

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17819

研究課題名(和文)カルシトリオールは糖尿病性潰瘍患者の皮膚バリア機能の調節と創傷治癒に対する効果

研究課題名(英文)Effect of calcitriol on regulation of skin barrier function and wound healing in diabetic ulcer patients

研究代表者

トルジージョ バレンテン(Trujillo, Valentin)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：60833605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒトケラチノサイトをカルシトリオールで刺激し、タイトジャンクション関連タンパク質の発現をqPCRおよび免疫蛍光、ウェスタンブロットで解析を行った。その結果、カルシトリオールは claudin-4、claudin-7、occludin および ZO-1 の発現を大きく促進することが示唆された。タイトジャンクションのバリア機能はCellZscopeを使用した経上皮電気抵抗によって測定されました。カルシトリオールで刺激された細胞は、経上皮電気抵抗値の大幅な増加を示します。この結果から、カルシトリオールがタイトジャンクション関連タンパク質を誘導し、皮膚バリア機能を強化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシトリオールは活性型ビタミンD3であり、その欠乏は糖尿病、結核、早期破水等の多数の疾患と関連している。最近、カルシトリオールの作用によりケラチノサイトが様々な抗菌ペプチドを産生することが報告されている。従って、糖尿病性潰瘍患者等の創傷治癒遅延患者において、皮膚にカルシトリオールを使用することは、頑固な感染を防御し、創傷治癒を促進する可能性がある。カルシトリオールによるタイトジャンクションの構造や創傷治癒の調節作用を理解することは、糖尿病を含む皮膚バリアを伴う疾患の新たな治療ターゲット探索への貢献となり得る。

研究成果の概要(英文)：Normal human keratinocytes were stimulated with calcitriol and the expression of tight junction-related proteins was analyzed by qPCR, immunofluorescence, and Western blot. As a result, it was suggested that calcitriol promotes the expression of claudin-4 claudin-7, occludin and ZO-1. The barrier function of tight junctions was measured by transepithelial electrical resistance using CellZscope. Cells stimulated with calcitriol showed a significant increase in transepithelial electrical resistance, suggesting that calcitriol induces tight junction-related proteins and enhances skin barrier function.

研究分野：皮膚科

キーワード：ケラチノサイト カルシトリオール タイトジャンクション 糖尿病 皮膚バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カルシトリオールは活性型ビタミン D3 であり、その欠乏は糖尿病、結核、早期破水等の多数の疾患と関連している。最近、カルシトリオールの作用によりケラチノサイトが様々な抗菌ペプチドを産生することが報告されている。従って、糖尿病性潰瘍患者等の創傷治癒遅延患者において、皮膚にカルシトリオールを使用することは、頑固な感染を防御し、創傷治癒を促進する可能性がある。また、カルシトリオールが腸管上皮と眼のタイトジャンクションの構造を調節していることを裏付けるエビデンスが存在している。ケラチノサイトがカルシトリオールに応答することによって、カテリシジン LL-37 やヒト α -ディフェンシンなどの皮膚由来抗菌ペプチドが産生され、これらの抗菌ペプチドは皮膚を病原体感染から防御し、皮膚バリア機能を維持・強化や創傷治癒を促進する。カルシトリオールが皮膚タイトジャンクションバリア機能の調節に寄与し、抗菌ペプチドの産生を誘導することはすでに知られている。しかし現在までに、皮膚においてカルシトリオールがタイトジャンクションの構造を調節しているのか否かは不明である。

2. 研究の目的

本研究ではヒト初代培養ケラチノサイトを用いて、カルシトリオールがタイトジャンクション関連タンパク質を誘導し、皮膚バリア機能を強化するか否かを検討する。また、カルシトリオールが作用するメカニズムを明らかにする。さらに、糖尿病性潰瘍に対する治療法として、カルシトリオールを使用することが可能であるかを糖尿病モデルマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

正常ヒトケラチノサイトを低濃度グルコース(通常培地)または高濃度グルコース培地で培養し、カルシトリオールで刺激する。これらのケラチノサイトを用いて、定量リアルタイム PCR、ウェスタンブロット、免疫染色などの方法で、カルシトリオールのタイトジャンクション関連タンパク質 (claudin、occludin、zonula occludens(ZO)など) の発現に対する作用を検討する。

CellZscope を用いて、ケラチノサイトの経上皮電気抵抗と細胞間透過性を測定し、タイトジャンクションのバリア機能を評価する。さらに、その作用メカニズムを分子レベルで明らかにする。

糖尿病モデルマウスを用いて、タイトジャンクションバリア機能に対するカルシトリオールの *in vivo* における役割を検討する。また、カルシトリオールがそれらのモデルマウス由来ケラチノサイトにおけるタイトジャンクション関連タンパク質の発現に及ぼす作用を検討する。

4. 研究成果

正常ヒトケラチノサイトをカルシトリオールで刺激し、タイトジャンクション関連タンパク質の発現を定量リアルタイム PCR および免疫蛍光、ウェスタンブロットで解析を行った。その結果、カルシトリオールは抗菌ペプチドである LL-37 と比較して claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-7、occludin および ZO-1 の mRNA 発現を大きく促進することが示唆された (Figure 1)。

Figure 1

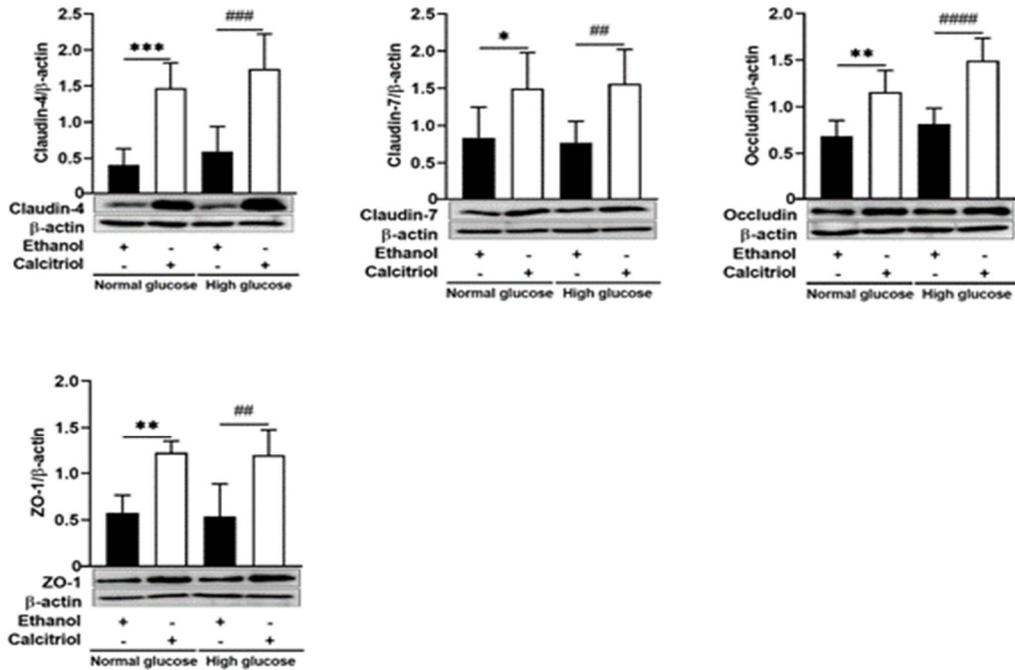


Figure 1. カルシトリオールはヒトケラチノサイトにおけるタイトジャンクション関連タンパク質発現を誘導する。

その結果、カルシトリオールはケラチノサイトにおける PKC、Rac-1、PI3K、Akt、のリン酸化を大きく促進することが示唆された (Figure 2)。

Figure 2

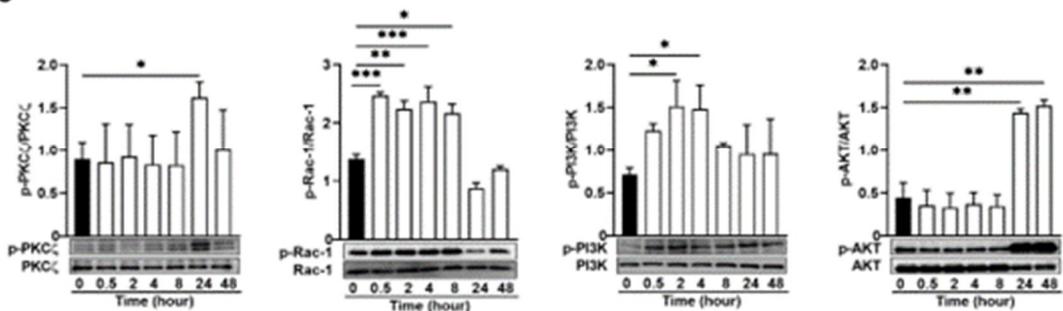


Figure 2. カルシトリオールは aPKC、Rac1、PI3K、AKT 経路を活性化する。

タイトジャンクションのバリア機能は CellZscope を使用した経上皮電気抵抗によって解析した。カルシトリオールで刺激されたケラチノサイトは、経上皮電気抵抗値 (TER) の大幅な増加を示し (Figure 3)、この結果から、カルシトリオールがタイトジャンクション関連タンパク質を誘導し、皮膚バリア機能を強化することが示唆された。タイトジャンクションバリア機能に關与するシグナル伝達経路として、非定型プロテインキナーゼ C (PKC)、Ras 關連 C3 ボツリヌス毒素基質 1 (Rac1)、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)、セリン/スレオニンキナーゼ Akt などが報告されている。そこで、カルシトリオールの作用メカニズムを明らかにするため、正常ヒトケラチノサイトをカルシトリオールで刺激し、これらのシグナル伝達経路が活性化されているかをウェスタンブロットで解析した。

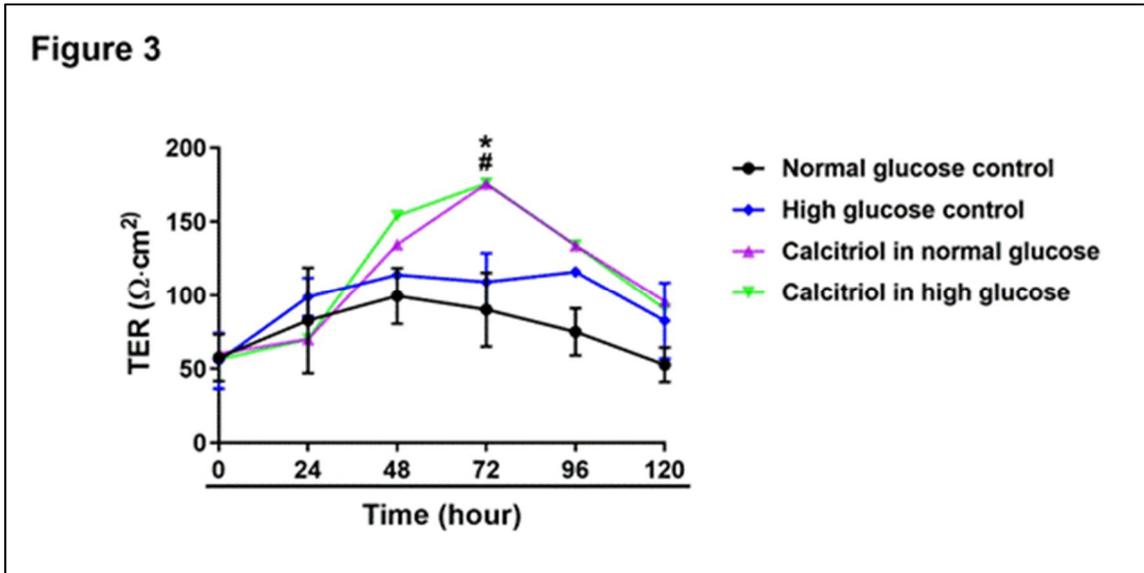


Figure 3. カルシトリオールはタイトジャンクションバリア機能の指標である TER を増加させる。

糖尿病モデルマウスの皮膚バリア機能を評価するため、Tewameter を用いて経表皮水分蒸散量 (TEWL) を測定した。その結果、カルシトリオールで処置された刺糖尿病モデルマウスでは、TEWL の大幅な減少がみとめられた (Figure 4)。また、これらのマウスの皮膚を採取し、定量リアルタイム PCR、ウェスタンブロット、免疫染色などの方法で、カルシトリオールによるバリア機能に対する役割を検討した結果、カルシトリオールは claudin-4、claudin-7、occludin および ZO-1 の発現を大きく促進することが示唆された。

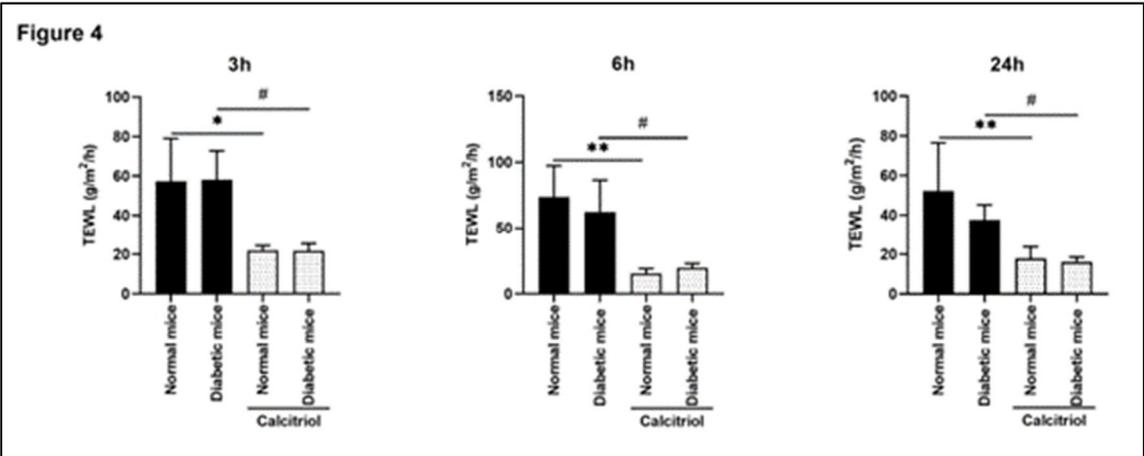


Figure 4. カルシトリオール治療は、糖尿病マウスの皮膚バリア機能障害を軽減しました。

本研究の結果から、カルシトリオールがタイトジャンクション関連タンパク質の発現を誘導し、皮膚バリア機能を強化することが示唆された。カルシトリオールによるタイトジャンクションバリア機能調節や創傷治癒の調節作用を理解することは、糖尿病を含む皮膚バリア機能障害を伴う疾患の新たな治療ターゲット探索への貢献となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nguyen HL, Trujillo V, Umehara Y, Yue H, Peng G, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Song P, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of antimicrobial peptides in skin barrier repair in individuals with atopic dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rodriguez A, Trujillo V, Gonzalez I, Marin S, Torres F, Santos A, Rivas C, Enciso JA, Zaga V, Rivas B	4. 巻 51
2. 論文標題 Host defense peptide RNase 7 is down-regulated in the skin of diabetic patients with or without chronic ulcers, and its expression is altered with metformin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Medical Research	6. 最初と最後の頁 327-335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.arcmed.2020.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umehara Y, Kiatsurayanon C, Trujillo V, Chieosilapatham P, Peng G, Yue H, Nguyen HLT, Song P, Okumura K, Ogawa H, Niyonsaba F	4. 巻 9
2. 論文標題 Intractable itch in atopic dermatitis: causes and treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9030229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yue H, Umehara Y, Trujillo V, Song P, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F	4. 巻 51
2. 論文標題 Exogenous factors in the pathogenesis of atopic dermatitis: Irritants and cutaneous infections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Allergy	6. 最初と最後の頁 382-392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cea.13820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 Trujillo V, Umehara Y, Ogawa H, Ikeda S, Okumura K, Niyonsaba F
2. 発表標題 La catelicidina LL-37 y la vitamina D regulan las uniones estrechas en altas concentraciones de glucosa
3. 学会等名 XXIV congreso nacional de Inmunologia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Trujillo V, Nguyen HL, Umehara Y, Yue H, Ikutama R, Takahashi M, Peng G, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 Regulation of skin-tight junction barrier function by calcitriol in diabetic milieu
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yue H, Umehara Y, Trujillo V, Nguyen HL, Peng G, Takahashi M, Ikutama R, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F
2. 発表標題 Antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5 improves diabetic wound healing via MAPK pathways
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi M, Umehara Y, Yue H, Trujillo V, Peng G, Nguyen HL, Ikutama R, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 Effects of human beta-defensin-3 on wound healing
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen HL, Trujillo V, Peng G, Yue H, Ikutama R, Takahashi M, Umehara Y, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 The effect of antimicrobial peptide AMP-IBP5 on skin barrier regulation
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peng G, Ikutama R, Umehara Y, Trujillo V, Yue H, Nguyen HL, Takahashi M, Kakeyama S, Komatsu M, Okumura K, Ogawa H, Shigaku I, Niyonsaba F
2. 発表標題 Effect of hBD-3 on Th2 cytokine-mediated modulation of autophagy in human keratinocytes
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peng G, Kageyama S, Ikutama R, Umehara Y, Trujillo V, Nguyen HL, Takahashi M, Yue H, Komatsu M, Okumura O, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 Both human α -defensin-3 and autophagy are needed for maintenance of skin barrier
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Cutaneous Immunology and Allergy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peng G, Kageyama S, Ikutama R, Umehara Y, Trujillo V, Nguyen HL, Takahashi M, Yue H, Komatsu M, Okumura O, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 The antimicrobial peptide human beta-defensin-3 activates autophagy in human keratinocytes
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 194. Scottsdale (国際学会)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Yue H, Umehara Y, Trujillo V, Peng G, Okumura O, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F
2 . 発表標題 Acceleration of diabetic wound healing by an antimicrobial peptide AMP-IBP5
3 . 学会等名 The 119th Annual Meeting of the Japanese Dermatological Association (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Nguyen HL , Trujillo V, Peng G, Yue H, Ikutama R , Takahashi M, Umehara Y, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F
2 . 発表標題 Effect of the antimicrobial peptide AMP-IBP5 on skin barrier regulation
3 . 学会等名 The 119th Annual Meeting of the Japanese Dermatological Association (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Trujillo V, Umehara Y, Okumura K, Niyonsaba F
2 . 発表標題 Regulation of tight junctions and differentiation markers in keratinocytes by calcitriol in diabetes
3 . 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Trujillo V, Umehara Y, Okumura K, Ogawa H, Niyonsaba F
2 . 発表標題 Tight junction barrier regulation by calcitriol and LL-37 in diabetes
3 . 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Yue H, Umehara Y, Trujillo V, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F
2. 発表標題 Acceleration of diabetic wound healing by an antimicrobial peptide AMP-IBP5
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nguyen LTH, Trujillo V, Peng G, Yue H, Ikutama R, Takahashi M, Umehara Y, Ikeda S, Ogawa H, Niyonsaba F
2. 発表標題 Effect of the antimicrobial peptide AMP-IBP5 on skin barrier regulation
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peng G, Kageyama S, Ikutama R, Umehara Y, Trujillo V, Nguyen HL, Yue H, Komatsu M, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 Human beta-defensin-3 activates autophagy linked to tight junction barrier in keratinocytes
3. 学会等名 第119回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Peng G, Kageyama S, Ikutama R, Umehara Y, Trujillo V, Nguyen HL, Takahashi M, Yue H, Komatsu M, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F
2. 発表標題 The antimicrobial peptide human beta-defensin-3 activates autophagy in human keratinocytes
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------