

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目 P2Y₆受容体は尿酸結晶による炎症反応を制御する

氏名 浦辻 秀弥

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。痛風では関節に尿酸結晶が沈着し、単球やマクロファージに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、interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)、IL-6、IL-8/CXCL8 といった炎症性サイトカインの産生を誘導し、急性炎症を誘発する。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、それらが過剰になると、尿酸結晶を形成し、これら尿酸結晶は、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。表皮は身体の最外層に位置し、紫外線や物理的的刺激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る。また、尿酸は核酸の最終代謝産物であるため、表皮の過増殖を示す皮膚疾患においても過剰になる可能性があり、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。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、尿酸結晶によって表皮から誘導される炎症性サイトカインの産生メカニズムについて検討した。

単球では、尿酸結晶が IL-1 β や IL-18 を含む様々な炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されていることから、表皮角化細胞においても検討した結果、尿酸結晶刺激により少量の TNF- α 、IL-1 β 及び多量の IL-8/CXCL8、IL-18、IL-6 の産生が誘導され、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の産生を誘導することが示された。次に、尿酸結晶によって誘発される炎症反応において、IL-1 受容体が重要であることが知られているため、表皮角化細胞での重要性を検討した。IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1 receptor antagonist : 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ことから、表皮角化細胞においても IL-1 が中心的な役割を担うことが示された。IL-1 のなかで、単球やマクロファージなどからは主に 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 の産生が確認された。また、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。また、caspase-1 阻害剤は尿酸結晶による 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。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 が IL-1 受容体に結合することによるシグナルが重要であることが示された。

次に、尿酸結晶がどのようにして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ものの、電子顕微鏡観察によって表皮角化細胞による尿酸結晶の貪食像は確認できず、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。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。尿酸が adenosine triphosphate (ATP) や核酸といったプリン体の分解物であること、P2 受容体が ATP などの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、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。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である reactive blue 2 (RB2) の作用を検討した結果、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。これらの結果から、表皮角化細胞における尿酸結晶による刺激は P2Y 受容体により制御されていることが明らかとなった。続いて、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、表皮角化細胞における P2Y 受容体の発現を検討した。Reverse transcription polymerase chain reaction (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、P2Y₁₂、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。これらの受容体のなかで、尿酸結晶刺激により発現が増加すること、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、我々は P2Y₆ 受容体に注目した。まず、P2Y₆ 受容体発現が尿酸結晶刺激により mRNA 及びタンパク質レベルで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。次に、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 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 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、P2Y₆ 受容体アンチセンスオリゴヌクレオチドもサイトカイン産生を有意に抑制した。さらに、P2Y₆ 受容体 small interfering RNA (siRNA) により IL-1 α 及び IL-8/CXCL8 産生が有意に抑制された。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、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 産生を有意に阻害することも確認した。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。

痛風の急性炎症では、単球が尿酸結晶刺激によって多量の IL-1 β を産生することが報告されているが、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。ヒト単球様細胞 (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、P2Y₆ 受容体特異的アンタゴニストである MRS2578 は 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。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、また、U-73122 によっても IL-1 β 産生は有意に抑制された。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。

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、尿酸結晶により誘導されるエアポーチ内の好中球数の増加に対し、MRS2578 を処置することにより、その好中球浸潤は有意に抑制された。また、尿酸結晶誘発のマウス腹膜炎モデルにおいても、MRS2578 によって腹腔内への好中球浸潤は有意に抑制された。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ことが示された。

以上の実験結果から、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、また、表皮角化細胞においては、単球とは異なり、尿酸結晶による炎症性サイトカイン産生が IL-1 α - IL-1 受容体経路により制御されていることが示唆された。従って、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、表皮角化細胞の過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新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。