

# 接触皮膚炎への p38 mitogen-activated protein kinase の関与機構の解明

千葉大学大学院 医学研究院分子生体制御学

粕谷 善俊

To elucidate the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38) in the pathogenesis of inflammation, a mouse contact hypersensitivity (CHS) model induced by 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) was used. Ear swelling was induced by challenge with DNFB, accompanied by infiltration of mononuclear cells, neutrophils and eosinophils, and a marked increase in mRNA levels of cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , IL-18 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in the challenged ear skin. Both ear swelling and the number of infiltrated cells in DNFB-challenged ear skin were significantly inhibited by treatment with SB202190, a p38 inhibitor. Furthermore, the DNFB-induced expression of all cytokines except IL-4 was significantly inhibited by treatment with SB202190. Ribonuclease protection assay revealed that the mRNA levels of chemokines such as IP-10 and MCP-1 in ear skin were markedly increased at 24 h after challenge with DNFB. The induction of these chemokines was significantly inhibited by treatment with SB202190. In p38 $\alpha$  +/- mice, both ear swelling and infiltration of cells induced by DNFB were reduced compared with those in wild-type mice. However, induction of cytokines by DNFB was also observed in p38 $\alpha$  +/- mice, although the induction of IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-18 was typically reduced compared with that in wild-type mice. Challenge with DNFB slightly induced IP-10 and MCP-1 mRNA in p38 $\alpha$  +/- mice, with weaker signals than those in SB202190-treated wild-type mice. These results suggest that p38 plays a key role in CHS and is an important target for the treatment of CHS.

## 1. 緒言

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーは、細胞外からの刺激を核内の転写機構制御にまで変換・伝達するリン酸化酵素群であり、細胞の増殖、分化、形質転換、生存、アポトーシス等の様々な生物現象において中心的役割を演ずる重要な酵素である。哺乳類における MAPKs は Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK (p38) の3つに分類することができる。

p38 は特にサイトカイン、UV 等の細胞外ストレスにより活性化されるとともに、サイトカインの産生にも積極的に関与している<sup>1)</sup>。したがって、炎症を伴う病態伸展に密接に関与すると考えられ、p38 をターゲットとしたサイトカイン抑制が炎症性疾患治療の良好な strategy になることを示唆している。一方、p38 阻害剤の適用は場合によっては一部のサイトカインの産生をむしろ上げるという報告もあり、p38 をターゲットとすることに異論を唱える説も登場している<sup>2)</sup>。これらの議論があるにもかかわらず、現時点では、炎症性病態伸展への p38 の関与様式を個体レベルで証明した研究はほとんど存在しないとともに、炎症性皮膚疾患に関連した研究報告は存在しない。

そこで我々は、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) によるマウス接触皮膚炎 (Contact Hypersensitivity: CHS) モデルを用い、p38 阻害剤の効果を検討するとともに p38 $\alpha$  ノックアウトマウス (ヘテロ接合体; ホモ接合体は胎生致死<sup>3)</sup>) の DNFB による接触皮膚炎誘導に対する応答を検討し、p38 の接触皮膚炎への関与機構を分子レベルで解明し、p38 阻害剤の適用法を含めた新たな治療法の開発を目的とした。

## 2. 実験

### 2.1 実験動物

C57BL/6J 雄マウスを p38 $\alpha$  遺伝子ヘテロ接合体雌マウスとかけ合わせ、p38 $\alpha$  遺伝子ヘテロ接合体マウス (p38 $\alpha$  +/-) と野生型マウス (Wt: p38 $\alpha$  +/+) を得た。F6 世代以降の雌マウスを実験に用いた。Genotyping に用いた3種の PCR プライマーと条件は以下の通り: A, 5'-CCCTATACTCCCTCTCTGTGTAACCTTTTG-3'; B, 5'-CCCAAACCCAGAAAGAAATGATG-3'; and C, 5'-TTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTG-3': 94 (30 秒), 55 (30 秒), 72 (1 分) で35 サイクル / 800-bp および 450-bp の PCR 産物をそれぞれ変異および野生型アリアルとして認識した。

### 2.2 接触皮膚炎モデル

0.5% DNFB (in acetone/olive oil (A/O) soln.) 100  $\mu$ l をマウス・8週令雌の背部に塗布 (感作) し、5日後、20  $\mu$ l の同液を耳介部に塗布した (惹起)。耳介腫脹と組織変化を経時的に計測・観察した。対照実験として、同様に感作したマウス耳介部に DNFB を含まない A/O soln. を 20  $\mu$ l 塗布した。p38 阻害剤: SB202190 は、惹起 30 分前に 10<sup>-5</sup> M を 25  $\mu$ l 塗布した。



Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Contact Hypersensitivity.

Yoshitoshi Kasuya

Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Graduate School of Medicine, Chiba University

## 2.3 形態学的検討

耳介部のパラフィン包埋切片（3 $\mu$ m）を作製しヘマトキシリン-エオジン（HE）染色後、高倍率下で組織浸潤炎症細胞を確認した。

## 2.4 局所サイトカイン mRNA 発現量の検討

耳介部より total RNA を調製し、各 2  $\mu$ g の total RNA を RT-PCR に供し、各種サイトカインの発現量を確認した。各サイトカインの検出用プライマー、アニーリング温度、サイクル数は Table 1 に記載した。

## 2.5 RNase protection assay による局所ケモカイン発現量の検討

マウス LTN、RANTES、eotaxin、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 $\alpha$ 、1 $\beta$ &2、IFN- $\gamma$  inducible protein (IP) -10、monocyte chemoattractant protein (MCP) -1、TCA-3 とハウスキープイングゼンである L32 (ribosomal RNA) および GAPDH に対するマルチプローブテンプレート (mCK-5/BD Pharmingen) を用いた RNase protection assay に、耳介部より調製した total RNA 各 10  $\mu$ g を供した。

## 2.6 リンパ球の皮下移植実験

感作した Wt および p38 $\alpha$ +/- マウスの所属リンパ節よりリンパ球をそれぞれ調製し、2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells in 20  $\mu$ l PBS の懸濁液を未感作の Wt マウス耳介部の表皮下にインジェクションし、そこに 2020  $\mu$ l の 0.5% DNFB (in A/O soln.) または A/O soln. を塗布して 24 時間後の耳介腫脹を観察した。対照実験として、細胞を含まない in 20  $\mu$ l PBS を、未感作の Wt マウス耳介部の表皮下にインジェクションし、20  $\mu$ l の 0.5% DNFB (in A/O soln.) を塗布した。

## 3. 結果

### 3.1 DNFB による CHS に対する p38 阻害剤の効果

DNFB は経時的に耳介腫脹を誘導した。p38 阻害剤である SB202190 の投与はこの耳介腫脹を有意に抑制した (Fig. 1)。また、その組織所見から、SB202190 の投与は、DNFB による炎症細胞の組織内浸潤と表皮細胞間浮腫を抑制した (Fig. 2)。惹起 24 時間後の浸潤細胞の構成は、リンパ球を主体とした単核球細胞が主であるが、好中球および好酸球も確認され、これら細胞の浸潤数も SB202190 の投与により抑制された (Fig. 3)。

### 3.2 局所サイトカイン発現量に対する p38 阻害剤の効果

惹起前にはほとんど検出されない耳介部のサイトカイン mRNA レベルが、DNFB による惹起によって時間依存的に一律誘導された。また、SB202190 の投与は IL-4 を除くサイトカイン (IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-5、IL-1 $\beta$ 、IL-18 および

Table 1 : Primer sequence, annealing temperature (A. temp), number of cycles (Cycle#) and size of PCR product used for detection of each cytokine.

Gene		Sequence (5' to 3')	A. temp.	Cycle#	Size
IL-2	Sense	CAAGCTCTACAGCGGAAG	58°C	33	370bp
	Antisense	TCCACCACAGTTGCTGAC			
IFN- $\gamma$	Sense	ATCCTTGGACCCTCTGACT	60°C	33	529bp
	Antisense	CGACTCCTTTTCGCTTCCT			
IL-4	Sense	ACGGCACAGAGCTATTGATG	60°C	35	454bp
	Antisense	ATGGTGGCTCAGTACTACGA			
IL-5	Sense	ATGTCCTGTAGTCAGTTAAACC	60°C	33	733bp
	Antisense	AAGTTCAGTTACACGGAGAAGT			
IL1- $\beta$	Sense	TGGCAGCTACCTGTGTCTTT	60°C	35	525bp
	Antisense	AGGCTTGTGCTCTGCTTGTG			
TNF- $\alpha$	Sense	CCTCCCTCTCATCAGTTCTATG	60°C	35	992bp
	Antisense	ACACCCATTCCCTTCACAGA			
IL-18	Sense	ACTGTACAACCGAGTAATACGG	60°C	33	319bp
	Antisense	TCCATCTTGTGTGCTCTGG			
GAPDH	Sense	AATGTATCCGTTGTGGATCT	60°C	25	262bp
	Antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

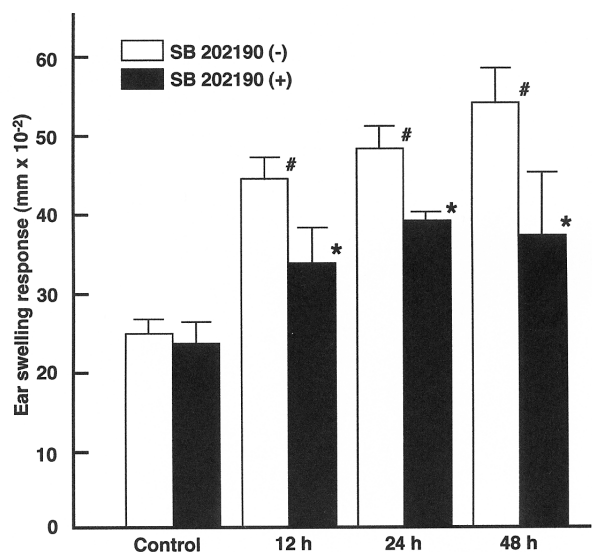


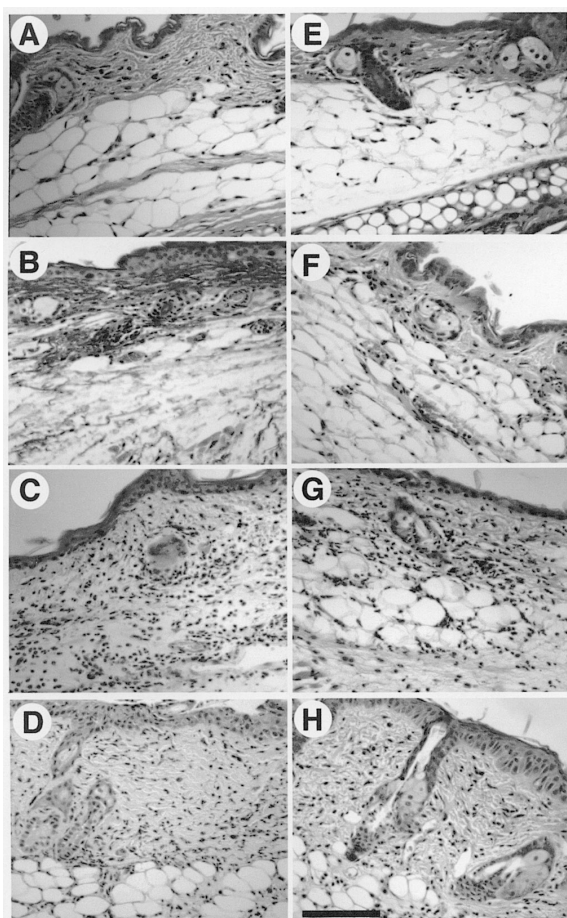
Fig. 1: Effect of SB202190 on time-dependent ear swelling response of mice after DNFB challenge. Mice were contact sensitized for 5 days with 0.5% DNFB and thereafter challenged. Before challenge (control) and 12, 24 and 48 h afterward, the thickness of the ears was measured (SB202190 (-); open bars, SB202190 (+); closed bars). SB202190 was topically applied to sensitized mice 30 min prior to challenge. Data presented are mean  $\pm$  SD of 12-18 mice. #Significantly different from control with P < 0.01 (ANOVA with Bonferroni method). \*Significantly different from SB202190-untreated value for each time period (P < 0.05, ANOVA with Bonferroni method).

TNF- $\alpha$ ) の DNFB による発現誘導を有意に抑制した (Fig. 4)。

### 3.3 p38 $\alpha$ +/- を用いた CHS の検討

Wt に比して p38 $\alpha$  +/- では、DNFB による惹起 24 時間後の耳介腫脹、単核球細胞等の組織内浸潤が有意に抑えら



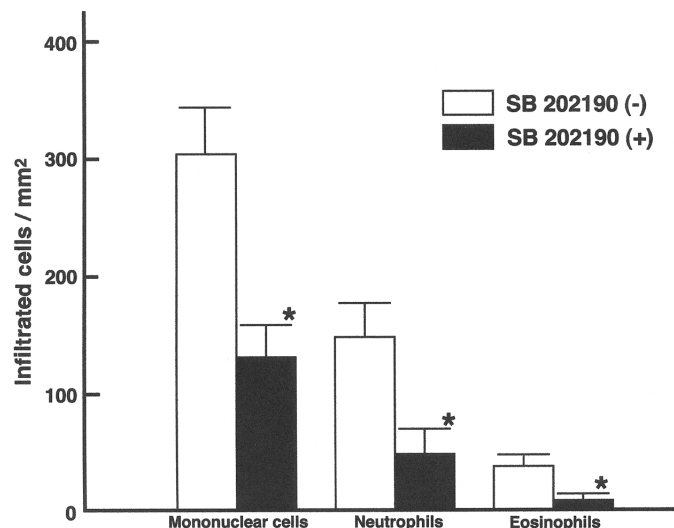


**Fig. 2: Effect of SB202190 on time-dependent histopathological findings of CHS induced by DNFB.**  
Histological features of CHS ear skin reaction were observed in control (A and E) mice, and mice at 12 h (B and F), 24 h (C and G), and 48 h (D and H) after challenge. Time-dependent severe infiltration and hyperplasia observed in the challenged ear skin (B-D) were apparently reduced in SB202190-treated mice (F-H). Mouse ear sections were stained with hematoxylin and eosin. Bar represents 200  $\mu$ m. Similar results were confirmed in eight independent experiments.

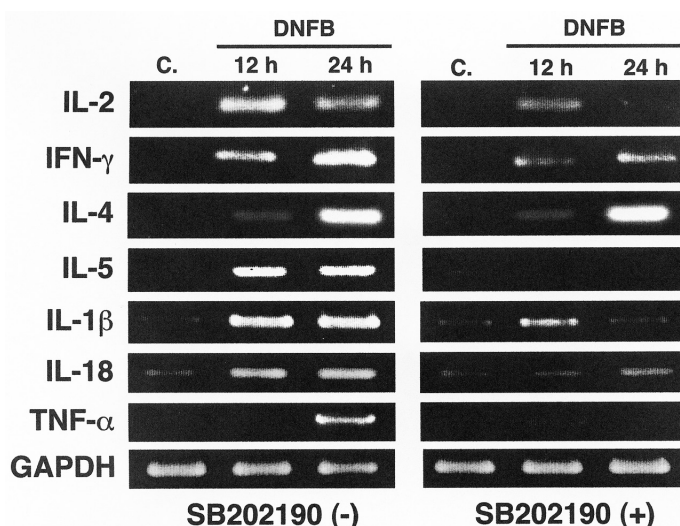
れていた。また、耳介部のサイトカイン mRNA レベルの DNFB による誘導は、IFN- $\gamma$ 、IL-5 および IL-18 は p38 $\alpha$  +/- では抑えられているものの、他のサイトカインは Wt とほぼ同等であった (Fig. 5)。

### 3.4 局所ケモカイン発現量の検討

DNFB による惹起 24 時間後の耳介部のケモカイン mRNA 発現誘導と SB202190 投与の効果、および p38 $\alpha$  +/- でのケモカインの挙動を検討した。Wt においてはコントロールレベルでは、MIP-1 $\beta$  および MIP-1 $\alpha$  mRNA の微弱な発現と MIP-2 mRNA の強い発現が認められるが、DNFB による惹起によって付加的に IP-10 および MCP-1 mRNA の強い発現誘導が確認された。この典型的な IP-10 および MCP-1 の発現誘導が SB202190 投与によって有意に抑えられた。一方 p38 $\alpha$  +/- では、Wt および SB202190 投与群のコントロールレベルで認められた



**Fig. 3: Effect of SB202190 on cellular distribution of 24 h-challenged skin.**  
Bars represent number of mononuclear cells, neutrophils, and eosinophils that infiltrated the challenged skin of SB202190-untreated mice (open bars) and SB202190-treated mice (closed bars). Data presented are mean  $\pm$  SD of 12 mice. \*Significantly different from SB202190-untreated values with  $P < 0.01$  (Student's t-test for unpaired values).

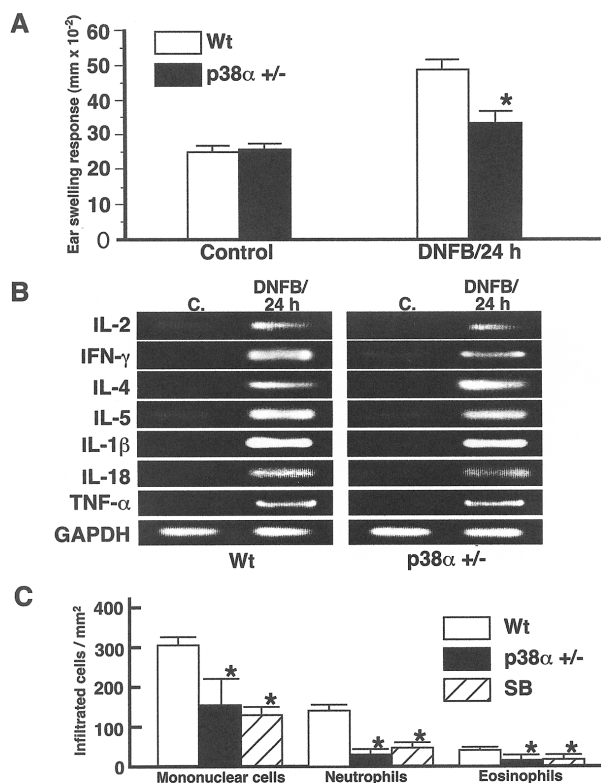


**Fig. 4: Effect of SB202190 on expression of cytokine mRNA in DNFB-challenged ear skin.**  
Total RNA was prepared from the ear of control mice, and challenged mice with or without SB202190 treatment at various times (12 and 24 h) after challenge. RT-PCR was performed under the experimental conditions defined in Table I. PCR product samples were subjected to 1.2% agarose gel electrophoresis and visualized by staining with ethidium bromide. Left and right panels represent the data in SB202190-untreated mice and SB202190-treated mice, respectively. Similar results were confirmed in three independent experiments.

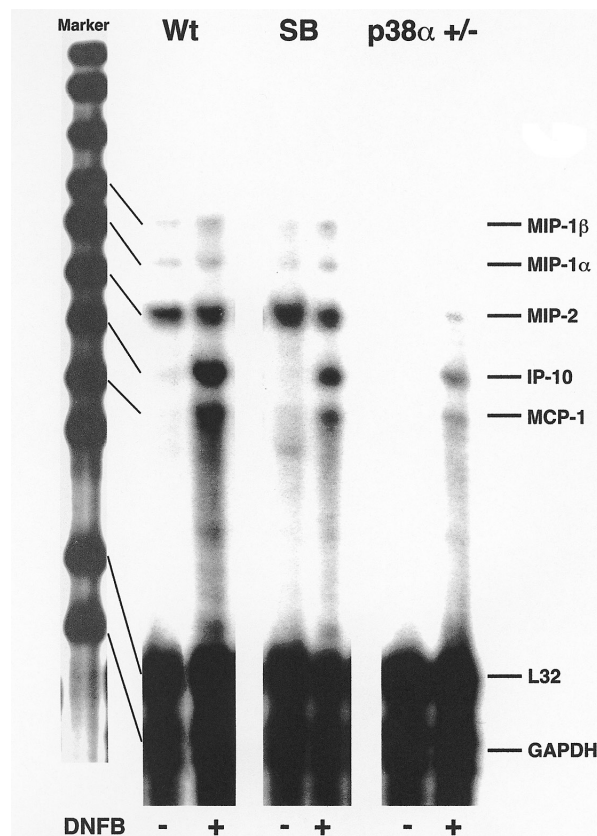
MIP-1 $\beta$ 、MIP-1 $\alpha$  および MIP-2 mRNA がほとんど認められず、DNFB による惹起によって誘導される IP-10 および MCP-1 mRNA の発現も微弱であった (Fig. 6)。

### 3.5 p38 $\alpha$ +/- の CHS 抵抗性機構の検討

p38 $\alpha$  +/- の CHS 抵抗性獲得は感作段階か否かを、移植実験により検討した。未感作 Wt 耳介部への DNFB 塗布は CHS を誘導しないが、感作した Wt および p38 $\alpha$  +/- から調製したリンパ球の未感作 Wt 耳介部への移植は、いずれの場合も DNFB 塗布によって CHS を誘導した。また、



**Fig. 5: Change of 24 h CHS ear skin reaction in p38α +/- mice.** (A). DNFB-induced ear swelling response in p38α +/- mice (closed bars) and Wt littermates (open bars). Data presented are mean ± SD of 8–10 mice. \*Significantly different from value for Wt with  $P < 0.01$  (Student's t-test for unpaired values). (B). Expression of cytokine mRNA in DNFB-challenged ear skin of p38α +/- mice (right panel) and Wt littermates (left panel). Total RNA was prepared from control and challenged (24 h) ears of p38α +/- mice and Wt littermates and subjected to RT-PCR. Similar results were confirmed in three independent experiments. (C). Cellular distribution of challenged ear skin of p38α +/- mice (closed bars) and Wt littermates (SB202190-untreated: open bars and SB202190-treated: hatched bars). Data presented are mean ± SD of 6 mice. \*Significantly different from SB202190-untreated Wt value ( $P < 0.01$ , ANOVA with Bonferroni method).



**Fig. 6: Expression of chemokine mRNA in DNFB-challenged ear skin.** Total RNA was prepared from control (-) ears and challenged (24 h: +) ears of p38α +/- mice (right column) and Wt littermates with (middle column) or without (left column) SB202190 treatment. RNA samples were subjected to RNase protection assay followed by electrophoresis and radioautography. Undigested labeled <sup>32</sup>P probes were used as markers, and bands were matched to chemokines based on the predicted digested length. Similar results were confirmed in three independent experiments.

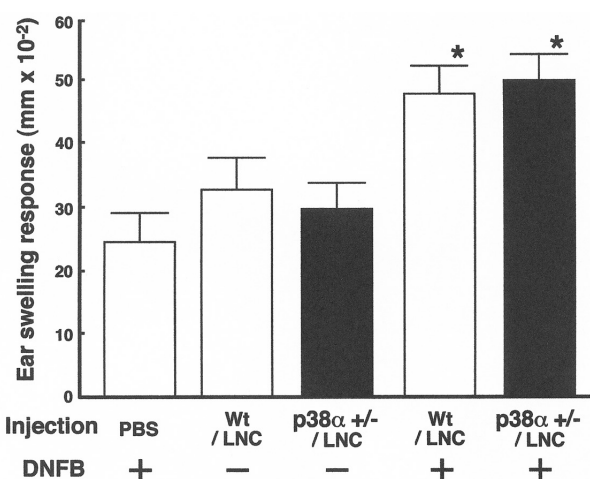
リンパ球の耳介部への移植後、DNFB-free A/O soln. の塗布では CHS は誘導されなかった (Fig. 7)。

#### 4. 考 察

本研究から、p38 が CHS の発症に密接に関与することが示唆され、p38 阻害剤が、経皮的投与という簡便な投与方法で CHS に治療効果を発揮する可能性が示された。

#### p38 アイソフォームの関与様式

p38 の関与様式としては、少なくとも局所におけるサイトカイン—ケモカインネットワークの産生制御を介して CHS の成立に寄与していると考えられた。p38 には、α、β、γ、δ の 4 つのアイソフォームの存在が知られている。このうち、様々な種類の細胞に広汎に存在するのは α および β であり、p38 阻害剤が効果を発揮する対象も α および β である。したがって、本研究で示された、p38 阻害剤の CHS の病態進展に対する抑制効果および p38α +/- では CHS 発症が抑えられることを考慮すると、p38 の 4 つのアイソフォームのうち、少なくとも α が中心的な役割を演じていることが考えられた。



**Fig. 7: LNC from sensitized p38α +/- mice could induce CHS in Wt mice.** LNC ( $2 \times 10^5$  cells per 20 μl PBS) from the sensitized p38α +/- mice (closed column) or Wt littermates (open column) were subcutaneously injected into the ears of naive Wt mice. The mice were immediately challenged by applying 20 μl of 0.5% DNFB in A/O solution or 20 μl of A/O solution alone on the ear. As a negative control, 20 μl cell-free PBS was subcutaneously injected into the ears of naive Wt mice and immediately challenged with 0.5% DNFB (N.C., shaded column). Data presented are mean ± SD of 4 mice. \*Significantly different from value for N.C. ( $P < 0.01$ , ANOVA with Bonferroni method).



### p38 の時間的・空間的関与機構

CHS の発症には、感作段階、惹起段階の 2 つのステップを経るが、少なくとも p38 阻害剤を用いた実験では、すでに感作したマウスに DNFB による惹起直前に p38 阻害剤を投与しているため、惹起段階での p38 の関与が明らかである。そこで、p38 $\alpha$  +/- において「はたして正常に感作が成されるか」をリンパ球の移植実験により検討した。感作した p38 $\alpha$  +/- の所属リンパ節から調製したリンパ球の未感作 (naive) Wt への移植によって、移植耳介部位への DNFB の塗布で耳介部腫脹を誘導できた。この事実は、p38 $\alpha$  +/- においても正常に感作されうることを示している。したがって、CHS における p38 の関与の時間的特性としては、感作段階よりもむしろ惹起段階にあると結論できる。次に、p38 の空間的関与機構については、DNFB による惹起 24 時間後の組織に浸潤した CD4 陽性細胞を回収・純化し、RT-PCR により Th1 サイトカインである IL-2 と IFN- $\gamma$ 、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-5 の発現を確認することで検討を加えた。p38 阻害剤を投与した Wt における浸潤 CD4 陽性細胞のサイトカイン産生能は、p38 阻害剤未投与の Wt のそれと同等であった。一方、p38 $\alpha$  +/- における浸潤 CD4 陽性細胞のサイトカイン産生能は IFN- $\gamma$  および IL-5 で低下が見られた (データは示さず：本研究結果の報告論文 4) 参照)。p38 $\alpha$  +/- における浸潤 CD4 陽性細胞の IFN- $\gamma$  および IL-5 の産生低下は、CHS 病変部におけるサイトカイン低下のプロファイルと相関していたことから、p38 $\alpha$  +/- では、細胞内の p38 の内活量の低下が一部のサイトカインおよびケモカインの産生抑制に直接的に寄与している可能性が考えられた。一方、p38 阻害剤による局所サイトカイン—ケモカインネットワークの産生制御は、浸潤細胞自体の p38 の内活量に影響することなく、少なくとも浸潤炎症細胞数の抑制を介して寄与することが示唆された。しかし、p38 阻害剤投与による CHS 病変部におけるサイトカイン低下はかなり顕著であったことから、p38 阻害剤は表皮構成細胞でのサイトカイン産生を付加的に抑えることも考えられた。

### p38 阻害剤の治療応用の今後の課題

p38 阻害剤の治療応用上の 1 つの問題点は、その特異性

にある。p38 阻害剤は、高濃度用いると異なるタイプの MAPK である JNK も阻害する<sup>5)</sup>。JNK は p38 と共有する上流のキナーゼ (MAPK Kinase Kinase) を有しており、p38 が活性化する細胞環境下では往々にして JNK も並行して活性化する。本研究の CHS モデルにおいても、p38 とほぼ同じ時間経過で JNK は活性化していた。しかしながら、本研究で用いた p38 阻害剤の投与方法・投与量では、p38 を特異的に阻害し JNK の活性には何ら影響しないことを確認している (未発表データ)。JNK が CHS にどのように関与しているかは今のところ不明であるが、治療応用を考慮する上で p38 阻害剤の JNK への影響を無視することはできない。次に、本研究において p38 阻害剤は惹起段階の直前に投与したが、惹起後の p38 阻害剤投与による効果の検討が、実用性を考える上で重要となる。また、ステロイド剤の繰り返し投与で確認されるような病変増悪効果が、はたして p38 阻害剤では成立しないか否かも今後の課題として検討が必要となる。

### 参考文献

- 1) Rincón, M., Enslen, H., Raingeaud, J., et al. : Interferon- $\gamma$  expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.*, 17, 2817-2829, 1998.
- 2) van den Blink, B., Juffermans, N.P., ten Hove, et al. : p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.*, 166, 582-587, 2001.
- 3) Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, et al. : Requirement for p38 $\alpha$  in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, 102, 221-231, 2000.
- 4) Takanami-Ohnishi, Y., Amano, S., Kimura, S., et al. : Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in contact hypersensitivity. *J. Biol. Chem.*, 277, 37896-37903, 2002.
- 5) Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., et al. : Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 751-763, 1999.