

ヒトはいかにして化粧品にかぶれるのか 一次刺激性皮膚炎を伴わない接触皮膚炎モデルの作成

東北大学大学院医学系研究科皮膚科学講座

相 場 節 也

To investigate the role of platelets in the process of sensitization of allergic contact dermatitis, we first examined that hapten stimulates CD40 ligand release from platelets in vitro. When platelets obtained from healthy volunteers were stimulated with a representative hapten, DNCB and one of danger signals, ATP, they significantly released CD40L in a dose-dependent fashion. Next, we examined using DNA microarray how ATP, which is released from platelets by various stimuli, e.g., thrombin, collagen, von Willebrand factor, ADP, vasopressin, platelet-activating factor, and Ca^{2+} ionophores affects immune response by keratinocytes. We identified several immune-related genes whose expression is augmented in ATP-stimulated human keratinocytes by DNA microarray. The statistical analysis of the microarray data revealed that, besides IL-6, the expression of several novel genes such as IL-20, CXCL1-3, and ATF3 was significantly augmented in ATP-stimulated keratinocytes. These data were validated by quantitative real-time RT-PCR. We also confirmed the augmented production of IL-6, IL-20, CXCL1 by ELISA and that of ATF3 by Western blotting. These studies characterized (1) production of IL-6 and IL-20, (2) chemotaxis for neutrophils via CXCL1-3, and (3) ATF3 activation as possible roles of ATP-stimulated keratinocytes. Finally, we demonstrated the presence of extracellular ATP in the sensitization phase of allergic contact dermatitis in vivo by using agarose beads coupled with luciferase. These studies suggest that platelets may play a crucial role in sensitization of allergic contact dermatitis and that platelets may surrogate the role of irritant dermatitis in sensitization.

1. 緒 言

化粧品開発においては、化粧品による接触皮膚炎をいかに防止するかは永遠のテーマであり、したがって、アレルギー性接触皮膚炎のメカニズムの解明は、化粧品の安全性を担保するうえで不可欠な課題である。現在、接触皮膚炎は、実験動物を用いた多くの研究により、感作相と惹起相に分けられること、そして、感作相における強い一次刺激性皮膚炎の存在が惹起相における免疫反応の誘導に必須であることが明らかにされている。しかし、ヒトの接触皮膚炎においては、患者のほとんどは、発症前に、このような強力な一次刺激性皮膚炎の存在を自覚していない。また、現実的に、一次刺激性皮膚炎を惹起するような化粧品が市場に広く流通することも考えにくい。これらの事実は、ヒトの接触皮膚炎の感作過程においては、マウス接触皮膚炎モデルとは全くことなった機序が存在していることを示唆しているように思われる。

近年、ノックアウトマウスを用いて接触皮膚炎の解析が多数試みられ、接触皮膚炎感作に必要な分子が次々と明らかにされてきている。そのなかで、Moodycliffeら¹⁾は、マウス接触皮膚炎感作には、CD40Lの存在が不可欠であ

ることを報告した。CD40Lは、以前から活性化T細胞に発現することがよく知られていた分子であるが、近年、活性化された血小板がCD40Lを放出すること、また、CD40Lのノックアウトマウスで抗体産生などの免疫反応が著明に抑制されること、さらには、このマウスにCD40Lを有するマウス由来の活性化血小板を移入するのみで免疫反応を回復させることができるなどの報告が相次いだ²⁾。

血小板が、様々な機械的、化学的刺激により活性化することを考えると、ヒトにおける接触皮膚炎の成立にも血小板が何らかの役割をはたしている可能性が推測される。また、血小板が種々の刺激により細胞外に放出するCD40LやATPは、樹状細胞のCD40やATP受容体に作用して樹状細胞を活性化させることが知られている。そこで、本研究においては、血小板をハプテンにて刺激した際にCD40Lが遊離されるか否か、また、細胞外のATPが表皮角化細胞にどのような影響を与えるかを検討した。最後に、ハプテン塗布によりマウス皮膚においてATPが実際に遊離されるか否かも検証した。

2. 実験方法

1) 血小板の分離

健康人ボランティアよりヘパリン採血した末梢血を素早く等量のPBSで稀釈し22℃、800g 5分間遠心することにより濃縮された血小板を含む分画を作成した。それを1% FCSを含むPBSで洗浄後10% FCS添加RPMI-1640培地に浮遊させ以下の実験に用いた。



How do cosmetics sensitize humans?
Analysis of a possible role of platelets.

Setsuya Aiba

Department of Dermatology, Tohoku
University Graduate School of Medicine

2) 血小板からの CD40L 放出

血小板からの CD40L の放出は、種々の濃度の異なった化学物質で 24 時間刺激後に培養上清を回収し、上清中の CD40L を市販の CD40L に対する ELISA kit を用いて定量した。

3) ヒト表皮細胞培養及び培養条件

ヒト正常表皮細胞 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、表皮角化細胞増殖用培地 (HuMedia-KG2 ; Kurabo) を用いて 5 % CO₂、37℃ 飽和水蒸気圧下で行った。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ーチゾンは 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、これを避けるために実験を行う 24 時間前にハイドロコーチゾンのみを除いた HuMedia-KG2 に置換した。

4) 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ルに従い、抽出した Total RNA は OD260 により定量した。また、Total RNA は RNA6000 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。

5) DNA マイクロアレイ解析

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 μM) 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。DNA マイクロアレイは常法にのっとりマイクロアレイスライド (44K Whole Human Genome*; Agilent technologies) を用いて行った。また、データの解析は、GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent technologies) を用いて行い、さらに結果の生物学的解釈には、Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) を用いた。

6) 定量 RT-PCR

DNA マイクロアレイの結果は、定量的 real-time PCR により確認した。

以下に使用した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'-TGAAGACTGGAGCTCTTGACCTCG-3'
CXCL1	5'-AAGGAGGCCCTGCCCTTAG-3'	5'-ATTAGGCACAATCCAGGTGGC-3'
CXCL2	5'-GGTTTGCAGATATTCTAGTCATTTG-3'	5'-TGGATTCTCAGCCTCTATCAC-3'
CXCL3	5'-ATTATCTCACATTATGTGTCAAC-3'	5'-ATTAAACAAGGCATTATGCC-3'
ATF3	5'-GGAAGAGCTGAGGTTTGCCA-3'	5'-TGACTGATTCCAGCCGACAG-3'
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-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)-ACAGAAGAGGAAAGAGACACAGCTGCA-(TAMRA)-3'
CXCL2	5'-(FAM)-TCTTCGTGATGACATATCAGATGTCAGCCA-(TAMRA)-3'
CXCL3	5'-(FAM)-GCTGAAGTTTCCCTTAGACATTTTATGTCT-(TAMRA)-3'
ATF3	5'-(FAM)-AGAACAAGCACCTCTGCCACCGGA-(TAMRA)-3'
GAPDH	5'-(FAM)-TGGCAAATTCATGGCACCGTCA-(TAMRA)-3'

7) ELISA

細胞上清中のサイトカインの定量 (IL-6、IL-20 および CXCL1) は、市販の ELISA kit を用いてメーカーから供与されたプロトコルに基づき行った。

8) タンパク質調製とウェスタンブロット解析

NHEKs 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 pH6.8)、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。その後、BCA protein assay (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いてタンパク量を定量した。調製したタンパク質を 10 - 20 % ポリアクリルアミドゲル (ATTO, Tokyo, Japan) にて泳動し、次に、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。Western blotting は、一次抗体に phosphotyrosine-STAT3 antibody、total STAT3 antibody (Cell Signaling Technology)、Anti-ATF3 (ATLAS, Stockholm, Sweden)、および Anti-β-Actin (mouse) (Sigma-Aldrich) 抗体、2 次抗体に Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody または Anti-mouse HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology) を用い基質に LumiGLO[®] chemiluminescent reagent (Cell Signaling Technology) を加えて化学発光にて検出した。

9) 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、Dunnett'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。

10) in vivo ATP imaging

細胞外に放出されたATPをin vivoで確認する目的で、私たちはEluc ルシフェラーゼをアガロースに固相化したビーズを作成した。これをあらかじめルシフェフェリンを腹腔内投与したマウス皮下に投与することにより投与部位周囲に存在するATPをIVIS 100 (Zenogen) を用いてimagingすることが可能となった。

3. 結果と考察

1) 血小板からの CD40L の放出

血小板を $1 \times 10^8/\text{ml}$ に浮遊し、それに10 μM , 30 μM , 100 μM の DNCB、100 μM , 300 μM , 1000 μM の NiCl_2 、100 μM , 300 μM , 1000 μM の ATP を加えて24時間培養し、培養上清中のCD40Lの存在をELISAにて検討した。その結果、図1のようにDNCBとATP刺激において血小板か

ら未刺激対照と比較して明らかに有意なCD40Lの放出が認められた。

CD40Lによる樹状細胞の活性化は、IL-12の産生増加とT細胞刺激活性の増強効果を伴っており接触皮膚炎の誘導に重要な役割を果たしていることが推測される³⁾。

2) DNA マイクロアレイを用いた ATP 処理 NHEKs における遺伝子変動解析

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 μM) 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、図2に示したストラテジーにて行った。

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

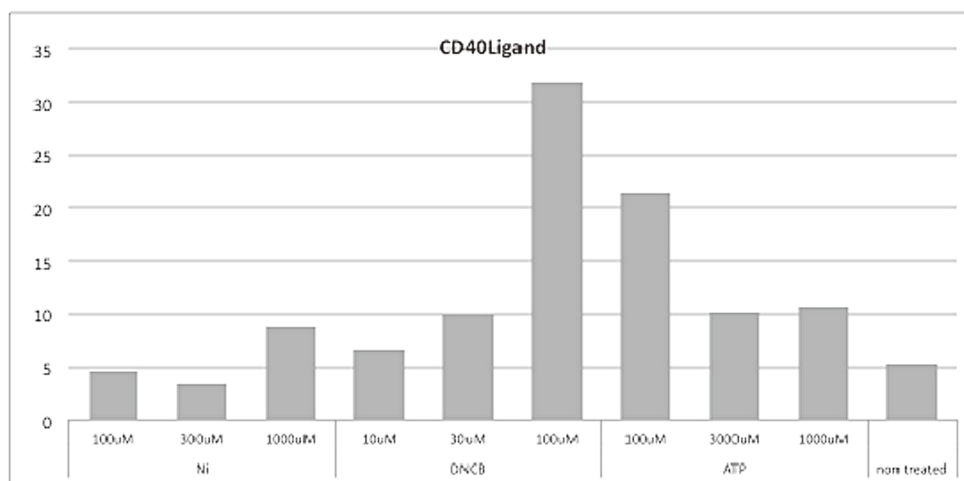


図1 ハプテン、ATP 刺激血小板からの CD40L の放出

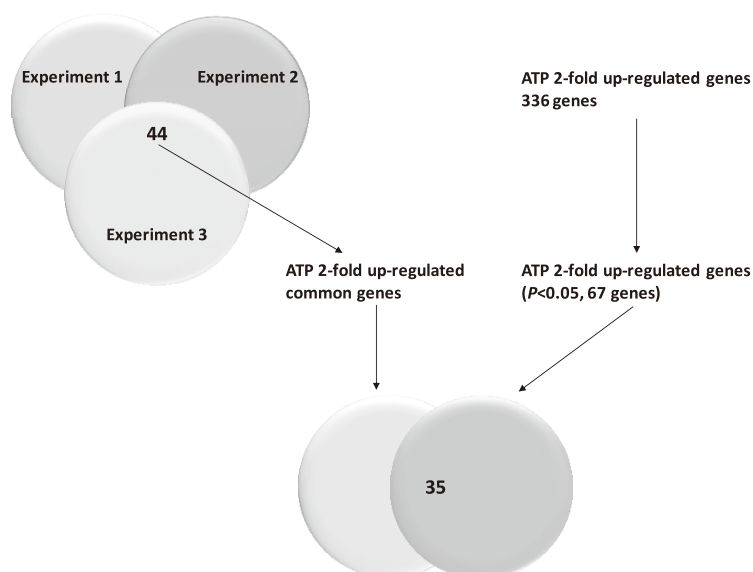


図2 ATP 処理 NHEKs で変動する遺伝子の同定アルゴリズム

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。

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 (表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^{4,5)}、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 (表3)。

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^{6,7)}。2007年、Gilchristら⁸⁾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

表1 ATP刺激表皮細胞で変動した遺伝子リスト

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

表2 ATP 刺激表皮細胞で発現が変動した遺伝子の Gene Ontology 解析

GO term	Genes in the Category	p-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

表3 ATP 刺激 NHEKs で優位に発現が増加した免疫関連遺伝子

Description	Gene Symbol	Genbank	Ratio				p-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

(ohara H, et al. *J. Dermatol. Sci.*, 58:143-151, 2010)

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。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^{9, 10)}。表皮細胞にはTLR2およびTLR4が発現しており^{11, 12)}、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¹³⁾。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^{13, 14)}。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^{15, 16)}。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。

2) DNA マイクロアレイ解析の mRNA およびタンパクレベルでの検証

次に、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発現変動をTaqMan probeを用いた定量RT-PCR法により確認した。また、その際に発現の経時変化についても検討を加えた。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

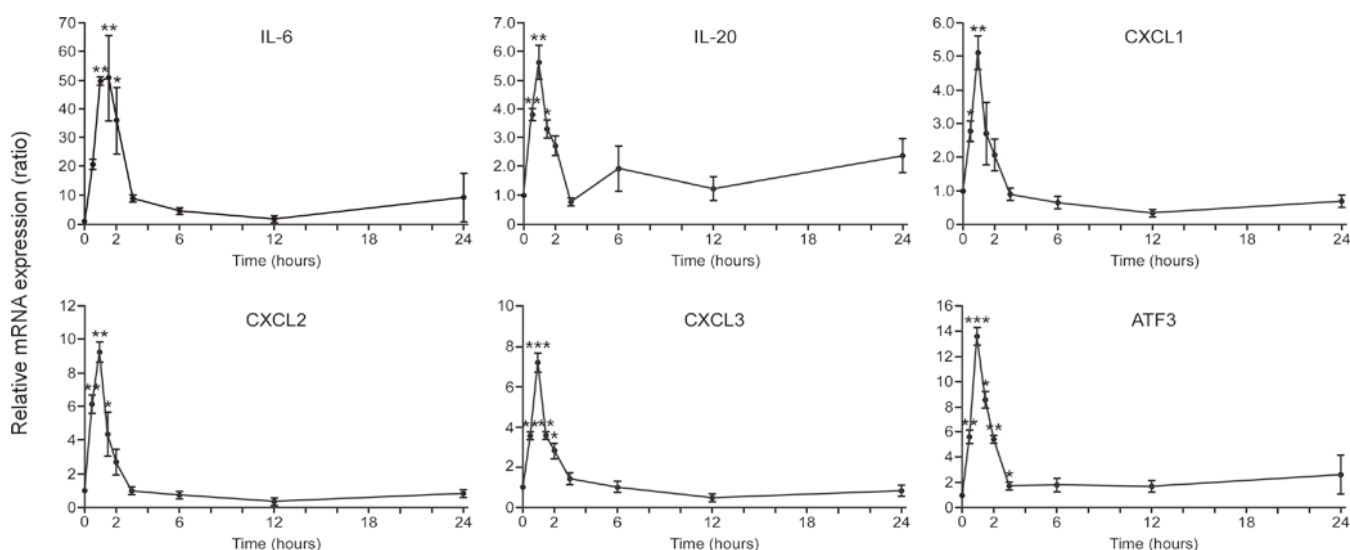


図3 DNA マイクロアレイ解析結果の quantitative real-time RT-PCR による検証

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.

間後以降は時間の経過に伴って減弱した(図3)。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。

同様に、タンパクレベルでの検証も試みた。図4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(図4 A, 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(図4 C)。

また、データは示さないが、これらのタンパク産生増加は、ATPの容量に依存していた。

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(図

4 A, 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、またはアポトーシスなどの多くの細胞内イベントに関与している^{6,7)}。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⁸⁻¹⁰⁾。NHEKsにおいてはTLR2およびTLR4が発現しており^{11,12)}、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。

以上の結果は、血小板が様々な刺激により活性化されATPを放出することを考慮すると¹⁷⁾、血小板の活性化が、ATP放出を介して皮膚免疫に多大な影響を及ぼす可能性を示唆している。我々もATPがプテンによる直接刺激と協調して樹状細胞の活性化を亢進させることを報告しているが¹⁸⁾、それに加えて、ATPが表皮細胞やその他皮膚構成細胞に作用してIL-6などの産生を介して樹状細胞の活性化に影響を与えることが明らかとなった。

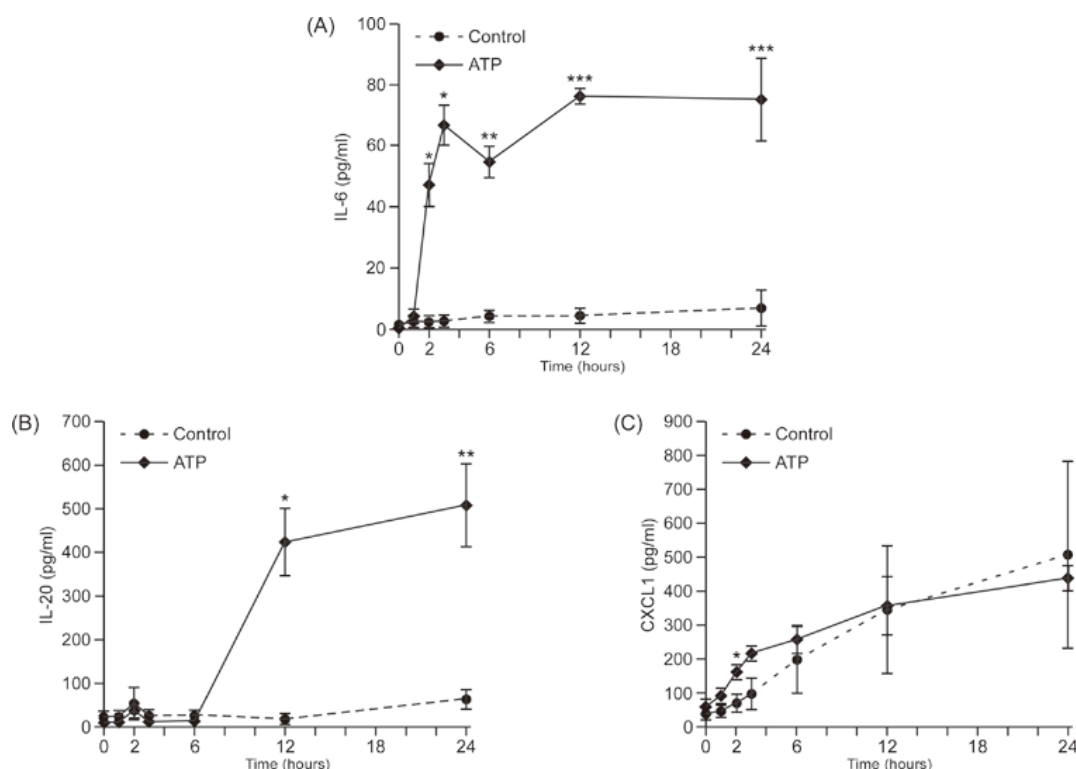


図4 DNAマイクロアレイ解析のタンパクレベルでの検証

NHEKs were cultured in the presence or absence of 100 μM 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 ± 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).

4) ハプテン刺激による皮膚からの ATP 放出

未感作マウス皮膚にハプテンを塗布し、経時的に塗布部位皮膚における細胞外 ATP の存在を固相化ルシフェラー

ゼにより検出した。その結果、ハプテン塗布 1 時間で皮膚における細胞外 ATP が検出できた。

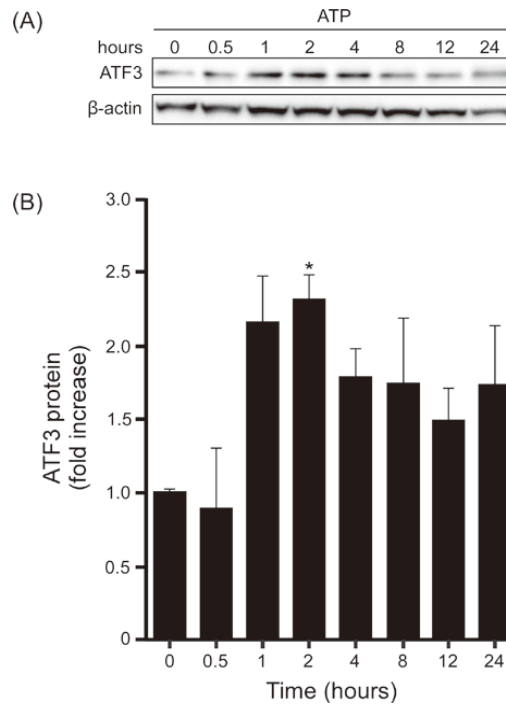


図5 細胞外 ATP による ATF3 タンパクの誘導

NHEKs were stimulated with $100\mu\text{M}$ 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.

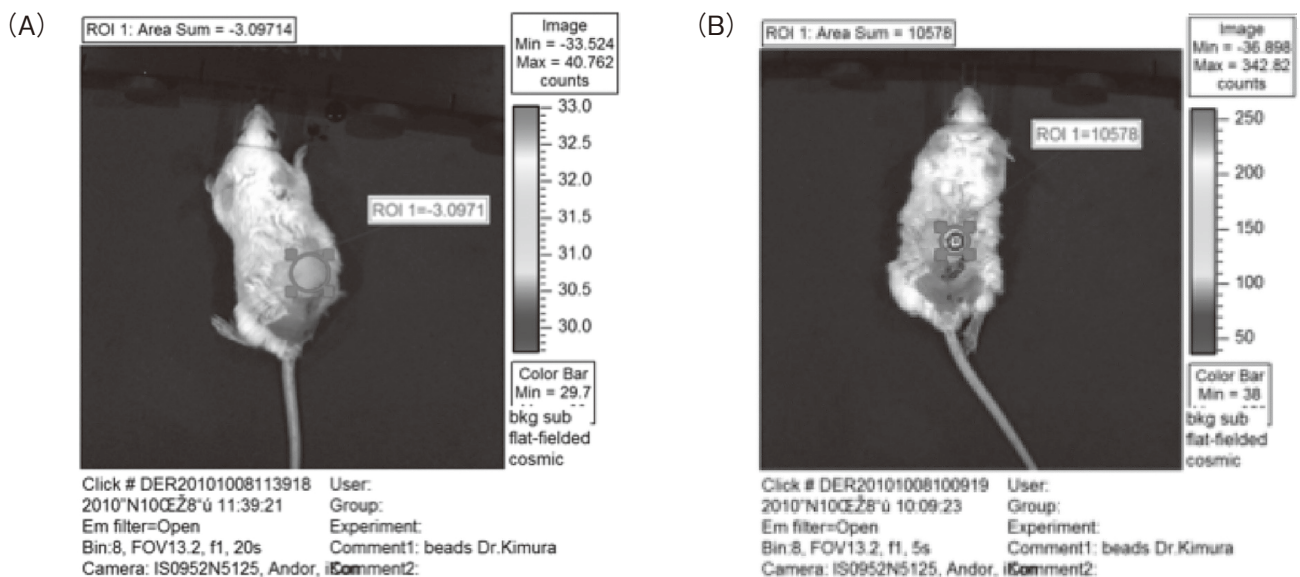


図6 ハプテン刺激皮膚における細胞外 ATP の検出
(A) 未処理 (B) DNCB 塗布 1 時間後

4. 結 語

今回の研究により、ハプテンおよびATP刺激により血小板からCD40Lが放出されることが明らかになった。また、血小板から種々の刺激で放出されるATPにより表皮細胞から免疫反応に関与するサイトカイン、ケモカインが放出されることも明らかとなった。また、実際に、ハプテン塗布皮膚には、細胞外にATPが存在していることも証明した。種々の刺激で活性化する血小板が、接触皮膚炎感作過程における樹状細胞活性化に関与していることが示唆された。

(文献)

- 1) Moodycliff A.M., Shreedhar V., Ullrich S.E., et al. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J. Exp. Med.*, **191**, 2011-2020 (2000).
- 2) Elzey B.D., Tian J., Jenxen R.J., et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, **19**, 9-19 (2003).
- 3) Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.*, **184**, 747-52 (1996).
- 4) 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).
- 5) Yoshida H., Kobayashi D., Ohkubo S., et al. ATP stimulates interleukin-6 production via P2Y receptors in human HaCaT keratinocytes. *Eur. J. Pharm.*, **540**, 1-9 (2006).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) Gilchrist M., Thorsson V., Li B., Rust G.A., et al. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*, **441**, 173-178 (2006).
- 9) Khuu H.C., Barrozo M.R., Hai T., et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) represses the expression of CCL4 in murine macrophages. *Mol. Immunol.*, **44**, 1598-1605 (2007).
- 10) Whitmore M.M., Iparraguirre A., Kubelka L., et al. Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J. Immunol.*, **179**, 3622-3630 (2007).
- 11) Kawai K., Shimura H., Minagawa M., et al. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **30**, 185-194 (2002).
- 12) Song I.P., Park Y-M., Abraham T., et al. Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 424-432 (2002).
- 13) Blumberg H., Conklin D., Xu W.F., et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, **104**, 9-19 (2001).
- 14) Kunz S., Wolk K., Witte E., et al. 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).
- 15) Addison C.L., Daniel T.O., Burdick M.D., et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.*, **165**, 5269-5277 (2000).
- 16) Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, **68**, 1-8 (2000).
- 17) Beigi R., Kobatake E., Aizawa M., et al. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **276**, C267-278 (1999).
- 18) Ohtani T., Mizuashi M., Nakagawa S., et al. TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology*, **126**, 485-499 (2009).