

アラザイム(Arazyme)はサイトカイン発現を抑制し、 皮膚保護タンパク質(Skin barrier protein)の発現を上方制御する

概要: 本研究において抗体や HaCaT ヒトケラチン細胞中のサイトカインの発現変化及び皮膚保護タンパク質の発現を評価することでアレルギー炎症に関するアラザイムの抑制効果を調査した。THP-1 ヒト単核球細胞(human monocytic cell)と EoL-1 ヒトエオジン好酸性細胞(human eosinophilic cell)をヤケヒョウダニ(*Dermatophagoides pteronyssinus*) 抽出物(DpE)で処理した。アラザイムはその細胞タイプ中の MCP-1/CCL2, IL-6 及び IL-8 の増加を著しくブロックした。THP-1 細胞中のリポポリサッカリド(LPS)によって誘発された MCP-1, IL-6, IL-8 の分泌もアラザイム処理によって抑制された。アラザイムはヒト肥満細胞中(mast cell)のホルボール 12-ミスチン 13-アセテート(phorbol 12-myristate 13-acetate) とカルシウムイオノフォア(calcium ionophores) に因って IL-6 や IL-8 の分泌を抑制した。アラザイムは HaCaT 細胞中の tumor necrosis factor- α (TNF- α) と interferon- γ (INF- γ) に因って thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17, MCP-1, IL-6 及び IL-8 の分泌をブロックした。TNF- α と INF- γ はフィラグリン(filaggrin), インボルクリン(invulocrin)及びロリクリン(loricrin) 含むヒト保護タンパク質の発現を抑えた。反対に、アラザイムはフィラグリン(filaggrin), インボルクリン(invulocrin)及びロリクリン(loricrin)の分泌を増加させた。これらの結果はアトピー性皮膚炎(atopic dermatitis) を含むアレルギー疾患治療のための治療薬開発に貢献するだろう。

序論: 調節不全となった免疫システム反応に結びついた環境因子やジェネリック因子は、アトピー性皮膚炎、ぜんそく及びアレルギー性鼻炎を含むアレルギー疾患に関わっている。イエダニ, *Dermatophagoides pteronyssinus* (DpE) は, immunoglobulin E (IgE) の発現を誘発し、皮膚保護タンパク質中の免疫細胞や脆弱性欠陥(exploits defect)を活性化することでサイトカインの発現を刺激する。サイトカイン発現の規制はアレルギー疾患の発症において重要である。Interleukin(IL)-6, IL-8 及び monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)/CCL2 を含むサイトカインは、アレルギーの急性から慢性症状へのシフト及びアレルギー炎症において最高潮に至らせる好中球(neutrophils) やモノサイトの引き込みに関わっている。アレルギー、特にアトピー性皮膚炎、に関連する Th2 ケモカインである Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 が、ケラチノサイト(keratinocytes) 中に主に生じる。またケラチノサイトは、フィラグリン(filaggrin), インボルクリン(invulocrin) 及びロリクリン(loricrin)を含む皮膚保護タンパク質を発生し、皮膚保護における欠陥はアトピー性皮膚炎を引き起こす。アレルギー疾患の正確な発症メカニズムは未だ決定されていないので、アトピー性皮膚炎に対する一般的な治療は抗炎症あるいは免疫抑制薬に依存している。然しながら、多くの薬剤は有害な副作用を伴う。

アラザイムは、蜘蛛、*Nephila clavata*, の腸から分離した aerobic gram-negative symbiotic bacterium (好気性グラム陰性共生菌) を, *Serratia proteamaculans* としても知られている *Aranicola proteolyticus* によって培養物中に発生、分泌させた新規メタロプロテアーゼ(metalloprotease)である。アラザイムは、transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad pathway を抑制する SMP30 の発現を強化すること及び抗酸化タンパク質(ant-oxidant protein) の発現を増加することで急性肝損傷を防ぐ。An in vitro スクリーニングシステムを使ってのアレルギー疾患の治療に対する新薬候補の識別は以前報告がなされている。アレルギー疾患の処方に対する治療薬の開発はこのように未だ成功に至っていない。従って、新しいスクリーニングシステムの開発は有益である。本研究では免疫細胞や皮膚ケラチノサイト(skin keratinocytes)中のサイトカインや皮膚保護タンパク質の産出に関するアラザイムの効果を、アトピー性皮膚炎を含むアレルギー治療のためにアラザイムを治療的に探究する目的で調査した。

Materials and Methods (資料と方法)

Enzyme purification (酵素精製):

アラザイムを以前述べたように精製した。簡単に言えば、細胞外膜片を培地の遠心分離あるいは 0.2 μ m 濾紙(Pall Life Science, Port Washington, NY, USA)を使用して濾過によって集めた。50mM potassium phosphate 緩衝剤(pH7.6)を備えた DEAE-セルロースカラムにクロマトグラフを実施した。流速 400ml/h の 0.1-0.5M 塩化ナトリウム濃度で結合タンパクを溶出し、各断片は 10kD カセット・メンブレンに濃縮させた (Pall Life Sciences)。タンパク質溶液は流速 20ml で事前に 50mM potassium phosphate 緩衝剤(pH7.8) で平衡にした Sephadex G-75 カラム(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)に入れた。タンパク質分解活性を含む断片は 10kD カセット・メンブレンに集められ、-20°Cで貯蔵した。

Cell Culture (細胞培養):

THP-1 ヒト単核球細胞(human monocytic cell)を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から入手。EoL-1 ヒトエオジン好酸性細胞(human eosinophilic cell)を Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan) から入手。2 つの細胞タイプを RPMI-1640 培地に培養した。HMC-1 ヒト肥満細胞やヒトケラチン細胞 HaCaT 細胞をそれぞれ 10%の熱不活性ウシ胎児血清(heat-inactivated fetal bovine serum), ペニシリン(100 U/ml) 及びストレプトマイシン(100µg/ml) で補った Iscove 培地や Dulbecco's modified Eagle 培地に培養した。

Cell viability assay (細胞生存評価) :

細胞増殖キット(Roche Korea, Seoul, Korea)を使って 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)の変換に基づき細胞生存を評価した。100µl の培地中の THP-1, EoL-1, HMC-1 及び HaCaT 細胞を 96-well plate に蒔いた。1µg と 50µg/ml 間の濃度範囲でアラザイムを溝(well)に加えた。37°C で 24 時間の培養に引き続き 10µl の MTT 溶液を加え 4 時間培養した。可溶性溶液(100µl)を溝(well)に加え、24 時間の培養に続き ELx808 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) を使って 550nm で吸光率を測定した。

ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay):

アラザイムで 30 分間の前処理後、THP-1, EoL-1, HMC-1 及び HaCaT 細胞を、Korea National Arthropods of Medical Impotence Resource Bank (Seoul, Korea) から供給された DpE で処理した。上澄み中の MCP-1, IL-6, IL-8 TARC 及び tumor necrosis factor- α (TNF- α)を、製造業者の指導の下 OptEIA Set(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) の sandwich ELISA を使って測定した。標準吸光値から得られる線形回帰式を使ってサイトカインの濃度を計算した。

Western Blotting (ウエスタン ブロッキング法) :

5x10⁶細胞/ml の細胞密度で HaCaT 細胞を 6 つの溝(well-plate) に蒔いた。アラザイムの有り無しで TNF- α と interferon(IFN- γ)で処理した後、細胞を採取し 50µl lysis buffer (細胞溶解剤-20mM HEPES, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 25% glycerol, 1mM dithiothreitol, 0.1mM Na₃VO₄ 及び protease inhibitor)中で溶解し、サンプルを 4°C で 15 分間 12,000 x g で遠心分離した。サンプル(50µg/lane) を 10%のドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリルアミドゲル電気遊動で分離し、ニトロセルロースフィルターに転写した。Blots(転写物)をフィラグリニン(filaggrin), インボルクリン(involutrin) 及びロリクリン(loricrin) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) で培養し、強化化学発光検出システム(Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA) を使って現像した。膜は剥がして、内部コントロールとして抗 ERK2 抗体で再検査した。

Statistical analysis (統計的分析) :

データは平均値 \pm 標準偏差(SD)として表されている。統計的差異を one-way ANOVA を使って分析した。統計分析には SPSS 統計ソフトウェア(version 10.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を使用した。P<0.05 は統計的に有意な差異を示していると考えられている。

Results (結果)

Arazyme inhibits the secretion of MCP-1 and IL-8 in THP-1 and EoL-1 cells

(アラザイムは THP-1 や EoL-1 細胞において MCP-1 と IL-8 の分泌を抑制する)。

THP-1, EoL-1, HMC-1 及び HaCaT 細胞の生存性に関するアラザイムの効果を決めるために MTT に基づく検査を使用した。図 1 に示すように、HMC-1 細胞の生存率は 1µg と 50µg/ml の間のアラザイム濃度範囲では影響を受けない。THP-1 や EoL-1 細胞の生存性は 1µg と 50µg/ml の間のアラザイム濃度範囲で若干抑制された。HaCaT 細胞では 5µg/ml のアラザイム濃度は細胞の生存性を若干抑制し、濃度範囲 10 と 50µg/ml の間ではアラザイムは有毒であった。DpE の抽出物や THP-1 中の LPS での処理を受けて MCP-1, IL-6 及び IL-8 の分泌は増加した(図 2 A と B)。アラザイムは、サイトカインのタイプに依存する異なる抑制にも拘らず、容量依存方式で DpE 処理後、顕著に MCP-1 の発生を抑制したが、一方で IL-8 は増えた(p<0.05)。アラザイムはまた MCP-1, IL-6 及び IL-8 の LPS 媒介の増加した発生を抑制した(図 2B)。EoL 細胞において、DpE は MCP-1, IL-6 及び IL-8 の発現を強めた。MCP-1 と IL-8 の発現は容量依存方式でアラザイム処理後減少した(図 3)。IL-6 の発現は低濃度アラザイム処理を受けて増加したが、ダニ処理のみと比べると高濃度処理で減少した。EoL-1 細胞中の

アラザイムによる IL-6 の変化は THP-1 細胞おけるそれと似ている。

Figure1: THP-1, EoL-1, HMC-1 及び HaCaT 細胞の生存に関するアラザイム効果。THP-1, EoL-1, HMC-1 (図 A) 及び HaCaT 細胞 (図 B) をアラザイム有り無し(無しは培地のみ)で 図に示す濃度で 24 時間培養した。生存率は MTT-based viability assay を実行して測定。データは未処理細胞の吸光率 (これを 100%に設定) に対する相対値として表わし、3つの独立した実験, MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-disphenyltetrazolium bromide の平均 \pm 標準偏差(SD)として表されている。

Figure2: アラザイムは THP-1 細胞中の DpE(図 A) or LPS(図 B) によって増加した MCP-1, IL-6, IL-8 の発生を抑制している。THP-1 細胞は 24-well plate の溝(well)に蒔かれ、0.5%FBS を含む RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養された。細胞は図に示す濃度のアラザイムの有り無しで前処理されている。細胞は 10 μ g/ml ダニ抽出で 24 時間処理され、その後上澄みを集めて ELISA で分析した。データは 3つの独立した実験の平均 \pm SD として表されている。* $P < 0.01$ と ** $P < 0.01$ は、未処理 vs DpE のみの処理グループ、あるいは DpE のみの処理 vs アラザイム処理のグループの間の統計的に有意な違いを示していると考えられる。MCP: monocyte chemotactic protein-1 の略。IL: interleukin。DpE: Dermatophagoides pteronissinus。

Figure3: アラザイムは EoL-1 細胞中の DpE によって増加した MCP-1, IL-6 及び IL-8 の発生を抑制している。EoL-1 細胞は 24-well に蒔かれ、0.5%FBS を含む RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養された。細胞は図に示す濃度のアラザイムの有り無しで前処理されている。細胞は 10 μ g/ml DpE で 24 時間処理され、その後上澄みを集めて ELISA で分析した。データは 3つの独立した実験の平均 \pm SD として表されている。* $P < 0.01$ と ** $P < 0.01$ は、未処理 vs DpE のみの処理グループ、あるいは DpE のみの処理 vs アラザイム処理のグループの間の統計的に有意な違いを示していると考えられる。MCP: monocyte chemotactic-1 の略。IL: interleukin。DpE: Dermatophagoides pteronissinus。

Arazyme inhibits the secretion of IL-6 and IL-8 in HMC-1 cells and the production of TARC, MCP-1, IL-6 and IL-8 in HaCaT cells (アラザイムは HMC-1 細胞の IL-6 と IL-8 の分泌と HaCaT 細胞の TARC, MCP-1, IL-6 及び IL-8 の発生を抑制する)

HMC-1 細胞は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と calcium ionophore (CaI) 処理後、IL-6, IL-8 及び TNF- α を発生する。アラザイムは容量依存方式で PMA と CaI によって誘発された IL-6 と IL-8 の増加を顕著に抑制することを見出した($p < 0.05$; 図 4)。HaCaT 細胞のサイトカイン発生も調査した。TNF- α と IFN- γ は、その細胞中の TARC, MCP-1, IL-6 及び IL-8 の発生を増やした。然しながら、IL-8 は、アラザイムによって若干抑制され、TARC, MCP-1 及び IL-6 はアラザイムによって著しく抑制された。図 1-5 に示した結果はアラザイムが monocyte, eosinophils, 肥満細胞(mast cell)及び keratinocyte を含む色々な細胞のサイトカイン産出を抑制するという仮説と一致している。このようにアラザイムがアレルギー疾患を含む炎症治療の為の可能性のある候補要素として示唆されている。

Figure4: アラザイムは HMC-1 細胞中の PMA と CaI によって増加した IL-6 と IL-8 の発生をブロックする。HMC-1 細胞は 24-well に蒔かれ、0.5%FBS を含む RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養された。細胞は図に示す濃度のアラザイムの有り無しで前処理されている。細胞は 50ng/ml PMA と 1 μ M CaI で 24 時間処理され、その後上澄みを集めて ELISA で分析した。データは 3つの独立した実験の平均 \pm SD として表されている。* $P < 0.01$ と ** $P < 0.01$ は、未処理 vs PMA+CaI のみの処理グループ、あるいは PMA+CaI のみの処理 vs アラザイム処理のグループの間の統計的に有意な違いを示していると考えられる。IL: interleukin。DpE: Dermatophagoides pteronissinus。PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate, CaI: calcium ionophore。

Figure5: アラザイムは HaCaT 細胞中の TNF- α と IFN- γ によって増加した TARC, MCP-1 及び IL-6 の発生を抑える。HaCaT 細胞は 24-well に蒔かれ、0.5%FBS を含む RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養された。細胞は図に示す濃度のアラザイムの有り無しで前処理されている。細胞は 10ng/ml TNF- α と IFN- γ で 24 時間処理され、その後上澄みを集めて ELISA で分析した。データは 3つの独立した実験の平均 \pm SD として表されている。* $P < 0.01$ と ** $P < 0.01$ は、未処理 vs TNF- α + IFN- γ のみの処理グループ、あるいは TNF- α + IFN- γ のみの処理 vs アラザイム処理のグループの間の統計的に有意な違いを示していると考えられる。TNF- α : tumor necrosis factor- α の略。IFN- γ : interferon- γ 。TARC: thymus and activation-regulated chemokine。MCP-1: monocyte chemotactic protein-1。IL: interleukin。

Arazyme increases the expression of filaggrin, involucrin and loricrin in HaCaT cells (アラザイムは HaCaT 細胞の filaggrin, involucrin 及び loricrin の発現を増加させる)。

皮膚保護は病原菌、アレルギー源、その他の環境毒素の侵入をブロックするので、保護機能障害の拡大はアレルギーの程度、特にアトピー皮膚炎、に関連している。皮膚保護タンパク質は filaggrin, involucrin 及び loricrin を含み、keratinocyte によって生み出される。故に HaCaT 細胞における皮膚保護タンパク質の規制に関してアラザイム効果を調査した。TNF- α と IFN- γ 処理は HaCaT 細胞における filaggrin, involucrin 及び loricrin の発現を抑制した(図 6A)。アラザイム、HaCaT 細胞における filaggrin, involucrin 及び loricrin の減少を反転した(図 6B)。これらの結果はアラザイムが皮膚保護タンパク質の減少したところで皮膚保護タンパク質の発現を増やすことを示している。

Figure6: アラザイムは TNF- α と IFN- γ によって減少した ilaggrin, involucrin 及び loricrin の発現を増加する。Serum-starved HaCaT 細

胞(図 A)は図に示した時間 10ng/ml TNF- α と IFN- γ で培養され、Serum-starved HaCaT 細胞(図 B)は 5 μ g/ml アラザイムの有り無しで 1 時間前処理されている。その後細胞を 10ng/ml TNF- α と IFN- γ で 24 時間と 48 時間培養した。採取された細胞を溶解し、filaggrin, involucrin 及び lorricrin を western blot analysis で分析した。その膜を剥がし、内部コントロールの為に抗 ERK 2 抗体で再検査した。TNF- α : tumor necrosis factor- α の略。 IFN- γ : interferon- γ 。

Discussion

本研究において、人の皮膚炎症に関連した細胞に初めて使用するために抗炎症薬あるいは抗アトピー性皮膚炎薬としてアラザイムの効能を調査した。アラザイムは THP-1 及び EoL-1 細胞で MCP-1、IL-6 及び IL-8 の発生を抑制すること、HMC-1 で IL-6 と IL-8 の分泌を抑えること、HaCaT 細胞で TARC、MCP-1、IL-6 及び IL-8 を減らすこと及び HaCaT 細胞で filaggrin, involucrin 及び lorricrin の発生を上方制御することが観察された。アラザイムはメタロプロテアーゼ(metalloprotease)であり、アレルギー炎症の発症における効果は明確ではないが、CC14 によって傷つけられた肝細胞を保護することが知られている。炎症抑制剤としてのアラザイムの効能は炎症細胞中のサイトカインや角化細胞(keratinocyte)中の皮膚保護タンパク質の変化を評価することで決定された。アラザイムは、効果細胞(effector cells)に依存して、差別的にサイトカインの発生を抑制したが、酵素は THP-1, EoL-1, HMC-1 及び HaCaT 細胞中のサイトカイン発生に関して抑制効果を持った。アラザイムはこの研究で使用されたすべての細胞において IL-8 をブロックし、THP-1, EoL-1 及び HaCaT 細胞中の MCP-1 発現を抑制した。MCP-1 はモノサイトの効能のある化学誘引物質として働き、IL-8 は生存、好中球(neutrophil)の移動や活性化における必須分子として機能するので、アラザイムはモノサイトや好中球(neutrophil)に含まれる免疫反応の規制によって炎症反応を抑制し得る。本研究ではアラザイムはまた容量依存方式で HMC-1 と HaCaT 細胞中の IL-6 の発現を抑えた。THP-1 や EoL-1 細胞においてアラザイムは低濃度で IL-6 の発現を増やし、高濃度でその発現を減らした。これらの観察は我々の先の研究と一致しているが、そのメカニズムは未知のままである。我々の先の研究における DpE 処理に続く IL-6 や IL-8 の放出は本研究においての方が高かった。この不一致は細胞培養条件や異なる調査者の技能のバラツキを含む種々の要素によって引き起こされたのかもしれない。しかしアラザイムは抗炎症薬剤あるいは抽出物と似たサイトカイン発生の抑制傾向を明確に見せた。アラザイムは強い分解能力を持ったプロテアーゼ(protease)なので、炎症誘発分子を加水分解するかもしれない。これはアラザイムが如何に抗炎症効果を誘発するかを決定する為に重要である。本結果に基づいて種々の仮説が考えられた。第一に、アラザイムはダニ抽出物、LPS, TNF- α 及び IFN- γ を含む細胞外炎症刺激因子を切断する。故に刺激因子はサイトカインや皮膚保護タンパク質の発生に関係する炎症信号を変換しない。次にアラザイムは、MCP-1, IL-6, IL-8 及び TARC を含むサイトカインを直接切断する。アラザイムはまた新型の今のところ未確認の受動体に結合し、サイトカイン発生や皮膚保護タンパク質の抑制に関連する抗炎症信号に変換する。アラザイムの正確なメカニズムは解明すべく残っており、引き続き研究の課題である。アトピー性皮膚炎は、皮膚炎症や IgE 介在の感作をイェダニを含む環境アレルギーに逆戻りさせる不適切な表皮保護機能によって特徴づけられるアレルギー皮膚疾患である。filaggrin, involucrin 及び lorricrin は表皮皮膚保護を形作る主要なタンパク質であり、これらのタンパク質の発生 and/or 導入における欠陥はアトピー性皮膚炎の発症において重要である。本研究において filaggrin, involucrin 及び lorricrin は HaCaT 細胞中の TNF- α 及び IFN- γ 処理後減少し、アラザイムはこれらの分子の発現を増やした。皮膚保護タンパク質を作り出す際の欠陥は病原菌の侵入及びアレルギー因子や有毒な化学物質との接触を促進することでアトピー疾患を引き起こし、悪化させる。Filaggrin の機能欠損変異体はアトピー性皮膚炎同様その他のアレルギー疾患に関係している。TARC は角化細胞(keratinocyte)やアトピー性皮膚炎中の皮膚炎症を引き起こす Th2 ケモカインとしての機能によって生み出される。本研究では、アラザイムは HaCaT 中の TARC 発現を強力に減少させた。これらの結果はアラザイムが角化細胞(keratinocyte)中の TARC 発現や皮膚保護タンパク質を規制することによってアトピー性皮膚炎の重症度を和らげていることを示しているのかも知れない。アトピー性皮膚炎を含むアレルギー治療のための薬剤は盛んに開発されているが、アレルギーあるいは炎症療法の為の効果的な薬としてステロイド(steroid)が広く使用されている。しかし、ステロイドは様々な副作用を引き起こす。アレルギー治療のための新しい候補を調べるために、プロテオリティカス A (A.proteolyticus) から導き出されるアラザイムの効果を調査し、アラザイムが抗炎症効果を誘発すること及び角化細胞(keratinocyte)中に filaggrin, involucrin 及び lorricrin の発現を増やすことを見出した。結論として、アラザイムはアレルギー疾患の治療において有望である。

以上