggers IL-1 β release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.*, **159**, 1451-1458 (1997).
- 28 Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J.M., Morelli A.. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, **97**, 587-600 (2001).
- 29 Dixon C.J., Bowler W.B., Littlewood-Evans A., Dillon J.P., Bilbe G., Sharpe G.R. Regulation of epidermal homeostasis through P2Y₂ receptors. *Br. J. Pharm.*, **127**, 1680-1686 (1999).
- 30 Seiffert K., Ding W., Wagner J.A., Granstein R.D. ATP γ S enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purinergic receptor signaling. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1017-1027 (2006).
- 31 Bles N., Horckmans M., Lefort A., Libert F., Macours P., Housni E.H., Marteau F., Boeynaems J-M., Communi D. Gene expression profiling defines ATP as a key regulator of human dendritic cell functions. *J. Immunol.*, **179**, 3550-3558 (2007).
- 32 Jiang Q., Mak D., Devidas S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J. Cell. Biol.*, **143**, 645-657 (1998).
- 33 Pellegatti P., Falzoni S., Pinton P., Rizzuto R., Di Virgilio F. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol. Biol. Cell.*, **16**, 3659-3665 (2005).

- 34 Burrell H.E., Wlodarski W., Foster B.J., Buckley K.A., Sharpe G.R., Quayle J.M. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, **280**, 29667-29676 (2005).
- 35 Abbracchio P.M., Burnstock G., Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmacol. Ther.*, **64**, 445-475 (1994).
- 36 Communi D., Gonzalez S.N., Detheux M., Bre´zillon S., Lannoy V., Parmentier M., Boeynaems J-M. Identification of a novel human ADP receptor coupled to Gi. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41479-41485 (2001).
- 37 Abbracchio P.M., Boeynaems J-M., Barnard A.E., Boyer L.J., Kennedy C., Miras-Portugal T.M., King F.B., Gachet C., Jacobson A.K., Weisman A.G., Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *TRENDS Pharmacol. Sci.*, **24**, 52-55 (2003).
- 38 Pastore S., Mascia F., Gulinelli S., Forchap S., Dattilo C., Adinolfi E., Girolomoni G., Di Virgilio F., Ferrari D. Stimulation of purinergic receptors modulates chemokine expression in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 660-667 (2007).
- 39 Burrell H.E., Bowler B., Gallagher J.A., Sharpe G.R. Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y₁, P2Y₂, and P2Y₄ receptors. *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 440-447 (2003).
- 40 Pillai S., Bikle D.D., Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, **90**, 42-51 (1992).
- 41 Greig H.A., Linge C., Cambrey A., Burnstock G. Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 1145-1149 (2003).
- 42 Inoue K., Hosoi J., Denda M. Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression

- and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 362-371 (2007).
- 43 Yoshida H., Kobayashi D., Ohkubo S., Nakahata N. ATP stimulates interleukin-6 production via P2Y receptors in human HaCaT keratinocytes. *Eur. J. Pharm.*, **540**, 1-9 (2006).
- 44 Marteau F., Gonzalez S.N., Communi D., Goldman M., Boeynaems J-M., Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellularATP in human dendritic cells. *Blood*, **106**, 3860-3866 (2005).
- 45 Georgiou G.J., Skarratt K.K., Fuller J.S., Martin J.C., Christopherson I.R., Wiley S.J., Sluyter R. Human epidermal and monocyte-derived langerhans cells express functional P2X₇ receptors. *J. Invest. Dermatol.*, **125**, 482-490 (2005).
- 46 Bulanova E., Budagian V., Orinska Z., Hein M., Petersen F., Thon L., Adam D., Bulfone-Paus S. Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X₇ receptor in murine mast cells. *J. Immunol.*, **174**, 3880-3890 (2005).
- 47 Solini A., Chiozzi P., Morelli A., Fellin R., Di Virgilio F. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X₇ receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J. Cell. Sci.*, **112**, 297-305 (1999).
- 48 Lu D., Wolfgang D.C., Hai T. Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses ras-stimulated tumorigenesis. *J. Biol. Chem.*, **281**, 10473-10481 (2006).
- 49 Yan C., Lu D., Hai T., Boyd D.D. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO. J.*, **24**, 2425-2435 (2005).
- 50 Gilchrist M., Thorsson V., Li B., Rust G.A., Korb M., Kennedy K., Hai T., Bolouri H., Aderem A. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*, **441**, 173-178 (2006).
- 51 Khuua H.C., Barrozo M.R., Hai T., Weinstein L.S. Activating transcription factor 3

- (ATF3) represses the expression of CCL4 in murine macrophages. *Mol. Immunol.*, **44**, 1598-1605 (2007).
- 52 Whitmore M.M., Iparraguirre A., Kubelka L., Weninger W., Hai T., Williams B.R. Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J. Immunol.*, **179**, 3622-3630 (2007).
- 53 Kawai K., Shimura H., Minagawa M., Ito A., Tomiyama K., Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **30**, 185-194 (2002).
- 54 Song I.P., Park Y-M., Abraham T., Harten B., Zivony A., Neparidze N., Armstrong A.C., Ansel C.J. Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 424-432 (2002).
- 55 Addison C.L., Daniel T.O., Burdick M.D., Liu H., Ehlert J.E., Xue Y.Y., Buechi L., Walz A., Richmond A., Strieter R.M. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.*, **165**, 5269-5277 (2000).
- 56 Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., Addison C.L., Ehlert J.E., Burdick M.D., Strieter R.M. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, **68**, 1-8 (2000).
- 57 Tekamp-Olson P., Gallegos C., Bauer D., McClain J., Sherry B., Fabre M., Deventer S. V., Cerami A. Cloning and Characterization of cDNAs for Murine Macrophage Inflammatory Protein 2 and its Human Homologues. *J. Exp. Med.*, **172**, 911-919 (1990).
- 58 Haskill S., Peace A., Morris J., Sporn S. A., Anisowicz A., Leeo S. W., Smith T., Martin G., RALPH P., Sager R. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7732-7736 (1990).
- 59 Petra B., Rule T. P., Dirk B., Jiirgen H., Alex M., Norbert E. F. Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**,

- 761-771 (1988).
- 60 Communi D., Robaye B., Boeynaems J-M. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1199-1206 (1999).
- 61 Schwiebert M.E., Zsembery A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1615**, 7-32 (2003).
- 62 Wilkin F., Duhant X., Bruyts C., Suarez-Huerta N., Boeynaems J-M., Robaye B. The P2Y₁₁ receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 7172-7177 (2001).
- 63 Schnurr M., Toy T., Stoitzner P., Cameron P., Shin A., Beecroft T., Davis D.I., Cebon J., Maraskovsky E. ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y₁₁ receptor signaling. *Blood*, **102**, 613-620 (2003).
- 64 Uchi H., Terao H., Koga T., Furue M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J. Dermatol.Sci.*, **24**, S29-S38 (2000).
- 65 Dreuw A., Hermanns M.H., Heise R., Jousen S., Rodri'guez F., Marquardt Y., Jugert F., Merk F.H., Heinrich C.P., Baron M.J. Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 28-37 (2005).
- 66 Dumoutier L., Leemans C., Lejeune D., Kotenko V.S., Renauld J-C. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J. Immunol.*, **167**, 3545-3549 (2001).
- 67 Fukada T., Ohtani T., Yoshida Y., Shirogane T., Nishida K., Nakajima K., Hibi M., Hirano T. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO. J.*, **17**, 6670-6677 (1998).
- 68 Gartsbein M., Alt A., Hashimoto K., Nakajima K., Kuroki T., Tennenbaum T. The role of protein kinase C δ activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced

- keratinocyte proliferation. *J. Cell Sci.*, **119**, 470-481 (2006).
- 69 Naka T., Nishimoto N., Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.*, **4**, S233-S242 (2002).
- 70 Washburn B.K., Neary T.J. P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience*, **142**, 411-423 (2006).
- 71 Walter K. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.*, **351**, 289-305 (2000).
- 72 Luca C.D., Carla P.C., Umberto D. Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays*, **25**, 1085-1095 (2003).
- 73 Livak J.K., Schmittgen D.T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**, 402-408 (2001).

発表論文リスト

- 1 Hiroshi Ohara, Rumiko Saito, Satoshi Hirakawa, Miki Shimada, Nariyasu Mano, Ryuhei Okuyama, Setsuya Aiba, Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation. *J. Dermatol. Sci.*, in press.