

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791075

研究課題名（和文） ヒトβデフェンシンのサイトカイン/ケモカイン産生誘導の決定領域

研究課題名（英文） Structural determinant of Human β-defensin-3 to stimulate cytokine/chemokine secretion

研究代表者

白藤 宜紀（SHIRAFUJI YOSHINORI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90423285

研究成果の概要（和文）：

ヒトβデフェンシン-3は抗菌活性のほか、様々なサイトカインやケモカインの分泌を促進させる作用を有し、自然免疫と獲得免疫を結びつけるものとして注目されている。この作用を決定づける領域をN末端のαヘリクス領域と仮定し、ヒトケラチノサイトのIL-6, IL-8分泌に対する影響を検討したが、誘導作用はなく、C末端のHBD-3に特異的なアルギニン2残基がこれらの分泌に大きく関与することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Human β-defensin-3 (HBD-3) possesses an ability to stimulate proinflammatory cytokine/chemokine secretion, which links innate and adaptive immunity, as well as antimicrobial activity. Although we hypothesized that α-helices in N-terminal is a structural determinant for this function and examined the effect on normal human epidermal keratinocytes to secrete IL-6 and -8, the secretion of IL-6 and -8 was associated with two Arg residues in C-terminal unique motif of HBD-3 not with α-helices.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ヒトβデフェンシン-3, αヘリカル, アルギニン, IL-6, IL-8

1. 研究開始当初の背景

ヒトβデフェンシン(HBD)-3はヒトβデフェンシン-1～-4の中で、グラム陰性菌のみでなく、グラム陽性菌にも強力な抗菌活性を有し、しかもその抗菌活性は塩抵抗性である。我々は平成21年度までにHBD-3の非常に広域な抗菌活性とその塩抵抗性に、他のHBDには認められないC末端のアルギニン2残基, Arg 42, Arg43が重要であることを示した。さらにHBDには末梢血リンパ球やケラチノサイトよりIL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-3α, RANTESなどのサイトカイン/ケ

モカインが放出させる作用もあり、innate immunityとacquired immunityをリンクさせるものとしても注目を集めているが、この作用がHBD-3のどの領域が担っているのかはこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

HBD-3のサイトカイン/ケモカイン誘導作用を決定づける領域を特定することを目的とし、特に抗菌活性に関してC末端のβヘリクスが重要な働きをしているのに対し、これまであまりその機能が明らかにされていない。

N 末端の α ヘリカルをサイトカイン/ケモカイン誘導作用の決定領域と仮説を立て、これを検証することを目的とした。また、抗菌活性において重要であった、Arg 42, Arg 43 とサイトカイン/ケモカイン誘導作用との関係も併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) α ヘリカル領域の機能解析

①抗菌活性 HBD-1,-2,-3 の α ヘリカル領域の合成ペプチド (それぞれ $N\alpha$ -1:HYNCSV, $N\alpha$ -2:PVTCLK, $N\alpha$ -3:YCRVR) を黄色ブドウ球菌または緑膿菌に加えて液体培地中にて培養後、寒天培地上に塗布し、コロニー数をカウントし、抗菌活性を測定した。

②ケラチノサイトにおける IL-6, -8 誘導作用の測定

培養ケラチノサイトに各ペプチドを加え、メッセンジャーRNA 及び培養上清を回収し、IL-6, IL-8 の発現を realtime PCR および ELISA にて定量する。

(2)HBD-3 Arg 42, Arg 43 とケラチノサイトの IL-6, -8 誘導作用の関連。

HBD-3 より Arg42, Arg 43 を除去した desR HBD-3 と、desR HBD-3 の N 末端にアルギニン残基 2 ヶを添付し、元来の HBD-3 と同じ電荷を有する NRR HBD-3 を生合成し、市販の合成 HBD-3 とともに、それぞれを培養ケラチノサイト内に加え、realtime PCR および ELISA 法により IL-6, IL-8 の発現を定量した。

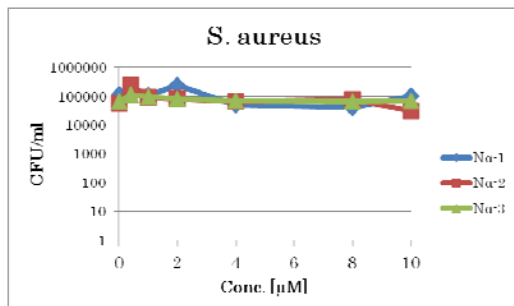
4. 研究成果

(1) α ヘリカル領域の機能解析

①抗菌活性

i) 黄色ブドウ球菌

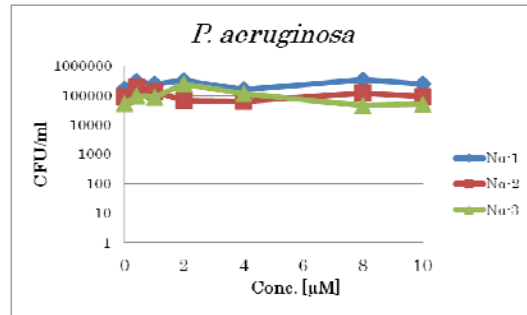
$N\alpha$ -1[~]-3 のいずれも 0[~]10 μ M の範囲において抗菌活性を示さなかった。



ii) 緑膿菌

黄色ブドウ球菌の場合と同様に、 $N\alpha$ -1[~]-3 のいずれも 0[~]10 μ M の範囲において抗菌活性を示さなかった。

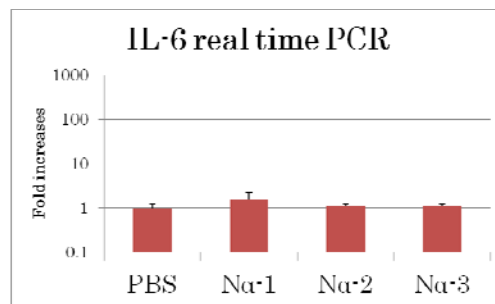
これらのことにより、HBD-1[~]3 のいずれの α ヘリカルも抗菌活性を有さないことが示唆された。



②IL-6, IL-8 realtime PCR

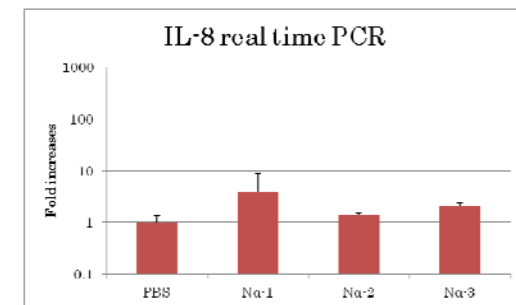
i) IL-6

$N\alpha$ -1[~]-3 のいずれもケラチノサイトの IL-6 mRNA 発現に参与していなかった。



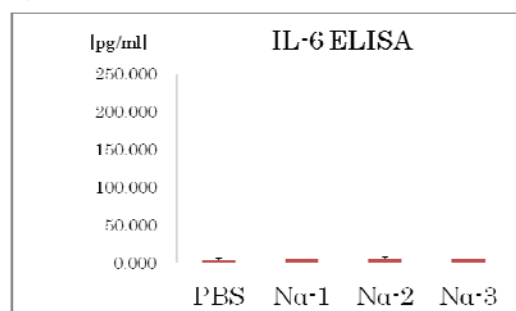
ii) IL-8

IL-6 の場合と同様に、いずれも影響を与えなかった。



③IL-6, IL-8 ELISA

i) IL-6

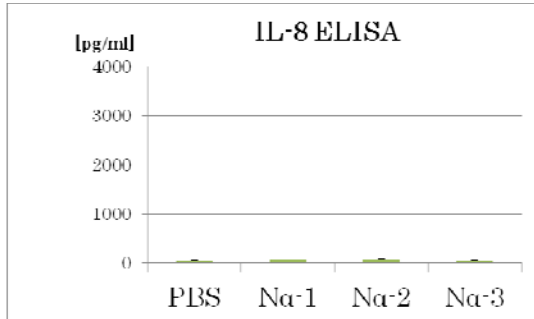


$N\alpha$ -1[~]-3 のいずれもケラチノサイトの IL-6

蛋白発現への関与は認められなかった。

ii) IL-8

IL-6 の場合と同様に、N α -1~3 のいずれもケラチノサイトの IL-6 蛋白発現への関与は認められなかった。



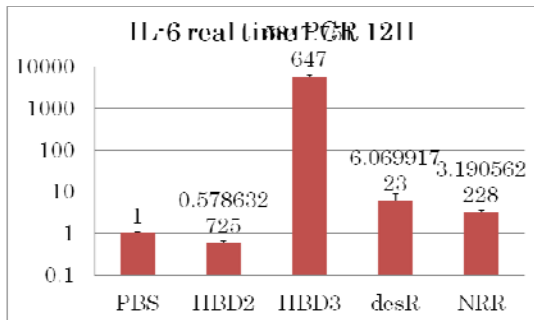
以上の結果により、我々の仮説に反して、HBD-1~3 の α ヘリカルは炎症誘導性のサイトカインである IL-6, -8 のケラチノサイトからの発現に関与していないことが示された。

(2) Arg 42, Arg 43 が IL-6, -8 誘導に及ぼす影響

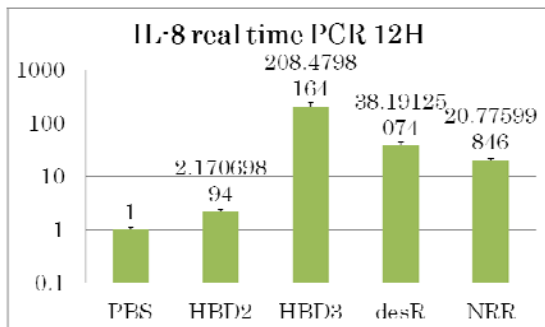
① IL-6, IL-8 realtime PCR

i) IL-6

Arg42, 43 を除去した desR HBD-3 において、IL-6 の発現は HBD-3 と比べ、著明に減少し、N 末端に Arg2 残基を移行させ、HBD-3 と電荷を同じくする NRR HBD-3 においても回復しなかった。



ii) IL-8

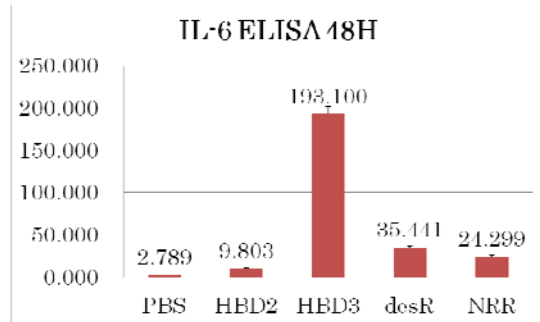


IL-6 の場合と同様に、Arg42, 43 を除去した desR HBD-3 において、IL-6 の発現は HBD-3 と比べ、著明に減少し、N 末端に Arg2 残基を移行させ、HBD-3 と電荷を同じくする NRR HBD-3 においても回復しなかった。

② IL-6, IL-8 ELISA

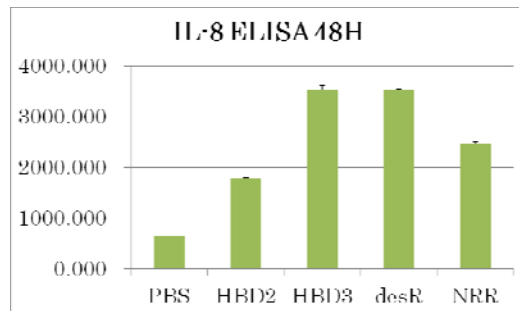
i) IL-6

realtime PCR のデータと同様に、desR HBD-3, NRR HBD-3 ともに HBD-3 と比べ、有意な減少を認めた。



ii) IL-8

IL-8 では desR HBD-3 と HBD-3 に明らかな差は無く、NRR HBD-3 では減少した。



これらの結果より、我々の実験前の仮説とは異なり、サイトカイン/ケモカイン発現の誘導に関しても、 α ヘリカル領域ではなく、C 末端のアルギニン残基が大きく関与しており、N 末端に移動させ、電荷のみ HBD-3 と合致させてもサイトカイン/ケモカインの発現は回復しないことが示された。しかし、IL-8 は mRNA レベルと蛋白レベルにおいて、その結果が完全には一致しなかった。

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 1 件)

① Shanahan MT, Vidrich A, Shirafuji Y, Dubois CL, Henschen-Edman A, Hagen SJ, Cohn SM, Ouellette AJ, Elevated expression of paneth cell CRS4C in ileitis-prone

sampl/YitFc mice: Regional distribution, subcellular localization, and mechanism of action J Biol Chem 査読有り, vol 285 2010, 7493-504

[学会発表] (計 2 件)

① Shirafuji Y, Yasui Y, Morizane S, Iwatsuki K Two Arg in C-terminal of human beta-defensin-3 are essential for the stimulation of proinflammatory cytokine secretion in keratinocytes The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2011 年 12 月 10 日 京都

② Yoko Yasui, Yoshinori Shirafuji, Keiji Iwatsuki Two Arginine residues of C-terminal are essential for the unique salt-insensitive and broad antimicrobial activities of human beta-defensin-3 The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology 2010 年 12 月 05 日 和歌山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白藤 宜紀 (SHIRAFUJI YOSHINORI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号 : 90423285

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者