

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06136・19K21251

研究課題名(和文) 乾癬、感染症、メタボリック症候群における抗菌ペプチドカセリサイディンの関与

研究課題名(英文) Function of Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Psoriasis, Infections, and Metabolic Syndrome

研究代表者

高橋 隼也 (Takahashi, Toshiya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30712195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なDamage-associated molecular patterns (DAMPs)であり、スカベンジャー受容体のリガンドとして知られるmock dsDNAやhigh mobility group box 1 proteinを活性型カセリサイジン(LL-37)とともにヒト培養角化細胞に加えたところ、単独に比べIL-6, TNF- α といったサイトカインが強く誘導された。また、乾癬患者病変部皮膚を用いた免疫組織化学法では、LL-37陽性角化細胞を多数認める症例でのみ、乾癬の病態形成に重要であるとされるIL-36 が表皮で陽性だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LL-37がDAMPsにより炎症誘導を強めることで、TNF- α 、IL-36といった乾癬のサイトカインを誘導し、その病態形成に関与することが示された。また、DAMPsは乾癬だけでなく広く炎症およびそれに伴う細胞傷害で放出されることが知られており、急性炎症性疾患である感染症や、慢性炎症を伴うメタボリック症候群でも同様の機序で炎症惹起を来している可能性が示された。過去にわれわれはLL-37とDAMPsによる炎症誘導の機序にスカベンジャー受容体が関与することを報告しており、LL-37やスカベンジャー受容体に対する抗体や薬剤が、新たな機序の抗炎症薬となる可能性を考えている。

研究成果の概要(英文)：We added poly(dA:dT) (mock dsDNA) and high mobility group box 1 protein (HMGB1), which are representative damage-associated molecular patterns (DAMPs) and known ligands of scavenger receptors, to human cultured keratinocytes (NHEKs) with or without active form of cathelicidin (LL-37). As a result, inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α were more strongly induced than those LL-37 or DAMPs alone. In addition, immunohistochemistry using lesional skin from psoriasis patients revealed that IL-36 was positive in the epidermis only in cases with a large number of LL-37-positive keratinocytes. These results suggest that LL-37 and its associated inflammation induce IL-36, which is important for the pathogenesis of psoriasis.

研究分野：皮膚科学、免疫学

キーワード：乾癬 メタボリック症候群 カセリサイジン DAMPs LL-37 抗菌ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乾癬は紀元前より記録のあるもっとも歴史のある皮膚疾患のひとつであり、欧米での有病率は約 2-5%、日本でも約 10 万人の患者が存在する。近年腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン(IL)17, IL12/23 といった免疫学的機序が病態に関与することが示され、それらを標的とした生物学的製剤は一定の治療効果を上げており、乾癬慢性病態形成に関与する複数の炎症性サイトカインが確認されてきた。しかしながら、乾癬発症機序や増悪起点に関して鑑みると、複数の遺伝子と後天的な誘発因子が病態に関与するとされるが、未だその分子機序には不明な点が多い。臨床上、溶連菌感染や C 型肝炎、さらに上気道感染や皮膚創への二次感染などの非特異的感染症により乾癬患者の皮膚、関節症状、発熱等の全身性炎症症状が急速に増悪することはしばしば経験されるが、その機序は明らかでない。また、乾癬は皮膚、関節症状により生活の質を下げるだけでなく、その慢性炎症状態の持続が生命予後にも影響する。乾癬患者では健常者に比し肥満や心筋梗塞、脳血管障害の合併率が高いこと、さらにそれらの罹患率は乾癬の重症度と正の相関があることが知られる(Nutr Diabetes 2(12), e54, 2012, J Am Heart Assoc 2(2), e000062, 2013)。しかし、皮膚や関節が病態の主座である乾癬で、なぜ全身のメタボリック症候群が関連するのかはやはり明らかでない。

私は、抗菌ペプチドの一つである LL-37 が、角化細胞やマクロファージの細胞膜に存在するスカベンジャー受容体(SR)を介し、dsRNA の細胞内への取り込みを促進することで炎症を惹起することを示した(Scientific Reports 8(1): 4032.)。dsRNA は細胞傷害に際し放出され、炎症を惹起する Damage-associated molecular patterns (DAMPs)の一つとして知られる。また SR はもともと細胞外の酸化 LDL を認識し細胞内に取り込む受容体として同定されたが、現在では細胞外の種々の物質をリガンドとすることが知られ、その中には複数の DAMPs が含まれる(Nat Rev Immunol 13(9): 621-634, 2013)。そして LL-37 は抗菌ペプチドの名に反し、直接の殺菌作用だけでなく走化作用や血管新生作用、細胞増殖促進など種々の免疫活性を持つことが明らかになり、実際炎症性腸疾患や腫瘍病変、膠原病といった多彩な疾患で発現上昇を認める(Dermatol Clin 35(1): 39-50, 2017)。皮膚疾患においては酒さ(Nat Med 13(8): 975-980, 2007)、そして乾癬患者の皮膚および血清で増加していることが知られる(Immunity 45(1): 119-130, 2016; Indian J Dermatol Venereol Leprol 79(4): 492, 2013)。さらに LL-37 は動脈硬化プラーク内でも発現がみられる(Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(7): 1551-1557, 2006)。これらのことから私は、LL-37 は SR を介し、dsRNA だけでなく他の DAMPs、さらに酸化 LDL の細胞内への取り込みをも促進することを予測している。そして乾癬患者では、LL-37 の発現が上昇しているために、感染症により生じた DAMPs が角化細胞、線維芽細胞、マクロファージや形質細胞様樹状細胞(pDC)などの細胞内に取り込まれて通常より強く炎症を惹起するうえ、慢性炎症に伴う酸化ストレス亢進により生じた酸化 LDL が脂肪細胞や血管内皮細胞、マクロファージの細胞内によく取り込まれ、肥満や動脈硬化を引き起こすのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

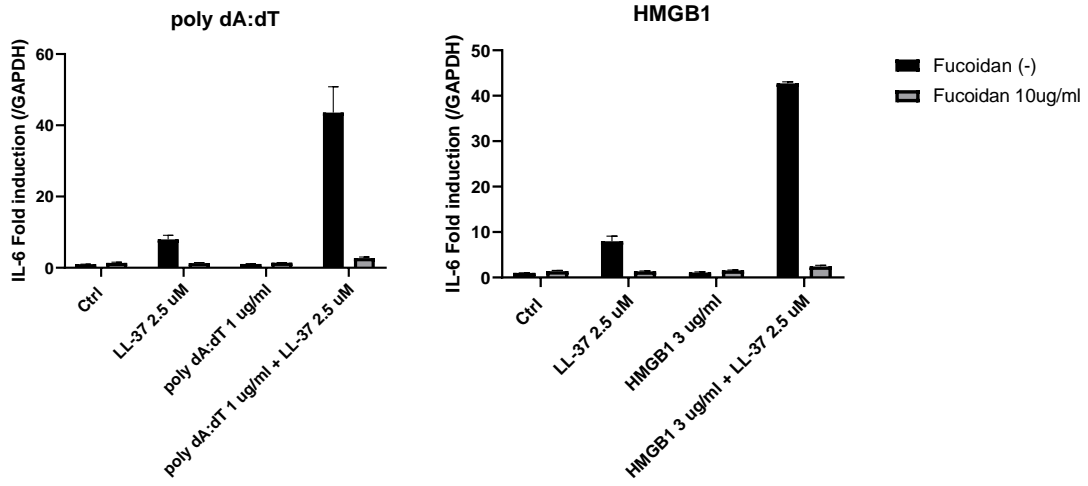
本研究では、感染や環境刺激により誘導される抗菌ペプチド LL-37 に着目し、自己免疫性炎症性疾患である乾癬の感染症による増悪、およびメタボリック症候群の合併の機序を探求することを目的として、LL-37 が DAMPs および LDL の細胞内への取り込みを促進してその病態を惹起するという仮説を検討する。本研究により、乾癬に限らず広く炎症性疾患、メタボリック症候群を増悪させる機序を同定することを目的とする。LL-37 は炎症性サイトカイン誘導や自己核酸の取り込みによる自己抗体誘導などの多様な免疫学的機序が報告されているが、DAMPs の細胞内取り込みに関する報告はみられない。また、本研究は乾癬、感染症、メタボリック症候群を対象としているが、LL-37、DAMPs、そして SR は自然免疫及び炎症性疾患に遍く関与する機序である。本研究により LL-37 や SR を標的とした治療が、革新的な抗炎症治療方法の開発に発展することを期待している。

3. 研究の方法

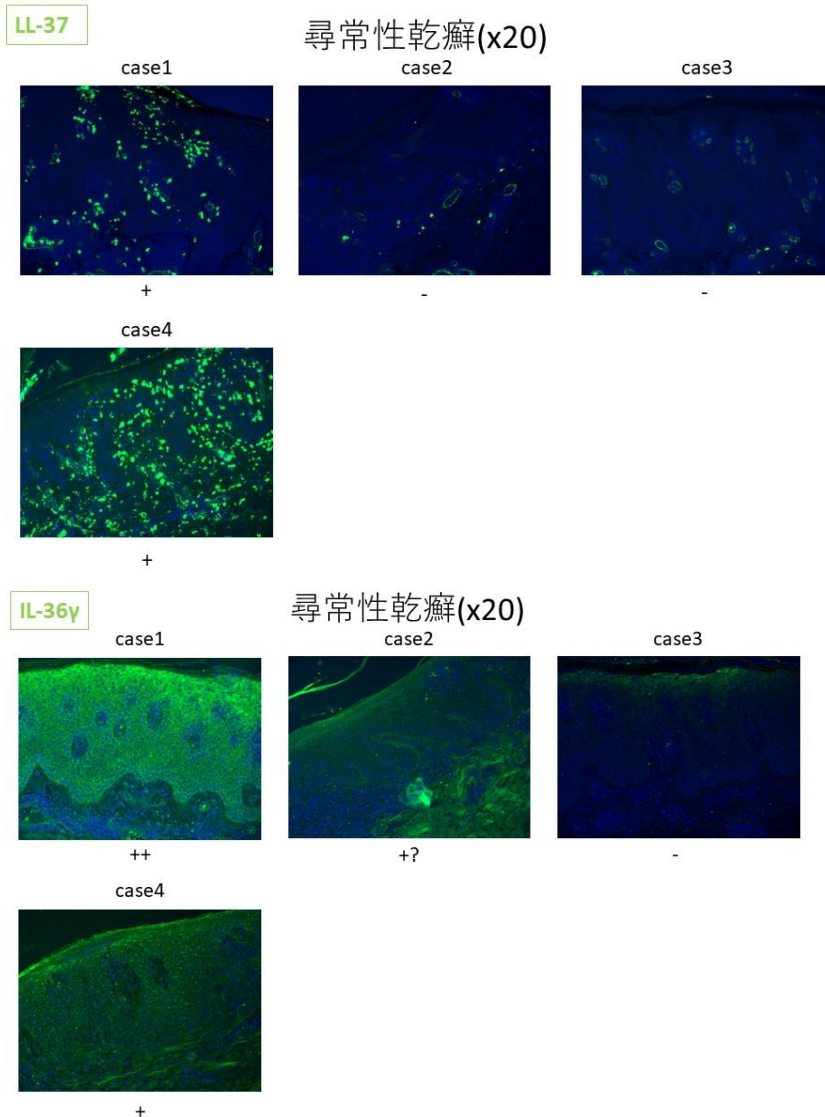
LL-37 が種々の DAMPs/PAMPs の取り込みに与える影響を観察する。まず SR に対するリガンドとして知られる短鎖ヒアルロン酸, high mobility group box 1 protein, heat shock protein, コラーゲン分解産物、フィブロネクチン、C 型肝炎ウイルスを検討し、必要に応じて対象を拡大する。最初にヒト培養角化細胞(NHEK)、線維芽細胞(3T3-L1)、ヒト末梢血から抽出した形質細胞様樹状細胞(pDC)に LL-37、DAMPs/PAMPs を加え、SR との結合が LL-37 により増えることを proximity ligation assay (PLA)により確認する。さらにその後の細胞内取り込みも LL-37 により増えることを蛍光免疫染色で、DAMPs/PAMPs の取り込みの結果生じる炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , インターフェロン γ など)の誘導を定量 PCR および ELISA で確認する。また、マウス骨髄由来の未成熟樹状細胞に LL-37 と DAMPs/PAMPs を加えた後、DAMPs/PAMPs の取り込みによる成熟樹状細胞の発現および LL-37 がそれに与える影響をフローサイトメトリーで観察する。成熟を示すマーカーには CD40, CD80, CD86, MHC class II を用いる。最後に、乾癬患者末梢血から採取した単球由来樹状細胞(MoDC)で同様の実験を行い、健常人と比較する。

4. 研究成果

代表的な Damage-associated molecular patterns (DAMPs)であり、スカベンジャー受容体のリガンドとして知られる polydA:dT (mock dsDNA)や high mobility groupbox 1 protein (HMGB1)を活性型カセリサイジン(LL-37)とともにヒト培養角化細胞(NHEK)に加えたところ、単独に比べ IL-6, TNF- α といった炎症性サイトカインが強く誘導された(図 1)。



また、乾癬患者病変部皮膚を用いた免疫組織化学法では、LL-37 陽性ケラチノサイトを多数認める症例でのみ、IL-36 γ が表皮で陽性だった(図 2)。



これらは LL-37 およびそれに伴う炎症により、乾癬の病態形成に重要であるとされる IL-36 γ が誘導されることを示唆する.

予定していた研究のうち、研究計画 2: LL-37 による酸化 LDL 取り込みの検討および研究計画 3: LL-37 トランスジェニックマウスにおける乾癬モデル、感染症モデル、メタボリック症候群モデルの検討についてはエフォート不足から十分に取り組めなかった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----