

# 天然由来石鹼に含まれる脂肪酸によるTSLP産生とアレルギー誘発作用

東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野

平澤 典保

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) plays critical roles in the induction and exacerbation of allergic diseases. We found that medium-chain fatty acid such as nonanoic acid induced the production of TSLP in vivo. Nonanoic acid promoted sensitization to ovalbumin, resulting in an enhancement of the cutaneous anaphylactic response. In this report, we clarified that the exposure to nonanoic acid after the sensitization augmented picryl chloride-induced thickening of the ear, which was reversed in TSLP receptor-deficient mice. However, coconut oil, which includes medium-chain fatty acids, did not induce TSLP production. To clarify the molecular mechanisms by which free fatty acid induced TSLP production, mouse epithelium cell line PAM212 was used. We found that valeric acid potently induced TSLP production. Isovaleric acid but not the related compounds showed the activity. The agonists to GPR120, GPR84, GPR43 (FFA2R), GPR41 (FFA3R), and GPR40 were not induced TSLP production. PTX did not inhibit TPA-induced TSLP production but inhibited valeric acid-induced one. Valeric acid-induced TSLP production was inhibited by U0126 and TACP-1, suggesting that ERK and NF- $\kappa$ B were involved in the production. These findings suggested that valeric acid induced TSLP production via G protein-coupled receptor and mediated by ERK and NF- $\kappa$ B.

**Conclusion:** Low and medium-chain fatty acids have the activity to produce TSLP via unidentified receptors and TSLP exacerbated allergic inflammation. Although coconut oil shows no activity, our findings suggested that the natural soap, which includes medium-chain fatty acids, might be a risk to induce allergic dermatitis.

## 1. 緒言

近年、手湿疹など、アレルギー性の湿疹、皮膚炎が増加している。この原因の一つに、石鹼や化粧品に含まれる化学物質による影響が示唆されている。特に天然由来の石鹼には、界面活性作用による皮膚バリア機能の低下とともに、同時に含まれる種々の化学物質が免疫機能に影響を与える可能性がある。本研究では、特に天然油脂に多く含まれる低・中鎖脂肪酸のアレルギー誘発活性に着目した。

石鹼や化粧品などの化学的因子の影響を直接的に受ける細胞としては皮膚上皮細胞があげられる。上皮細胞はこれまで、バリア機能を担う細胞として認識されてきたが、近年では外的刺激に対してサイトカイン等の炎症性メディエーターを産生し、免疫応答の制御にも寄与する<sup>1)</sup>ことが明らかとなり、アトピー性皮膚炎の病態への寄与が示唆されている<sup>2)</sup>。

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、主に上皮細胞から産生される interleukin (IL)-7 様サイトカインである<sup>3)</sup>。産生された TSLP は TSLP 受容体を介して、未成熟な樹状細胞を活性化させて成熟樹状細胞へと分化させる。成熟樹状細胞はリンパ節に遊走し、naïve CD4<sup>+</sup> T細胞を

IL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカイン、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインを産生する炎症性Th2細胞へと分化誘導し、さらに樹状細胞からの thymus and activation-regulated chemokine (TARC) および monocyte-derived chemokine (MDC) の産生を誘導することでTh2型のアレルギー反応を増強し<sup>4)</sup>、IgEの産生を高める。

アトピー性皮膚炎患者の病変部位<sup>5)</sup>や、重度の気管支喘息患者の気道上皮細胞<sup>6)</sup>では、TSLPが高発現しておりアレルギー疾患におけるTSLPの関与が示唆された。遺伝子組み換えマウスを用いた実験によって、皮膚に特異的なTSLPの過剰発現により湿疹、紅斑といったアトピー性皮膚炎様皮膚症状が自然発症する<sup>7)</sup>こと、またOVAを抗原としたアトピー性皮膚炎モデル<sup>8)</sup>や喘息モデル<sup>9)</sup>におけるアレルギー炎症はTSLP受容体欠損マウスにおいて顕著に抑制されることから、TSLPはアレルギー炎症において必要かつ十分なマスタースイッチとして働くと考えられている<sup>10)</sup>。

TSLPの誘導因子については、Toll like receptor (TLR) のリガンド、TNF- $\alpha$ やIL-4などのサイトカイン、タバコの煙 (Cigarette smoke extract) 等、さまざまな刺激因子が報告されているが、これらによるTSLP産生誘導メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。また、これらの誘導因子に加えて、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) や dibutyl phthalate といった化学物質もTSLP産生を誘導することが報告されている<sup>11)</sup>。当研究室では、環境因子によるアレルギー増悪化の機序の一つとして、TSLPの関与を仮定し、身近に存在する化学物質によるTSLP産生を解



Effects of short- and medium-chain fatty acids on TSLP production and induction of allergy

Noriyasu Hirasawa

Laboratory of Pharmacotherapy of Lifestyle Related Diseases, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

析した結果、*m*-xylene や 1, 2, 4-trimethylbenzene といったより身近な化合物が TSLP 産生を誘導する<sup>12)</sup> ことを明らかにしている。特に、ヤシ油 (ココナツオイル) など天然由来石鹼等に多く含まれる低・中鎖脂肪酸に TSLP 産生を誘導する活性 (図 1)、更には外来蛋白質に対するアレルギーを増強する活性 (図 2) がある事を見いだした<sup>13)</sup>。そこで本研究では、低・中鎖脂肪酸の TSLP 産生誘導機構と、アレルギー誘発作用について、マウスのアレルギーモデル、ならびにマウスケラチノサイト細胞株の PAM212 細胞を用いて検討した。

## 2. 実験

### 2.1 マウス耳介塗布モデル

Balb/c 雄性マウスをジエチルエーテル麻酔し、耳介皮膚の表裏に種々の化合物計 20 $\mu$ l 塗布した。一定時間後、耳介皮膚組織を切り取った後、皮打ち抜きパンチ (直径 10mm) で一定面積を打ち抜き、耳介皮膚組織を電子天秤にて重量を測定した。耳介組織は、破砕用ビーズを用いて破砕した。遠心上清中の TSLP 量は Mouse TSLP DuoSet<sup>®</sup> ELISA を用いて測定した。また mRNA 測定のためには耳介組織 20–30mg を 5% Proteinase K 含有 RNAiso Plus 500 $\mu$ l 中で同様に破砕し、Real time PCR 法で解析した。

### 2.2 塩化ピクリルによるアレルギー性慢性皮膚炎様病態マウスの作製

C57BL/6 および TSLP 受容体欠損マウス (C57BL/6) を用いた。Cyclophosphamide 溶液 (30mg/ml) を 150mg/kg となるように腹部皮下に投与した。2 日後、マウスの右耳介皮膚に 7% (w/v) PiCl 溶液 50 $\mu$ l を表裏均等塗布することにより感作を行った。感作 5 日後と 10 日後に、感作を行った右耳介の表裏均等に nonanoic acid を 20 $\mu$ l 塗布

した。PiCl で感作を行って 12 日後、感作した右耳介皮膚表裏に 1% (w/v) PiCl 溶液 20 $\mu$ l を塗布することにより惹起を行った。その後経時的に耳介の厚さを測定した。

### 2.3 マウスケラチノサイト株 PAM212 細胞における TSLP 産生

PAM212 細胞を 10% FBS 含有 MEM $\alpha$  中、 $1 \times 10^5$  cells/ml になるように調製した。各濃度の阻害薬を添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で任意の時間前処理した後、BSA 存在下各種濃度の fatty acid で刺激した。24 時間培養後、培養液上清中の TSLP を ELISA で測定した。細胞毒性は MTT 法で評価した。

## 3. 結果

### 3.1 PiCl 誘発性接触皮膚炎モデルにおける耳介浮腫に対する nonanoic acid の影響

Picryl chloride (PiCl) を抗原とした接触皮膚炎モデルにおいて、感作と惹起の間に nonanoic acid を塗布することで、惹起時の反応に対する影響を解析した。PiCl で感作を行い (day 0)、12 日後惹起を行った。その後、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に耳介の厚さを計測した。各々の耳介の厚さから惹起前の厚さを引き、耳介皮膚の厚みの変化として表した。野生型 C57BL/6 マウスでは、惹起後に耳介肥厚がみられ、nonanoic acid を感作と惹起の間に 2 回塗布することで耳介肥厚が増強された (図 3A)。一方、TSLP 受容体欠損マウスにおいて、同様の実験を行った結果、惹起後の耳介肥厚はみられたが、nonanoic acid 塗布による耳介肥厚の増強作用は著しく減弱した (図 3B)<sup>13)</sup>。この結果から、nonanoic acid は PiCl による接触皮膚炎を増強すること、そしてこの作用は TSLP 産生を介していることが示唆された。

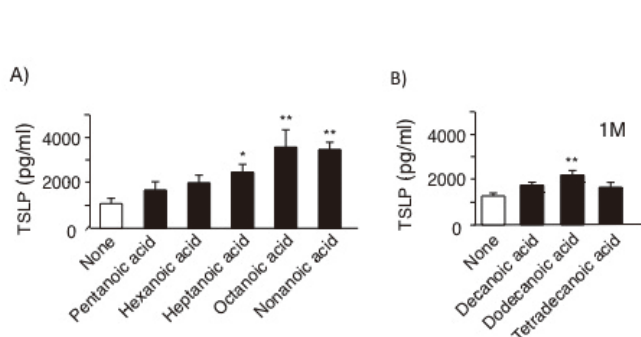


図 1 マウス耳介モデルにおける脂肪酸の TSLP 産生誘導活性<sup>13)</sup>  
マウス耳介に各脂肪酸 20 $\mu$ l を塗布し、24 時間後の耳介組織ホモジネート中の TSLP 量を測定した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

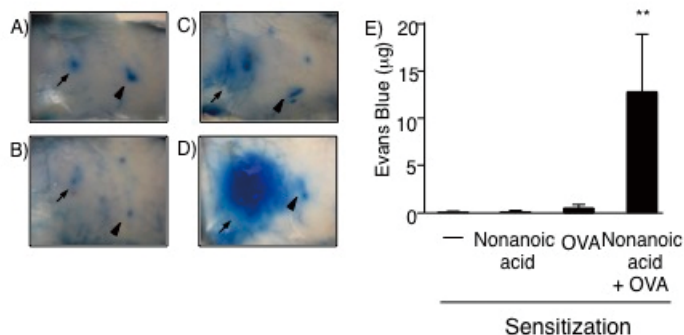


図 2 Nonanoic acid による外来蛋白質に対するアレルギー増強<sup>13)</sup>  
BALB/c マウスに nonanoic acid (B, D) あるいは vehicle (A, C) を塗布し 24 時間後に同部位に ovalbumin (OVA) を皮内注射して感作した。9 日後、0.05% Evans blue 溶液を静脈内注射した後、vehicle (矢頭) および OVA 溶液 (矢印) を皮内注射した。30 分後、皮内に漏出した色素を抽出し定量した (E)。\*\* $P < 0.01$

### 3.2 中鎖脂肪酸を含むココナツオイルの作用

中鎖脂肪酸を多く含む天然成分として、ヤシ油(ココナツオイル)が注目されている。ココナツオイルは炭素数12のラウリン酸などの中鎖脂肪酸を多く含み、天然由来石鹼等に用いられている。そこでまず、ココナツオイルをマウス耳介に塗布し、24時間後のTSLP産生を解析したが、TSLPの産生は認められなかった(data not shown)。

### 3.3 PAM212細胞におけるTSLP産生誘導

マウス耳介への脂肪酸刺激によりTSLP産生誘導がみられたことから、マウスケラチノサイト細胞株であるPAM212細胞を用いて、*in vitro*における短鎖および中鎖脂肪酸のTSLP産生誘導活性を解析した。PAM212細胞をBSA存在下各種脂肪酸で24時間刺激し、培養上清中TSLP濃度をELISAにより測定した。その結果、脂肪酸のTSLP産

生誘導活性には炭素数による違いがみられ、炭素数5のvaleric acidが最も強い活性を示した(図4)。またvaleric acidの類似化合物の活性について解析したところ、isovaleric acidには同程度のTSLP産生誘導活性が認められたが、pivalic acid、2-methyl butanoic acid、1-pentanol、2-pentanone、 $\gamma$ -aminobutyric acid(図5)は2 mM濃度で活性は認められなかった。

### 3.4 ATPの作用

上皮細胞は物理的刺激によりATPを放出し。このATPがサイトカイン産生を誘導する可能性も報告されている。そこで、TSLP産生に物理的刺激により放出されるATPが関与しているかどうか明らかにするために、ATPのTSLP産生効果を検討した。その結果、ATPは1 mMまでの濃度範囲でTSLP産生を誘導しなかった(data not shown)。

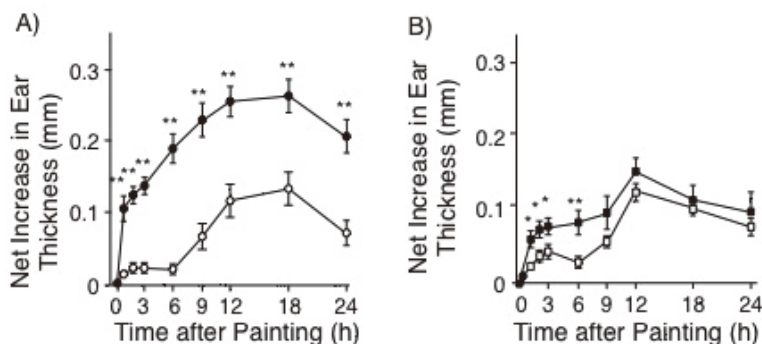


図3 Nonanoic acidによる塩化ピクリルによる接触アレルギーの増強<sup>13)</sup>  
野生型マウス(A)あるいはTSLPR欠損マウスを2.2の方法で感作惹起した。感作と惹起の間(5日と10日)にnonanoic acid(黒丸)あるいはvehicle(白丸)を塗布した。惹起後経時的に耳介浮腫を計測した。  
\*P<0.05, \*\*P<0.01

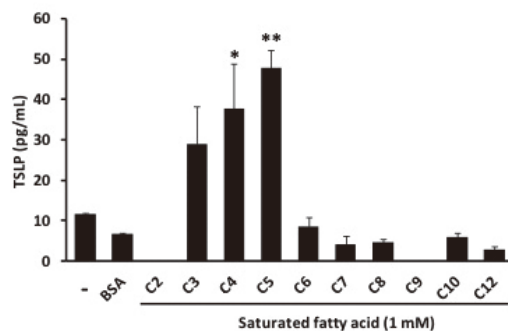


図4 PAM212細胞における脂肪酸によるTSLP産生  
PAM212細胞を各炭素数の飽和脂肪酸1 mMで刺激し、24時間後の培養液上清中のTSLPを測定した。  
\*P<0.05, \*\*P<0.01

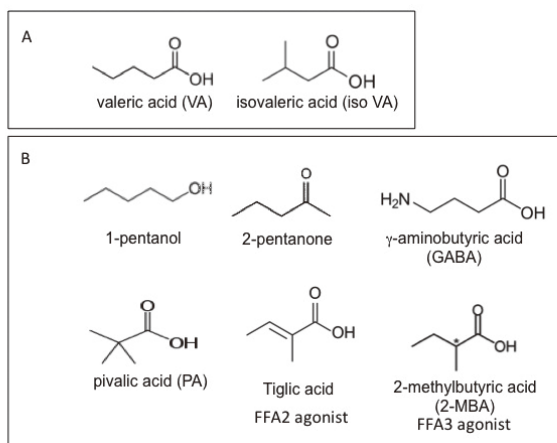


図5 Valeric acid類似構造化学物質  
Valeric acidおよびisovaleric acid(A)にはTSLP誘導活性が見られたが、その他の化合物(B)には2 mMで活性は認められなかった。

### 3.5 G 蛋白質連関受容体 (GPCR) の関与

Valeric acid による TSLP 産生誘導メカニズムの解析にあたり、初めにこの反応が受容体を介する反応か否かについて明らかにするため、Gi タンパク質共役型 GPCR の関与の有無を検討した。百日咳毒素 (PTX) は G タンパク質の一つの Gi の  $\alpha$  サブユニットを ADP リボシル化することで受容体との相互作用を阻害する。PAM212 細胞を 50, 100 nM の PTX で 1 時間前処理後、2 mM の valeric acid あるいは受容体を介さない刺激薬として 30 nM の 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で刺激し、24 時間後の培養上清中 TSLP 濃度を ELISA により測定した。その結果、TPA による TSLP 産生は PTX の影響をほとんど受けないのに対し、Valeric acid による TSLP 産生は PTX の前処理により半分程度に抑制された (図 6)。この結果は、valeric acid の作用の少なくとも 1 部は GPCR を介したものであることを示唆している。

### 3.6 FFAR 関連の関与

これまで結果から、valeric acid の作用はカルボン酸が必要であること、受容体を介した作用であることが示唆されたため、次に中鎖-長鎖脂肪酸受容体 FFA1R (GPR40) および GPR120, 中鎖脂肪酸受容体 GPR84, 短鎖脂肪酸

FFA2R (GPR43) および FFA3R (GPR41) の関与を検討した。さらに上皮細胞の化学物質に対する核内受容体 AhR についても検討した。GPR84 のアゴニストである 3,3'-diindolylmethane (DIM)、GPR40 のアゴニストである troglitazone、GPR40 および GPR120 のアゴニストである GW9508 はアゴニスト作用を十分発現する濃度 10  $\mu$ M まで TSLP 産生を誘導しなかった (data not shown)。また FFA2R アゴニストである tiglic acid、FFA3R アゴニストである 2-methylbutyric acid は valeric acid とおなじ 2 mM でも TSLP 産生を誘導しなかった。さらに PAM212 細胞を AhR のアゴニストである  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) で刺激した場合にも TSLP 産生は増加しなかった (data not shown)。

### 3.7 TSLP 産生誘導シグナル

TSLP 産生誘導に関与する細胞内シグナルの同定のために、各種阻害薬の効果を検討した。PAM212 細胞を MEK 阻害薬の U0126 (1  $\mu$ M)、p38 阻害薬の SB203580 (10  $\mu$ M)、JNK 阻害薬の SP600125 (30  $\mu$ M)、PI3K 阻害薬の wortmannin (100 nM) で 1 時間前処理後、2 mM の valeric acid で刺激し、24 時間後の培養上清中 TSLP 濃度を ELISA により測定した。その結果、U0126 の前処理によってのみ、valeric acid による TSLP 産生は抑制された (図 7)。また、

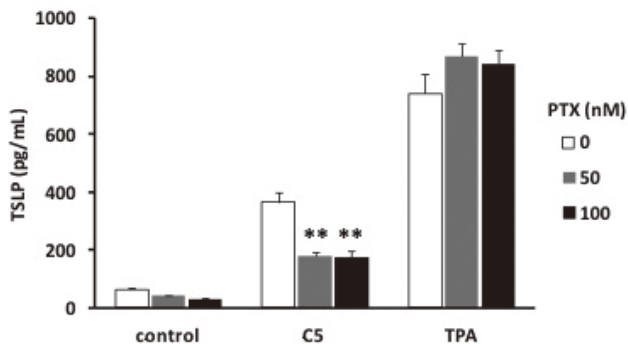


図 6 百日咳毒素の作用

百日咳毒素 50, 100 nM で 16 時間処理した後、valeric acid (C5) あるいは TPA で刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。\*\* $P < 0.01$

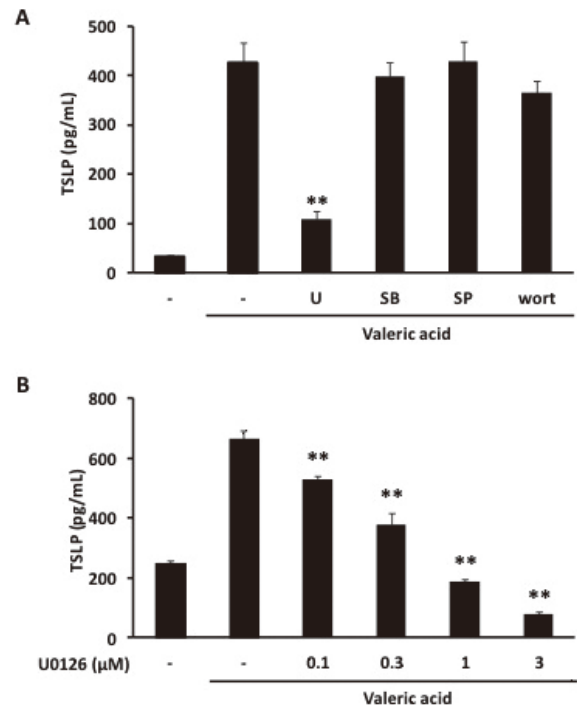


図 7 Valeric acid による TSLP 産生に対する各種阻害薬の効果

PAM212 細胞を U0126 (U, 1  $\mu$ M), SB203580 (SB, 10  $\mu$ M), SP600125 (SP, 30  $\mu$ M), および wortmannin (wort, 100 nM) (A) あるいは各濃度の U0126 (B) で 1 時間処理した後、valeric acid 2 mM で刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。\*\* $P < 0.01$

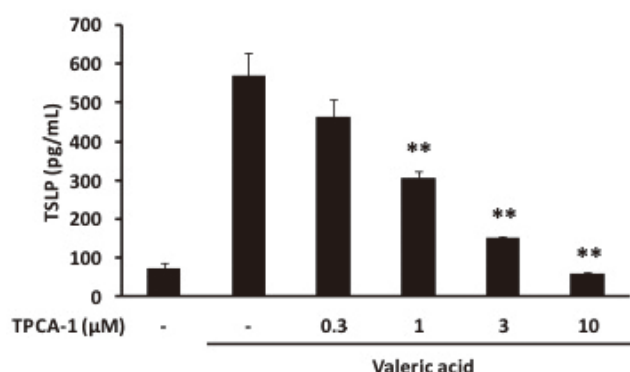


図8 Valeric acidによるTSLP産生におけるNF-κBの関与  
各濃度のTPCA-1で1時間前処理したち、valeric acid 2 mMで刺激し、24時間後の培養液上清中のTSLP量を測定した。  
\*\*P<0.01

I-κB kinase-2 阻害薬のTPCA-1 (0.3, 1, 3, 10 μM) も、valeric acidによるTSLP産生を濃度依存的に抑制し、NF-κBが関与している事が示唆された(図8)。

#### 4. 考 察

石鹸は脂肪酸のナトリウム塩あるいはカリウム塩が主成分となり、天然油脂として牛脂、ヤシ油(ココナツオイル)などが加えられることがある。ヤシ油には炭素数12のラウリン酸などの中鎖脂肪酸が多く含まれている。炭素数が少ない脂肪酸で作った石鹸は親水性が強いが親油性が弱い。今回、マウス耳介塗布モデルでは炭素数9のnonanoic acidが最も強い活性を、またPAM212細胞を用いた系では炭素数5のvaleric acidが最も強い活性を示したが、これは組織浸透性や培地への溶解性に基づくものであると考えられる。いずれの場合も、カルボン酸である事が必要で、アルデヒドやアルコール、ケトンでは活性が認められなかった。これまでマウス耳介において、TSLP産生を誘導することが明らかになっているnonanoic acidは外来抗原に対するIgE抗体産生を増大させるだけでなく、今回、接触抗原による皮膚アレルギーも増強する事が明らかになった。

低・中鎖脂肪酸の作用機構を明らかにするためにPAM212細胞を用いて解析した。最も活性が強かったものは炭素数5のvaleric acidおよびisovaleric acidであった。Isovaleric acidは足などの臭いの原因化合物である。類似化合物、ならびにこれまで明らかになっている脂肪酸受容体アゴニストはいずれもTSLP産生を誘導しないこと、GPCRを介する事、物理的的刺激で放出されるATPにも活性が認められない事から、脂肪酸は未同定の受容体に作用している可能性が示唆された。化学構造のわずかな相違により活性が大きく異なる事から、特異性の高い受容体を介しているものと推測される。各種阻害剤の効果を検討した結果、PKC、ERKならびにNF-κBの活性化が関与してい

る事が示唆された。

一方、中鎖脂肪酸が多く含まれるとされるココナツオイルをマウス耳介に塗布してもTSLP産生活性は認められなかった。したがって、通常の状態では、ココナツオイルが添加されても、アレルギー誘発のリスクはさほど大きくないと考えられる。これは中鎖脂肪酸がグリセロールにエステル化されているためであること、あるいは濃度が活性を示すまでに達していない事が考えられるが、感染等、付加的な環境要因が加わると加水分解等により中鎖脂肪酸濃度が充進して、アレルギーを増幅する可能性は否定できない。石鹸は、皮膚バリア機能を低下させるため、外来抗原の侵入を促進する可能性がある。「茶のしずく」のように、蛋白成分が石鹸に含まれる場合には抗原の侵入が容易になるとともに、石鹸成分の脂肪酸がTSLP産生を増大させて、アレルギーを増大させる可能性も考えられる。

#### 5. 総 括

本研究により、天然油脂に多く含まれる低・中鎖脂肪酸には、皮膚上皮細胞において、TSLP産生をしめすことが明らかになり、これらの成分を含む石鹸、化粧品にはアレルギー誘発のリスクがある事が示唆された。そのリスクは大きいものではないと考えられるが、今後新しい製品を開発する上では、TSLP産生について評価する事が望まれる。脂肪酸の受容機構は、GPCRが関与している事が示唆されたが、その同定にはいたらなかった。今後更に、上皮細胞の化学物質受容機構について解析を加える予定である。

#### (引用文献)

- 1) Esche C, De Benedetto A, and Beck L: Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals. *Cur. allergy asthma reports* 4, 276-284, 2004.
- 2) Holgate ST: The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol* 28, 248-251, 2007.
- 3) Ray R.J, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ: Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *Eur. J. Immunol* 26, 10-16, 1996.
- 4) Liu Y-J: Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 203, 269-273, 2006.
- 5) Soumelis V, *et al.*: Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunol.* 3, 673-680, 2002.
- 6) Ying S, *et al.*: Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting

- chemokines and disease severity. *J. Immunol.* 174, 8183–8190, 2005.
- 7) Yoo J, *et al.* : Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.* 202, 541–549, 2005.
- 8) He R, *et al.* : TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11875–11880, 2008.
- 9) Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ: A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J. Exp. Med.* 202, 829–839, 2005.
- 10) Harada M, *et al.* : Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 44, 787–793, 2011.
- 11) Segawa R, Hirasawa N: Exacerbation of allergic diseases by chemical s: roles of thymic stromal lymphopoietin. *J. Pharmacol. Sci.* 2015, in press
- 12) Satou N, *et al.* : Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *Int. Archs Allergy Immunol.* 157, 194–201, 2012.
- 13) Yamashita S, Segawa R, Satou N, Hiratsuka M, Leonard WJ, Hirasawa N: Induction of thymic stromal lymphopoietin production by nonanoic acid and exacerbation of allergic inflammation in mice *Allergol. Int.* 62, 463-371, 2013.