

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19217

研究課題名(和文) 抗菌ペプチドカテリシジンに着目したアトピー性皮膚炎の新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Effect of antimicrobial peptide cathelicidin on atopic dermatitis

研究代表者

梅原 芳恵 (Umehara, Yoshie)

順天堂大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：40707072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗菌ペプチドの一種であるカテリシジンがアトピー性皮膚炎(AD)の病態を改善する効果を持つか否かについて検討を行った。ADモデルNC/Ngaマウスを用いて解析を行った結果、マウスカテリシジンmCRAMPの皮膚炎およびかゆみに対する作用は認められなかったが、皮膚バリア機能を改善する作用を持つことが明らかになった。カテリシジンはフィラグリンからの天然保湿因子産生に關与するプロテアーゼの発現を上昇させることで角層水分量を増加させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of antimicrobial peptide cathelicidin on atopic dermatitis (AD). Following induction of AD-like symptoms on NC/Nga mice, cathelicidin mCRAMP ointment was applied to the lesional skin. Although dermatitis scores and scratching behavior were not suppressed, stratum corneum hydration was improved by the ointment. We also found that expressions of calpain I and BH mRNA in epidermis were increased. These data suggest that increased NMFs by upregulation of NMF-generating proteases improve stratum corneum hydration.

研究分野：かゆみ科学、分子発生学

キーワード：難治性かゆみ アトピー性皮膚炎 抗菌ペプチド カテリシジン アトピー性皮膚炎モデルNC/Ngaマウス

1. 研究開始当初の背景

正常な表皮バリアは、外界からの種々の刺激から身体を防御し、適度な水分を体内に保持させる役割を持つ。表皮は物理的なバリアであると同時に、表皮自身が独自の病原体の認識・排除機構を持ち、リンパ球の関与しない自然免疫のバリアを形成している。表皮バリア機能の破綻は易刺激性の原因となり、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性のかゆみを引き起こす。アトピー性皮膚炎(AD)のかゆみは難治性であり、激しいかゆみによる搔破はさらに皮疹を悪化させる。特に近年、ADは有病率が増加しており、患者は強いかゆみのために不眠や集中力欠如などに悩まされている。このようにAD患者の quality of life (QOL)は著しく低下していることから、ADの治療においてかゆみのコントロールは必要不可欠である。

病原体の排除機構として表皮角化細胞は抗菌ペプチドを産生する。AD病変部では表皮に炎症があるにもかかわらず抗菌ペプチドの発現が誘導されないことが報告されており、健常者には認められない黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)が細菌叢を形成する(Ong et al., N Engl J Med, 2002, 347: 1151-1160)。この抗菌ペプチドの発現異常は、AD病変部における*S. aureus*の増殖や重症感染の頻度が極めて高い原因の1つと考えられている。また、*S. aureus*が産生する毒素やプロテアーゼはADの慢性化と重症化の一因とされている(Cork et al., J Invest Dermatol, 2009, 129: 1892-1908)。

我々の先行研究では、皮膚バリアの機能が破綻しているAD患者や乾皮症、またはそれらのモデルマウスの皮膚において、神経伸長因子(nerve growth factor [NGF]、amphiregulin)の発現増加ならびに、神経線維を退縮させる神経反発因子(Semaphorin 3A [Sema3A]、anosmin-1)の発現減少を見出し、それにより通常は表皮真皮境界部に収束している知覚神経線維が表皮内に多数侵入し、増生することを報告した(Tominaga and Takamori, J Dermatol, 2014, 41: 205-212)。また、リコンビナントSema3Aを配合した軟膏はADモデル動物の搔破行動を抑制すると共に皮膚炎も改善した(Negi et al., J Dermatol Sci, 2012, 66: 37-43)。以上の結果は、神経反発因子が表皮内神経侵入を伴う難治性かゆみの治療標的になることを強く示唆する成果であった。

最近、我々は抗菌ペプチドの一種であるカテリシジンで表皮角化細胞を刺激すると、Sema3Aの発現が増加することを見出した(Umehara et al., J Invest Dermatol, 2015, 135: 2887-2890)。さらに、カテリシジンは他の抗菌ペプチドであるβ-ディフェンシンの産生を誘導すること(梅原ら, 特願 2014-177778)皮膚のタイトジャンクションバリア機能を調節すること(Akiyama et al., J Innate Immun, 2014, 6: 739-753)など、ドライスキンやADの病態改善に有用な様々な活性を持つことが明らかになりつつある。

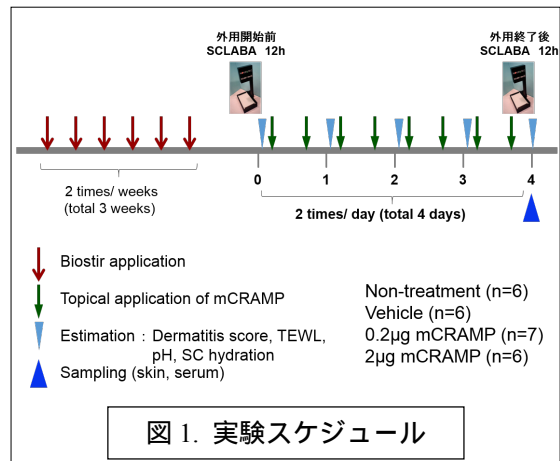
そこで、カテリシジン配合軟膏をAD病変部に外用することで、抗菌ペプチドの補充と共にSema3A発現の正常化やバリア機能の回復が可能となり、効率的にドライスキンやADの病態を改善し、難治性かゆみを克服できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ADモデルNC/Ngaマウスに対するカテリシジンの治療効果について検討を行った。そのため、ADモデルNC/Ngaマウスを作製し、病変部にマウスカテリシジンmCRAMP配合軟膏の塗布を行い、病態が改善するか否かについて解析した。

3. 研究の方法

4% SDS溶液でNC/Ngaマウスの背側部の皮膚バリアを破壊後、ピオスタAD軟膏(コナヒョウヒダニの虫体成分[Biostir])を同部位に週2回、100 mg/siteで塗布し、この操作を3週間行うことでADモデルマウスを作製した(Yamamoto et al., Allergol Int, 2007, 56: 139-148)[図1]。皮膚炎スコアが5以上のマウスをピックアップし、マウスカテリシジンmCRAMPをワセリンと混合したmCRAMP軟膏を病変部に1日2回(朝夕)4日間塗布した。対照群にはワセリンのみ塗布した(Vehicle群)。



(1) ADモデルNC/Ngaマウスのバリア機能に対するカテリシジンの効果

カテリシジン投与期間中、毎朝、皮膚炎 [Dermatitis score] および皮膚バリア機能の評価を行った[図1]。皮膚バリア機能の評価として、経皮水分蒸散量 [TEWL]、pH、角層水分量 [stratum corneum (SC) hydration] の測定を行った。

(2) ADモデルNC/Ngaマウスのかゆみに対するカテリシジンの治療効果

カテリシジン投与前後にSCLABA-Real®を用いて夜間12時間の搔破行動を解析し、かゆみ抑制効果について対照群と比較検討した。

(3) AD モデル NC/Nga マウスの皮膚に対するカテリシジンの作用

実験終了後に病変部の皮膚を採取し、表皮における *Sema3A* 等の遺伝子の発現を定量的 real-time PCR または免疫組織化学染色法により比較した。

4. 研究成果

(1) AD モデル NC/Nga マウスのバリア機能に対するカテリシジンの効果

AD モデル NC/Nga マウスに mCRAMP 配合軟膏を塗布した結果、対照のワセリン塗布群と比較して皮膚炎スコアの改善は認められなかった [図 2A] 経皮水分蒸散量、pH の減少傾向は観察されたが、有意な差は認められなかった [図 2C、2D] 一方、角層水分量の増加が観察され、バリア機能が改善していることが示唆された [図 2B] 以上の結果から、mCRAMP はドライスキンを改善する作用を持つことが示唆された。

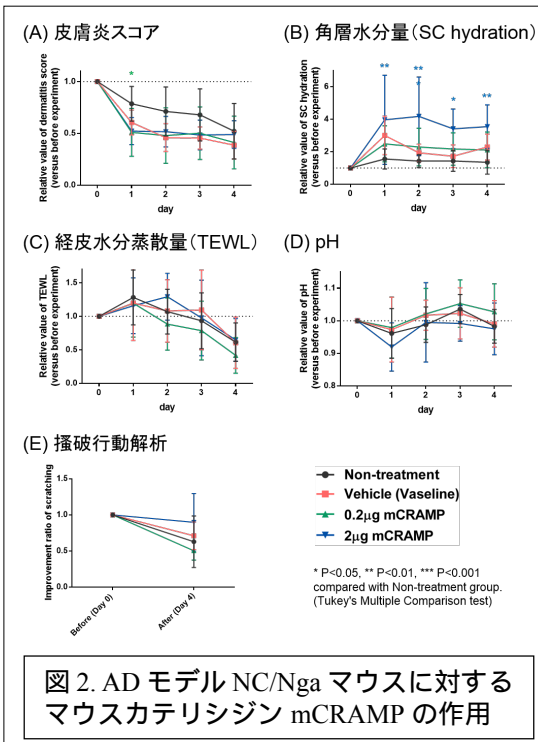


図 2. AD モデル NC/Nga マウスに対するマウスカテリシジン mCRAMP の作用

(2) AD モデル NC/Nga マウスのかゆみに対するカテリシジンの治療効果

mCRAMP 配合軟膏の外用前後における掻破行動の解析を行った結果、いずれの群間においても変化は認められず、mCRAMP のかゆみ抑制効果は低いと考えられた [図 2E]

(3) AD モデル NC/Nga マウスの皮膚に対するカテリシジンの作用

AD モデル NC/Nga マウスに mCRAMP 配合

軟膏を外用し、4日後の表皮における各分子の発現を解析した結果、いずれの群間においても *Sema3A* 遺伝子の発現に変化は認められなかった [図 3A] さらに、採取した皮膚組織を用いて免疫染色を行い、表皮における *Sema3A* タンパク質の発現を単位面積当たりの蛍光強度により比較した結果、変化は認められなかった [図 3B]

Sema3A の発現が上昇していないために、表皮内神経線維の増生およびかゆみが抑制されていないことが考えられ、この結果は(2)と一致していた。我々はヒトのカテリシジン LL-37 でヒト表皮角化細胞を刺激すると、*Sema3A* の発現が増加することを報告しているが、マウスのカテリシジンは同様の作用を持たない可能性、AD モデル NC/Nga マウスの表皮においては他の要因により *Sema3A* の発現が誘導できない可能性、等が考えられた。

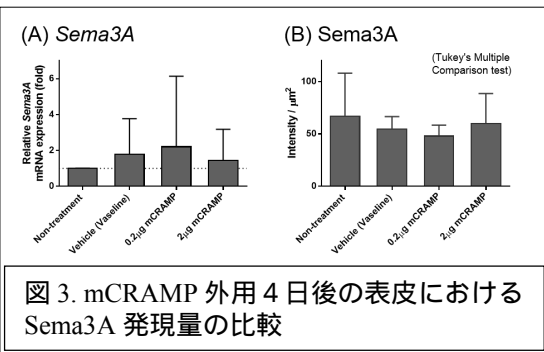


図 3. mCRAMP 外用 4 日後の表皮における *Sema3A* 発現量の比較

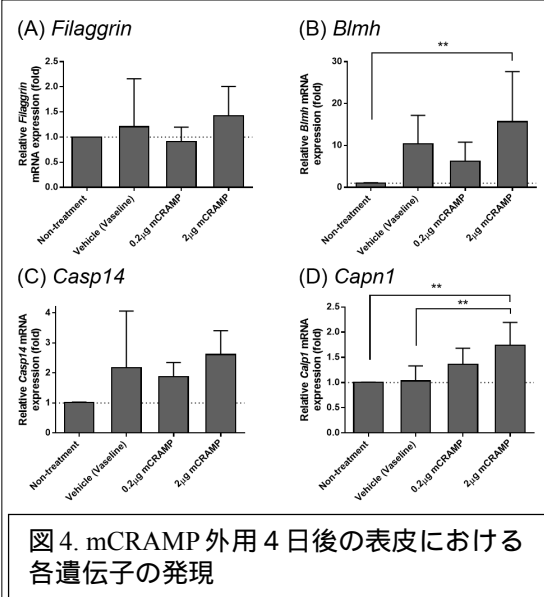


図 4. mCRAMP 外用 4 日後の表皮における各遺伝子の発現

皮膚のバリア機能を正常に保つには、フィラグリン由来天然保湿因子の産生に参与するプロテアーゼの発現が重要であり、それらの異常がドライスキンや AD の発症要因の 1 つになることが報告されている (Kamata et al., Arch Dermatol Res, 2012, 304: 31-38)。結果(1)において mCRAMP 配合軟膏の塗布により角層水分量の増加が観察されたため、皮膚におけるこれらのプロテアーゼ (プレオマイシン水解酵素 [*Blmh*]、カルパイン I [*Cap1*]、カ

スパーゼ 14 [Casp14]) およびフィラグリンの発現を定量的 real-time PCR により解析した。その結果、フィラグリンおよびカスパーゼ 14 の発現変化は認められなかったが [図 4A、4C] mCRAMP 配合軟膏の塗布によりブレオマイシン水解酵素およびカルパイン I の発現が増加していた [図 4B、4D] 以上の結果から、mCRAMP はこれらのプロテアーゼの発現を誘導することで天然保湿因子の産生を増加させ、それにより角層水分量を増加させていることが示唆された。

タイトジャンクションは隣接する上皮細胞を強固に接着する構造であり、皮膚のバリア機能に重要であることが知られているため (Kirschner et al., J Invest Dermatol, 2013, 133: 1161-1169) 今後は皮膚におけるタイトジャンクション構成タンパク質 (クローディン、オクルディン、zonula occludens) の発現解析を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Antimicrobial peptides human LL-37 and β -defensin-3 modulate the expression of nerve elongation factors in human epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci 2017, 88: 365-367. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.07.010

Takahashi N, Tominaga M, Kosaka R, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Sakaguchi A, Ogawa H, Takamori K. Involvement of μ -opioid Receptors and κ -opioid Receptors in Itch-related Scratching Behaviour of Imiquimod-induced Psoriasis-like Dermatitis in Mice. Acta Derm Venereol 2017, 97: 928-933. doi: 10.2340/00015555-2704

Sakaguchi A, Kamata Y, Takahashi N, Matsuda H, Kosaka R, Umehara Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Oral administration of milk-derived phospholipids inhibits a penetration of cutaneous nerve fibers into epidermis in an acute dry skin model mouse. Clin Exp Dermatol 2017, 42: 890-894. doi: 10.1111/ced.13207

Noguchi A, Tominaga M, Takahashi N, Matsuda H, Kamata Y, Umehara Y, Ko KC, Suga Y, Ogawa H, Takamori K Differences in therapeutic effects of topically applied corticosteroid and tacrolimus on atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice. J Dermatol Sci 2017, 86: 54-62, doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.12.015

Ko KC, Tominaga M, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K Possible anti-pruritic mechanisms of cyclosporine A in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol 2016, 96: 624-629. doi: 10.2340/00015555-2318

[学会発表] (計 8 件)

Umehara Y, Tominaga M, Matsuda H, Takahashi N, Kamata Y, Ogawa H, Takamori K. A method to differentiate peripheral neurons from human induced pluripotent stem cells to develop treatments for intractable itch 日本研究皮膚科学会 第 42 回年次学術大会・総会 (2017 年 12 月 15 日 ~ 17 日) 高知

Kamata Y, Umehara Y, Sakaguchi A, Suga Y, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K. Calcium increases semaphorin 3A expression by activating PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in normal human epidermal keratinocytes 日本研究皮膚科学会 第 42 回年次学術大会・総会 (2017 年 12 月 15 日 ~ 17 日) 高知

Kamata Y, Umehara Y, Sakaguchi A, Suga Y, Tominaga M, Takamori K. Sema3A expression is regulated by calcium/PKC/MAPK/AP-1 signaling axis in normal human epidermal keratinocytes 9th World Congress of Itch, Wroclaw, Poland, October 15th till 17th 2017

Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Effects of antimicrobial peptide LL-37 on expression of natural moisturizing factor-generating proteases in epidermal keratinocytes 日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会 (2016 年 12 月 9 ~ 11 日、仙台) 査読有、ポスター発表
Tominaga M, Takahashi N, Kimura U, Kamata Y, Umehara Y, Suga Y, Ogawa H, Takamori K. Serum lipocalin-2 is a potential biomarker for pruritus in patients with psoriasis 日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会 (2016 年 12 月 9 ~ 11 日、仙台) 査読有、ポスター発表

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 芳恵 (UMEHARA, Yoshie)
順天堂大学大学院・医学研究科・博士研究員
研究者番号 : 40707072

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

鎌田 弥生 (KAMATA, Yayoi)

順天堂大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：00410035

松田 浩則 (MATSUDA, Hironori)

順天堂大学大学院・医学研究科・技術員

ニヨンサバ フランソワ (NIYONSABA,
François)

順天堂大学・国際教養学部・教授

研究者番号：60365640

富永 光俊 (TOMINAGA, Mitsutoshi)

順天堂大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号：50468592