

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860898

研究課題名(和文) 抗菌ペプチドによる神経反発因子の発現促進機構とアトピー性皮膚炎治療薬への応用

研究課題名(英文) Cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A expression in human epidermal keratinocytes: implications for possible application to pruritus

研究代表者

鎌田 弥生 (Kamata, Yayoi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助教

研究者番号：00410035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アトピー性皮膚炎の病変部では、神経反発因子の発現減少に伴い表皮内神経線維の稠密化による起痒刺激の受容増加と、抗菌ペプチドの減少に伴う易感染性が認められる。本研究は、正常ヒト表皮角化細胞を用いて、抗菌ペプチドLL-37が神経反発因子セマフォリン3A (Sema3A) の発現に及ぼす影響ならびにそのシグナル伝達系を中心に検討した。その結果、抗菌ペプチドLL-37はSema3Aの発現を誘導すること、その誘導にはGiタンパク質共役型受容体ならびにMAPKの一種であるERK1/2を介することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of antimicrobial peptide LL-37 on nerve repulsion factor semaphorin 3A (Sema3A) expression in cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEKs), as well as the signaling pathways involved in LL-37-induced Sema3A expression. We found that Sema3A expression in cultured NHEK was increased by stimulation with LL-37. LL-37-induced Sema3A expression was completely inhibited by pertussis toxin and PD98059. These results suggested that Gi-coupled GTP-binding protein coupled receptor and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 signaling may be required for Sema3A induction.

研究分野：皮膚科学

キーワード：神経反発因子 抗菌ペプチド アトピー性皮膚炎

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痒みを引き起こす。痒みは強い搔破行動と湿疹の増悪をもたらし、睡眠障害や就労障害など患者のQOLを著しく障害することから、ADの治療において痒みのコントロールは必要不可欠である。

健全な皮膚の神経線維は、多くが真皮-表皮境界部に収束している。先行研究では、バリア機能が破綻したアトピー性皮膚炎(AD)モデルNC/Ngaマウスの皮膚において、a) 神経伸長因子(例: 神経成長因子[NGF])の発現増加、及び神経線維を退縮させる神経反発因子(セマフォリン3A [Sema3A])の発現減少、b) マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)による真皮-表皮境界部にある基底膜の分解等を見出し、それにより多数の神経線維が表皮内に侵入・増生することを報告した(Tominaga et al., Exp Rev Dermatol, 2010, 5: 197-212)[図1]。表皮内神経線維の増生は起痒刺激の受容増加につながり、さらに搔破のような外部刺激は知覚神経を興奮させ、痒みを惹起・増悪させる。一方、リコンビナント Sema3A タンパク質を配合した軟膏はADモデル動物の搔破行動を抑制するととも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痒みの治療標的になることを強く示唆する成果であった。

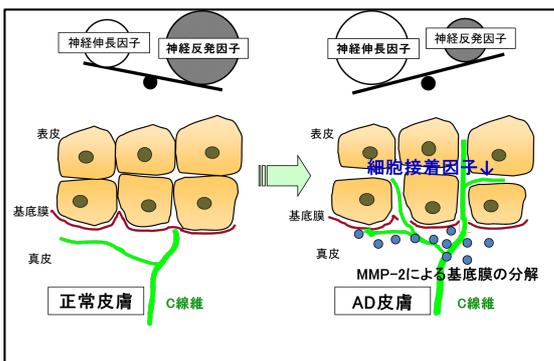


図1. 皮膚バリア破綻による神経線維の侵入・伸長メカニズム

一方、AD病変部には健常者では見られない黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の colonization が見られる。*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)。*S. aureus* の colonization の率(90%)や重症感染の頻度が極めて高い原因として、表皮

において抗菌ペプチドの発現誘導が低下することが報告されている(Ong et al., N Engl J Med, 2002, 347: 1151-1160)。

最近、我々は抗菌ペプチドの一種である LL-37 で正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)を刺激すると、Sema3A の mRNA 発現が増加することを見出した。ヒト cathelicidin は陽性荷電を持つ 18 kDa の不活性型タンパク質(hCAP18)として産生され、セリンプロテアーゼのカリクレインによる分解を受ける。それにより、C末端の抗菌活性を持つペプチドが LL-37 として遊離する。健常人の表皮角化細胞が産生する主な抗菌ペプチドには、ヒト-defensin (hBD)と cathelicidin がある。強い陽性荷電を持つこれらのペプチドは、陰性に荷電した細菌の細胞膜に挿入され、小孔を形成し、殺菌作用を発揮する(Ganz et al., Nat Rev Immunol, 2003, 3: 710-720)。皮膚では表皮角化細胞が hBD-1~4 と LL-37、マスト細胞が LL-37 を産生する(Niyonsaba et al., J Immunol, 2010, 184: 3526-3534)。

そこで、抗菌ペプチドを配合した軟膏を作製し AD 病変部に外用すれば、Sema3A 発現の正常化と共に抗菌ペプチドの補充が可能となり、効率的に AD の病態を改善することができるのではないかと考えた。しかしながら、AD 病変部の Sema3A 発現と抗菌ペプチドの関連性については全く報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は、抗菌ペプチドによる神経反発因子 Sema3A の発現促進機構を解明し、止痒効果と抗菌作用の両者を併せ持つ、新しい AD 治療薬を開発することを目的とし、主に培養細胞を用いて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 表皮角化細胞の培養

正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)は 0.15 mM CaCl₂ の存在下で、KGM-Gold Single Quots を添加した KBM-Gold を用いて、37℃, 5% CO₂ 存在下で培養した。細胞、培地及び添加剤は全て Lonza (Basel, Switzerland) から購入した。

(2) Real-time PCR による遺伝子発現解析

RLT buffer を加えて細胞を溶解後、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、total RNA を抽出した。逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) を用いた。Real-time PCR は SYBR Premix Ex Taq を使用し、Applied Biosystems Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で解析した。

(3) NHEK における Sema3A の発現に及ぼす抗菌ペプチドの作用

プレコンフルエントの NHEK に抗菌ペプチド(hBD-1~4 または LL-37)を添加し、培養

を継続する。添加後 3 時間、24 時間、48 時間時点で total RNA 及び培養上清を回収した。Total RNA は逆転写反応後、Real-time PCR で *Sema3A* mRNA の発現を確認した。培養上清中へ分泌された *Sema3A* タンパク質の定量はヒト *Sema3A* ELISA キット(Uscon Life Science, Wuhan, China)を用いた。

(3) 抗菌ペプチド LL-37 の *Sema3A* 発現促進作用におけるシグナル伝達経路の解析

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 阻害剤を用いた解析

GPCR 阻害剤であるコレラ毒素(cholera toxin; CT)または百日咳毒素 (pertussis toxin; PT) と NHEK を 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 を添加し、24 時間後に細胞から total RNA を抽出、Real-time PCR で *Sema3A* mRNA の発現を解析した。CT は和光純薬工業 (Osaka, Japan) から、PT は Sigma-Aldrich (St Louis, MO USA) から購入した。

MAPK 阻害剤を用いた解析

ERK1/2 阻害剤 PD98059、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤ワートマニン、p38 阻害剤 SB203580 または c-Jun N-terminal kinase(JNK)阻害剤 SP600125 と NHEK を 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 を添加し、24 時間後に細胞から total RNA を抽出し、Real-time PCR で *Sema3A* mRNA の発現を解析した。PD98059 は Cell Signaling Technology (Beverly, MA USA) から、ワートマニン及び SB203580 は Sigma-Aldrich から、SP600125 は Calbiochem (Darmstadt, Germany)から購入した。

LL-37 の候補受容体の阻害剤を用いた解析

P2X₇ 受容体 (P2X₇R) アンタゴニスト Coomassie brilliant blue G-250 (BBG) または formyl peptide receptor like-1(FPRL1) アンタゴニスト WRW4 を NHEK と 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 を添加し、24 時間後に細胞から total RNA を抽出、Real-time PCR で *Sema3A* mRNA の発現を解析した。BBG は東京化成工業 (Tokyo, Japan) から、WRW4 は Abgent (San Diego, CA USA) から購入した。

(4) 統計処理

全ての統計解析は統計ソフト GraphPad Prism 5(GraphPad Software, La Jolla, CA USA)を用いて行った。2 群間の有意差検定は Student's t-test、それ以外は Dunnett's multiple comparison test を用い、P<0.05 以下を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) NHEK における *Sema3A* 発現に及ぼす抗菌ペプチドの作用

NHEK に抗菌ペプチドの hBD-1, -2, -3, -4 及び LL-37 各 10 µg/mL を添加し、3 時間後、24 時間後、48 時間後の *Sema3A* mRNA 発現を Real-time PCR で解析した。その結果、LL-37 添加 48 時間後に有意に *Sema3A* mRNA 発現が約 3 倍促進された (P<0.001) [図 2]。hBD-2 及び hBD-3 添加時にも *Sema3A* の発現増加傾向が見られたが、有意差はなかった。

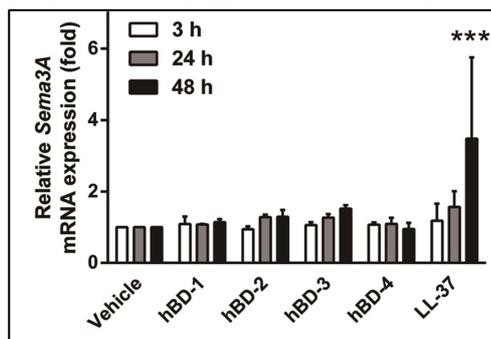


図 2. 抗菌ペプチドで刺激後の NHEK における *Sema3A* mRNA 発現の定量

LL-37 の添加濃度を 0, 1, 10, 20 µg/mL とし、3 時間後、24 時間後、48 時間後の *Sema3A* mRNA 発現変化を解析した。10 µg/mL 添加群は 48 時間後に約 3 倍 (P<0.001)、20 µg/mL 添加群は 24 時間後に約 2 倍 (P<0.05) 及び 48 時間後に約 4 倍 (P<0.001)、*Sema3A* mRNA 発現が増加した [図 3]。20 µg/mL を添加し 48 時間後の培養上清中の *Sema3A* タンパク質量も約 2 倍増加した (P<0.001) [図 4]。

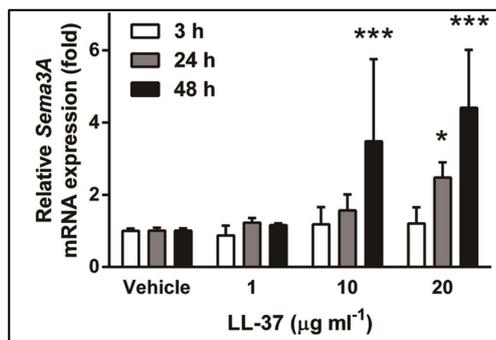


図 3. LL-37 刺激後の NHEK における *Sema3A* mRNA 発現の変化

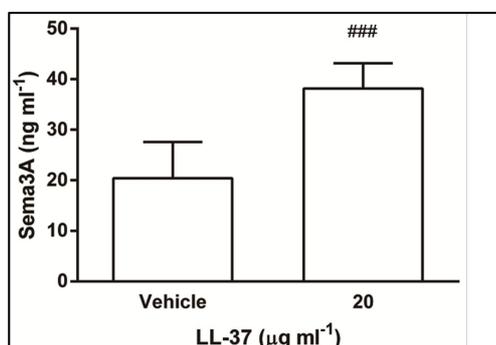


図 4. LL-37 刺激後の NHEK 培養上清中に分泌された *Sema3A* の定量

(2) LL-37 による *Sema3A* 発現促進作用に対する GPCR 阻害剤及び MAPK 阻害剤の影響

抗菌ペプチドのなかでも LL-37 の *Sema3A* 発現促進作用が最も強いことが判明した。そこで、*Sema3A* に対する LL-37 の作用機序を解明するために、シグナル伝達経路を解析した。G タンパク質は、サブユニットから成る三量体であり、受容体刺激のシグナルを細胞内へと運ぶ役割を持つ。hBD や LL-37 によるヒト表皮角化細胞からの IL-18 分泌促進作用、及びヒトマスト細胞からの IL-31 分泌促進作用は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路を介することが報告されている (Niyonsaba et al., J Immunol, 2005, 175: 1776-1784; Niyonsaba et al., J Immunol, 2010, 184: 3526-3534) GPCR のサブユニットは G_s, G_i, G_q 等のサブファミリーに分類される。表皮角化細胞において、*Sema3A* の発現促進作用に關与する LL-37 の受容体を同定するために、GPCR 阻害剤を用いた解析を行った。NHEK を G_i 阻害剤の PT (200 ng/mL) または G_s 阻害剤の CT (100 μ g/mL) と 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 (20 μ g/mL) を添加した結果、LL-37 単独添加群と比較して LL-37 + PT 添加群では、*Sema3A* mRNA 発現促進作用が消失した ($P < 0.01$) [図 5a]。一方、LL-37 + CT 添加群は *Sema3A* 発現に影響はなかった。

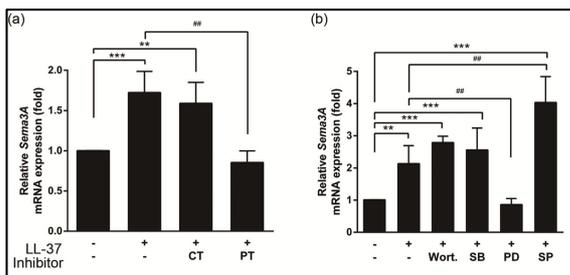


図 5 . LL-37 による *Sema3A* mRNA の発現促進作用は G_i 阻害剤の PT ならびに ERK1/2 阻害剤 PD98059 により阻害される

次に LL-37 による *Sema3A* 発現促進作用に關与するシグナル伝達系を明らかにするため、MAPK 阻害剤を用いて解析を行った。NHEK を ERK1/2 阻害剤の PD98059 (PD, 10 μ M)、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤のワートマニン (Wort, 20 μ M)、p38 阻害剤の SB203580 (SB, 10 μ M) または c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤の SP600125 (SP, 10 μ M) と NHEK を 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 (20 μ g/mL) を添加した結果、LL-37 単独添加群と比較して LL-37 + PD98059 添加群では LL-37 による *Sema3A* mRNA 発現促進作用が消失した ($P < 0.01$) [図 5b]。以上の結果は、LL-37 による *Sema3A* mRNA 発現促進作用は G_i 共役型 GPCR ならびに MAPK の一種である ERK1/2 を介することを示唆した。一方、LL-37 単独添加群と比較して LL-37 + SP600125 添加群の

Sema3A mRNA 発現はさらに促進されたことから ($P < 0.01$)、JNK は *Sema3A* の発現抑制に關与する可能性が考えられた [図 5b]。

(3) LL-37 の候補受容体の阻害剤が LL-37 による *Sema3A* 発現促進作用に及ぼす影響

(2) の解析から、LL-37 の *Sema3A* mRNA 発現促進作用には G_i 共役型 GPCR が關与していることが判明した。LL-37 の候補受容体として GPCR の $P2X_7$ 受容体 ($P2X_7R$) と formyl peptide receptor like-1 (FPRL1) が報告されている (Niyonsaba et al., Curr Pharm Des, 2009, 15: 2393-2413)。そこで、これらの受容体の阻害剤を用いて、(2) と同様の解析を行った。NHEK を $P2X_7R$ アンタゴニストの BBG (1 μ M) または FPRL1 アンタゴニストの WRW4 (1 μ M) と 1 時間プレインキュベーション後、LL-37 (20 μ g/mL) を添加した結果、LL-37 + BBG 添加群で LL-37 による *Sema3A* mRNA 発現促進作用がやや抑制された [図 6]。以上の結果より、LL-37 による *Sema3A* 発現促進作用は一部 $P2X_7R$ を介している可能性が考えられた。

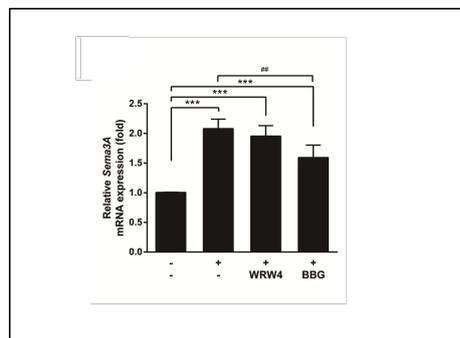


図 6 . LL-37 による *Sema3A* 発現促進作用は一部 $P2X_7R$ を介している

(まとめ)

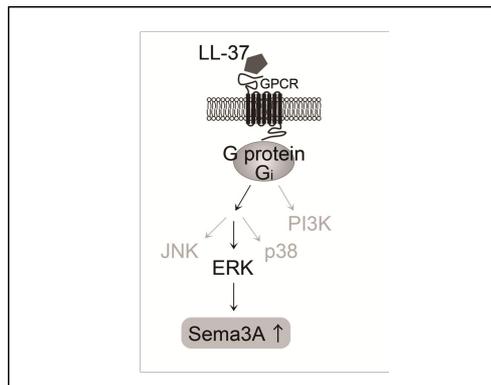


図 7 . LL-37 による *Sema3A* 発現促進に關与するシグナル伝達系

本研究では、抗菌ペプチドによる *Sema3A* 発現促進作用に着眼し、その発現促進メカニズムについて解析した。抗菌ペプチドの中でも LL-37 で NHEK を刺激した時、*Sema3A* の mRNA ならびにタンパク質発現は最も促進されることが判明した。阻害剤を用いた実験から、LL-37 は G_i 共役型 GPCR と ERK1/2 を介して、

Sema3A の発現を促進することが明らかとなった。また、LL-37 による Sema3A 発現促進作用は一部、GPCR の一種である P2X₇R を介していることが示唆された。[図7]

AD 病変部では Sema3A 発現が減少し、表皮内神経線維が増生、抗ヒスタミン薬抵抗性の痒みの一因となる (Tominaga et al., J Dermatol, 2014, 41:205-12.)。一方、AD 患者の皮膚では抗菌ペプチドの発現が誘導されず、非病変部・病変部に問わず、*S. aureus* が高頻度に検出される (Ong et al., N Engl J Med, 2002, 347: 1151-1160)。以上のことから、抗菌ペプチド LL-37 を配合した軟膏は Sema3A 発現促進剤として、AD の痒み治療に応用できる可能性が示唆された。今後は、LL-37 に応答する遺伝子プロモーター領域を同定すると共に、実際に LL-37 配合軟膏を AD モデルマウスに塗布し止痒ならびに病態改善効果を評価する予定である。

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 1 件)

Yoshie Umehara, Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, François Niyonsaba, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori. Cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A expression in human epidermal keratinocytes: implications for possible application to pruritus. J Invest Dermatol, 135: 2887-2890, 2015. 査読有

DOI: 10.1038/jid.2015.243

[学会発表](計 4 件)

Yoshie Umehara, Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, François Niyonsaba, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori: The effects of cathelicidin LL-37 on semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes. 8th World Congress on Itch, 2015 年 9 月 28-29 日, Nara Kasugano International Forum (Nara, Japan).

Yoshie Umehara, Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, François Niyonsaba, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori. The antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A production in normal human epidermal keratinocytes. Society for Investigative Dermatology 2015 Annual Meeting, 2015 年 5 月 8 日, Hilton Atlanta (Atlanta, GA, USA).

Yoshie Umehara, Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, François Niyonsaba, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori: Effects

of antimicrobial peptides on expression of axon guidance molecules in normal human epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015 年 12 月 11 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)。

梅原芳恵、鎌田弥生、富永光俊、François Niyonsaba、小川秀興、高森建二: 抗菌ペプチド LL-37 は培養正常ヒト表皮角化細胞における神経反発因子 semaphorin 3A の発現を促進する。第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 2015 年 11 月 21 日, 島根県民会館 (島根県松江市)。

[図書](計 4 件)

Yayoi Kamata, Mitsutoshi Tominaga, Kenji Takamori: Management of Itch in Atopic Dermatitis. Itch: Management in Clinical Practice, 1st ed, S. Karger AG, Szepietowski JC and Weisshaar E (eds), 2016, in press.

鎌田弥生、高森建二: 抗ヒスタミン薬・膠原病・リウマチ・アレルギー研修ノート, 診断と治療社, 574 (271-273), 2016.

富永光俊、加茂敦子、鎌田弥生、高森建二: いまどうなっている? アトピー性皮膚炎かゆみのメカニズム. *Mebio*, 32 (4), (98)29-37, 2015.

富永光俊、鎌田弥生、梅原芳恵、Ky Chan Ko、加茂敦子、高森建二: アトピー性皮膚炎かゆみのメカニズム. *J Environ Dermatol Cutan Allergol*, 9 (1), (72)1-11, 2015.

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称: 掻痒性皮膚疾患の治療又は予防剤
発明者: 梅原芳恵、鎌田弥生、富永光俊、ニヨンサバ フランソワ、高森建二
権利者: 学校法人 順天堂、東レ株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2014-177778
出願年月日: 2014 年 9 月 2 日
国内外の別: 国内

名称: 掻痒性皮膚疾患の治療又は予防剤
発明者: 梅原芳恵、鎌田弥生、富永光俊、ニヨンサバ フランソワ、高森建二
権利者: 東レ株式会社
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/ 74906
出願年月日: 2015 年 9 月 2 日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 弥生 (KAMATA, Yayoi)
順天堂大学・大学院医学研究科・
非常勤助教
研究者番号：00410035

(2) 研究協力者

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

ニヨンサバ フランソワ
(NIYONSABA, François)
順天堂大学・国際教養学部・前任准教授
研究者番号：60365640