

尋常性乾癬における細胞膜を 介する情報伝達機構の研究

(研究課題番号：03670519)

平成5年度科学研究費補助金 一般研究C
—研究成果報告書—

平成6年2月

研究代表者 飯塚 一
(旭川医科大学医学部皮膚科)

尋常性乾癬における細胞膜を介する情報伝達機構の研究

課題番号 03670519

平成5年度科学研究費補助金 一般研究C 研究成果報告書

平成6年2月

研究代表者 飯塚 一

(旭川医科大学医学部皮膚科)

研究組織

研究代表者 飯塚 一 (旭川医科大学医学部教授)
筒井真人 (旭川医科大学医学部講師)
高橋英俊 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成3年度	700千円
4年度	700千円
5年度	600千円
計	2,000千円

研究発表

- 1) Iizuka, H., Asano, K., Ito, F., Tamura, T., Takahashi, H., Tsutsui, M.: Desensitization of the epidermal adenylate cyclase system: agonists and phorbol esters desensitize by independent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1093: 95-101, 1991
- 2) Iizuka, H., Tahahashi, H.: Glucocorticoid-induced regulation of β 2-adrenergic receptors in keratinocytes. *The Biology of the Epidermis* (eds. A. Ohkawara, J. McGuire) Elsevier 1992; pp97-105.
- 3) Iizuka, H., Takahashi, H.: Psoriasis, involucrin, and protein kinase C. *Int J Dermatol* 32: 333-338, 1993
- 4) Iizuka, H., Asaga, H., Koike, K., Iizuka, S.: Decreased Cu,Zn-superoxide dismutase activity in psoriatic hyperproliferative epidermis. *Eur J Dermatol* 3: 56-58, 1993
- 5) Takahashi, H., Iizuka, H.: Regulation of β 2-adrenergic receptors in keratinocytes: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA in foetal rat keratinizing epidermal cells. *Br J Dermatol* 124: 341-347, 1991
- 6) Takahashi, H., Iizuka, H.: Analysis of the 5'-upstream promoter region of human involucrin gene: activation by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Invest Dermatol* 100: 10-15, 1993
- 7) Kobayashi, T., Matsumoto, M., Iizuka, H., Suzuki, K., Taniguchi, N.: Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol* 124: 555-559, 1991
- 8) Kobayashi, T., Saito, N., Takemori, N., Iizuka, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., Iizuka, H.: Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin. *Acta Derm Venereol* 73: 41-45, 1993
- 9) Hashimoto, Y., Ohkuma, N., Iizuka, H.: Reduced superoxide dismutase activity in UVB-induced hyperproliferative pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 283: 317-320, 1991
- 10) Hashimoto, Y., Tsutsui, M., Iizuka, H.: Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: effects of tape stripping. *J Dermatol Sci* 4: 193-201, 1992
- 11) 飯塚 一: phospholipase A2 活性の上昇からみた乾癬 皮膚臨床 33: 1015-1023, 1991
- 12) 飯塚 一: 乾癬とアラキドン酸カスケード 日皮会誌 101: 1702-1706, 1991
- 13) 飯塚 一: 表皮細胞増殖とSOD 活性酸素フリーラジカル 3: 313-321, 1992
- 14) 飯塚 一: 表皮細胞の増殖制御: カルモジュリンとその展開 皮膚病診療 15: 1034-1038, 1993
- 15) 飯塚 一、高橋英俊: 表皮の β -アドレナリンアデニル酸シクラーゼ: グルココルチコイドによる制御 皮膚臨床 35: 1291-1296, 1993

研究成果目次

1. 研究目的とその成果のまとめ
2. Desensitization of the epidermal adenylate cyclase system: agonists and phorbol esters desensitize by independent mechanisms.
3. Glucocorticoid-induced regulation of β 2-adrenergic receptors in keratinocytes.
4. Psoriasis, involucrin, and protein kinase C.
5. Decreased Cu,Zn-superoxide dismutase activity in psoriatic hyperproliferative epidermis.
6. Regulation of β 2-adrenergic receptors in keratinocytes: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA in foetal rat keratinizing epidermal cells.
7. Analysis of the 5'-upstream promoter region of human involucrin gene: activation by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate.
8. Superoxide dismutase in psoriasis, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study.
9. Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin.
10. Reduced superoxide dismutase activity in UVB-induced hyperproliferative pig epidermis.
11. phospholipase A2 活性の上昇からみた乾癬
12. 表皮細胞増殖と S O D
13. 表皮細胞の増殖制御：カルモジュリンとその展開
14. 表皮の β -アドレナリンアデニル酸シクラーゼ：グルココルチコイドによる制御

研究目的とその成果のまとめ

I. 乾癬表皮における adenylylase の反応性の異常

乾癬皮膚部表皮においてはbeta-adrenergic adenylylaseの反応性の低下が認められる。一方、コレラ毒素処理やフォルスコリン処理によるcyclic AMP産生能は増加する。これらの所見はprotein kinase C活性化因子であるphorbol,12-myristate,13-acetate (PMA) 処理によっても、また、アゴニスト刺激により受容体特異的不応状態になった表皮においても認められる。ヒト表皮ではbeta-adrenergic adenylylase系が圧倒的に優位であり、2つのメカニズムの分別は、他の動物種における解析ほど効率が良くない。したがって、乾癬表皮におけるbeta-adrenergic adenylylaseの反応性低下機構の確定は今後の問題である。しかしながら、いくつかの状況証拠は、protein kinase C依存性の機序を示唆している。

II. グルココルチコイドによる beta-adrenergic adenylylase 応答の増強

glucocorticoidは乾癬に対し有効な薬剤であるが、表皮のbeta-adrenergic adenylylaseの反応性を増強させる働きがある。beta-adrenergic受容体には $\beta 1$ から $\beta 3$ までであるが、表皮に存在するものは $\beta 2$ タイプである。脂溶性ホルモンであるグルココルチコイドは、細胞膜を容易に通過した後、細胞質のglucocorticoid受容体と結合する。リガンドと結合したglucocorticoid受容体は核内へ移動し標的エンハンサーにはたらく。glucocorticoid受容体が認識するエンハンサーをglucocorticoid response element (GRE)とよぶ。beta2-adrenergic受容体遺伝子にはGREに相当する配列が複数個、存在することが知られており、いくつかの細胞系においてglucocorticoidによるbeta2-adrenergic受容体の誘導が報告されている。われわれはラット胎児表皮細胞由来のFRSK細胞を用いて、glucocorticoidによるbeta2-adrenergic受容体の誘導を証明した。beta2-adrenergic受容体の誘導はbeta-responseの増強作用と連動しており、beta2-adrenergic受容体の発現程度がcyclic AMP産生の律速になっていることを推定させる。グルココルチコイドによるbeta-adrenergic受容体の誘導はそれほど強いものではないが、beta-adrenergic adenylylaseの活性化に際してのepinephrineのED50濃度が高いことと、cyclic AMP-dependent protein kinase活性化に要するcyclic AMPレベルが低いという2つの理由により、グルココルチコイドによるbeta-adrenergic増強作用は、この程度であっても生理的な意味をもつものと考えられる。

III. インボルクリン遺伝子発現におよぼす PMAの作用

インボルクリンは表皮細胞のcornified cell envelopeの前駆タンパクの1つである。角化の最終段階で細胞膜に内側からはりつき、cornified cell envelopeの重要な構成成分となる。インボルクリンがcornified cell envelopeを作る際、架橋が形成されるが、その反応をつかさどる酵素をtransglutaminaseとよぶ。

乾癬病変部表皮においてはインボルクリンの過剰発現が報告されている。protein kinase C活性化因子であるPMAは表皮細胞にはたらし、ある細胞集団には増殖をひきおこし、別の細胞集団には急速な分化をひきおこす。これは乾癬の病態と、極めて近似しており、乾癬病変の形成におけるprotein kinase Cの関与が推定されている。protein kinase Cの活性化はJun/Fos heterodimerであるAP-1を介して複数の遺伝子の転写を誘導することが知られている。これらの遺伝子上流にはTRE (TPA response element)とよばれる共通配列があり、AP-1を結合する。インボルクリン遺伝子はすでにクローニングされているが、上流に数ヶ所TRE様配列がある。われわれはインボルクリン遺伝子の5'上流領域を約900 bp CAT vectorに接続し、FRSK細胞にtransfectする実験系を作成してインボルクリン遺伝子の発現を検討した。予想どおりPMAはprotein kinase C活性化を介し、AP-1依存性にインボルクリンの発現を引き起こすことが示された。transglutaminaseもPMAにより発現が誘導されることが知られており、われわれの結果は、cornified cell envelopeの形成過程においてprotein kinase Cの活性化が強く関与しているという仮説を支持するものであった。cornified cell

envelopeの形成は角化機構において優先順位が高く、ターンオーバーの亢進した乾癬表皮においてもその機構は強く保持されているものと推定される。グルココルチコイドは、いくつかの細胞系においてAP-1 依存性の遺伝子発現を阻害することが報告されているが、われわれの系においてもグルココルチコイドはインボルクリンの発現を抑制することが示された。

IV. 表皮細胞アデニル酸シクラーゼにおよぼすレチノイドの作用

レチノイドは乾癬治療に有効な薬剤である。すでに我々はレチノイドが豚皮膚の器官培養系においてbeta-adrenergic adenylate cyclase反応性の増強作用をきたすことを報告している。ラット胎児表皮細胞由来のFRSK 細胞を用いた系では、レチノイドは予想に反してbeta-adrenergic adenylate cyclase反応性の低下を引き起こすことが示された。この作用はthymidine取り込みの亢進と連動しておりbeta-adrenergic adenylate cyclaseの反応性と表皮細胞増殖の間には負の相関があることが推定される（豚表皮ではレチノイドは細胞増殖を低下させる）。従来からレチノイドは培養条件により、増殖亢進と低下の相反する作用を示すことが知られている。我々の結果はレチノイド作用を解析するにあたり、表皮細胞の増殖状態を常に念頭に置くべきことを示唆している。

V. 乾癬表皮におけるSOD活性

乾癬表皮においてはSOD活性の低下が認められる。これは主にCu,Zn-SOD活性の低下によるものでありMn-SOD活性はむしろ上昇している。免疫染色をおこなうと真皮乳頭に対応した表皮基底細胞層のCu,Zn-SODの染色性が低下している。乾癬では皮膚の血流が亢進しており、特に真皮乳頭部分は血管と表皮の距離が接近している。したがって、それにもなう酸素アクセスの上昇が活性酸素、過酸化水素の産生を引き起こし、過酸化水素感受性のCu,Zn-SOD活性が低下している可能性がある。表皮細胞は高酸素状態にその増殖能のピークを設定しているにもかかわらず、通常は嫌気的な条件下にある。乾癬においてみられる血流の亢進は、酸素環境からみると表皮細胞増殖に有利な条件を提供していることになり、SOD活性の変動はその意味からも注目される。

VI. 今後の課題

表皮細胞の情報伝達系を乾癬の病態との関連において検討してきたが、その過程でprotein kinase C依存性シグナルと乾癬において見られる情報伝達系の異常との類似が明らかになった。protein kinase C 依存性のbeta-adrenergic adenylate cyclase反応性の低下やインボルクリンの誘導はその代表的な例である。乾癬治療に用いられるグルココルチコイドがbeta-adrenergic adenylate cyclaseの反応性を上昇させ、インボルクリンの発現を抑えるという結果はprotein kinase C依存性反応の解析が乾癬の治療という面からも今後の重要な研究課題になりうることを示している。レチノイドの作用に関しては、表皮細胞の増殖状態がシグナル伝達系の変動に重要な意味を持つことが明らかになった。

われわれの研究結果は同時に表皮細胞にとってcornified cell envelopeの形成が極めて優先順位の高いシステムとして細胞増殖亢進時にも強く保持されていることを示すものである。インボルクリン-transglutaminaseを中心とするcornified cell envelope形成機構の解析はprotein kinase Cを軸として、さらに検討されるべきであろう。角化阻害剤としてのレチノイドの作用も、増殖との関連において検討すべきものと考えられる。protein kinase Cはいくつかのアイソザイムが知られており、特に、最近同定されたprotein kinase C η は表皮上層で特異的に発現し角化への関与が推定されている。われわれも角化におけるprotein kinase C η の関与をcornified cell envelope形成との関連のもとに検討を進める予定である。なお表皮細胞のcornified cell envelopeの前駆タンパクはインボルクリン以外にもloricrin, spr/cornifin など多数知られており、それらタンパクの発現機構の解析も今後の重要な研究課題と思われる。