

4000915

尋常性乾癬表皮における 細胞膜を介する情報伝達機構の研究

(研究課題番号：63570464)



平成2年度科学研究費補助金 一般研究C

研究成果報告書

平成3年3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)
 松尾 忍 (旭川医科大学医学部講師)
 筒井 真人 (旭川医科大学医学部助手)
 高橋 英俊 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

昭和63年度	1、600千円
平成元年度	300千円
2年度	300千円
計	2、200千円

研究発表

- 1) Iizuka, H., Matsuo, S., Tamura, T., and Ohkuma, N.: Increased Cholera Toxin-, and Forskolin-induced Cyclic AMP Accumulations in Psoriatic Involved Versus Uninvolved or Normal Human Epidermis. *J Invest Dermatol* 91:154-157, 1988
- 2) Iizuka, h., Sakai, H., and Tamura, T.: Effects of the Tumor Promoter, Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate, on the Epidermal Adenylate Cyclase-Regulation by Protein Kinase C. *J Invest Dermatol* 93:387-391, 1989
- 3) Iizuka, H., Sakai, H., and Kinouchi, M.: Epidermal adenylate cyclase system is regulated by diacylglycerol-protein kinase C signal, but not by calcium signal. *Br J Dermatol* 122:459-467, 1990
- 4) Matsuo, S. and Iizuka, H.: Cholera toxin- and forskolin-induced cyclic AMP accumulations of pig skin (epidermis). *J Dermatol Science* 1:7-14, 1990
- 5) Hashimoto, Y. Ohkuma, N. and Iizuka, H.: Effects of retinoids on DNA synthesis of pig epidermis. *J Dermatol Science* 1:303-310, 1990
- 6) Takahashi, H. Iizuka, H. and Katagiri, M.: No evidence for the mutation of ras gene in psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res* 282:8-11, 1990
- 7) Hirokawa, M. Hashimoto, Y. Ohkuma, N. Mizumoto, T. and Iizuka, H.: Reversible Inhibition of Keratinocyte Thymidine Incorporation by the Calmodulin Antagonist, W-7. *J Dermatol* 7:403-408, 1990
- 8) Takahashi, H. Tamura, T. Tsutsui, M. and Iizuka, H.: Adenylate Cyclase System in Fetal Rat Keratinizing Epidermal Cells (FRSK Cells) and SV40-transformed Human Keratinocytes. *J Dermatol* 8:457- 464, 1990
- 9) Takahashi, H. Miyokawa, N. Katagiri, M. and Iizuka, H.: Expression of guanine nucleotide binding proteins, Gs and Gi, in mRNAs in epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 282:392-396 1990
- 10) Tsutsui, M. and Iizuka, H.: Inhibitory guanine nucleotide binding protein in pig epidermis: regulation of epidermal adenylate cyclase

Arch Dermatol Res 282:469-474 1990

- 11) 飯塚 一.: 表皮細胞における情報伝達系—レセプターの相互関係— 日本臨牀 47:887-892 1989
- 12) 飯塚 一.: 乾癬表皮における cyclic AMP 系の異常—表皮細胞増殖制御因子としての cyclic AMP— 皮膚病診療 11:1014-1018 1989
- 13) 飯塚 一.: 乾癬の病因に関する最近の話題 生化学的観点から—乾癬表皮における情報伝達系の異常 現代皮膚科学大系 年刊版' 90-A:195-204, 1990
- 14) 飯塚 一.: 表皮細胞増殖制御因子 (オートクリンとパラクリン) 医学のあゆみ 156:503-505 1991

研究成果目次

1. 研究目的とその成果のまとめ
2. Increased Cholera Toxin-, and Forskolin-induced Cyclic AMP Accumulations in Psoriatic Involved Versus Uninvolved or Normal Human Epidermis.
3. Effects of the Tumor Promoter, Phorbol 12-Myristate,13-Acetate, on the Epidermal Adenylate Cyclase-Regulation by Protein Kinase C.
4. Epidermal adenylate cyclase system is regulated by diacylglycerol-protein kinase C signal, but not by calcium signal.
5. Cholera toxin- and forskolin-induced cyclic AMP accumulations of pig skin (epidermis).
6. Effects of retinoids on DNA synthesis of pig epidermis.
7. No evidence for the mutation of ras gene in psoriatic epidermis.
8. Reversible Inhibition of Keratinocyte Thymidine Incorporation by the Calmodulin Antagonist, W-7.
9. Adenylate Cyclase System in Fetal Rat Keratinizing Epidermal Cells (FRSK Cells) and SV40-transformed Human Keratinocytes.
10. Expression of guanine nucleotide binding proteins, Gs and Gi, in mRNAs in epidermal keratinocytes.
11. Inhibitory guanine nucleotide binding protein in pig epidermis: regulation of epidermal adenylate cyclase.
12. 表皮細胞における情報伝達系—レセプターの相互関係—
13. 乾癬表皮における cyclic AMP 系の異常—表皮細胞増殖制御因子としての cyclic AMP—
14. 乾癬の病因に関する最近の話題 生化学的観点から—乾癬表皮における情報伝達系の異常
15. 表皮細胞増殖制御因子 (オートクリンとパラクリン)

研究目的とその成果のまとめ

I. 乾癬表皮におけるadenylate cyclaseの異常

adenylate cyclaseは膜に存在する酵素であるが、通常は非活性の状態にある。生理的なagonistは受容体(R)に結合し、そのシグナルはGTP結合蛋白質(G蛋白質)を介してadenylate cyclaseに伝わる。G蛋白質には、adenylate cyclaseに対して刺激性に働くもの(stimulatory G(G_s))と抑制的に働くもの(inhibitory G(G_i))とがある。各々、対応する受容体が想定されるが(R_s , R_i), 表皮には、現時点で R_s のみが認められている。

ヒト表皮において R_s として β_2 -adrenergic-, prostaglandin E-, adenosine-, histamine (H_2) -の4つの独立した受容体系がある。このうち β_2 -adrenergic系が最も優位な受容体系であるが、乾癬表皮においては、本受容体系の反応性の著しい低下が認められる。(prostaglandin E系も乾癬表皮において低下が認められるが、 β_2 -adrenergic系とくらべ、cyclic AMPの産生能力は、はるかに弱い。)

β_2 -adrenergic adenylylase系の反応性の低下は系としてみた場合、受容体、 G_s ないし G_i , adenylylase本体といった各々のcomponentの異常、ないし、これらのcomponent間のuncouplingのいずれによっても説明されうる。

コレラ毒素は G_s の α subunitをADPリボシル化することによって、 G_s の活性化状態を持続させる。フォルスコリンはadenylate cyclaseの本体に働いてcyclic AMPを産生する。従ってこれら2つの薬剤を用いて G_s からadenylate cyclaseまでのいわば後半の反応を解析することができる。

尋常性乾癬表皮では、コレラ毒素およびフォルスコリンによるcyclic AMP産生作用は無疹部ないし正常表皮とくらべ、亢進していることが、我々の研究により明らかになった。このことは乾癬表皮における β -adrenergic adenylylaseの反応性の低下が、受容体そのものか、受容体と G_s のuncouplingによるものかのいずれかであることを示唆するものである。

G_s 以降の反応性の上昇の意味については、現時点では不明であるが、後述するようにtumor promoterであるPMA (phorbol 12 myristate 13 acetate) 処理によっても、同様な反応パターンを得ることができる。

II. PMA 処理表皮と乾癬表皮の類似性

tumor promoterであるPMAを表皮に塗ると表皮の増殖がおこることが知られている。PMAのadenylate cyclaseに対する作用については、受容体とGsとの間のuncouplingによる機構が想定されていたが、GS以降の反応性の解析はなされていなかった。

豚表皮をPMA処理すると、 β -adrenergic系を含めた受容体adenylate cyclaseの反応性の低下が認められる。一方、コレラ毒素、フォルスコリンによるcyclic AMP上昇作用はむしろ亢進していることが我々の研究により明らかとなった。

これは乾癬表皮におけるadenylate cyclaseの反応性パターンと全く同一である。従来からPMAはprotein kinase Cを介してその作用をあらわすものと推定されている。protein kinase Cに対する生理的な刺激因子はdiacylglycerol (DAG)である。膜通過型のDAGアナログである1-oleoyl 2-acetyl glycerol (OAG)を表皮に処理するとPMA処理表皮と同様のadenylate cyclaseに対する反応性の変動が認められる。またprotein kinase C阻害剤であるH-7処理によりこれらの作用は抑制される。従って、PMAないしOAGの作用はprotein kinase Cを介して働くものと考えられる。

diacylglycerolの生理的な産生は、イノシトールリン脂質にphospholipase Cが働いて引き起こされるものと考えられている。この系路はDAGのほか、IP₃が産生されることが分かっており、後者は細胞内Ca²⁺濃度の上昇をひき起こすシグナルとして働く。

我々は細胞内、細胞外Ca²⁺濃度を動かすことにより、表皮adenylate cyclase系の反応性の変動を調べたが、受容体を介する刺激、コレラ毒素作用、フォルスコリン作用、いずれも変動は認められなかった。

従って表皮adenylate cyclaseはdiacylglycerol-protein kinase Cシグナルにより制御されているが、Ca²⁺シグナルは作用を有さないことがわかる。

Ⅲ. 表皮におけるG蛋白質の存在

G蛋白質は adenylylase を含めた膜の情報伝達系において、ちょうどtransducerのような働きをしている。adenylylase系については、GsとGiの2種類が知られているが、その存在については、表皮では、コレラ毒素によるadenylylaseの活性化のような、間接的証明しかなされていなかった。

我々はコレラ毒素、および百日咳毒素によるADP ribosyl化反応を用いてG蛋白質の存在証明を試みた。前者はGsの、後者はGiの α subunitをADP ribosyl化する因子である。この方法により表皮におけるGs, Giの存在証明がなされ、特に百日咳毒素によるadenylylaseの反応性の変動も証明された。これは表皮においてもGiが機能していることを示すものである。ただし、Giに対応するRiの証明は現時点でなされていない。今後、この未知のRiの検索が要求される。

PMA処理後も、百日咳毒素処理により adenylylase の反応性の変動が認められる。従って、PMAによるGiの変動がadenylylaseの反応性の変動の機序と考えるのは、現時点では否定的である。

G蛋白質の α subunitについては、すでにいくつかの施設によりクローニングがなされている。Gsは1種類の、Giは3種類の遺伝子が存在し、Gsについてはalternative splicingにより、いくつかのGs蛋白が作られる。

我々は、東大医科研の上代研究室から供与をうけたGsとGiに対するcDNAを用いて表皮におけるG蛋白質のノーザン解析を行った。その結果、表皮には、GsとGi2、Gi3の α subunitが存在していることが示された。Gi1- α 、Go- α は存在していない。

tape strippingやUVB照射により、表皮細胞増殖がひきおこされることが知られている。この状態でのG蛋白質のmRNAの発現を検討したところ、Gs Gi2、Gi3のいずれも上昇が認められた。しかしながらアクテンmRNAの上昇も付随して認められており、G蛋白質に特異的なものではないようである。

IV. R A S との関係

癌遺伝子産物の1つであるR A S蛋白質は、細胞膜上に発現し、各種情報伝達系に影響を及ぼしていることが報告されている。

乾癬表皮においてはR A Sの発現の上昇が推定されている。R A Sはpoint mutationにより活性化がかかることも分かっているため、P C R法を用いて乾癬表皮のras遺伝子のpoint mutationの有無を調べたが、全例、point mutationについては陰性の結果であった。従って、乾癬表皮においてはR A Sの過剰発現は起こっているかもしれないが発現しているR A Sそのものには異常はないものと推定される。

R A Sは細胞増殖、分化などに影響を及ぼすものと推定されるが、乾癬表皮における役割りについては、今後の課題であろう。

V. 今後の課題

乾癬表皮におけるadenylate cyclaseの反応性の変動は、protein kinase Cを介しているものと推定される。protein kinase Cはdiacylglycerol (D A G) Ca^{2+} , P S (phosphatidyl serine) により、活性化をうける蛋白リン酸化酵素として見出されるものであり、通常のprotein kinase Cは高濃度 Ca^{2+} により、たとえD A Gがなくても活性化をうけることが分かっている。にもかかわらず、表皮のadenylate cyclaseはD A Gによっては作用をうけるが、 Ca^{2+} によっては影響を受けない。

最近protein kinase Cにはいくつかの分子種があることが知られるようになった。この中でnovel protein kinase Cと総称される一群のprotein kinase Cは Ca^{2+} 感受性を有さないことがわかっている。

表皮におけるprotein kinase Cについて、最近、黒木らのグループはP K C η という新しいprotein kinase Cを同定した。本酵素は Ca^{2+} 感受性を有さないことが推定されており、adenylate cyclaseの反応性からみた我々のデータを説明するものとして極めて興味がある。

今後、表皮におけるprotein kinase Cの基質を含めた検討が必要であろう。乾癬表皮における細胞膜を介する情報伝達系の異常は、その過程で明らかになっていくものと思われる。