

博士論文

P2Y₆受容体は尿酸結晶による炎症反応を制御する

浦辻 秀弥

P2Y₆受容体は尿酸結晶による炎症反応を制御する

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

外科学専攻

指導教員 佐藤伸一教授

浦辻秀弥

目次

I 要旨.....	4
II 序文.....	5
III 方法.....	9
[1] 細胞.....	9
[2] 試薬.....	9
[3] 培養上清中のサイトカイン濃度測定.....	10
[4] 電子顕微鏡観察.....	11
[5] messenger RNA 発現解析.....	11
[6] 免疫ブロット法.....	14
[7] アンチセンス処置.....	15
[8] トランスフェクション.....	15
[9] 尿酸結晶誘発マウス炎症モデル.....	16
[10] データ解析と統計.....	17
IV 結果.....	18
[1] IL-1 α は表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症に中心的な役割を果たす.....	18
[2] 表皮角化細胞において尿酸結晶は P2Y 受容体を介して炎症を誘導する..	22

[3] 表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症は P2Y ₆ 受容体により制御される.....	27
[4] THP-1 細胞における尿酸結晶誘発の炎症は P2Y ₆ 受容体により制御される.....	34
[5] P2Y ₆ 受容体は <i>in vivo</i> で尿酸結晶誘発の炎症を制御する.....	36
V 考察.....	38
VI 謝辞.....	45
VII 参考文献.....	46

I 要旨

痛風は関節に沈着した尿酸結晶が炎症反応を誘発することで発症する。痛風結節や尋常性乾癬といった皮膚疾患のなかにも、皮膚への尿酸結晶の沈着が認められるものがある。そこで、表皮角化細胞、単球及びマウス炎症モデルを用いて、尿酸結晶による炎症誘発メカニズムについて検討した。その結果、尿酸結晶刺激による各細胞からの炎症性サイトカイン産生やマウスにおける好中球浸潤は $P2Y_6$ 受容体の阻害によって抑制されることを確認した。従って、尿酸結晶によって誘発される炎症反応は $P2Y_6$ 受容体を介したシグナル経路により制御されており、尿酸結晶が関連する疾患において、当シグナル経路が治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

II 序文

尿酸はプリン体の最終代謝産物であり、通常は血漿中に可溶型で存在するが、飽和限界濃度以上になると尿酸は結晶化し、この尿酸結晶（monosodium urate crystals : MSU）は痛風の原因物質としてよく知られている。一般的に、痛風は高尿酸血症と関連性があり、関節や皮膚に尿酸結晶が沈着して急性炎症を誘発することを特徴とする。痛風では、尿酸結晶は interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)、IL-6 といった炎症性サイトカインや IL-8/CXCL8 や S100A8/A9 といった好中球遊走因子の産生を誘導する[1 - 6]。単球やマクロファージにおいては、尿酸結晶の認識機構に関する研究が盛んであり、そのメカニズムは明確になりつつある。近年の研究では、単球やマクロファージといった貪食細胞によって貪食された尿酸結晶がインフラマゾームを活性化することにより、炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を誘導することが明らかとなっている[7, 8]。

また、尿酸は細胞が傷害を受けた際や感染した際に放出され、それらが沈着して、尿酸結晶を形成し、これらの尿酸結晶が免疫機構を活性化する危険信号（danger signal）として作用することが知られている[9]。表皮は他の臓器と比較して身体の最外層に位置し、紫外線や物理的的刺激、病原体、アレルギー物質といった多様な刺激や抗原に頻繁に曝されている。さらに、アトピー性皮膚炎や

接触皮膚炎、扁平苔癬、中毒性表皮壊死症といった多くの炎症性皮膚疾患において、表皮角化細胞のアポトーシスやネクローシスが認められる。それゆえ、表皮角化細胞では細胞傷害やネクローシスが頻繁に認められ、その結果として、尿酸結晶が表皮内に容易に沈着する可能性があり、また、尿酸が核酸の最終代謝産物であることから、表皮の過増殖を示す皮膚疾患においても過剰に産生される可能性がある。実際、表皮の過増殖を示す乾癬皮疹部の表皮において、尿酸結晶が検出されている[10, 11]。

しかしながら、表皮において、尿酸結晶が炎症を誘発する正確なメカニズムについては不明である。そこで、我々は、尿酸結晶による表皮からの炎症性サイトカインやケモカインの産生メカニズムについて検討した。なお、当研究において対象とした炎症性サイトカイン及びケモカイン（IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8/CXCL8、IL-18）について、それらの主な作用などを表 1 に示す。また、当研究でターゲットとした P2Y 受容体について、その内因性リガンドなどの情報を表 2 に示す。

表1 炎症性サイトカイン及びケモカインの概要

	主な作用	主な産生細胞
IL-1 α / β	<ul style="list-style-type: none"> IL-2 産生誘導を介した T 細胞増殖亢進 接着分子の発現誘導、シクロオキシゲナーゼ 2 及びアラキドン酸等の産生誘導を介した炎症反応の誘導 線維芽細胞や平滑筋細胞等の増殖亢進 発熱、低血圧、一酸化窒素産生等の全身臓器への作用。 骨からのカルシウム遊離促進 	T・B 細胞、単球・マクロファージ、好中球、樹状細胞 (IL-1 α : 上皮細胞及び間葉系細胞からも産生)
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> 単球・マクロファージからのサイトカイン産生誘導 好中球の活性酸素産生、貪食能亢進 T 細胞の細胞障害性亢進、サイトカイン産生誘導 血管内皮細胞における血管新生、血管透過性亢進、接着因子の発現増加 線維芽細胞の増殖亢進、サイトカイン産生亢進 	単球・マクロファージ、T・B 細胞、好中球、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、骨芽細胞、上皮細胞
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> B 細胞に対する抗体産生細胞への分化誘導、抗体産生促進 T 細胞の分化及び機能制御 マクロファージの分化誘導 樹状細胞の成熟化 造血幹細胞の細胞周期調節 骨系細胞、表皮角化細胞等の増殖促進 	T・B 細胞、単球・マクロファージ、樹状細胞、星状細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、粘膜上皮細胞、表皮角化細胞
IL-8/CXCL8	<ul style="list-style-type: none"> 好中球、T 及び B 細胞に対する遊走促進 	T 細胞、好中球、血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞
IL-18	<ul style="list-style-type: none"> 免疫細胞からのインターフェロン-γ (IFN-γ) 等のサイトカイン産生促進 ナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞障害活性増強 	単球・マクロファージ、樹状細胞、ミクログリア、上皮細胞

参考文献[12]から作成

表 2 P2Y 受容体の概要

	リガンド	G タンパク質	主な発現細胞・組織
P2Y ₁	ADP	G _{q/11} 共役型	内皮細胞、血小板、平滑筋細胞、神経細胞、星状細胞、破骨細胞
P2Y ₂	UTP ATP	G _{q/11} 共役型	上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、肝細胞、星状細胞、下垂体
P2Y ₄	UTP	G _{q/11} 共役型	上皮細胞、平滑筋細胞、神経細胞、星状細胞、胎盤
P2Y ₆	UDP	G _{q/11} 共役型	上皮細胞、平滑筋細胞、脾臓、単球、グリア細胞、心臓、胎盤
P2Y ₁₁	ATP	G _{q/11} 及び G _s 共役型	上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、顆粒球、樹状細胞、脾臓、腎臓
P2Y ₁₂	ADP	G _i 共役型	血小板、グリア細胞
P2Y ₁₃	ADP	G _i 共役型	リンパ節、骨髄細胞、樹状細胞、脾臓
P2Y ₁₄	UDP- glucose	G _i 共役型	脂肪細胞、星状細胞、好中球、リンパ球、樹状細胞、肥満細胞

参考文献[13]から作成

III 方法

[1] 細胞

正常ヒト表皮角化細胞 (Normal human epidermal keratinocytes : NHK) はKurabo (Osaka, Japan) より購入し、インスリン (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、human recombinant epidermal growth factor (0.1 ng/ml)、ヒドロコルチゾン (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ゲンタマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、アムホテリシンB (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ウシ下垂体抽出物 0.4% v/vを添加した無血清培地 (Humedia-KG2、Kurabo) で培養した。THP-1細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC、Manassas、VA) から購入し、10% heat-inactivated fetal bovine serum、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地にて培養した。THP-1細胞は尿酸結晶刺激の前日に0.5 μM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA、Sigma、St. Louis、MO) で3時間処置した。この処置により、THP-1細胞の貪食能が増加し、恒常的にIL-1 β 前駆体の産生が誘導される。PMA処置後、PBSで細胞を洗浄し、RPMI 1640培地にて、一晚、培養した。翌日、細胞をPBSで洗浄した後、尿酸結晶刺激のために、OptiMEM培地 (Invitrogen、Carlsbad、CA) に交換した。

[2] 試薬

尿酸結晶は Alexis (Lausen、Switzerland) から購入した。Caspase-1 阻害剤

(z-YVAD)、U-73122 及び U-73433 は Merck KGaA (Darmstadt, Germany) から購入した。Recombinant human TNF- α 、recombinant human IL-1 receptor antagonist (IL-1RA)、monoclonal anti-human TNF- α antibody、monoclonal anti-TNF receptor I antibody、anti-human IL-1 α antibody 及び anti-human IL-1 β antibody は R&D systems (Minneapolis, MN) から購入した。Suramin、KN-62、reactive blue 2 (RB2)、uricase from *Arthrobacter globiformis*、cytochalasin D 及び MRS2578 は Sigma から購入した。Soluble uric acid は Wako pure chemical (Osaka, Japan) から購入した。

[3] 培養上清中のサイトカイン濃度測定

表皮角化細胞は 2.0×10^4 cells/well の密度で 24 ウェルプレートに播種した。細胞がサブコンフルエンスに達した際に、培地を除去し、尿酸結晶（最終濃度：50、100、200、500 $\mu\text{g/ml}$ ）とともに新たな培地を添加した。24 時間後に培養上清を回収した。IL-1RA、anti-TNF receptor、anti-TNF- α 、cytochalasin D、suramin、RB2、MRS2578、U-73122 または U-73343 は尿酸結晶（最終濃度：200、500 $\mu\text{g/ml}$ ）による刺激 1 時間前に添加した。培養上清は尿酸結晶で 24 時間刺激した後に回収した。培養上清中の IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA、R&D systems) により、取扱説明書に従って測定した。IL-18 濃度は MBL (Nagoya, Japan) から購入した ELISA キ

ットで測定した。表皮角化細胞における細胞傷害性は MTT アッセイ (Nacalaitesque, Kyoto, Japan) により測定した。THP-1 細胞は PMA で刺激した後、 4.0×10^5 cells/well の密度で 24 ウェルプレートに播種した。z-YVAD、MRS2578 または U-73122 は尿酸結晶 (100 $\mu\text{g/ml}$) 刺激の 1 時間前から処置し、尿酸結晶で 6 時間刺激した後に培養上清を回収した。培養上清中の IL-1 β 濃度は ELISA (R&D systems) により測定した。

[4] 電子顕微鏡観察

表皮角化細胞については 400 $\mu\text{g/ml}$ 尿酸結晶で 24 時間刺激し、THP-1 細胞については 100 $\mu\text{g/ml}$ 尿酸結晶で 2 時間刺激した後に細胞を回収した。回収した細胞を 3% glutaraldehyde 及び 0.1 M cacodylate 含有バッファーで前固定、1% osmium tetroxide 溶液で後固定した後、脱水・包埋し、透過型電子顕微鏡 (JEM 100SX、JEOL、Tokyo、Japan) で観察した。

[5] messenger RNA 発現解析

Total RNA は RNAeasy kit (Qiagen、Valencia、CA) を用いて抽出した。ゲノム DNA の混入を避けるため、DNase I (Invitrogen) を使用した。Superscript First-Strand Synthesis System for reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR、Invitrogen) を用い、total RNA (1 µg) から cDNA を合成し、合成した cDNA を鋳型として PCR を実施した。RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列は表 3 に示す。プライマーや cDNA、増幅バッファの混合液を 94°C (5 分) で変性処置した後、94°C (30 秒)、55°C (30 秒)、72°C (1 分) を 35 サイクル行い、その後、72°C (10 分) で伸長反応した。増幅された DNA 断片は 2% アガロースゲル電気泳動により評価した。qPCR Human Reference cDNA, oligo(dT)-primed (Clontech、Mountain View、CA) をポジティブコントロールとして使用した。リアルタイム RT-PCR には、ABI prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems、Carlsbad、CA) を使用した。RNase-free water で希釈した cDNA、TaqMan Gene Expression Assays (2.5 µL) 及び TaqMan Universal PCR Master Mix (25 µL、Applied Biosystems) を混合して、計 50 µL の混合液を調製した。Gene Expression Assays は非標識 PCR primers (20×) と TaqMan MGB プローブ (FAM dye 標識) からなり、IL-1 α 、P2Y₆ 受容体及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、Assay ID : Hs99999028_m1、Hs00602548_m1 及び Hs99999905_m1 をそれぞれ使用した。反応条件は、95°C (15 秒) で変性させた後、50°C (2 分)、95°C (10 分) を 40 サイクル行い、60°C (1 分) で伸長反応させた。各遺伝子発現は GAPDH で標準化した。

表3 P2Y受容体とGAPDHのプライマー配列

Gene		Primer sequences	Product size (bp)
P2Y ₁	F	5'-GGTCTAGCAAGTCTCAACAG-3'	359
	R	5'-AAGCTAAGTGTGGATGTGGG-3'	
P2Y ₂	F	5'-TTGCCGTCATCCTTGTCTGT-3'	433
	R	5'-CTGCCCAACACATCTTCTAT-3'	
P2Y ₄	F	5'-TGTCTTTTCCTCACCTGCA-3'	440
	R	5'-AGTAAATGGTGCGGGTGATG-3'	
P2Y ₆	F	5'-CACATCACCAAGACAGCCTA-3'	340
	R	5'-TCTTAACTCCATGCCCAGCT-3'	
P2Y ₁₁	F	5'-AGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGTT-3'	369
	R	5'-ACGGTTTAGGGGCGGCTGTGGCATT-3'	
P2Y ₁₂	F	5'-GTGTCAAGTTACCTCCGTCA-3'	274
	R	5'-ATGCCAGACTAGACCGAACT-3'	
P2Y ₁₃	F	5'-CCTTTCAAATCCTCTCTGACTC-3'	266
	R	5'-TCCTTGTTGCTCAAGATCGT-3'	
P2Y ₁₄	F	5'-CTCTGCCGTGCTCTTCTACGTCAA-3'	275
	R	5'-TTGATGCTTTGTGCCACTTCCGT-3'	
GAPDH	F	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	983
	R	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	

[6] 免疫ブロット法

細胞を 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (Nacalai Tesque)、1 mg/ml leupeptin (Peptide Institute, Osaka, Japan)、1 mM sodium orthovanadate (Sigma) を添加した lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM sodium pyrophosphate、1mM β -glycerophosphate) で溶解した。Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて、抽出したタンパク質濃度を測定した。サンプルは同量の 2×sample buffer (100 mM Tris/HCl pH 6.8、4% sodium dodecylsulfate、0.2% bromophenol blue、20% glycerol、1% β -mercaptoethanol) と混合し、3 分間煮沸し、12.5% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (3 μ g of protein per lane) で分離した。Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Billerica, MA) に転写し、その membrane を blocking buffer (5% skim milk in 25 mM Tris、0.02% KCl、0.8% NaCl、pH 7.4 tris-buffered saline) 中で、1 時間 (室温)、インキュベートした後、4°C で一晩、一次抗体処置した。Membrane を洗浄し、二次抗体を 30 分間処置し、バンドを chemiluminescence method (LumiGLOTM Reagent and Peroxide, Cell Signaling, Danvers, MA) により可視化した。一次抗体は、Rabbit polyclonal anti-human P2Y₆ antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 及び Rabbit polyclonal anti-human β -actin antibody (Cell Signaling) を使用し、anti-rabbit IgG HRP linked

antibody (Cell Signaling) を二次抗体として使用した。

[7] アンチセンス処置

P2Y₆受容体タンパク質に対するアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレチドはホスホロチオエート修飾したオリゴヌクレチドとして合成され、液体クロマトグラフィーにより精製した。アンチセンス及びセンスの配列は、それぞれ、5'-CATTGTCCCATTCCATGGC-3'及び 5'-GCCATGGAATGGGACAATG-3'とした。表皮角化細胞においては、オリゴヌクレオチド (0.5 μM) は FuGENE 6 (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) によりトランスフェクションされた (24 時間培養)。トランスフェクション後、培地交換して、さらに 24 時間培養した後、尿酸結晶 (200 μg/ml) で 24 時間刺激した。THP-1 細胞においては、PBS で 2 回洗浄した後、無血清の RPMI 1640 培地で培養した。2.5% oligofectamine (Invitrogen) とオリゴヌクレオチドを添加して 4 時間培養し、それから 4 倍量の完全培地を添加して、さらに一晩培養した。翌日、培地を OPTI-MEM 培地に交換した後、尿酸結晶 (100 μg/ml) で 6 時間刺激した。

[8] トランスフェクション

全てのトランスフェクションは Lipofectamin 2000 (Invitrogen) の取扱説明書

に従って行った。P2Y₆受容体の small interfering RNA (siRNA、M-004579-02-0005、Thermo Scientific Dharmacon、Massachusetts、MA) または negative control siRNA (D-001210-05-05、Thermo Scientific Dharmacon) を Lipofectamine 2000 とともに 30~50%コンフルエント (6 ウェルプレート) の表皮角化細胞に添加して 6 時間培養することによりトランスフェクトした。培地交換し、さらに 24 時間培養した後、尿酸結晶 (200 µg/ml) で 24 時間刺激した。刺激後、RT-PCR 及び免疫ブロットにより P2Y₆受容体の mRNA 及びタンパク発現をそれぞれ検討し、培養上清を回収して、上清中の IL-1α 及び IL-8/CXCL8 濃度を ELISA により測定した。

[9] 尿酸結晶誘発マウス炎症モデル

エアポーチはマウス (BALB/c、8 週齢、メス、Japan SLC、Hamamatsu、Japan) の背部に作製した。3 ml のフィルター滅菌した空気を 3 日間隔で 2 回、皮下に注入した。最初の空気注入から 7 日後に、1 ml の PBS に懸濁した尿酸結晶 (2 mg) または PBS のみをエアポーチ内に注入した。9 時間後に 1 ml の PBS によりエアポーチ内液を回収した。腹膜炎は 1 ml の PBS に懸濁した尿酸結晶 (1 mg) または PBS のみを腹腔内投与して誘発した。尿酸結晶の投与 6 時間後に 8 ml の PBS により腹腔内液を回収した。エアポーチモデル及び腹膜炎モデルのいずれにおいても、P2Y₆受容体の作用を解析するために、MRS2578 (5 µg) または溶媒 (PBS)

を尿酸結晶の注入 1 時間前に、エアポーチまたは腹腔内に投与した。回収液中の細胞は、anti-mouse CD16/CD32 mAb 2.4G2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を用いて Fc γ II/III 受容体をブロックした後に、FITC 標識 Ly-6G (BD Biosciences) で染色した。死細胞を除去するために、propidium iodide (PI) を添加した後、細胞を FACScan flow cytometer (FACS caliber, BD Biosciences) により解析した。好中球数は Ly-6G(+)/PI(-)の細胞数を測定することにより決定した。なお、全ての動物実験については、東京大学の部局動物実験委員会の承認を得て実施した。

[10] データ解析と統計

データは全て平均 \pm 標準誤差で示し、各実験については同一の実験を 2 回以上、実施して再現性を確認し、そのうちの 1 回の結果を代表例として示した。統計解析については、2 群間においては F 検定を実施した後、Student または Aspin-Welch の t 検定を用い、多群間においては Dunnett または Tukey の多重比較検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ をもって有意差とした。

IV 結果

[1] IL-1 α は表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症に中心的な役割を果たす

単球では、尿酸結晶により IL-1 β や IL-18 を含む様々な炎症性サイトカイン及びケモカインの産生が誘導されることが報告されている[2 - 4]。表皮角化細胞においても、尿酸結晶により IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 の産生が刺激濃度依存的に誘導された (図 1)。一方、可溶型の尿酸または尿酸分解酵素 (uricase) 処理した尿酸結晶では、表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 は誘導されなかった (図 2)。これらの結果から、単球だけでなく、表皮角化細胞においても尿酸結晶が炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を誘導することが示された。

尿酸結晶によって誘発される炎症において、IL-1 受容体が重要であることが知られているため[1]、次に、表皮角化細胞での尿酸結晶誘発の炎症反応における IL-1 受容体の重要性を検討した。IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) によって、尿酸結晶により誘導される表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は有意に抑制された (図 3A)。TNF- α も炎症誘発サイトカインであるが、抗 TNF- α 抗体と抗 TNF 受容体抗体のいずれも、TNF- α 刺激による IL-8/CXCL8 産生を抑制する濃度において、尿酸結晶により誘導される IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を阻害しなかった (図 3B)。これらの結果から、表皮角化細胞においても

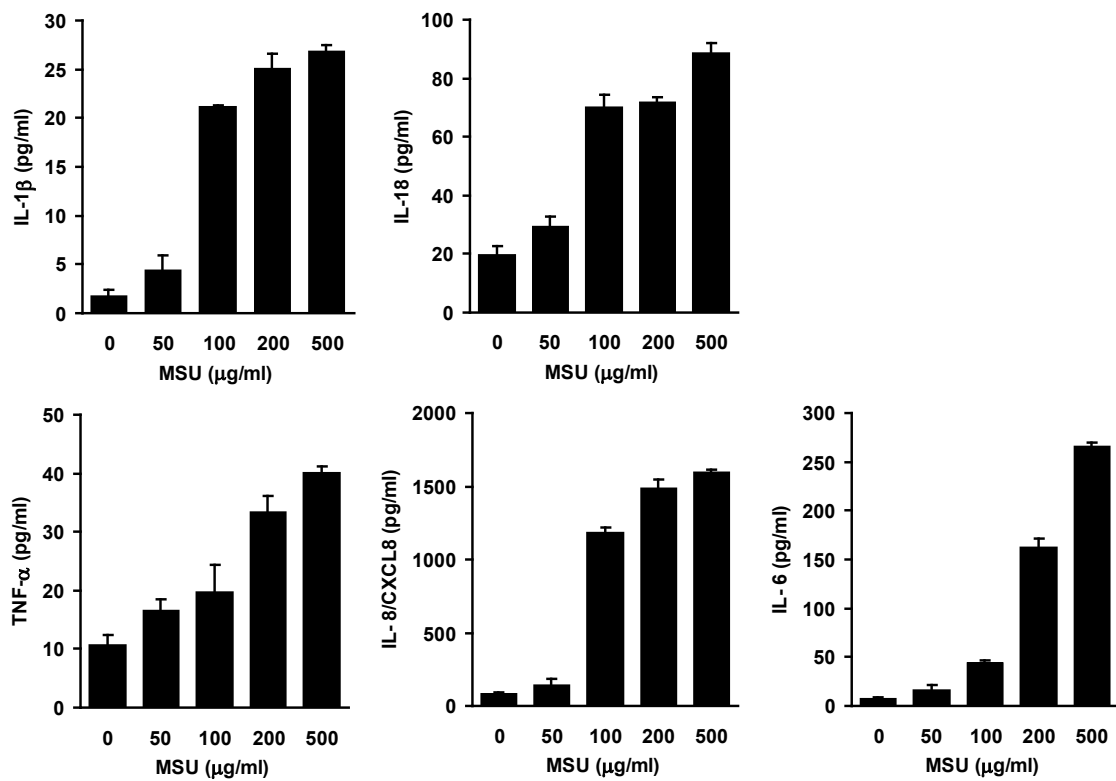


図 1

尿酸結晶刺激により表皮角化細胞から炎症性メディエーター産生が誘導される。

表皮角化細胞を各濃度の尿酸結晶（MSU）で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA により測定した。データは 3 または 4 ウェルの実験結果の平均±標準誤差で示す。

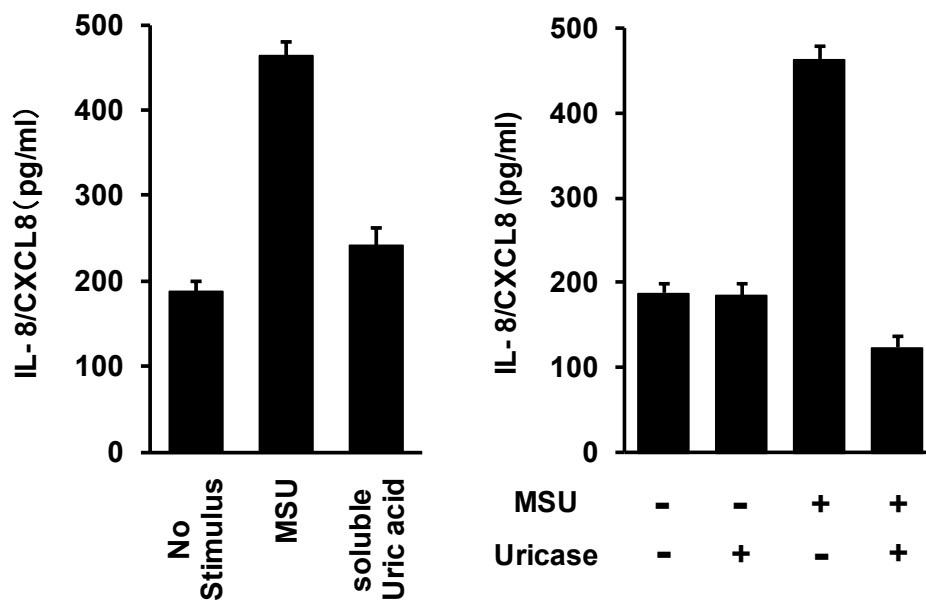


図 2

可溶型の尿酸及び uricase 処理された尿酸結晶では表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 産生は誘導されない。

表皮角化細胞を尿酸結晶 (200 $\mu\text{g/ml}$)、可溶型の尿酸 (200 $\mu\text{g/ml}$) 及び uricase 処理した尿酸結晶 (240 μg の尿酸結晶を 20 U uricase により 25 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間処理) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、培養上清中の IL-8/CXCL8 濃度を ELISA により測定した。データは 4 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。

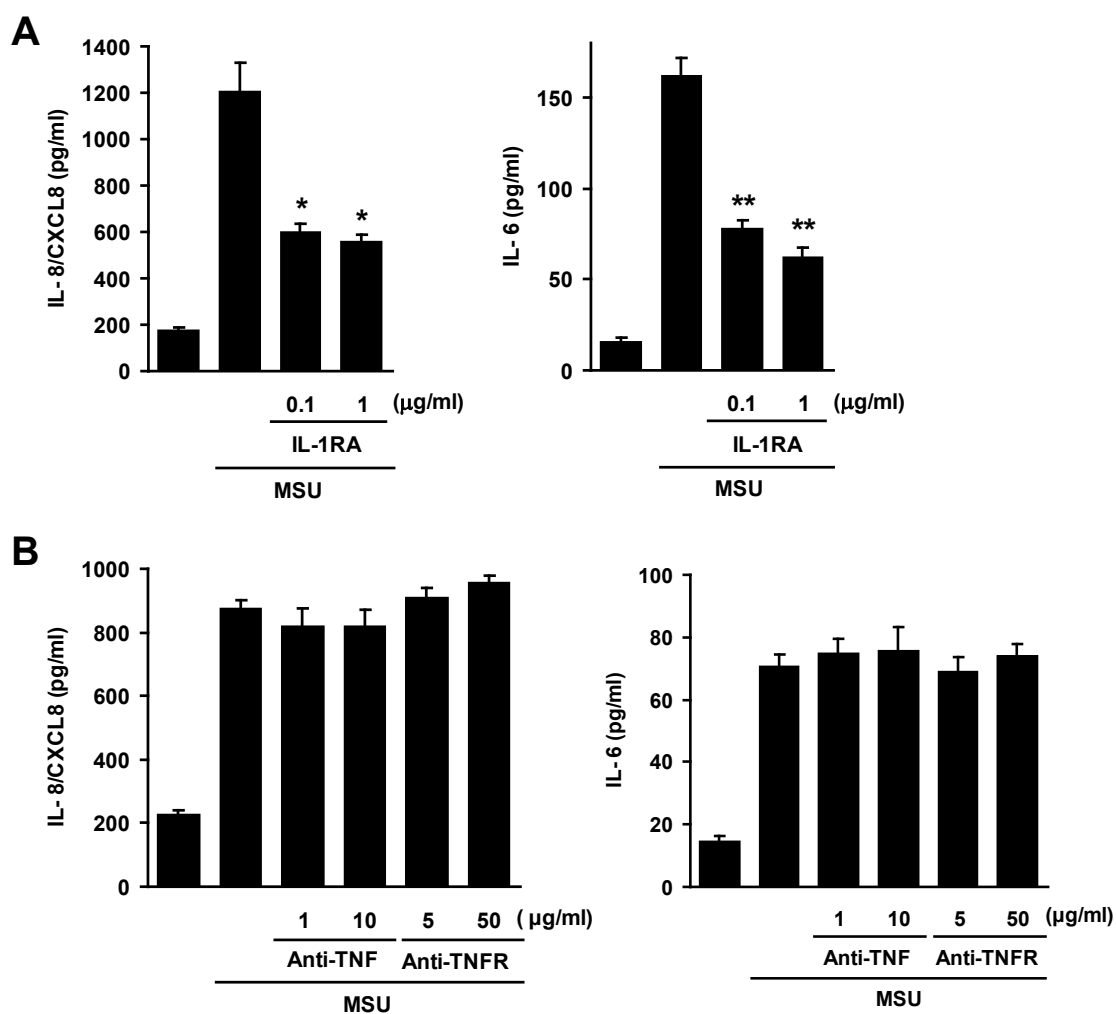


図 3

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は IL-1 により制御される。

A、B：表皮角化細胞を IL-1 受容体アンタゴニスト (A) 及び抗 TNF- α 抗体または抗 TNF 受容体抗体 (B) 存在下において尿酸結晶 (200 $\mu\text{g/ml}$) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 4 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。*、**；尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

IL-1 が中心的な役割を担うことが示された。単球やマクロファージ、樹状細胞では IL-1 のなかで主に IL-1 β が産生されるが、表皮角化細胞を含む上皮細胞からは主に IL-1 α が産生される。そのため、尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 産生について検討したところ、IL-1 β よりも多量の IL-1 α が産生されることが確認された (図 4A)。また、尿酸結晶刺激によって IL-1 α 分泌だけでなく、細胞中の IL-1 α mRNA 量も刺激濃度及び時間依存的に増加した (図 4B)。さらに、抗 IL-1 β 抗体では IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生が抑制されない一方で、抗 IL-1 α 抗体はこれらの産生を有意に抑制した (図 4C)。また、IL-1 β の産生は未活性型 (Pro IL-1 β) から活性型 (IL-1 β) への変換酵素である caspase-1 により制御されているが、その caspase-1 阻害剤である z-YVAD は尿酸結晶による IL-1 β 産生を阻害するものの、IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を抑制しなかった (図 4D)。従って、表皮角化細胞においては、尿酸結晶刺激によって誘導される IL-8/CXCL8 や IL-6 といった二次的なサイトカイン産生には、IL-1 α の IL-1 受容体への結合を介したシグナルが重要であることが示された。

[2] 表皮角化細胞において尿酸結晶は P2Y 受容体を介して炎症を誘導する

次に、どのようにして尿酸結晶が表皮角化細胞を刺激するかについて検討した。表皮角化細胞はメラノソームを貪食できることから貪食能は有するが[14]、

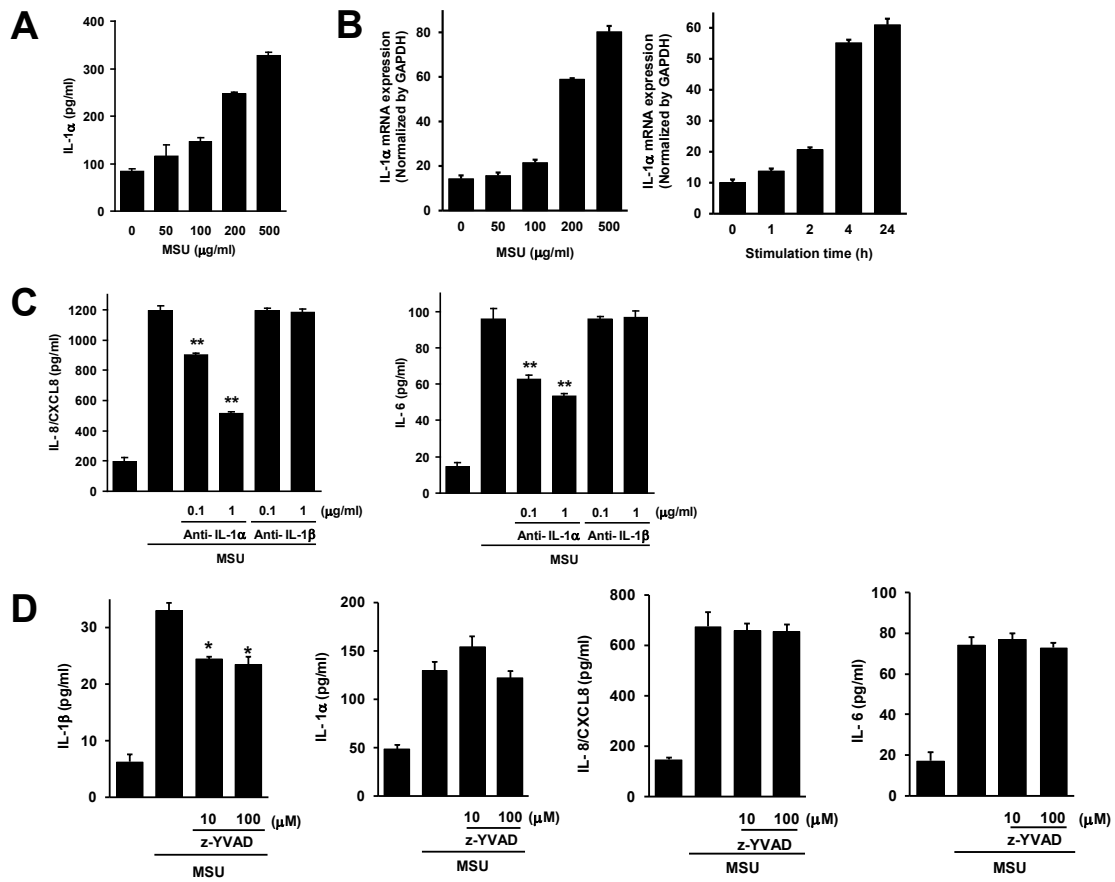


図 4

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は IL-1α により制御される。

A : 表皮角化細胞を各濃度の尿酸結晶で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1α 濃度を ELISA により測定した。B : 表皮角化細胞を各濃度の尿酸結晶で 24 時間刺激、または 200 μg/ml 尿酸結晶で各時間刺激した後に細胞を回収し、細胞中の IL-1α mRNA 量を測定した。C、D : 表皮角化細胞を抗 IL-1α 抗体または抗 IL-1β 抗体 (C) 及び caspase-1 阻害剤 z-YVAD (D) 存在下において尿酸結晶 (200 μg/ml) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-8/CXCL8、IL-6、IL-1β 及び IL-1α 濃度を ELISA により測定した。データは 3 または 4 ウェルの実験結果の平均±標準誤差で示す。*、** ; 尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった (p<0.05、p<0.01)。

電子顕微鏡観察では表皮角化細胞による尿酸結晶の貪食像は確認できず(図 5A)、貪食阻害剤である cytochalasin D 処置によっても IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は抑制されなかった(図 5B)。そのため、表皮角化細胞は、貪食細胞とは異なるメカニズムにより尿酸結晶を認識しているのではないかと考えた。そこで、表皮角化細胞において、尿酸結晶による反応に関与する細胞膜受容体の特定を試みた。IL-1 受容体アンタゴニストは尿酸刺激による IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は抑制するものの、IL-1 α 産生は抑制しなかったため(図 6A)、IL-1 受容体は尿酸結晶を認識する受容体ではないことが示された。次に、尿酸が adenosine triphosphate (ATP) や guanosine triphosphate (GTP)、核酸といったプリン体の分解物であること、及び P2 受容体が ATP や adenosine diphosphate (ADP)、uridine triphosphate (UTP)、uridine diphosphate (UDP) といった細胞外のヌクレオチドを認識する受容体であることから[13]、尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からのサイトカイン産生における P2 受容体の関与を検討した。単球において、尿酸結晶により誘導される IL-1 β 産生が P2X₇ 受容体アンタゴニストにより抑制されることが報告されているため[15]、我々はまず P2X₇ 受容体に着目した。しかしながら、P2X₇ 受容体特異的アンタゴニストである KN-62 は尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を抑制しなかった(図 6B)。次に、P2 受容体アンタゴニストである suramin 及び P2Y 受容体アンタゴニスト

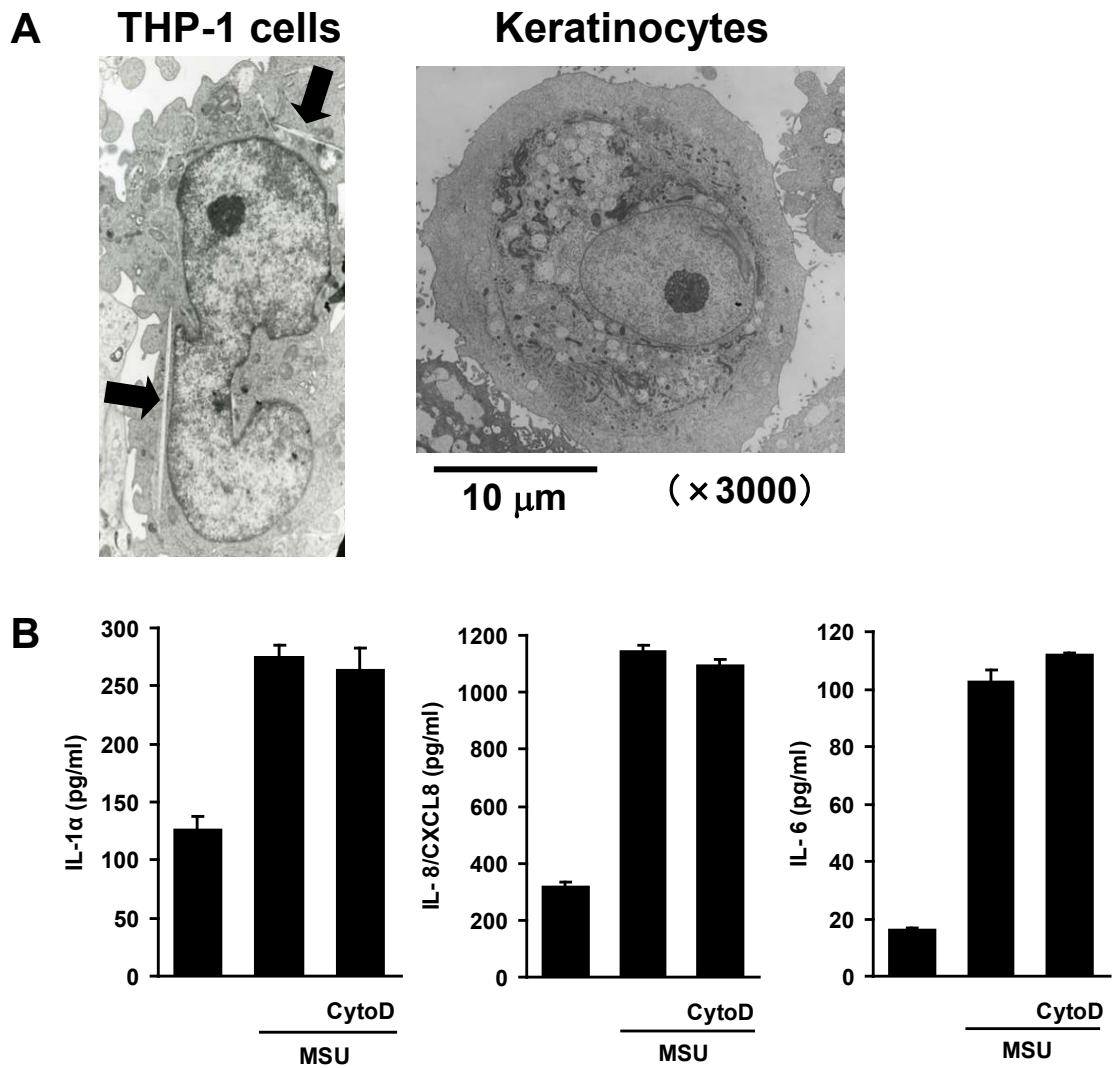


図 5

尿酸結晶刺激によるヒト表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は食食作用に依存しない。

A : THP-1 細胞また表皮角化細胞を尿酸結晶 (100 または 400 $\mu\text{g/ml}$) で 2 または 24 時間刺激した後に細胞を回収した。細胞を固定した後、電子顕微鏡により観察した。結果は各細胞を 100 個ずつ観察したうちの代表例を示す。矢印は尿酸結晶を示す。B : 表皮角化細胞を食食阻害剤 cytochalasin D (CytoD、5 μM) 存在下において尿酸結晶 (200 $\mu\text{g/ml}$) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 3 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。

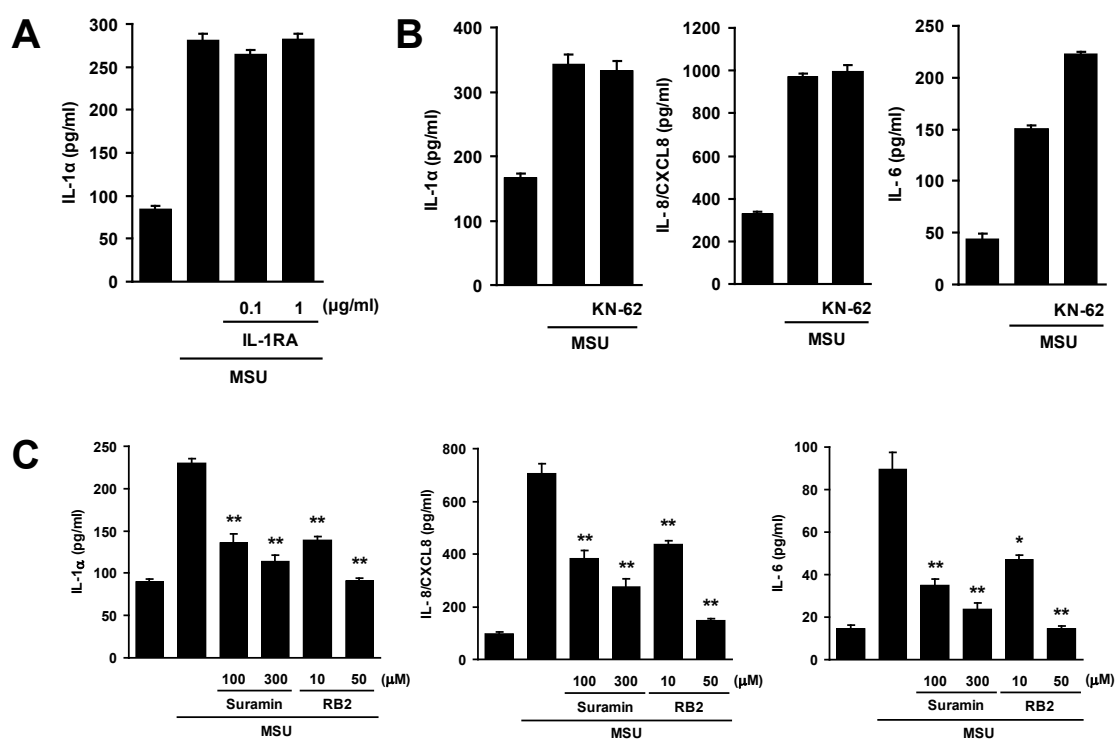


図 6

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は P2Y 受容体により制御される。

表皮角化細胞を IL-1 受容体アンタゴニスト (A)、P2X₇ 受容体アンタゴニスト KN-62 (1 μ M, B)、P2 受容体アンタゴニスト Suramin (C) または P2Y 受容体アンタゴニスト RB2 (C) 存在下において尿酸結晶 (200 μ g/ml) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 4 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。*、** ; 尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

である RB2 の作用を検討した。なお、suramin は P2X₇ 受容体に対する阻害作用はない[16]。まず、これらのアンタゴニストに細胞傷害性がないことを MTT アッセイにより確認後に検討した結果、suramin 及び RB2 は IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生をほぼ完全に抑制した (図 6C)。これらの結果から、表皮角化細胞における尿酸結晶刺激は P2Y 受容体により制御されていることが明らかとなった。

[3] 表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症は P2Y₆ 受容体により制御される

表皮角化細胞において尿酸結晶刺激に対して反応性のある P2Y 受容体を特定するために、まず、表皮角化細胞における P2Y 受容体の発現を検討した。RT-PCR の結果、表皮角化細胞には P2Y₁、P2Y₂、P2Y₆、P2Y₁₁ 受容体の発現が認められ、尿酸結晶刺激により、P2Y₆、P2Y₁₄ 受容体の発現が増加し、その他のサブタイプの発現に変化はなかった (図 7A)。これらの受容体のなかで、尿酸刺激によって発現が増加すること、及び suramin と RB2 は P2Y₆ 受容体に対するアンタゴニスト作用を有する一方で、P2Y₁₄ 受容体に対するアンタゴニスト作用はないことから[13]、我々は P2Y₆ 受容体に注目した。P2Y₆ 受容体は表皮角化細胞に定常的に発現しており、尿酸結晶刺激により mRNA 及びタンパク質レベルで発現が増加することをリアルタイム RT-PCR 及び免疫ブロットにより確認した (図 7B、C)。尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からのサイトカイン産生に対する P2Y₆

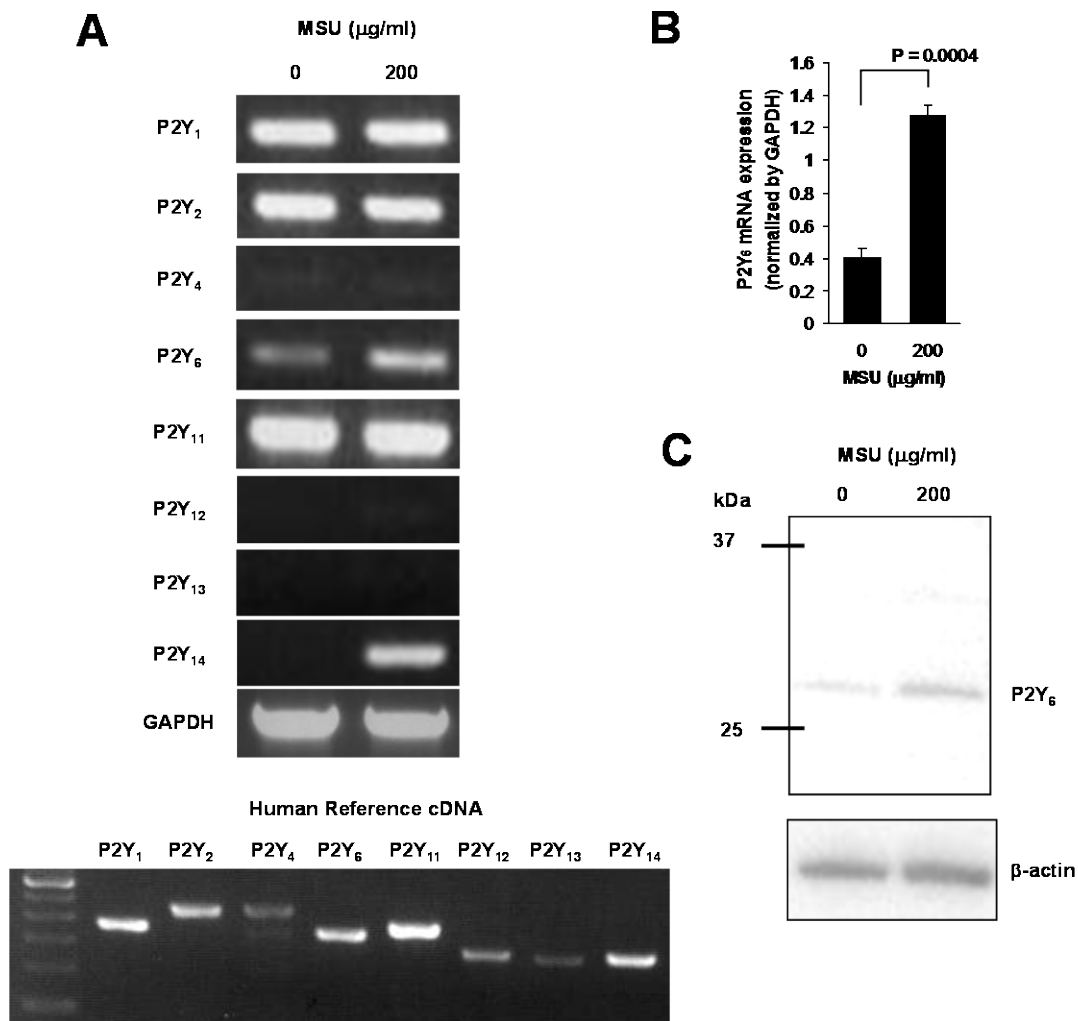


図 7

尿酸結晶刺激により表皮角化細胞における P2Y₆ 受容体発現が増加する。

A : 無刺激及び尿酸結晶 (200 µg/ml) 刺激下で 24 時間培養した際の表皮角化細胞中の P2Y 受容体 mRNA 発現を比較した。Human Reference cDNA を P2Y 受容体発現のポジティブコントロールとして使用した。B : 無刺激及び尿酸結晶 (200 µg/ml) 刺激下で 24 時間培養した際の表皮角化細胞中の P2Y₆ 受容体 mRNA 量を real-time RT-PCR により測定した。データは 3 ウェルの実験結果の平均±標準誤差で示し、P 値は Student の *t* 検定により算出した。C : 無刺激及び尿酸結晶 (200 µg/ml) 刺激下で 24 時間培養した際の表皮角化細胞中の P2Y₆ 受容体タンパク質発現を免疫ブロット法により比較した。

受容体の役割を検討するために、P2Y₆受容体特異的アンタゴニストである MRS2578[17]、及び P2Y₆受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用した。MRS2578 は尿酸結晶により誘導される表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を有意に阻害した (図 8)。P2Y₆受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドは、P2Y₆受容体のタンパク質発現を減少させ (図 9A)、表皮角化細胞からのサイトカイン産生を有意に抑制した (図 9B)。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験を補完するために P2Y₆受容体 siRNA の作用も検討した。P2Y₆受容体 siRNA は mRNA 及びタンパク質レベルで P2Y₆受容体発現を抑制し (図 10A、B)、表皮角化細胞からの IL-1 α 及び IL-8/CXCL8 産生を有意に抑制した (図 10C)。P2Y₆受容体が活性化することにより、細胞内で phospholipase C (PLC) が活性化することが知られているが[13]、この点と一致して、PLC 阻害剤である U-73122 は尿酸結晶により誘導される表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を有意に阻害した (図 11)。この際、U-73122 の不活性化型である U-73343 では阻害作用は認められなかった (図 11)。これらの結果より、表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症性サイトカイン及びケモカイン産生において、P2Y₆受容体 - PLC 経路が重要な役割を果たすことが示された。

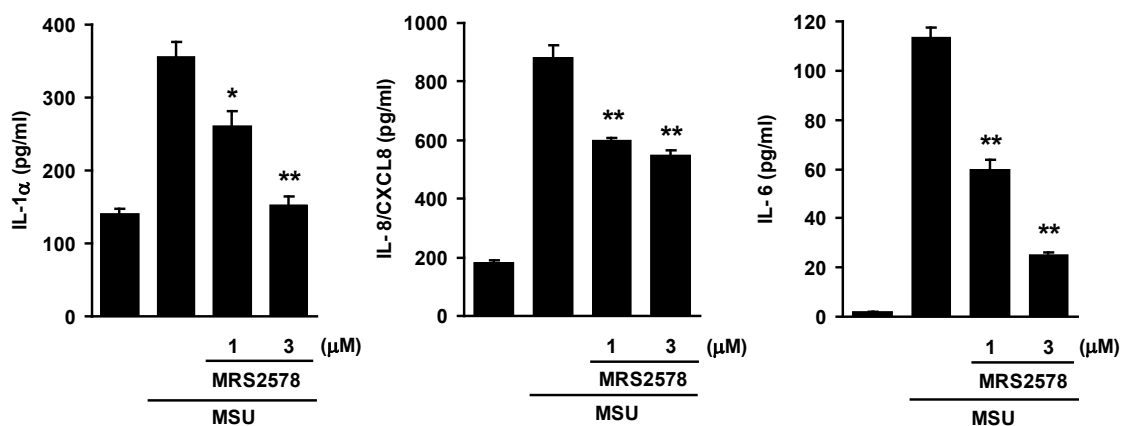


図 8

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1α、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は P2Y₆ 受容体アンタゴニストにより抑制される。

表皮角化細胞を P2Y₆ 受容体アンタゴニスト MRS2578 存在下において尿酸結晶 (200 μg/ml) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1α、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 4 ウェルの実験結果の平均±標準誤差で示す。*、** ; 尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった (p<0.05、p<0.01)。

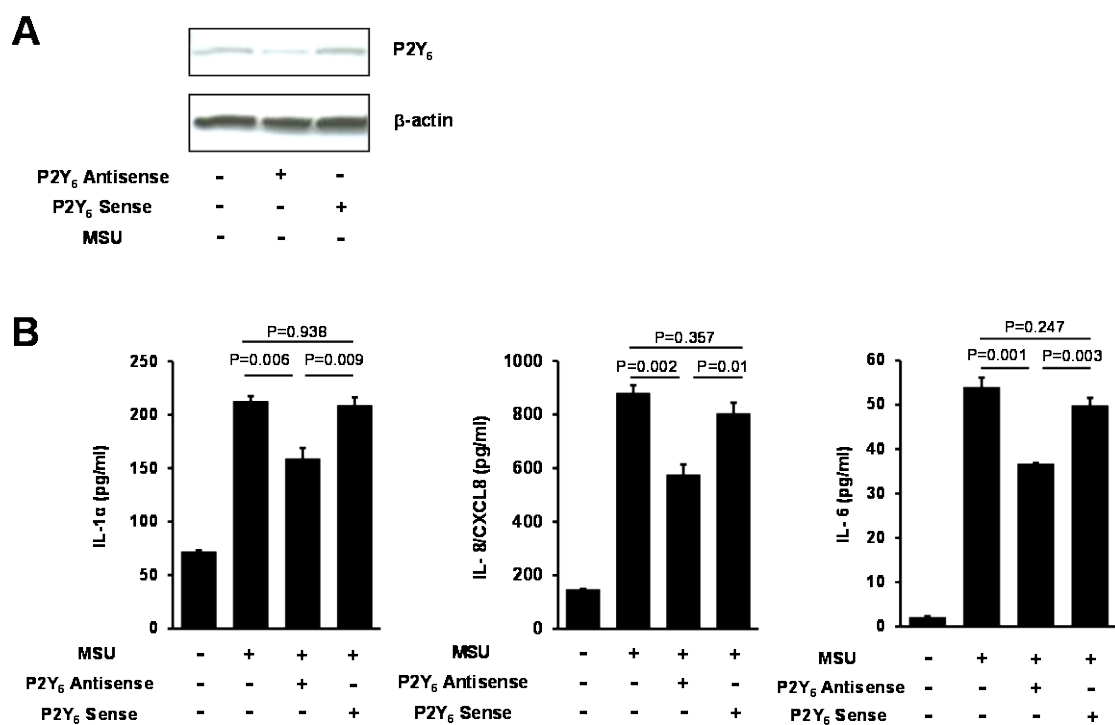


図 9

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は P2Y₆ 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドにより抑制される。

A：表皮角化細胞を P2Y₆ 受容体アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチド処理した際の P2Y₆ 受容体タンパク質発現。B：表皮角化細胞を P2Y₆ 受容体アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチド処理した後に尿酸結晶（200 μ g/ml）で 24 時間刺激した。刺激後、培養上清を回収し、上清中の IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 3 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。

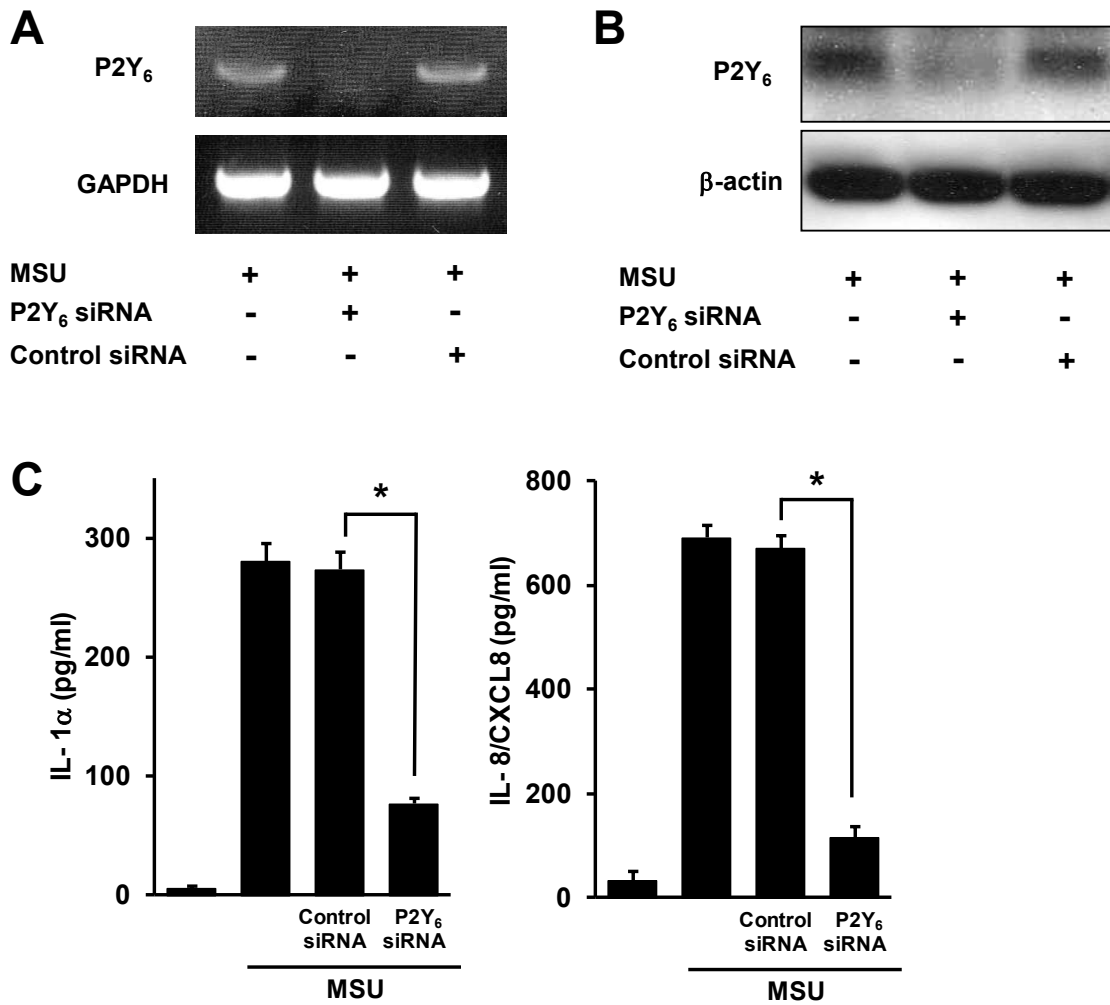


図 10

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は P2Y₆ 受容体 siRNA により抑制される。

A、B : P2Y₆ 受容体またはコントロール siRNA をトランスフェクションした表皮角化細胞における P2Y₆ 受容体 mRNA (A) 及びタンパク質 (B) 発現。C : 表皮角化細胞をコントロール siRNA または P2Y₆ 受容体 siRNA で処理した後に尿酸結晶 (200 μ g/ml) で 24 時間刺激した。刺激後、培養上清を回収し、上清中の IL-1 α 及び IL-8/CXCL8 濃度を ELISA により測定した。データは 3 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。* ; p<0.05。

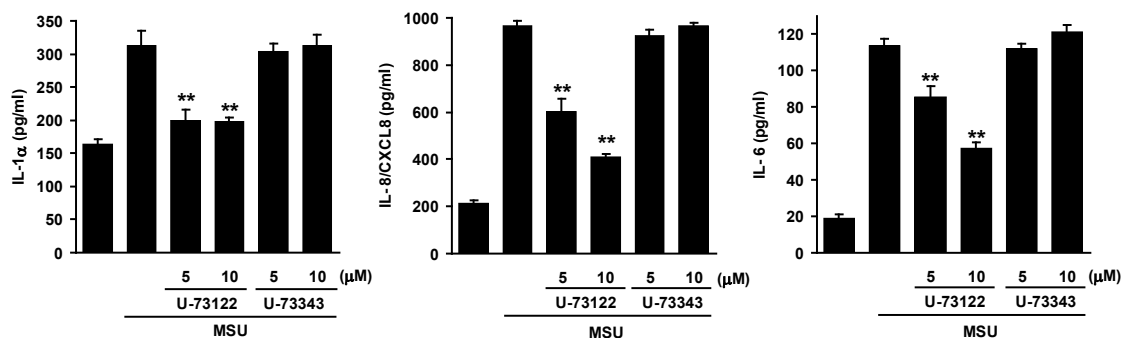


図 11

尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は phospholipase C 阻害剤により抑制される。

表皮角化細胞を phospholipase C 阻害剤 U-73122 またはその不活性型 U-73343 存在下において尿酸結晶 (200 $\mu\text{g/ml}$) で 24 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 濃度を ELISA により測定した。データは 4 ウェルの実験結果の平均 \pm 標準誤差で示す。** ; 尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった ($p<0.01$)。

[4] THP-1 細胞における尿酸結晶誘発の炎症は P2Y₆ 受容体により制御される

痛風の急性炎症では、単球が尿酸結晶を取り込むことにより、細胞内で NALP3 インフラマゾームにより認識され、caspase-1 を活性化した結果、IL-1 β の産生が亢進することが報告されている[7]。実際に、尿酸結晶刺激により、表皮角化細胞からの IL-1 β 産生と比較して、多量の IL-1 β が THP-1 細胞から産生された。そこで、この単球からの IL-1 β 産生においても P2Y₆ 受容体が重要であるかを検討した。THP-1 細胞における P2Y₆ 受容体発現は尿酸結晶刺激により増加した (図 12A)。Caspase-1 特異的阻害剤である z-YVAD は THP-1 細胞における尿酸結晶刺激による IL-1 β 産生を完全に抑制したことから (図 12B)、既報と一致して、この IL-1 β 産生が caspase-1 の活性化に依存することを確認した。P2Y₆ 受容体特異的アンタゴニストである MRS2578 もまた THP-1 細胞における尿酸結晶誘発の IL-1 β 産生をほぼ完全に抑制した (図 12B)。さらに、P2Y₆ 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチド処置により、THP-1 細胞における尿酸結晶誘発の IL-1 β 産生は有意に抑制され (図 12C)、また、U-73122 によっても IL-1 β 産生は有意に抑制された (図 12D)。以上の結果より、表皮角化細胞だけでなく、単球においても、尿酸結晶誘発の炎症反応が P2Y₆ 受容体 - PLC 経路により制御されていることが示された。

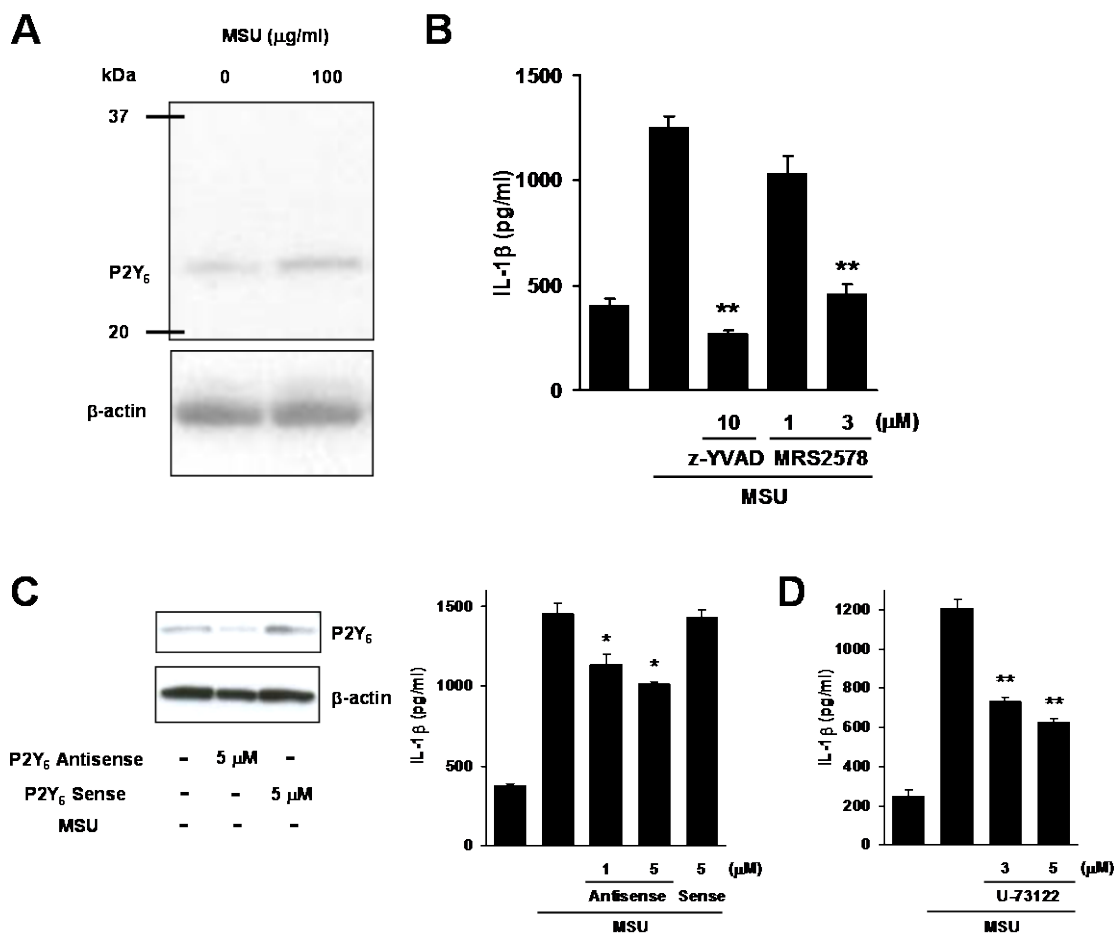


図 12

THP-1 細胞においても尿酸結晶による炎症は P2Y₆ 受容体により制御される。

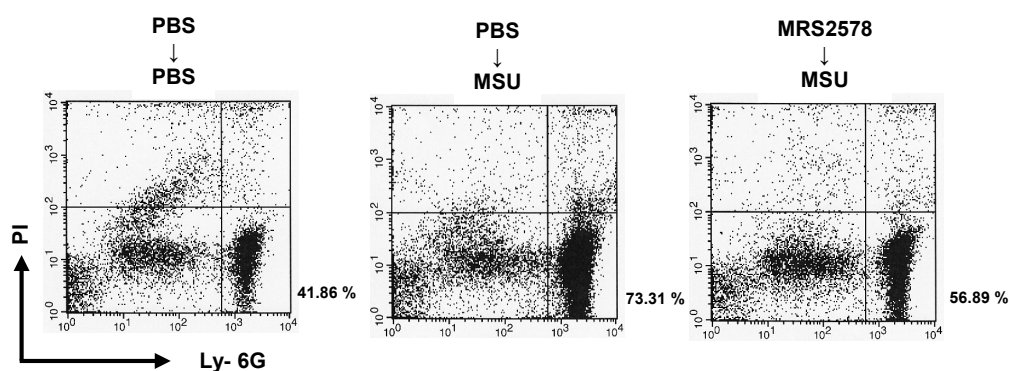
A : 無刺激及び尿酸結晶 (100 µg/ml) 刺激した際の THP-1 細胞中の P2Y₆ 受容体タンパク質発現を免疫ブロット法により比較した。B : THP-1 細胞を caspase-1 阻害剤 z-YVAD または P2Y₆ 受容体アンタゴニスト MRS2578 存在下において尿酸結晶 (100 µg/ml) で 6 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1β 濃度を ELISA により測定した。C : THP-1 細胞を P2Y₆ 受容体アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチド処理した際の P2Y₆ 受容体タンパク質発現。また、P2Y₆ 受容体アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチド処理した後に尿酸結晶 (100 µg/ml) で 6 時間刺激した。刺激後、培養上清を回収し、上清中の IL-1β 濃度を ELISA により測定した。D : THP-1 細胞を phospholipase C 阻害剤 U-73122 存在下において尿酸結晶 (100 µg/ml) で 6 時間刺激した後に培養上清を回収し、上清中の IL-1β 濃度を ELISA により測定した。

データは 3 または 4 ウェルの実験結果の平均±標準誤差で示す。*、** ; 尿酸結晶刺激のみと比較して有意であった (p<0.05、p<0.01)。

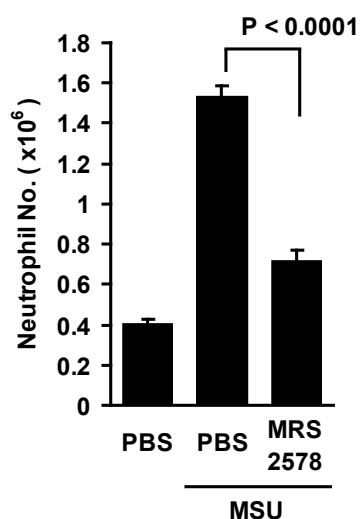
[5] P2Y₆受容体は *in vivo* で尿酸結晶誘発の炎症を制御する

最後に、我々は *in vivo* でも P2Y₆受容体が尿酸結晶誘発の炎症に対して反応性を有するかを検討した。マウスエアポートモデルにおいて、尿酸結晶によりエアポーチ内に好中球が浸潤することが報告されている[18]。エアポーチ内に浸潤した好中球数は、好中球マーカーである Ly-6G を染色することにより測定した。検討の結果、尿酸結晶によりエアポーチ内の好中球数が増加し、MRS2578 によって、その好中球浸潤は有意に抑制された (図 13A、B)。我々はまた尿酸結晶誘発のマウス腹膜炎モデルを用いても MRS2578 の作用を検討した。その理由としては、以前の報告から、この 2 つのモデルで、薬剤の反応性に違いがあったためであるが[1, 18]、尿酸結晶の腹腔内投与により認められる好中球浸潤に対しても MRS2578 の有意な抑制作用が確認された (図 13C)。これらの結果から、*in vivo* においても P2Y₆受容体が尿酸結晶誘発の炎症反応に重要な役割を果たすという結論に至った。

A Air pouch model



B Air pouch model



C Peritonitis model

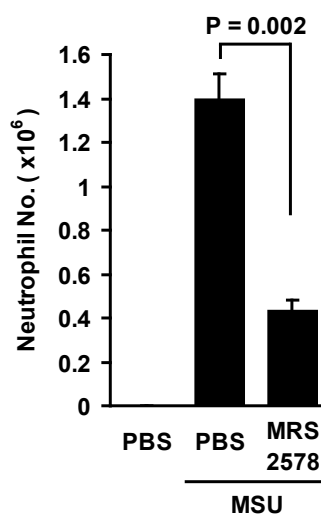


図 13

尿酸結晶による好中球浸潤 (in vivo) は $P2Y_6$ 受容体アンタゴニストにより抑制される。

A: エアポーチモデルから回収された細胞における Ly-6G 発現細胞のドットプロット (代表例)。Ly-6G 陽性 PI 陰性細胞が好中球を示す。B、C: $P2Y_6$ 受容体アンタゴニスト MRS2578 (5 μg) 処理によるエアポーチモデル (B) 及び腹膜炎モデル (C) における好中球数。データは平均 \pm 標準誤差 (n=5 または 3) で示す。

V 考察

今回の研究における中心的な結果の一つとして、尿酸結晶により誘導される炎症性サイトカイン及びケモカインの産生が、表皮角化細胞と単球のいずれにおいても、Gタンパク共役型 P2Y₆ 受容体 - PLC シグナル経路により制御されていることを示した。これまでにいくつかの細胞表面受容体が尿酸結晶によって誘発される炎症に関わることが報告されており、それらはマクロファージにおける Toll-like receptor (TLR) 2/4 や CD14[18、19]、好中球における CD16 や補体受容体[20]、血小板におけるインテグリン (GPIIb/IIIa) [21] などである。一方、Ng らは最近、樹状細胞では、細胞膜受容体ではなく、尿酸結晶の細胞膜への直接的な結合が重要であることを報告している[22]。今回の研究において、我々は尿酸結晶により誘発される炎症反応における P2 受容体の関与を検討した。P2 受容体は分子構造と細胞内シグナル伝達経路にもとづき、P2X と P2Y 受容体に分類される。P2X 受容体はイオンチャネル型であり、P2X₁~X₇ の 7 種類のサブタイプが存在する。P2Y 受容体は Gタンパク共役型受容体であり、ヒトでは P2Y₁、Y₂、Y₄、Y₆、Y₁₁~Y₁₄ の 7 種類のサブタイプがある。P2Y₁、Y₂、Y₄、Y₆、Y₁₁ 受容体は G_{q/11} タンパクを介して PLC を活性化し、P2Y₁₂、Y₁₃、Y₁₄ 受容体は G_i タンパクを介して adenylate cyclase を活性化する[13]。様々な組織に広く分布する

P2Y 受容体の活性化は、多種類の細胞で増殖や分化、炎症に関連する。表皮角化細胞では P2Y 受容体のなかで、P2Y₂受容体が細胞増殖[23]や創傷部位での遊走阻害[24]に関わることが報告されている。さらに、ATP や UTP は P2Y 受容体を介して IL-6 産生を誘導し[25]、ATP は interferon- γ で刺激された表皮角化細胞からの IL-8/CXCL8 産生を増加させる[26]。表皮角化細胞における P2Y₆受容体発現については不確定であったものの[27]、我々は、尿酸結晶で刺激された表皮角化細胞において、mRNA 及びタンパク質レベルで P2Y₆受容体発現が増加すること、さらには、尿酸結晶により誘導される IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生が P2Y₆ 受容体アンタゴニスト及びアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制されることを示した。これらの結果は、尿酸結晶刺激下において、表皮角化細胞に機能的な P2Y₆ 受容体が発現することを強く示唆するものであり、さらに、これと一致して、肺や小腸の上皮細胞では、P2Y₆ 受容体を介した IL-8/CXCL8 産生が報告されている[28、29]。

単球も機能的な P2Y₆ 受容体を発現し、THP-1 細胞では、P2Y₆ 受容体の内因性リガンドである UDP によって、IL-8/CXCL8 産生が誘導され[30]、他の単球細胞株である U937 では、P2Y₆ 受容体を恒常的に発現させた際に、UDP 刺激によって、TNF- α 、IL-8/CXCL8、IL-1 β の mRNA 発現が増加する[31]。また、UDP は P2Y₆ 受容体依存的にミクログリアにおける貪食作用を促進することから[32]、

単球による尿酸結晶の貪食は P2Y₆ 受容体シグナルを介する可能性がある。実際、好中球による尿酸結晶の貪食が P2Y₆ 受容体アンタゴニスト (MRS2578) により阻害されることが、最近報告されており [33]、この可能性を支持するものと考えられる。尿酸結晶刺激により単球から分泌される IL-1 β は急性の痛風炎症を誘発するが、我々の今回の研究から、尿酸結晶で刺激された単球からの IL-1 β 産生に P2Y₆ 受容体が重要な役割を果たすことが示された。

さらに、我々は、P2Y₆ 受容体アンタゴニストにより、エアポーチ及び腹膜炎モデルの両方で尿酸結晶誘発の好中球浸潤が抑制されることを示した。我々の結果は、P2Y₆ 受容体が *in vivo* における好中球性の痛風炎症を制御する中心的な受容体であることを明確に示すものであると考える。P2Y₆ 受容体については、炎症性大腸炎患者の腸に浸潤した T 細胞において、その発現が増加していることが報告されており、疾患への関与が考えられる [34]。痛風においては、P2Y₆ 受容体の関与を示唆する報告はないものの、最近の報告では、痛風における尿酸結晶による好中球の活性化に protein kinase C (PKC) が重要であることが報告されている [35]。P2Y₆ 受容体は G_{q/11} タンパク共役型であり、PLC の活性化を介して、PKC の活性化を誘導する。したがって、この報告は痛風における P2Y₆ 受容体の関与を示唆する可能性がある。我々は、P2Y₆ 受容体の関与のメカニズムを説明するために、いくつかの検討を行った。最初に、P2Y₆ 受容体が尿酸結

晶を直接的に認識する受容体である可能性を検討した。尿酸結晶が直接的に P2Y₆ 受容体に結合するかを検討するため、P2Y₆ 受容体をトランスフェクションした 1321N 星状細胞腫を用いて、尿酸結晶刺激による細胞内カルシウム動態を評価したが、尿酸結晶刺激直後にカルシウム流入は検出されなかったため (data not shown)、尿酸結晶は P2Y₆ 受容体に直接的には結合していないことが示唆された。次に、UDP 刺激によって肺上皮細胞から IL-8/CXCL8 産生が誘導されることから[28]、尿酸結晶刺激により産生される UDP が P2Y₆ 受容体を介してサイトカイン産生に関与する可能性を検討した。しかしながら、UDP (1、10、100、1000 μM) は表皮角化細胞からの IL-1α、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生を誘導せず、THP-1 細胞からの IL-1β 産生も誘導しなかった (data not shown)。我々はまた、尿酸結晶刺激により分泌される ATP が表皮角化細胞を活性化する可能性を考えたが、ATP は表皮角化細胞からの IL-1α 及び IL-8/CXCL8 産生を誘導しなかったため (data not shown)、この可能性も否定された。これらの結果から、尿酸結晶が P2Y₆ 受容体シグナル経路を介して細胞に作用するメカニズムは未知のままであり、今後、その正確なメカニズムを明らかにするための更なる検討が必要である。この P2Y₆ 受容体を介した尿酸結晶刺激による表皮角化細胞からの炎症性サイトカイン産生メカニズムの解明においては、P2Y₆ 受容体の活性化因子 (アゴニスト) の特定が重要であると考えられる。活性化因子については、我々の

実験結果から ATP や内因性アゴニストである UDP の関与は低いと考えられるものの、UTP など、他の細胞外ヌクレオチドが関与している可能性もある。また、細胞外ヌクレオチドとは異なる活性化因子が P2Y₆ 受容体に結合する可能性も考えられる。実際、プロスタグランジン E₂ グリセロールエステルが P2Y₆ 受容体に対して内因性アゴニストとして作用することが最近報告されており[36]、既知の活性化因子とは異なるものが関与する可能性も考えられる。また、P2Y₆ 受容体とともに尿酸結晶刺激により mRNA 発現増加が認められた P2Y₁₄ 受容体 (図 7) については、表皮角化細胞から IL-1 α 及び IL-6 産生に関与せず、IL-8/CXCL8 産生にのみ関与することを我々は確認しており[37]、P2Y₁₄ 受容体の関与も併せて考慮することで、より正確なメカニズム解明に繋がると考えられる。

次に、今回の研究において、尿酸結晶によりヒト表皮角化細胞から様々な炎症性サイトカイン及びケモカインが誘導され、その中で IL-1 α - IL-1 受容体経路が重要であることも示された。最近、尿酸結晶が単球において NALP3 インフラマゾームの形成を介し、caspase-1 を活性化することによって IL-1 β 産生が誘導され、その後、IL-1 受容体 - Myd88 経路を介して TNF- α 、IL-6 及び IL-8/CXCL8 の産生を誘導することが報告されている[1, 7]。Watanabe らは表皮角化細胞にも NALP3 インフラマゾーム形成に必要な全ての構成要素が存在し、皮膚刺激性物質や紫外線によって、NALP3 インフラマゾームが形成され、IL-1 β が産生される

ことを示している[38]。今回の研究では、尿酸結晶により、表皮角化細胞から IL-1 β が産生されたが、その産生量は単球と比較して極めて少量であった。さらに、caspase-1 阻害剤である z-YVAD により IL-1 β 産生は抑制されたが、IL-1 α 、IL-8/CXCL8 及び IL-6 産生は抑制されなかった。これらの結果から、表皮角化細胞においては、インフラマゾームの関与なしに炎症性シグナルを促進するために P2Y₆ 受容体によって活性化されるシグナル経路の存在が示唆される。一方、尿酸結晶により刺激された表皮角化細胞から産生される多量の IL-8/CXCL8 及び IL-6 は IL-1 受容体依存的に産生される。そこで、我々は IL-1 β と受容体を共有する IL-1 α に着目した。

IL-1 α は表皮角化細胞から分泌される IL-1 のうち主要なサブタイプであり、表皮に感染や傷害があった際に、即座に分泌される[39]。表皮角化細胞から産生される IL-1 α はオートクライン経路により他の炎症性サイトカイン及びケモカイン産生を誘導できる[39、40]。マウス表皮における IL-1 α の強制過剰発現により炎症性皮疹が形成されることから、IL-1 α が皮膚炎症を誘発できることが示唆される[41]。尿酸結晶により表皮角化細胞から多量の IL-1 α が産生され、IL-1 受容体アンタゴニストや抗 IL-1 α 中和抗体により IL-6 及び IL-8/CXCL8 産生が有意に抑制されることから、表皮角化細胞における尿酸結晶誘発の炎症反応には IL-1 β ではなく、IL-1 α が重要であり、単球とは異なることが示された。我々の

知る限りでは、尿酸結晶と IL-1 α の関連を明らかにした初めての報告であり、これまで、尿酸結晶により誘発される痛風炎症は貪食細胞による尿酸結晶の貪食が中心であると報告されていたため[8]、表皮角化細胞のような上皮細胞において、貪食を介さずに IL-1 α - IL-1 受容体経路によって炎症が誘導されることは興味深い。

結論として、我々は、表皮角化細胞と単球のいずれにおいても、P2Y₆ 受容体が尿酸結晶による炎症反応を制御すること、P2Y₆ 受容体アンタゴニストによりマウスエアポーチ及び腹膜炎モデルの好中球浸潤が阻害されることを示した。また、表皮角化細胞においては、尿酸結晶による炎症性サイトカイン及びケモカイン産生が IL-1 α - IL-1 受容体経路により制御されていることも示した。従って、今回の結果から、P2Y₆ 受容体シグナル経路は尿酸結晶が関連する炎症性疾患の治療ターゲットとなる可能性があり、痛風結節以外の皮膚疾患に関しては、表皮角化細胞の増殖やアポトーシス、ネクローシスの亢進が認められるような乾癬やアトピー性皮膚炎もターゲットとなる可能性がある。

VI 謝辞

東京大学医学部皮膚科学教室での研究機会を与えて頂き、御指導御鞭撻を賜りました東京大学医学部皮膚科学教室の佐藤伸一教授、故玉置邦彦前教授に深謝致します。また、本研究に共同研究者として御指導頂いた帝京大学医学部皮膚科学講座（元 東京大学医学部皮膚科学教室）の多田弥生教授に万謝致します。

VII 参考文献

- [1] Chen CJ, Shi Y, Hearn A, Fitzgerald K, Golenbock D, Reed G, et al.: MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J Clin Invest* 116: 2262-2271, 2006.
- [2] di Giovine FS, Malawista SE, Thornton E, Duff GW: Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics, and cellular distribution. *J Clin Invest* 87: 1375-1381, 1991.
- [3] Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, Martin J, Peveri P, Matsushima K: Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 34: 894-903, 1991.
- [4] Guerne PA, Terkeltaub R, Zuraw B, Lotz M: Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 32: 1443-1452, 1989.
- [5] Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, Duff GW: Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. *J Immunol* 138: 3213-3218, 1987.

- [6] Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE, et al.: Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2310-2320, 2003.
- [7] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241, 2006.
- [8] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al.: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9: 847-856, 2008.
- [9] Shi Y, Evans JE, Rock KL: Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521, 2003.
- [10] Eisen AZ, Seegmiller JE: Uric acid metabolism in psoriasis. *J Clin Invest* 40: 1486-1494, 1961.
- [11] Goldman M: Uric acid in the etiology of psoriasis. *Am J Dermatopathol* 3: 397-404, 1981.
- [12] Yata J, Miyasaka N: All of the cytokines. *Clinical Immunology & Allergology* 57 (suppl. 21): 2012.
- [13] Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C,

et al.: International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58: 281-341, 2006.

[14] Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7: 769-778, 2006.

[15] Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A: ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8067-8072, 2008.

[16] Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, et al.: P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol* 141: 1106-1117, 2004.

[17] Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kugelgen I, Jacobson KA. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y6 nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol* 67: 1763-1770, 2004.

[18] Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R: Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 52: 2936-2946, 2005.

- [19] Scott P, Ma H, Viriyakosol S, Terkeltaub R, Liu-Bryan R: Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol* 177: 6370-6378, 2006.
- [20] Barabe F, Gilbert C, Liao N, Bourgoin SG, Naccache PH: Crystal-induced neutrophil activation VI. Involvement of FcγRIIIB (CD16) and CD11b in response to inflammatory microcrystals. *FASEB J* 12: 209-220, 1998.
- [21] Jaques BC, Ginsberg MH: The role of cell surface proteins in platelet stimulation by monosodium urate crystals. *Arthritis Rheum* 25: 508-521, 1982.
- [22] Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, et al.: Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 29: 807-818, 2008.
- [23] Greig AV, Linge C, Terenghi G, McGrouther DA, Burnstock G: Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120: 1007-1015, 2003.
- [24] Taboubi S, Milanini J, Delamarre E, Parat F, Garrouste F, Pommier G, et al.: G_{α(q/11)}-coupled P2Y₂ nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *FASEB J* 21: 4047-4058, 2007.
- [25] Inoue K, Hosoi J, Denda M: Extracellular ATP has stimulatory effects on the

expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127: 362-371, 2007.

[26] Pastore S, Mascia F, Gulinelli S, Forchap S, Dattilo C, Adinolfi E, et al.: Stimulation of purinergic receptors modulates chemokine expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 127: 660-667, 2007.

[27] Burrell HE, Bowler WB, Gallagher JA, Sharpe GR: Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J Invest Dermatol* 120: 440-447, 2003.

[28] Khine AA, Del Sorbo L, Vaschetto R, Voglis S, Tullis E, Slutsky AS, et al.: Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. *Blood* 107: 2936-2942, 2006.

[29] Grbic DM, Degagne E, Langlois C, Dupuis AA, Gendron FP: Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. *J Immunol* 180: 2659-2668, 2008.

[30] Warny M, Aboudola S, Robson SC, Sevigny J, Communi D, Soltoff SP, et al.: P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276: 26051-26056, 2001.

[31] Cox MA, Gomes B, Palmer K, Du K, Wiekowski M, Wilburn B, et al.: The

pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 467-473, 2005.

[32] Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al.: UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446: 1091-1095, 2007.

[33] Sil P, Hayes CP, Reaves BJ, Breen P, Quinn S, Sokolove J, et al.: P2Y6 receptor antagonist MRS2578 inhibits neutrophil activation and aggregated neutrophil extracellular trap formation induced by gout-associated monosodium urate crystals. *J Immunol* 198: 428-442, 2017.

[34] Somers GR, Hammet FM, Trute L, Southey MC, Venter DJ. Expression of the P2Y6 purinergic receptor in human T cells infiltrating inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 78: 1375-1383, 1998.

[35] Popa-Nita O, Proulx S, Pare G, Rollet-Labelle E, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation: XI. Implication and novel roles of classical protein kinase C. *J Immunol* 183: 2104-2114, 2009.

[36] Brüser A, Zimmermann A, Crews BC, Sliwoski G, Meiler J, König GM, et al.: Prostaglandin E2 glyceryl ester is an endogenous agonist of the nucleotide receptor

P2Y6. *Sci Rep* 7: 2380. 2017.

[37] Uratsuji H, Tada Y, Hau CS, Shibata S, Kamata M, Kawashima T, et al.: Monosodium urate crystals induce functional expression of P2Y14 receptor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 136: 1293-1296, 2016.

[38] Watanabe H, Gaide O, Petrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al.: Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 127: 1956-1963, 2007.

[39] Kupper TS: Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86: 1783-1789, 1990.

[40] Yano S, Banno T, Walsh R, Blumenberg M: Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. *J Cell Physiol* 214: 1-13, 2008.

[41] Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS. Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11874-11878, 1995.

