

## 分担研究報告書

### オートファジーによる酸化ストレスの制御機構

研究分担者 辻 学 九州大学病院油症ダイオキシン研究診療センター 准教授

**研究要旨** これまでの研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。その結果、メトホルミンは炎症性サイトカインである IL-17A・TNF- $\alpha$  による酸化ストレスによって誘導されるインフラマソームの活性化を抑制し、最終的に IL-1 $\beta$  の産生を抑制することで、炎症を抑制する働きがあることが明らかとなった。メトホルミンは、油症のみならず IL-1 $\beta$  が病態形成に関わる炎症性疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

これまでの研究で、糖尿病治療薬であるメトホルミンは、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体を活性化し、さらにオートファジーを誘導することが明らかとなった。そこで、今回は、表皮細胞における酸化ストレスによる炎症をメトホルミンがどのような機序で制御するかについて研究を行なった。

#### B. 研究方法

培養ヒト表皮細胞に対して、炎症性サイトカインである IL-17A と TNF- $\alpha$  による刺激を行い、酸化ストレスによる炎症を誘導した。これに対して、メトホルミンの投与を行い、IL-17A と TNF- $\alpha$  による炎症性サイトカインの産生が抑制される機構について検討した。

次に、イミキモド (Toll-like receptor 7 アゴニスト) を C57/BL6 マウスの耳介に反復外用することで皮膚炎を生じるモデルを用いてメトホルミンの効果を *in vivo* で検証した。5%イミキモドを 2-4 日外用する間に、同時にメトホルミンの内服を行った。耳介の皮膚組織を回収し、耳介の炎症による肥厚を病理組織学的に評価した。また、炎症性サイトカインの産生について免疫染色・RT-PCR を用いて検討を行なった。

(倫理面への配慮)

本実験で行なった動物実験に関しては、自施設の倫理委員会で既に承認を得ている。

#### C. 研究結果

**実験 1. ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  によって誘導される IL-1 $\beta$  の産生を抑制した。**

ヒト表皮細胞をメトホルミン (15 mM) 存在下・非存在下で、IL-17A (10 ng/ml) と TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激を行なった。Total RNA を抽出し、microarray を用いて炎症性サイトカインの産生について網羅的な解析を行なったところ、メトホルミンは IL-1 $\beta$  の発現の誘導を抑制する可能性が考えられた。そこで、qRT-PCR で検証したところ、メトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  による pro IL-1 $\beta$  mRNA の発現を抑制した (Figure 1A)。さらに、細胞培養液の上清中の mature IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA で測定したところ、同様にメトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  による mature IL-1 $\beta$  の産生を抑制した (Figure 1B)。Pro IL-1 $\beta$  から mature IL-1 $\beta$  の変換にはインフラマソームの活性化が必須であるため、次に IL-17A と TNF- $\alpha$  によって活性化されるインフラマソームに対して、メトホルミンがどのよう

な影響を及ぼすのかについて検討した。抗 pro IL-1 $\beta$  抗体、抗 Caspase-1 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行なったところ、メトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  によって誘導される pro IL-1 $\beta$  タンパクの発現を抑制することが明らかとなった (Figure 1C)。さらに、メトホルミンは Caspase-1 の発現を抑制することが分かった。

メトホルミンが Caspase-1 の発現を抑制する機構を明らかにするため、メトホルミンの濃度を 0.1 mM-15 mM に調節して、表皮細胞に投与して、Caspase-1 の発現を qRT-PCR・ウエスタンブロッティングで評価した。その結果、Caspase-1 の mRNA の発現は変わらなかった (Figure 1D) が、メトホルミンの用量依存性に Caspase-1 のタンパクの発現が低下することが分かった (Figure 1E)。

メトホルミンは、AMPK のリン酸化と SIRT1 の活性化によってオートファジーを誘導することが様々な細胞で報告されている。そこで、メトホルミンがヒト表皮細胞において AMPK のリン酸化を生じるか、抗リン酸化 AMPK 抗体を用いてウエスタンブロットで評価した。メトホルミンはヒト表皮細胞においても用量依存性に AMPK のリン酸化を誘導することが分かった (Figure 1F)。そこで、AMPK の選択的阻害薬であるドルソモルフィン、または SIRT1 の選択的阻害薬であるサーチノール存在下・非存在下でメトホルミン (15 mM) を 24 時間投与し、Caspase-1 の発現が低下するかを評価した。ドルソモルフィン、サーチノール存在下では、メトホルミンによる Caspase-1 の発現の減少は認められなかった (Figure 1G and 1H)。

これらの結果から、メトホルミンは、AMPK—SIRT1 を介して Caspase-1 の発現を減少させ、IL-17A と TNF- $\alpha$  によるインフラマソームの活性化を抑制することで、IL-1 $\beta$  の産生を抑制することが明らかとなった。

**実験 2. ヒト表皮細胞において IL-1 $\beta$  は IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、**

**CXCL1/2 の発現を誘導した。**

IL-1 $\beta$  は、非常に多くの炎症性サイトカイン・ケモカイン・抗菌ペプチドを誘導するサイトカインである。ヒト表皮細胞を IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激を行ない、total RNA を回収し、qRT-PCR で mRNA の発現を評価した。IL-1 $\beta$  は IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の mRNA の発現を誘導することが分かった (Figure 2A)。そこで、細胞よりタンパクを抽出し、IL-36 $\gamma$ 、S100A7/8/9 の発現をウエスタンブロットで解析した (Figure 2B)。また、培養液の上清を回収し、CXCL1/2、CCL20 の産生を ELISA で解析した (Figure 2C)。

その結果、IL-1 $\beta$  はタンパクレベルでも IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現を誘導することが分かった。

**実験 3. ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  によって誘導される IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現の誘導を抑制した。**

メトホルミンが IL-17A と TNF- $\alpha$  によって誘導される IL-1 $\beta$  の産生を抑制する結果より、メトホルミンは IL-1 $\beta$  によって誘導される IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現を抑制する可能性が考えられた。そこで、ヒト表皮細胞をメトホルミン (15 mM) 存在下・非存在下で、IL-17A (10 ng/ml) と TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激を行ない、IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現について、実験 2 と同様の手順で検討を行った。

ヒト表皮細胞においてメトホルミンは IL-17A と TNF- $\alpha$  によって誘導される IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 の発現の誘導を抑制した (Figure 3A, 3B and 3C)。

**実験 4. イミキモド誘導性のマウス皮膚炎モデルにおいてメトホルミンは皮膚炎の病勢を**

## 抑えた。

次に in vivo でのメトホルミンの効果を検討するため、C57BL/6 マウスにイミキモド (Toll-like receptor 7 agonist) 外用することで皮膚炎を生じるマウス皮膚炎モデルを用いた。このマウスモデルでは、イミキモドによって生じる表皮における IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$  の産生と、病変部に浸潤する T 細胞による IL-17A の産生が病態形成に重要であることが明らかとなっている。

イミキモドをマウス耳介に 5 日間連続で外用し、その際にメトホルミン (100 mg/kg、200 mg/kg) の経口投与を行なった。メトホルミン (200 mg/kg) は、イミキモドによって誘導される皮膚炎を軽減することが、臨床的評価 (Figure 4A)・病理組織学的評価 (Figure 4B) によって確かめられた。また、皮膚組織における IL-1 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$ 、CXCL1/2、CCL20、S100A7/8/9、CXCL1/2 mRNA の発現を RT-PCR で評価したところ、メトホルミンはイミキモドによるこれらの mRNA の発現を抑制することが分かった (Figure 4C)。

これらの結果から、メトホルミンは in vivo でも IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$ ・IL-17 による皮膚の炎症を軽減させる効果がある可能性が示唆された。

## D. 考察

本研究で、糖尿病の治療薬であるメトホルミンが IL-17・TNF- $\alpha$  によるインフラマソームの活性化を抑制することで、IL-1 $\beta$  の産生を抑制し、結果的に IL-1 $\beta$  誘導性の多くの炎症性サイトカイン・ケモカイン・抗菌ペプチドの発現を抑えることが明らかとなった。さらに、この効果はマウス皮膚炎モデルでも確認された。

IL-1 $\beta$  の産生機構については、産生を調節するプロモーター領域に芳香族炭化水素受容体が結合する部位が特定されており、芳香族炭化水素受容体が活性化されると pro IL-1 $\beta$  mRNA の発現が誘導することが分かっている。その際に、酸化ストレスを生じるリガンドであった場合には、さらにインフラマ

ソームが活性化され、mature IL-1 $\beta$  が産生されて炎症が誘導される。これまでの研究で、ヒト表皮細胞においてベンゾピレンは mature IL-1 $\beta$  の産生を誘導することが分かっている。したがって、油症においても IL-1 $\beta$  を主体とした炎症反応を生じている可能性がある。

## E. 結論

本研究で、医薬品であるメトホルミンが酸化ストレスによるインフラマソームの活性化を抑えることが明らかとなり、メトホルミンが油症の病態を改善する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Metformin inhibits IL-1 $\beta$  secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes.

*Cell Death Discovery 2019 (in press)*

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

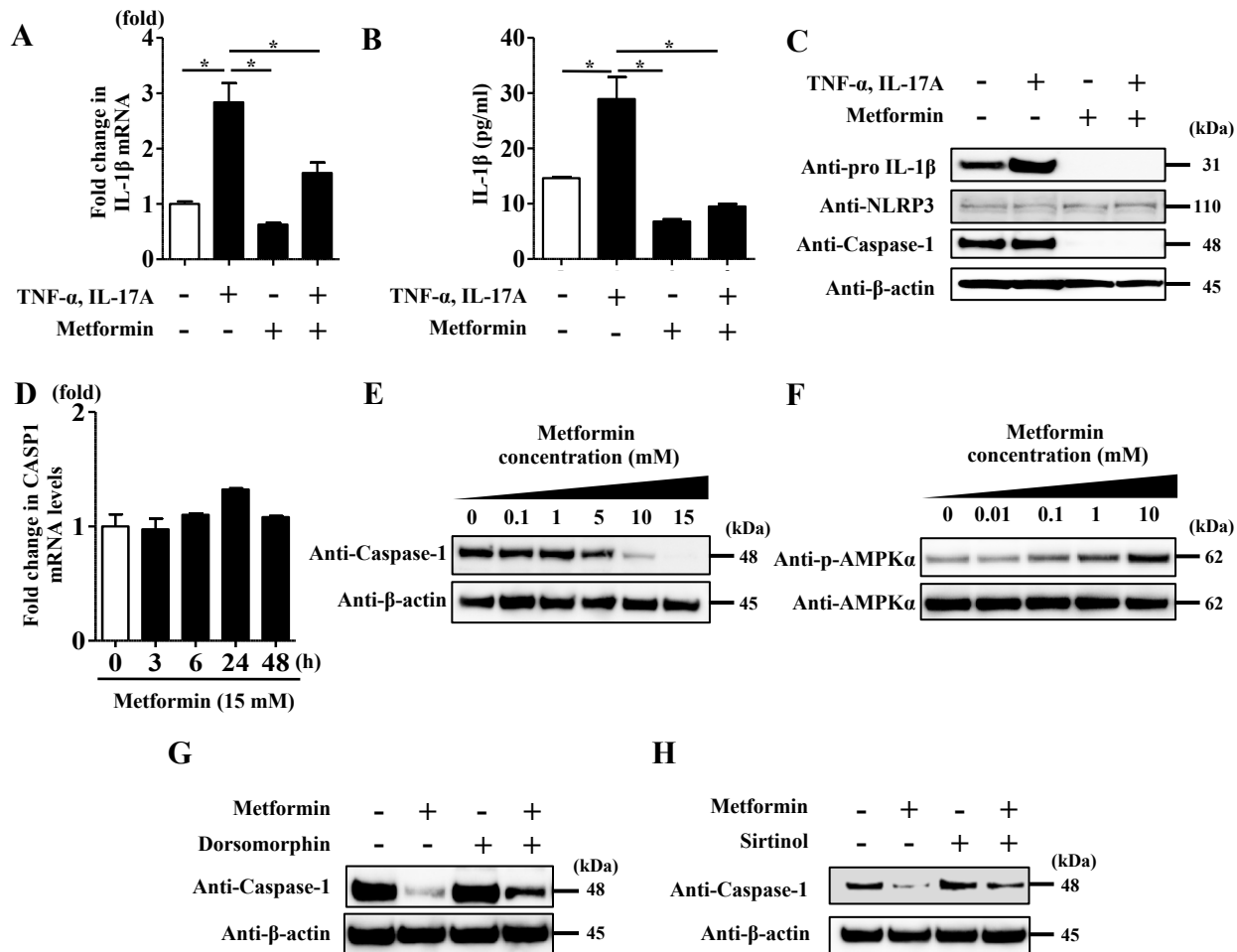
なし

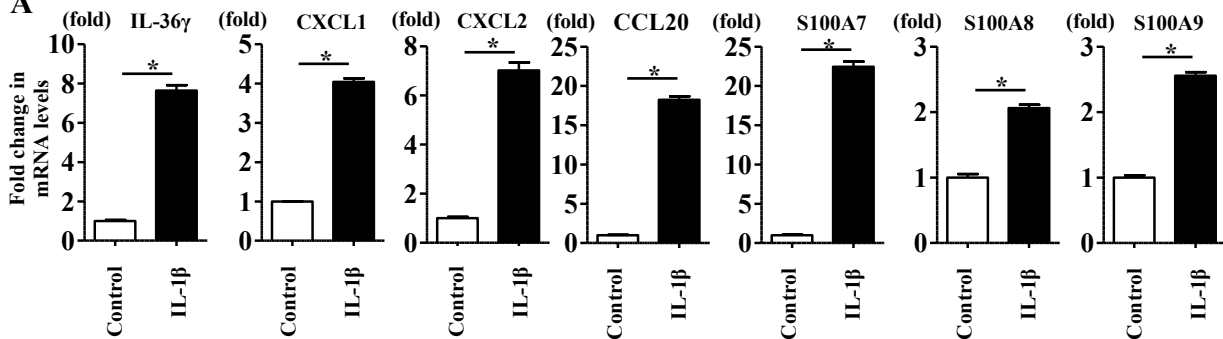
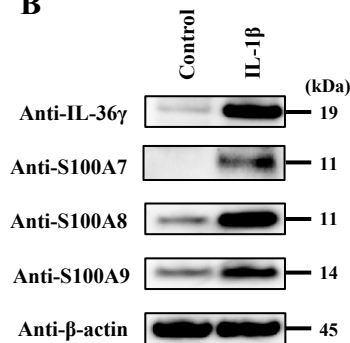
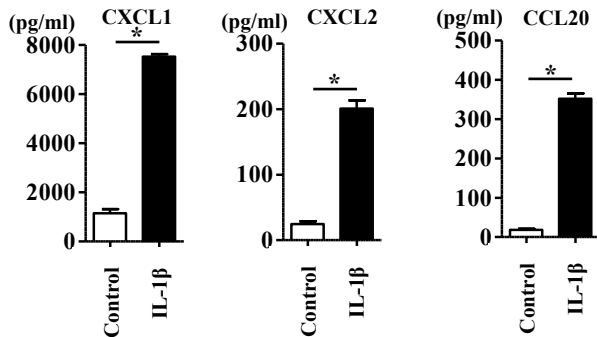
### 2. 実用新案登録

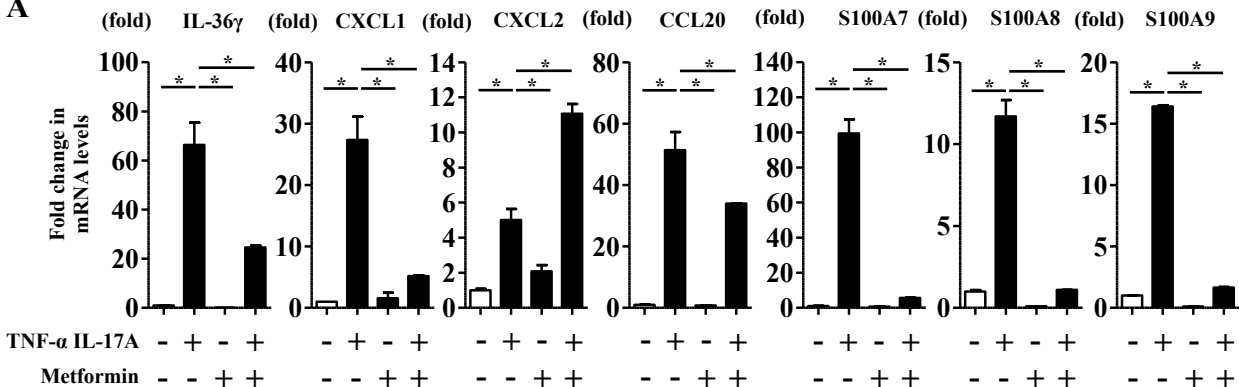
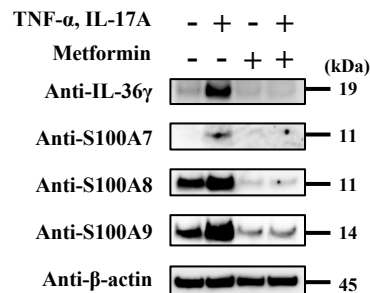
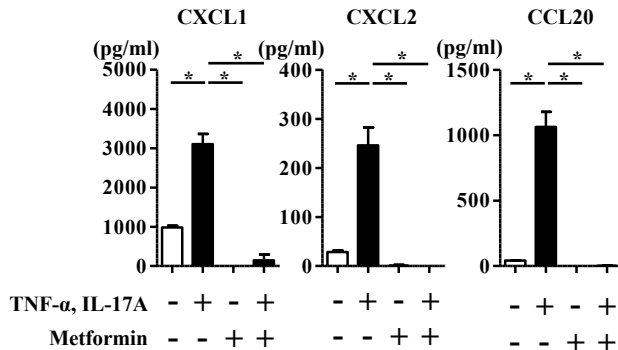
なし

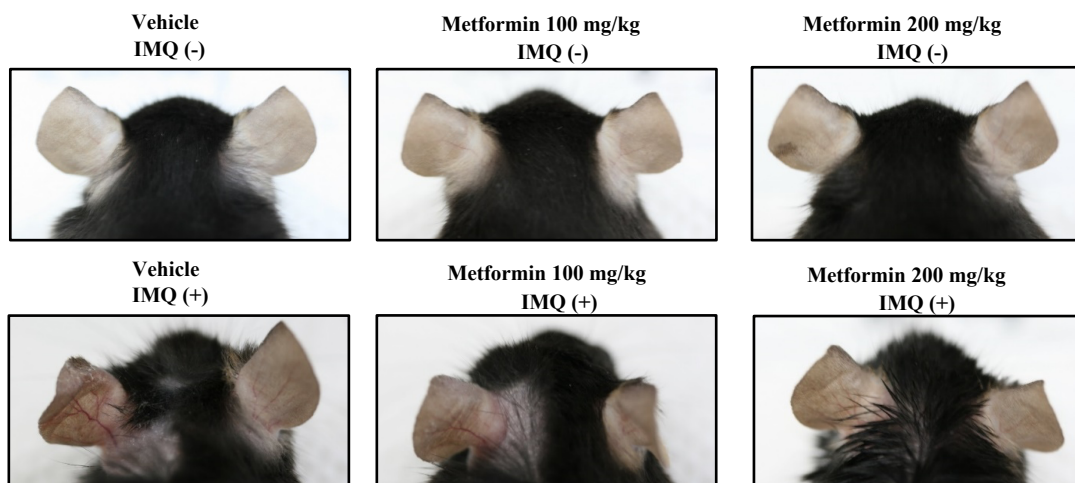
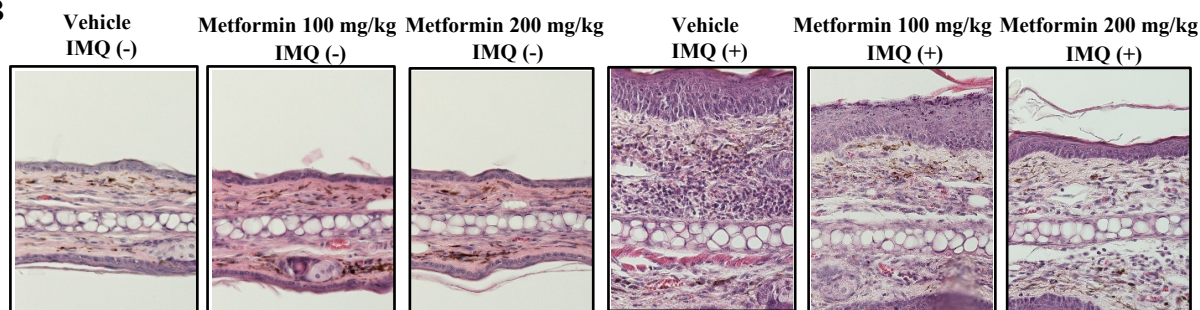
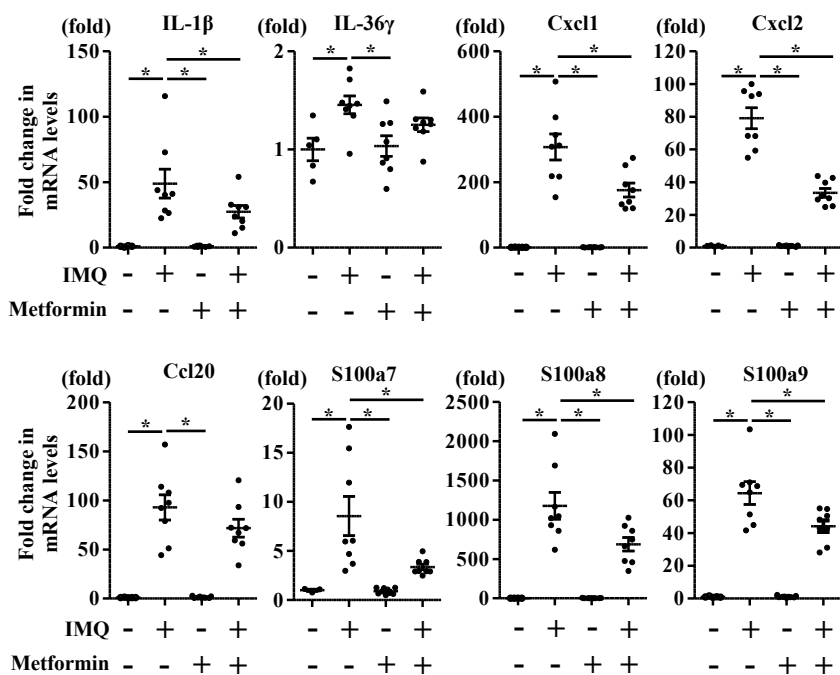
### 3. その他

なし

**Figure 1**

**Figure 2****A****B****C**

**Figure 3****A****B****C**

**Figure 4****A****B****C**

**Figure 1. Metformin treatment inhibited TNF- $\alpha$ - and IL-17A-induced IL-1 $\beta$**

**secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in NHEKs.**

NHEKs were stimulated with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) and IL-17A (10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of metformin (15 mM). (A) Pro-IL-1 $\beta$  mRNA level was analysed by qRT-PCR. (B) IL-1 $\beta$  secretion (mature IL-1 $\beta$ ) in culture supernatant was measured using ELISA. (C) Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with an anti-pro-IL-1 $\beta$  antibody, an anti-NLRP3 antibody and an anti-caspase-1 antibody. The data are representative of experiments repeated three times with similar results. (D) NHEKs were treated with metformin (15 mM) for 3, 6, 24 and 48 h. Caspase-1 mRNA level was analysed by qRT-PCR. (E) NHEKs were treated with metformin (0.1, 1, 10 and 15 mM) for 24 h. Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with an anti-caspase-1 antibody. (F) NHEKs were treated with metformin (0.01, 0.1, 1 and 10 mM) for 3 h. Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with an anti-phosphorylated AMPK $\alpha$  and an anti-AMPK $\alpha$  antibody. NHEKs were treated with metformin (15 mM) for 24 h in the presence or absence of dorsomorphin (1  $\mu$ M) (G) or sirtinol (5  $\mu$ M) (H).



Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with an anti-caspase-1 antibody. (A, B and D) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; n = 3 for each group. \**P* < 0.05. (C, E, F, G and H) The data are representative of experiments repeated three times with similar results.

**Figure 2. IL-1 $\beta$  stimulation induced upregulation of IL36 $\gamma$ , CXCL1, CXCL2, CCL20, S100A7, S100A8 and S100A9 expression in NHEKs.**

NHEKs were stimulated with IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) for 24 h. (A) IL-36 $\gamma$ , CXCL1, CXCL2, CCL20, S100A7, S100A8 and S100A9 mRNA levels were analysed by qRT-PCR. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; n = 3 for each group. \**P* < 0.05. (B) Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with anti-IL-36 $\gamma$ , anti-S100A7, anti-S100A8 and anti-S100A9 antibodies. The data are representative of experiments repeated three times with similar results. CXCL1, CXCL2 and CCL20 production in culture supernatant was measured using ELISA. (A and C) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; n = 3 for each group. \**P* < 0.05.

**Figure 3. Metformin treatment inhibited TNF- $\alpha$ - and IL-17A-induced upregulation of IL-36 $\gamma$ , CXCL1, CXCL2, CCL20, S100A7, S100A8 and S100A9 expression in NHEKs.**

NHEKs were stimulated with TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) and IL-17A (10 ng/ml) for 24 h in the presence or absence of metformin (15 mM). (A) IL-36 $\gamma$ , CXCL1, CXCL2, CCL20, S100A7, S100A8 and S100A9 mRNA levels were analysed by qRT-PCR. (B) Total cell lysates were prepared and subjected to western blotting analysis with anti-IL-36 $\gamma$ , anti-S100A7, anti-S100A8 and anti-S100A9 antibodies. The data are representative of experiments repeated three times with similar results. (C) CXCL1, CXCL2 and CCL20 production in culture supernatant was measured using ELISA. (A and C) Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.; n = 3 for each group. \* $P$  < 0.05.

**Figure 4. Oral metformin administration prevented the development of IMQ-induced psoriasiform eruptions.**

C57BL/6 mice were administered vehicle or metformin (100 and 200 mg/kg, once daily) for 5 days from the day of topical application of IMQ to the left ear. (A) Clinical

images of the ear. (B) Histology of the ear. Scale bar = 100  $\mu$ m. (C) C57BL/6 mice were administered vehicle or metformin (200 mg/kg, once daily) for 3 days from the day of topical application of IMQ to the ear. Then, mRNAs were extracted from the epidermis of the ear and IL-1 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , Cxcl1, Cxcl2, Ccl20, S100a7, S100a8 and S100a9 mRNA levels were analysed by qRT-PCR. (A and B) n = 6 for each group. (C) Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.; n = 6 for each group. \* $P$  < 0.05. (A–C) The data are representative of experiments repeated three times with similar results.