

炎症性皮膚疾患におけるストレス応答性キナーゼ ASK1 の機能解析

東京大学大学院薬学系研究科

一條 秀憲、水上 潤哉

The skin provides a first line of defense against various physicochemical and biological stresses such as wound and microbial pathogens and induces inflammatory response. The adaptive responses to these stresses are essential for the maintenance of homeostasis and dependent on the stress recognition mechanism and intracellular signaling systems. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is activated in response to various stimuli such as oxidative stress and a mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) family member that activates both the p38 and JNK signaling cascades. Recent studies revealed that ASK1 is required for the production of inflammatory cytokines and migration of macrophages and induces apoptosis of keratinocytes in the skin.

Contact hypersensitivity (CHS) is a form of delayed-type hypersensitivity, an immune response to a variety of reactive contact sensitizers, such as metals, preservatives, and hair dyes. Whereas the sensitization phase of CHS has been focused on as a model for investigating T-cell-dependent immune response by immunologists, the elicitation phase in which allergic contact dermatitis is clinically manifested has received much attention from clinicians. Even in the mouse model of CHS, however, it is difficult to distinguish between the role of a certain molecule involved in the CHS response in the sensitization phase and that in the elicitation phase. Here we show, using a chemical genetic approach, that ASK1 plays an important role in the both sensitization and elicitation phase of the CHS response and would be a therapeutic target for the inflammatory skin diseases.

1. 緒言

皮膚の炎症性疾患は、化粧品の安全性を考える上で最も重要な疾患であり、その病態ならびに治療・予防方法を明らかにすることは、安全性の高い化粧品やその安全な使用方法の開発に向けての必須の課題である。

皮膚は常に外界からの様々なストレスに直接さらされる組織であり、高度に発達した獲得免疫系と、幅広い生物種において保存されている自然免疫系とを協調的に制御することで、生体を守る最前線の防御壁としての役割を果たしている¹⁾。しかし、過大なストレス刺激や免疫系の不全あるいは過剰応答はその防御機構を破綻させ、多様な炎症性皮膚疾患を引き起こす。もっともポピュラーな炎症性皮膚疾患としては接触皮膚炎が知られており、いったん接触抗原に対する感作が成立すると抗原に接触する度に皮膚炎を引き起こすため、日常生活に多大な影響を及ぼす疾患として多くの患者が苦しんでおり、化粧品もその原因の一つとして重要視されている。治療法としては、初期感作を未然に防ぐこと自体は容易ではないため、抗原に再暴露した際の発症をいかに予防するかが重要であるが、その手がかりはまだつかめていない。その他の炎症性皮膚疾患について

も、その多くは対症療法に頼っているのが現状である。

このような炎症性皮膚疾患の病態への理解を深め、治療・予防方法を見いだすためには、抗原を含む様々なストレス刺激を受容・認識し、その情報を免疫系へと正確に伝達する分子機構を明らかにする必要がある。我々は、その機構を担う分子として、様々なストレスに応答してアポトーシスの誘導²⁾や炎症性サイトカインの産生調節に働く分子であり^{3,4)}、自然免疫応答においても重要な機能をもつ⁵⁾ ASK1 というストレス応答性キナーゼに着目した。最近、ASK1 ノックアウトマウスの皮膚では接触過敏反応が著しく減弱することを見いだしたことから、ASK1 が様々な炎症性皮膚疾患における鍵因子と考え、ASK1 の皮膚疾患における機能を明らかにするとともに、治療・予防の標的としての有用性を探ることを本研究の目的とした。

2. 実験

本研究では、おもにマウス接触過敏反応モデルを用いて獲得免疫系における ASK1 の新たな機能を明らかにすることで、その病態を解明するとともに、治療・予防への応用に向けての創薬基盤を確立することを目的とした。研究内容としては、マウスの個体レベルでの解析に加え、細胞レベル、分子レベルまで解析を進め、ASK1 の活性を時期特異的に、濃度依存的に制御できるノックインマウス (ASK1^{ASKA} マウス) を新たに作製し様々な実験に用いることで、ASK1 の治療標的としての重要性を十分に検討した。

(1) 接触過敏反応における ASK1 の機能解析:

野生型マウスおよび ASK1KO マウスに DNFB、FITC



A role of stress response kinase ASK1 in the inflammatory skin disease.

Hidenori Ichijo*, Junya Mizukami

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

をDay0、1に感作させ、Day5に耳に再感作を行い、24時間後の炎症の程度を耳の腫脹で検討した。

(2) 初期感作後の樹状細胞における ASK1 の機能解析

これまでの解析から接触過敏反応の感作期においてASK1が重要な役割を担うことを明らかにしていることから、まず感作初期に関わる樹状細胞の形成、機能について検討した。

(3) 感作後のリンパ球の分化やサイトカイン産生における ASK1 の役割の解析

初期感作後リンパ球でのサイトカイン産生パターンの解析から、ASK1は T_H の分化誘導を制御することが示唆される。 T_H の分化誘導は抗原提示細胞である樹状細胞とナイーブTリンパ球との相互作用が非常に重要であり、樹状細胞、Tリンパ球、それぞれの細胞における細胞内シグナル伝達および共刺激分子の発現等により厳密に制御されている。そこで、感作リンパ節細胞の養子免疫実験やサイトカイン産生、ならびにナイーブTリンパ球から各 T_H サブセットへの分化におけるASK1の関与を検討した。

(4) ASK1^{ASKA} マウスを用いた接触過敏反応の惹起相における ASK1 の役割の解析

接触過敏反応は初めて抗原に接触する感作期(Day0-5)と再度抗原に接触してから炎症反応がおこる炎症惹起期(Day6以降)に分けられる。ASK1ノックアウトマウスの解析から感作期における重要性は明らかとなっているが、炎症惹起期における機能はまだ明らかとなっていない。ASK1^{ASKA}マウスにDNFBを塗布して感作を成立させたのち、Day5に再度DNFBを塗布する前に低分子化合物である1Na-PP1の投与/非投与群を検証することで、炎症惹起期のASK1の機能を明らかにした。

3. 結果

(1) ASK1 は CHS 反応の誘導に働く

CHSにおけるASK1の役割を検討するために、我々は除毛した背部皮膚にDNFBを塗布することで、WTマウス、ASK1KOマウスを感作させた。

5日後にCHSを惹起させるため、DNFBを経表皮的に塗布し、耳にチャレンジ(再塗布)を行った⁶⁾。WT、ASK1KOマウスともにDNFB塗布後に耳の浮腫を生じたが、耳の腫脹を測定したところASK1KOマウスではWTマウスと比較して有意に耳の腫脹が軽減していた。接触感作物質(contact sensitizer)としてFITC(Fluorescein isothiocyanate)を用いた時も同様にASK1KOマウスではCHS反応が減弱していた。

(2) ASK1 は皮膚ランゲルハンス細胞の分化、遊走能に寄与しない

CHSでは表皮に存在するLangerhans cell(LC)が抗原を取り込み、所属リンパ節へ遊走することが重要である。まず初めにLCでのASK1の役割について検討するため、表皮シートをPEラベルされたMHC class II抗体を用いて染色した。MHC class II陽性のLCの形態、細胞密度はWTマウス、ASK1KOマウスでは同様であった。次にLCの遊走を検討するため、FITCをマウス皮膚に塗布した。LCは皮膚に塗布されたFITCを取り込み、FITC陽性細胞として所属リンパ節へ遊走する⁷⁾。FITC塗布24時間後、所属リンパ節を採取し、LCの数をフローサイトメトリーで測定したところ、所属リンパ節でのMHC class II-FITC陽性LCの数は、WTマウス、ASK1KOマウスで同様であった。以上の結果より、LCの発生やリンパ節への遊走にASK1は影響を及ぼさなかった。

(2) ASK1KO マウスでは DNFB 感作後の Th17 細胞の分化が低下する

リンパ節に遊走したLCはナイーブT細胞に抗原提示を行い、ハプテン特異的なT細胞に誘導することが知られている^{8,9)}。そこで、次に抗原提示を受けたリンパ節細胞におけるASK1の役割を解析するために、DNFB感作WTマウス、ASK1KOマウスをドナーとして所属リンパ節よりリンパ節細胞を採取し、ナイーブなWTマウス、ASK1KOマウスに後天的に細胞を移植した。感作ASK1KOリンパ節細胞のWTレシピエントマウスでは、感作WTリンパ節細胞のレシピエントマウスと比較してCHS反応が抑制されていた。逆に、WTドナー由来の感作リンパ節細胞をナイーブASK1KOマウスに移植した時には、DNFBチャレンジにより正常なCHS反応が惹起された。これらの結果から、感作リンパ節細胞でのASK1がCHS反応において重要な役割を担うことが示唆された。

感作後のリンパ節内では抗原特異的なリンパ球の分化が誘導され、再度抗原刺激を受けると局所へ遊走して炎症性サイトカインの産生に重要な役割を担う。ASK1の欠損がDNFB感作後のリンパ球にどのように影響するかを調べるために、次にリンパ球の構成、サイトカイン産生や分化について解析した。

DNFB誘導性CHSでは感作後にTh1細胞、Th17細胞が分化誘導される。DNFB感作によるIFN- γ 産生細胞およびIL-17産生細胞の数はWT、ASK1KOマウスにおいていずれも増加していた。しかしながら、ASK1KOマウスではWTマウスと比較してIL-17産生細胞数が有意に減少していた。DNFB感作マウスからリンパ節細胞を採取し、in vitroでDNBS(dinitrobenzene sulfonic acid)でチャレンジしたところ、ASK1KOマウス由来リンパ節細胞からのIFN- γ

産生は、WTマウスと比較して差は見られなかった、興味深いことにASK1KOマウス由来のリンパ節細胞ではDNBSチャレンジによるIL-17の産生は著しく低下していた。IL-17は主にナイーブT細胞から分化したTh17細胞から産生されることが知られ¹⁰⁾、特にその分化には制御転写因子ROR γ t(RAR-related orphan nuclear receptor γ t)が重要な役割を担うことが知られている¹¹⁾。そこでDNFB感作5日後のリンパ節細胞からCD4+T細胞を分離し、転写因子のmRNA発現を検討したところ、DNFB感作後のASK1KOマウス由来CD4+T細胞ではROR γ tの発現が有意に低下していた。以上の結果からASK1はDNFB感作後にTh17への分化やIL-17産生に影響することが示唆された。

(4) ASK1は惹起相においてIL-17産生を促進しCHSを誘導する

次にCHSの惹起相におけるASK1の時期特異的な役割を検討するため、我々は通常は野生型ASK1と同じく機能するものの、ATP類似薬(1Na-PP1)の投与によって活性が阻害されるASK1変異体のノックインマウス(ASK1^{ASKA}マウス)を作製した。この変異体はASKA(ATP analog-sensitive allele)テクノロジーに基づいて設計したもので、ASK1のキナーゼ領域への点変異の導入によりATP結合部位を改変することで、天然型ATPを用いたキナーゼ活性は野生型キナーゼと同等に維持されるが、1Na-PP1によって選択的に活性阻害を受ける(1Na-PP1は野生型のプロテインキナーゼは一切阻害しない)^{12,13,14)}。

まず我々は、ASK1^{ASKA}をHEK293細胞に過剰発現させ、1Na-PP1によるASK1の活性阻害効果を検討した。Flag-ASK1^{ASKA}を過剰発現したHEK293細胞は、Flag-ASK1を過剰発現させた細胞とともにH₂O₂刺激依存的な活性化が検出できた。しかし、1Na-PP1を前投与しておく、Flag-ASK1^{ASKA}の過剰発現ではH₂O₂刺激依存的なASK1の活性化が抑制された。一方、1Na-PP1の類似体である1NM-PP1によるASK1の活性阻害効果は弱いことが分かった。Flag-ASK1を過剰発現させた細胞では1Na-PP1、1NM-PP1によるASK1の活性化阻害効果は見られなかった。次にASK1^{ASKA}ノックインマウスにおけるPP1の活性阻害効果を検討した。H₂O₂刺激後の1Na-PP1のASK1活性阻害効果は、ASK1^{ASKA}マウス骨髄由来マクロファージにおいて1Na-PP1濃度依存的に見られるが、WTマウス由来骨髄マクロファージでは阻害効果が見られなかった。これらの結果は、1Na-PP1が選択的かつ強力にASK1の活性化を阻害し、高濃度のこの化合物が野生型のASK1シグナル伝達に影響を及ぼさないことを示している。

次にin vivoでのASK1シグナル伝達における1Na-PP1による阻害効果の効力および特異性を検討した。コントロール群、惹起相投与群に分けて1Na-PP1を投与し、チャレ

ンジ24時間後の耳の厚さを測定したところ、惹起相でのみ1Na-PP1を投与したマウスにおいて耳の腫脹が低下していた。以上の結果から、ASK1はCHSの惹起相で炎症反応に重要な役割を担うことが示された。

また、DNFB感作後のASK1^{ASKA}マウスから採取したリンパ節細胞に、in vitroで1Na-PP1を加え、惹起相を想定したDNBS依存的なサイトカイン産生を検討した。その結果、1Na-PP1投与のリンパ節細胞では1Na-PP1非投与リンパ節細胞と比較して、DNBS依存的なIFN- γ の産生には差は見られなかったが、IL-17の産生が有意に低下していた。

4. 考察

CHSの感作期および惹起期でASK1が非常に重要な役割を担うことが明らかとなった。我々はCHSにおけるASK1の時期特異性を解明するため、ASKAを用いた化学遺伝学的手法によりノックインマウスを作製し実験を行った。小分子阻害剤の不利な点は機能的な選択性にあるが、蛋白キナーゼ情報伝達解析のための化学遺伝学的手法は、分子特異性において小分子阻害剤より優れることが報告されている¹⁵⁾。この化学遺伝学的手法を用いて、CHSにおけるASK1の時期特異的な役割および重要性を見いだした。

CHSの病因についての研究は、ナイーブT細胞が抗原特異的なエフェクターT細胞に分化する感作相に焦点がおかれている報告が多い。DNFB誘導性CHSでは、感作相でランゲルハンス細胞が抗原を取り込み、所属リンパ節へ遊走する。リンパ節でランゲルハンス細胞から抗原提示を受けたナイーブT細胞はTh1、Th17などのエフェクターT細胞に分化する¹⁶⁾。Th17細胞への分化はIL-23、IL-6、TGF- β などのサイトカイン制御だけでなく転写因子の発現が必要で¹⁷⁾、ROR γ tはTh17細胞に特異的に発現する転写因子として同定されている¹¹⁾。特に分化したTh17細胞から産生される炎症性サイトカインの一つであるIL-17はマウスCHSの誘導に必要不可欠である¹⁸⁾。またIL-17はヒトにおいても接触皮膚炎のみならず感染防御や慢性炎症性疾患の長期化など、炎症反応において重要な役割を担っている¹⁹⁾。ASK1KOマウスでは感作後のCD4+T細胞でROR γ t発現が低下しており、ASK1が感作期においてTh17への分化制御を担う可能性が示唆された。またASK1KOマウス由来の感作リンパ節細胞ではDNBS依存的なIL-17産生が低下していた。

しかしながら、DNFB誘導性CHSにおいて惹起相のみのASK1活性阻害でCHS反応が抑制され、in vitroにおいて感作リンパ節細胞はDNBS刺激時のASK1活性化を阻害することでIL-17産生が有意に低下した。これらの結果から、ASK1は感作期におけるTh17分化制御に加え、惹起相においてはエフェクター細胞からのIL-17産生を促し、CHS反応を誘導することが示唆された(Fig. 1)。

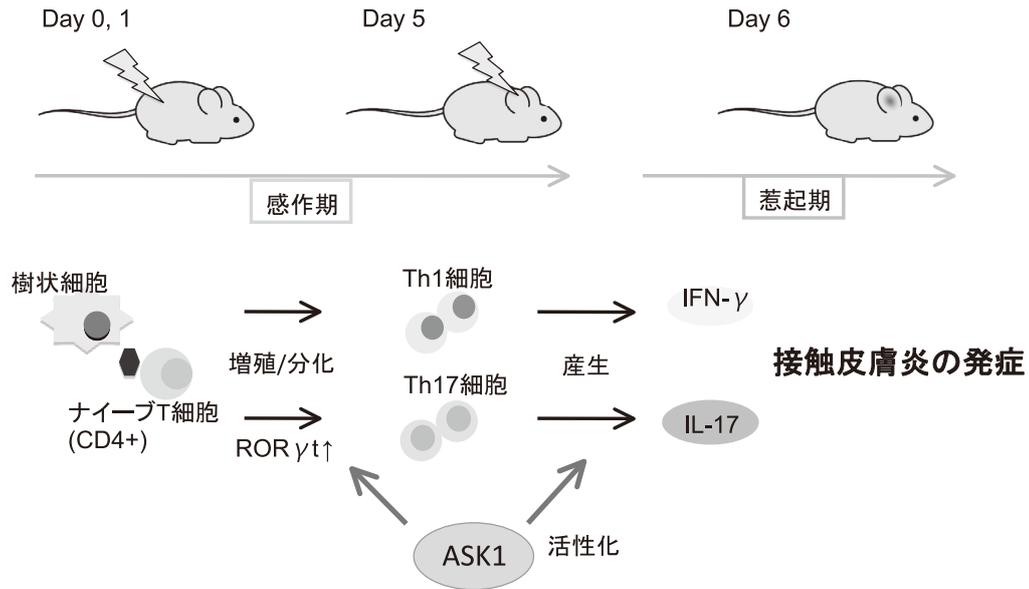


Figure 1 The role of ASK1 in CHS.

ASK1 は、感作期においてヘルパーT細胞でのROR γ tの発現やTh17への分化制御を担い、惹起相においてはエフェクター細胞からのIL-17産生を促し、CHS反応を誘導することが示唆された。

5. 総括

IL-17はCHSの病因の主要な役割を担うが、ASK1を介するIL-17産生機構や実際にどのような炎症細胞が関与しているかなどは依然として検討する余地がある。それでもなお、ASK1の活性を制御することで、惹起相でのIL-17産生の調節を介して、臨床的に局所の炎症反応や組織破壊を制御できる可能性があり、ASK1が新たなCHSの治療標的となることが期待される。

(引用文献)

- 1) Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679-691 (2009)
- 2) Ichijo H, et al. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-9
- 3) Osaka N, et al. ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. *J. Cell Biol.* 2007, 176:903-909
- 4) Iriyama T, et al. (2009) ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J* 28:843-853.
- 5) Matsuzawa A, et al. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* 2005, 6:587-92
- 6) Kabashima, K. et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat. Med.* 9, 744-749 (2003)
- 7) Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S. & Fryer, P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizers fluorescein isothiocyanate. Functional and Morphological studies. *J. Exp. Med.* 166, 1654-1667 (1987)
- 8) Grabbe, S., Schwarz, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19, 37-44 (1998)
- 9) Gocinski, B.L., Tigelaar, R.E. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121-4128 (1990)
- 10) Steinman, L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13, 139-145 (2007)
- 11) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33.
- 12) Denzel, A. et al. Cutting edge: a chemical genetic

- system for the analysis of kinases regulating T cell development. *J. Immunol.* **171**, 519-523 (2003)
- 13) Ventura, J.J. et al. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* **21**, 701-710 (2006)
- 14) Chen, X. et al. A chemical-genetic approach to studying neurotrophin signaling. *Neuron* **46**, 13-21 (2005)
- 15) Bishop, A.C. et al. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401 (2000)
- 16) Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* **226**, 57-79 (2009)
- 17) Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol. Rev.* **2008**, 226:80-86
- 18) Nakae, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**, 375-387 (2002)
- 19) Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. ENGL. J. MED.* **361**, 888-898 (2009)