

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591655

研究課題名(和文)新規の皮膚由来抗菌物質である catestatin の皮膚の自然免疫調節機能

研究課題名(英文)Cutaneous immunoregulatory functions of a novel antimicrobial agent, catestatin

研究代表者

ニヨンサバ フランソワ (NIYONSABA, FRANCOIS)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60365640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本来神経内分泌機能だけが持つCatestatinが抗菌物質としてケラチノサイトや線維芽細胞などに発現し、さらに、皮膚の創傷と感染により過剰に発現されることが明らかになった。本研究では、Catestatinと新規の抗菌ペプチドIDRがヒトケラチノサイトや好中球の様々な機能の活性化を調節し、創傷治癒を促進することを見出した。従って、皮膚が産生する殺菌物質は体内で単に殺菌物質として働くだけでなく、ケラチノサイトを活性化することによって皮膚の感染防御、炎症反応と自然免疫に関与する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Catestatin, initially believed to act as a neuroendocrine regulator, is an antimicrobial agent found in the skin keratinocytes and fibroblasts, and is over-expressed during wound healing and infection. In this study, we observed that Catestatin and the newly discovered antimicrobial peptides known as IDRs stimulated various functions of human keratinocytes and neutrophils, leading to the wound healing acceleration. Thus, in addition to their microbicidal properties, skin-derived antimicrobial agents might also participate to the regulation of cutaneous host defense, inflammation and innate immune system through activation of keratinocytes.

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：抗菌ペプチド 皮膚免疫 自然免疫 ケラチノサイト 好中球

1. 研究開始当初の背景

人間の皮膚は常に種々の病原微生物に曝されているが、皮膚の微生物叢の数と構成は生理的な状態で一定に保たれている。それが皮膚の物理的なバリアだけではなく、皮膚のケラチノサイトが産生する数多くの抗菌物質による自然免疫作用である。近年、上皮組織由来抗菌物質の中で、強い抗菌作用を持つ低分子性抗菌ペプチドであるヒト β -デフェンシン(human β -defensin, hBD)、cathelicidin LL-37、Dermcidin、Psoriasin などが注目されている。これらの抗菌物質が皮膚、気道、腸管などにおいて過剰に発現していることが明らかにされ、上皮組織の感染防御における上記の抗菌物質の働きが注目されている。さらに、hBD、LL-37、Dermcidin、Psoriasin が創傷や数多くの皮膚疾患において多量に発現していることが報告され、創傷治癒とこれら皮膚疾患の病態にこれらの抗菌物質が関与する可能性が示唆されている (*Curr Pharm Des* 15: 2393-2413; 2009)。

近年、皮膚組織が上記の抗菌物質の他に、新たな抗菌物質である Catestatin を産生することが報告された。本来神経内分泌機能だけが持つ Catestatin(カテコラミン遊離調節ペプチド)が抗菌物質として正常皮膚(ケラチノサイト、線維芽細胞と樹状細胞)に発現し、さらに、皮膚の創傷と感染により過剰に発現されることが明らかになった。(*Radek KA et al. J Invest Dermatol* 128: 1525-34; 2008)。Catestatin を含めてヒト抗菌物質においては、従来使用されている抗生物質より抗菌範囲が広く、低濃度で作用を示すことが知られており、抗生物質様作用を持つ新しい物質として注目を浴びている。しかし、これまでに Catestatin が、神経内分泌機能や抗菌作用以外の機能は詳細な検討はなされていない。

申請者は、1998年から現在までに数多くの

皮膚由来抗菌物質が抗菌作用の他に、ケラチノサイト、マスト細胞と好中球などの免疫担当細胞や炎症性細胞を活性化し、皮膚の自然免疫、炎症反応とアレルギー反応の調節に関与していることを見だしている。(*Eur J Immunol* 31: 1066-75; 2001; *Int Immunol* 14: 421-6; 2002; *Immunology* 106: 20-6; 2002; *Immunology* 111: 273-81, 2004; *J Immunol* 175: 1776-84, 2005; *J Dermatol Sci* 40: 157-68, 2005)。従って、Catestatin が同様の作用を有する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

ケラチノサイトが創傷、乾癬とアトピー性皮膚炎の病態に関与していることは、Catestatin がケラチノサイトに作用しているからと考えられる。Catestatin がケラチノサイトに作用し、創傷治癒と皮膚の恒常性に対する効果の詳細な検討をするために、この抗菌物質の正常ヒトケラチノサイトに対して次の8点について検討する予定： サイトカインとケモカインの産生、遊走作用、増殖と分化、Catestatin の血管新生機能と創傷治癒過程における直接的関与、ケラチノサイトにおける Catestatin の発現パターン、作用メカニズムと特異的な受容体の有無とその同定、Catestatin 以外の皮膚由来抗菌物質 (RNase 7, Elafin, Adrenomedullin, Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI)) のケラチノサイトに対する作用と、他の抗菌物質との相乗効果の検討。また、マスト細胞と好中球が皮膚疾患の病態に関与していることを知られているので、Catestatin のマスト細胞と好中球における発現、活性化とそのメカニズムについて検討する予定。

以上のことから、Catestatin は体内で単に神経内分泌ペプチドと抗菌物質として働くだけでなく、幅広い生物活性を生体内で示すことによって感染防御、炎症反応や自然免疫の調節に関与する新たな証拠が考えられる。

3. 研究の方法

1. Catestatin の刺激によるサイトカインや

ケモカインの産生作用: 正常ヒトケラチノサイトを培養し、Catestatin で刺激する。ケラチノサイトが産生する サイトカイン(TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-19、IL-20、IL-22) と ケモカイン(MIP-1 α , β 、MIP-2 α 、MIP-3 α 、MCP-1、MCP-3、MCP-4、RANTES、IP-10、TSLP など) の産生を特異的なELISA キットを用いて調べる。さらに、これらのサイトカインやケモカインの産生経路 (MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ、Akt、NF- κ B などの経路) を検討する。

2. Catestatin のケラチノサイトに対する遊走

作用: 培養した正常ヒトケラチノサイトの遊走能は chemotaxis micro-chamber (Boyden's chamber)を用いて、Catestatin に対する遊走活性として測定する。Catestatin の特異的抗体を用いて、Catestatin がケラチノサイトに直接作用するかどうかの検討を行う。Catestatin の遊走作用とケラチノサイトの分化との関連性を調べる。Catestatin のケラチノサイトの遊走メカニズムを、ケラチノサイトを G 蛋白、ホスホリパーゼ C と STAT1-5 のそれぞれ阻害剤で処理することにより、明らかにする。

3. Catestatin のケラチノサイトに対する増殖

と分化に及ぼす影響: 細胞増殖は、5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) 取込みで解析する。培養した正常ヒトケラチノサイトを Catestatin で刺激した後、BrdU とインキュベーションし、BrdU を取込んだ細胞を抗 BrdU 抗体で検出し、その陽性細胞数を顕微鏡で計測する。さらに、Catestatin がケラチノサイトの分化を誘導するかどうかを調べるために、ケラチノサイトを Catestatin とインキュベーションし、Keratin 1、Keratin 10、Keratin 14、Loricrin、Filaggrin、Involucrin などのケラチノサイト分化マーカーの mRNA と蛋白発現の変化を調べる。

4. ケラチノサイトにおける Catestatin の発

現: ケラチノサイトを PMA、Butyrate、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 など) あるいは Toll-Like Receptor の ligand (Lipopolysaccharide、Peptidoglycan、Poly Inosinic: Cytidylic、Flagellin、Macrophage-Activating Lipopeptide-2 (Malp-2)、CpG) で刺激し、Catestatin の発現パターンを real-time PCR と Western blot あるいは免疫染色法で解析する。

5. Catestatin の創傷治癒に及ぼす影響: ケラチノサイトを細胞培養ディッシュで confluent になるまで培養し、ピペットチップを用いて、直径 1.0 ~ 2.5 mm の円形創傷を作る。Catestatin を培地中に加えた後、さらに培養し、顕微鏡下で経時的に観察・記録し、その創傷面の変化を画像解析装置で計測する。さらに、その作用メカニズムを調べる。

6. Catestatin の血管新生因子の発現や産生に

対する作用: 正常ヒトケラチノサイトを培養し、Catestatin で刺激する。ケラチノサイトが産生する血管新生因子である Epidermal growth factor (EGF)、Transforming growth factor- α (TGF- α)、TGF- β 、Activin、Bone morphogenic factor (BMP)、Fibroblast growth factor (FGF)、Platelet derived growth factor (PDGF) と Vascular endothelial growth factor (VEGF)の mRNA 発現や蛋白産生に及ぼす影響について real-time PCR と Western blot、ELISA あるいは免疫染色法で解析する。

7. Catestatin の *in vivo* 血管新生機能に対

する作用: Catestatin が *in vivo* で血管新生を誘導するかどうかを Cultrex directed *in vivo* angiogenesis assay (DIVAA) kit を用いて測定する。Catestatin を BME (Basement Membrane Extract)に加え、マイクロチューブにセットした angioreactor にゲルローディングチップを用いて充填する。ゲル化後、angioreactor をマイクロチューブから取り

出し、麻酔したマウスの背側の皮下に移植する。マウスを 9 日～15 日間飼育し、angioreactor を回収し、BME と新生した血管の複合体をマイクロチューブに移す。遠心後に、ペレットを FITC-lectin diluent で希釈し、96 well プレートに移し、血管新生因子の濃度の蛍光を測定する。

8. Catestatin に対する特異的レセプター検索

と同定: Catestatin を、Na¹²⁵I を用いて標識する。¹²⁵I-Catestatin のケラチノサイトへの結合。Scatchard 解析を用いて、受容体数や結合部位を同定する。Catestatin 結合蛋白質の同定: Catestatin を固定したアフィニティカラムを用いて、ケラチノサイトの細胞膜からそれぞれの結合蛋白質を分離する。得られた蛋白質をアミノ酸配列分析などで解析することにより、Catestatin に対する受容体を同定する。

9. 他の皮膚由来抗菌物質のケラチノサイトに及ぼす影響:

培養したヒトケラチノサイトを RNase 7、Elafin、Adrenomedullin と Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) で刺激し、サイトカインやケモカインの産生を ELISA キットを用いて調べる。さらに、これら抗菌物質の作用メカニズムを検討する。また、RNase 7、Elafin、Adrenomedullin と SLPI は Catestatin とのケラチノサイトに対する効果は相乗的であるかどうかを調べる。

10. Catestatin のヒトマスト細胞や好中球などの細胞に対する作用:

培養したヒトマスト細胞 (LAD2 cell line や末梢血由来 primary mast cell) 及び正常ヒト好中球を用いて、Catestatin の発現を PCR と Western blot あるいは免疫染色法で解析する。また、Catestatin がマスト細胞や好中球の活性化: ROS (reactive oxygen species) と NO (nitric oxide) の産生、サイトカインやケモカインの産生、遊走能とそのメカニズム、マスト細胞や好中球

由来抗菌物質の産生について調べる。

11. 他の皮膚由来抗菌物質のヒトマスト細胞

や好中球に対する作用: ヒトマスト細胞及び好中球を RNase 7、Elafin、adrenomedullin、SLPI で刺激し、これらの抗菌物質のマスト細胞や好中球に対する ROS と NO の産生、サイトカインやケモカインの産生、遊走能とそのメカニズムを調べる。また、上記の抗菌物質は Catestatin とのマスト細胞や好中球に対する効果は相乗的であるかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) まず、Catestatin のケラチノサイト、マスト細胞と好中球に及ぼす様々な細胞機能活性化、創傷治癒などの機能を検討した。その結果、Catestatin と Catestatin 由来ペプチドがケラチノサイトのサイトカインやケモカイン産生、遊走作用と増殖を誘導した。さらに、これらのペプチドが創傷治癒を促進した。また、Catestatin ペプチドがケラチノサイトの細胞内カルシウムの動員を誘導し、さらに、細胞周期の調節に関与することがわかった。Catestatin の作用メカニズムを調べたところ、これらのペプチドが G タンパク質、ホスホリパーゼ C、皮成長因子受容体 (EGFR)、Akt/PI3 キナーゼと MAP キナーゼの経路を介して、ケラチノサイトに作用することが明らかとなった。(J Dermatol Sci, 64: 108-118, 2011)。

(2) 次に、Catestatin の血管新生機能に対する作用を調べたが、効果を見られなかった。また、Catestatin の特異的レセプターの同定はできなかった。代わりに、Catestatin のケラチノサイトでの発現機構と LL-37 のケラチノサイトに対する作用を調べた。その結果、IL-36 α 、 β 、 γ が Catestatin ではなく、ソラヤシンと LL-37 の遺伝子発現やタンパク産生量を促進することを明らかにした。また、IL-1 β および各 IL-36 サイトカインを併用すると、ソラヤシンおよび LL-37 の産生は、さらに相加的に高まった。さ

らに、作用メカニズムとして、MAPKとNF-κBのシグナル伝達経路が関与することが分かった。また、LL-37がケラチノサイトを活性化し、炎症を調節することを見出した。(*J Dermatol Sci*, 68: 63-66, 2012)

(3) さらに、Catestatinの好中球の活性化に対する効果を調べたが、効果を見られなかった。一方、新規の抗菌ペプチドであるIDR-HH2、IDR-1002とIDR-1018の好中球の活性化に及ぼす影響を調べたところ、これらのペプチドが好中球の接着及び活性化マーカーの発現を誘導し、さらに、好中球の血管内皮細胞への接着を著明に増強した。また、これらのペプチドが好中球の遊走能、抗菌物質の産生と殺菌作用を促進した。興味深いことに、上記のペプチドがLPSによる好中球の脱顆粒、活性酸素種と炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになった。(*J Leukoc Biol*, 94: 159-170, 2013)

以上の結果をまとめると、皮膚が産生する殺菌物質は体内で単に抗菌物質として働くだけでなく、皮膚の細胞を活性化することによって、皮膚の感染防御、炎症反応と自然免疫に関与する可能性があると考えられる。また、皮膚の障害によって放出される Catestatin を介したヒトのケラチノサイト活性化機構が神経—免疫相互作用による皮膚の炎症やアレルギー疾患の病態の形成に新たに関与する可能性を示唆するものである。また、乾癬などの皮膚疾患で過剰に発現している IL-36 がケラチノサイトを活性化し、抗菌物質の産生を促進することを初めて明らかにした。この結果は、様々な皮膚疾患で過剰発現する抗菌ペプチドの産生のメカニズムを明らかにし、これら皮膚疾患の病態を理解する上で重要な知見となり得る。さらに、抗菌ペプチドが好中球の活性化を調節することによって、抗菌作用だけでなく、炎症反応、生体防御や免疫調節に関与していると考えられた。

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 5 件)

1. Hoq MI, Niyonsaba F, Ushio H, Aung G, Okumura K, Ogawa H. Human catestatin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 査読有、64(2)、2011、108-118. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.08.001.
2. Nagaoka I, Suzuki K, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M. Modulation of neutrophil apoptosis by antimicrobial peptides. *ISRN Microbiol*, 査読有、2012、345791、2012. DOI: 10.5402/2012/345791
3. Nguyen TT, Niyonsaba F, Ushio H, Akiyama T, Kiatsurayanon C, Smithrithee R, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasin and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPKs and NF-κB. *J Dermatol Sci*, 査読有、68 (1) 、2012、63-66. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.07.010
4. Chen X, Takai T, Xie Y, Niyonsaba F, Okumura K, Ogawa H. Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 433 (4) 、査読有、2013、532-537. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.024.
5. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock R E W. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002 and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J*

Leukoc Biol、査読有、94(1)、2013:
159-170. DOI: 10.1189/jlb.1012497.

〔学会発表〕(計7件)

1. Niyonsaba E, Hoq MI, Ushio H, Aung G, Okumura K, Ogawa H. Neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, and its variants increase keratinocyte migration and proliferation. The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2011年12月9日, 国立京都国際会館, 京都.
2. Niyonsaba E, Hoq MI, Ushio H, Aung G, Okumura K, Ogawa H. Human catestatin induces epidermal keratinocyte migration and proliferation. 第39日本免疫学会総会第. 2011年11月29日, 幕張メッセ, 千葉.
3. ニヨンサバ フランソワ. ランチョンセミナー: ヒト抗菌物質の皮膚免疫調節機能に対する役割. 第58回ドキシシンポジウム. 2011年7月7日, 順天堂大学, 東京.
4. Niyonsaba E, Madera L, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. Innate defense regulator peptides modulate neutrophil functions. 第62日本アレルギー学会. 2012年11月30日, 大阪国際会議場, 大阪.
5. Nguyen TT, Niyonsaba E, Akiyama T, Smithrithee R, Kiatsurayanon C, Ushio H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Effects of IL-36 cytokines on S100A7/psoriasin and cathelicidin LL-37 expression and production by primary human keratinocytes. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012年12月8日, ロワジールホテル&スパタワー那覇, 沖縄.

6. Niyonsaba E, Madera L, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. Synthetic innate defense regulator peptides modulate various functions of human neutrophils. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012年12月9日, ロワジールホテル&スパタワー那覇, 沖縄.
7. Niyonsaba E, Madera L, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. Synthetic immunomodulatory peptides IDR-HH2, IDR-1002 and IDR-1018 regulate neutrophil functions. 15th International Congress of Immunology. 2013年8月25日, ミラノ, イタリア.

〔図書〕(計0件)

**〔産業財産権〕
出願状況(計0件)**

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ニヨンサバ フランソワ
(NIYONSABA FRANCOIS)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60365640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし