

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16346

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患の病態形成に関わる抗菌ペプチドmBD14の発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the expression control mechanism of mBD14, an antimicrobial peptide involved in the pathogenesis of inflammatory skin diseases

研究代表者

広瀬 晴奈 (Matsuda-Hirose, Haruna)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50750915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1)表皮角化細胞特異的TRAF6欠損マウスでは、ランゲルハンス細胞特異的TRAF6欠損マウスと比較し、定常状態におけるmBD14発現レベルが低下していた。この結果は、定常状態の表皮でのmBD14の発現における表皮角化細胞のTRAF6の重要性を示唆する。

(2)黄色ブドウ球菌によるmBD14の発現上昇反応が、ランゲルハンス細胞特異的TRAF6欠損マウスでは維持されたが、表皮角化細胞特異的TRAF6欠損マウスでは抑制された。この結果は、黄色ブドウ球菌の経皮的侵入によるmBD14発現誘導における表皮角化細胞のTRAF6の重要性を示唆する。しかし、より安定性の高い実験系で再現性を確認する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮角化細胞のTRAF6が、黄色ブドウ球菌に対する皮膚の防御反応において重要な蛋白質である抗菌ペプチドの発現誘導において重要な分子で有る可能性が示された。本研究によって、様々な皮膚の炎症性疾患の病態において重要な、皮膚における抗菌バリア機能の機序の一端が明らかになろうとしている。

研究成果の概要(英文)：(1)In the keratinocyte-specific TRAF6-deficient mice, the mBD14 expression level in the steady state was decreased as compared with that in the Langerhans cell-specific TRAF6-deficient mice. This result suggests the importance of keratinocyte TRAF6 in the expression of mBD14 levels in epidermis in steady-state.

(2)The *S. aureus*-induced upregulation of mBD14 mRNA expression was maintained in Langerhans cell-specific TRAF6-deficient mice, but was suppressed in keratinocyte-specific TRAF6-deficient mice. This result suggests the importance of TRAF6 in keratinocytes but not Langerhans cells in induction of mBD14 expression in response to transcutaneous invasion of *S. aureus*. However, it was found that more reliable experimental system should be conducted to conclude the result.

研究分野：皮膚科学

キーワード：抗菌ペプチド TRAF6

1. 研究開始当初の背景

皮膚には様々な常在菌から構成される皮膚細菌叢が形成されており、皮膚の恒常性維持に不可欠である。近年、皮膚で産生される defensin などの抗菌ペプチドが何らかの原因で減少する皮膚細菌叢の多様性が失われ、黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) の割合が増えることでアトピー性皮膚炎 (AD) が増悪することが明らかになった。従って、皮膚における defensin の発現調節機構の解明は重要であるが、未だその詳細は不明であった。defensin は、 α -defensin の 2 種に分類されるが、皮膚に存在するのは α -defensin であり、3 種類の α -defensin の中でも hBD-3 は何らかの炎症刺激により発現が誘導され、グラム陽性菌を含む幅広い抗菌性を示す。AD を含む炎症性皮膚疾患の発症には、*S.aureus* や化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) などのグラム陽性菌が関連していることから、本疾患の病態解明と制御法の確立には hBD-3 の発現制御機構の解明が不可欠であった。

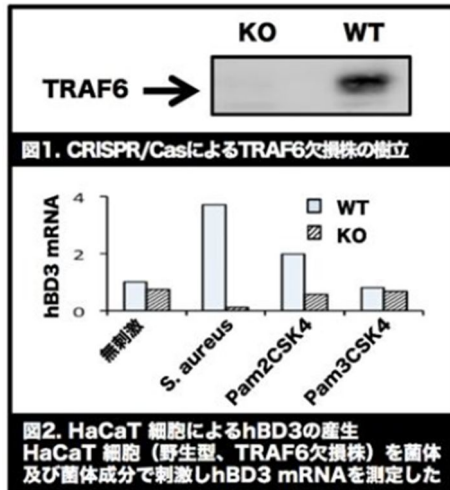


図1. CRISPR/CasによるTRAF6欠損株の樹立

図2. HaCaT細胞によるhBD3の産生
HaCaT細胞(野生型、TRAF6欠損株)を菌体及び菌体成分で刺激しhBD3 mRNAを測定した

表皮角化細胞は、TLR(Toll様受容体)1/2,TLR2/6を介してグラム陽性球菌のリポペプチドを認識し、抗菌ペプチドを産生することが知られている。TLRは細胞内分子 TRAF6によりシグナルを伝達することから、我々は、ヒトケラチノサイト細胞株であるHaCaT細胞のTRAF6遺伝子をCRISPR/Casシステムによりノックアウトした(図1)。

続いて野生型及びTRAF6欠損HaCaT細胞を黄色ブドウ球菌菌体 (*S.aureus*) で刺激し、hBD3mRNAの発現をreal time PCR法で解析したところ、hBD3がケラチノサイトでTRAF6依存的に誘導されることを見出した(図2)。一方、グラム陽性菌成分(Pam2CSK4,Pam3CSK4)で刺激を加えたところ、TLR2/6のリガンドであるPam2CSK4の刺激でhBD3が誘導されることも発見した(図2)。さらに、hBD3は炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-1

の刺激でも誘導され、これらの誘導はIL-4の添加で抑制されることが明らかになった。

これらの予備検討の結果から、生体内の皮膚組織におけるhBD3の誘導機序を分子レベルで解

明するため、マウスのhBD3オホログであるmBD14の発現誘導機構を組織特異的TRAF6欠損マウスを用いて解析しようという着想に至った。mBD14(マウス遺伝子)は、hBD3(ヒト遺伝子)との相同性が68%以上あり、hBD3同様に炎症により誘導され幅広い抗菌性を示す抗菌ペプチドである。また、生体内ではケラチノサイトのみならずランゲルハンス細胞などの抗原提示細胞もTLRを介して病原体成分を認識し、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインを産生する。

2. 研究の目的

組織特異的TRAF6欠損マウスに*S.aureus*感染させmBD14誘導能を明らかにすることを目的とする。具体的には、ケラチノサイト特異的にTRAF6を欠損するK5Cre-TRAF6Floxマウスと、ランゲルハンス細胞特異的にTRAF6を欠損するCD11cCre-TRAF6Floxマウスを用いて、*S.aureus*の皮膚感染実験を行い、感染部位のmBD14の発現誘導をrealtime PCR法で明らかにする。

3. 研究の方法

TRAF6flox/floxマウスとK5Creマウス・InvolucrinCreマウス・CD11cCreマウスとを交配させコンディショナルノックアウトマウスを作製した。その野生雌性BALB/c、ケラチノサイトやランゲルハンス細胞に特異的TRAF6欠損マウスの背側皮膚を剃毛・脱毛後にテープストリッピングを行い、TEWLを80g/(m²・h)程度にした。当該皮膚に6.4×10⁹cfu/50μlの*S.aureus*を浸み込ませたフィンチャンバーを貼付した。コントロール群においてはPBSを浸み込ませたフィンチャンバーを貼付した。24時間後に皮膚を採取し、mBD14の発現を解析した。実験は全部で3回行った(実験1~3)。ABP1においては被試験皮膚を腹部に、実験2・実験3においては、被試験皮膚を背部に変更して行った。

4. 研究成果

実験1~3共通して認められた結果

コントロール群(PBS群)における皮膚組織内のmBD14のmRNAの発現レベルは、ケラチノサイト特異的TRAF6欠損マウス(K5-CreTRAF6)において、コントロールマウスやランゲルハンス細胞特異的TRAF6欠損マウス(CD11c-CreTRAF6)と比較して低かった。

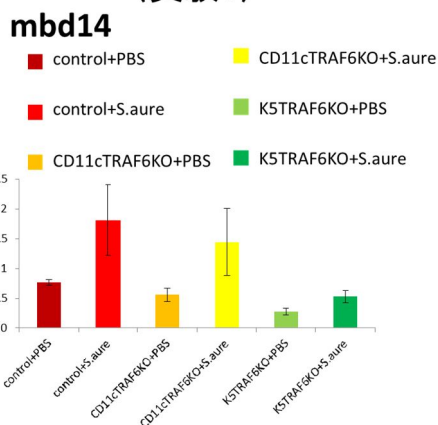
実験1のみで認められた結果

実験1においては、*S.aureus*によるmBD14のmRNA発現上昇反応が、CD11c-CreTRAF6では維持されていたが、K5-CreTRAF6ではその反応が抑制されていた。

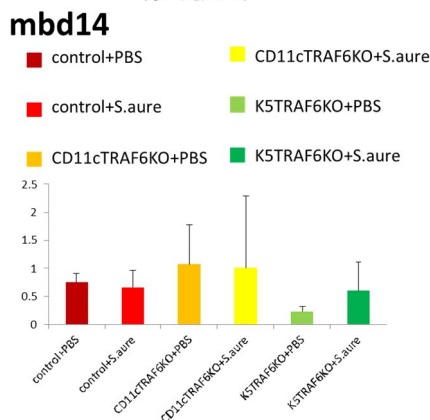
実験2と3での結果

実験 2 と 3 においては、コントロールマウス、K5-CreTRAF6 と CD11c-CreTRAF のいずれのマウスにおいても *S.aureus* による mBD14 の発現誘導が確認できず、*S.aureus* による mBD14 の発現増強に関して再現性を得ることができなかった。

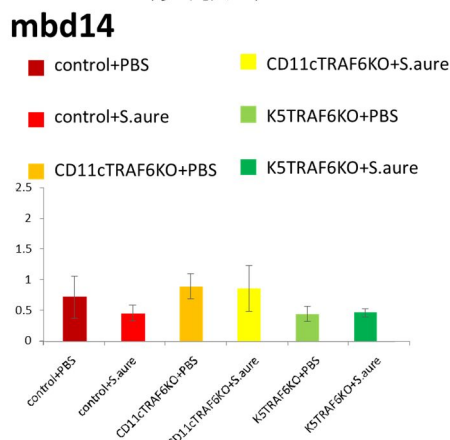
〈実験1〉



〈実験2〉



〈実験3〉



(成果のまとめ)

S.aureus 非塗布、則ち PBS 塗布群での比較において、K5-CreTRAF6 における mBD14 発現レベルが、コントロールマウスや CD11c-CreTRAF6 と比較し低いレベルであった点は、定常状態における皮膚の mBD14 レベルの発現におけるケラチノサイトの TRAF6 の重要性を示唆している。一方、本研究では剃毛やテープストリップというバリア(主に角層透過性バリア)傷害操作を実施した後に mBD14 の mRNA 発現レベルを解析している点に留意する必要がある。mBD14 は外傷やバリア破壊によっても上昇することが知られており、今回認められた K5-CreTRAF6 における mBD14 発現レベルの低値は、外傷やバリア破壊による反応性の mBD14 発現誘導にケラチノサイトにおける TRAF6 が関与している可能性を示唆するのかもしれない。耳介など、剃毛の要しない組織での発現レベルの解析やテープストリッピング後の発現レベルの経時的変化などの解析により明らかになると考えられる。

実験 1 で得られた結果が事実であれば、*S.aureus* の経皮的侵入に対応した mBD14 発現誘導におけるケラチノサイトの TRAF6 の重要性が示唆される。一方、実験 2 と実験 3 では、同様の結果が再現できなかった。実験 1 で得られた結果が事実でないか、実験 2 と実験 3 の実験条件が不適切であったかのいずれかと考えられる。特に、実験 2 と実験 3 では、PBS 塗布と比較した *S.aureus* 塗布による mBD14 発現誘導が観察されていない点が問題である。尿・便汚染や傷による影響あるいは PBS 内での細菌の繁殖などにより *S.aureus* 塗布効果が観察出来なかったのかもしれない。尿・便汚染を防ぐため、実験 3 では貼付部位を腹側から背側へ変更したが、尿・便汚染が阻止できているとは言えなかった。一方、実験 1 における尿・便汚染の程度がどの程度であったかの記録がないが、*S.aureus* 塗布による mBD14 発現誘導が観察されていることから、実験 1 の信頼性が高い可能性がある。本研究は、尿・便汚染の影響を無視できる耳介などで施行することや PBS の無菌性をより確実にする等の工夫を行い、*S.aureus* 塗布による mBD14 発現誘導が明確に観察可能な実験系を確立した上で、再度、実施する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Noguchi Kaori, Kamiyama Naganori, Hidano Shinya, Gendo Yoshiko, Sonoda Akira, Ozaki Takashi, Hirose Haruna, Sachi Nozomi, Saechue Benjawan, Ozaka Sotaro, Eshita Yuki, Mizukami Kazuhiro, Kawano Kenji, Kobayashi Takashi | 4. 巻 504 |
| 2. 論文標題 Autoimmune sialadenitis is associated with the upregulation of chemokine/chemokine receptor pairs in T cell-specific TRAF6-deficient mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 245 ~ 250 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.162 | 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 Sonoda Akira, Kamiyama Naganori, Ozaka Sotaro, Gendo Yoshiko, Ozaki Takashi, Hirose Haruna, Noguchi Kaori, Saechue Benjawan, Sachi Nozomi, Sakai Kumiko, Mizukami Kazuhiro, Hidano Shinya, Murakami Kazunari, Kobayashi Takashi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Oral administration of antibiotics results in fecal occult bleeding due to metabolic disorders and defective proliferation of the gut epithelial cell in mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1055 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12649 | 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 Gendo Y, Matsumoto T, Kamiyama N, Saechue B, Fukuda C, Dewayani A, Hidano S, Noguchi K, Sonoda A, Ozaki T, Sachi N, Hirose H, Ozaka S, Eshita Y, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Yoshimatsu T, Nishida H, Daa T, Yamaoka Y, Murakami K, Kobayashi T. | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Dysbiosis of the Gut Microbiota on the Inflammatory Background due to Lack of Suppressor of Cytokine Signalling-1 in Mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Inflammatory Intestinal Diseases | 6. 最初と最後の頁 145 ~ 154 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000495462 | 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 Zhang Wei, Sakai Takashi, Matsuda-Hirose Haruna, Goto Mizuki, Yamate Tomoko, Hatano Yutaka | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 Cutaneous permeability barrier function in signal transducer and activator of transcription 6-deficient mice is superior to that in wild-type mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science | 6. 最初と最後の頁 54 ~ 61 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.07.008 | 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 Ishikawa Kazushi, Furuhashi Mie, Sasaki Takashi, Kudoh Jun, Tsuchisaka Atsunari, Hashimoto Takashi, Sasaki Takako, Yoshioka Hidekatsu, Eshima Nobuoki, Matsuda-Hirose Haruna, Sakai Takashi, Hatano Yutaka, Fujiwara Sakuhei | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Intragenic copy number variation within human epiplakin 1 (EPPK1) generates variation of molecular size of epiplakin | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science | 6. 最初と最後の頁 228 ~ 231 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.05.008 | 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 酒井 貴史、広瀬 晴奈、甲斐 宜貴、石川 一志、後藤 瑞生、島田 浩光、竹尾 直子、藤原 作平、波多野 豊 | 4. 巻 128 |
| 2. 論文標題 皮膚科病棟における静脈血栓塞栓症の発生状況とその対策 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 2269 ~ 2278 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.14924/dermatol.128.2269 | 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 Wei Zhang'Correspondence information about the author Wei Zhang, Takashi Sakai, Haruna Matsuda-Hirose, Yutaka Hatano | 4. 巻 86 |
| 2. 論文標題 Permeability barrier function in STAT6-deficient mice is superior to that in wild-type mice | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science | 6. 最初と最後の頁 e41-e41 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.02.121 | 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 Matsuda-Hirose H, Yamate T, Goto M, Katoh A, Kouji H, Yamamoto Y, Sakai T, Uemura N, Kobayashi T, Hatano Y | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Selective inhibition of β -catenin/co-activator cyclic-AMP-response-element-binding protein - dependent signaling prevents the emergence of hapten-induced atopic dermatitis-like dermatitis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 631-639 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5021/ad.2019.31.6.631 | 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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Benjawan Saechue, Naganori Kamiyama, Shinya Hidano, Kaori Noguchi, Yoshiko Gendo, Takashi Ozaki, Akira Sonoda, Haruna Hirise, Nozomi Sachi, Sotaro Ozaka, Takashi Kobayashi, |
| 2. 発表標題 Development of a rapid and simple reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for Chikungunya virus |
| 3. 学会等名 41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神山長慶, 渡辺 景, Benjawan Saechue, 飛弾野真也, 野口香緒里, 玄同淑子, 尾崎貴士, 園田光, 広瀬 晴奈, 小坂 聡太郎, 佐知望美, 鈴木 亮介, 小林隆志 |
| 2. 発表標題 アフリカ株とアジア株SRIPsを用いた、ジカウイルスの宿主細胞侵入効率の解析 |
| 3. 学会等名 41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齊藤 華奈実, 広瀬 晴奈, 中村 優佑, 竹尾 直子, 後藤 瑞生, 片山 映樹, 緒方 正男, 岡本 壽男, 波多野 豊 |
| 2. 発表標題 ベキサロテンとPUVA療法併用の奏効した汗腺向性菌状息肉症の1例 |
| 3. 学会等名 第103回日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 広瀬 晴奈, 福山 莉沙, 中田 京子, 竹尾 直子, 山手 哲明, 波多野 豊 |
| 2. 発表標題 熱帯魚が感染源と考えられたMycobacterium marinumによる非結核性抗酸菌症 |
| 3. 学会等名 第103回日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤華奈実 広瀬晴奈 生野知子 後藤瑞生 竹尾直子 波多野豊 島田浩光 柴富和貴 |
| 2. 発表標題 生物学的製剤の使用の工夫 ~アクティブバイオスイッチとネガティブバイオスイッチに関して |
| 3. 学会等名 第33回日本乾癬学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 広瀬晴奈 正百合子 山手朋子 中村優佑 齋藤華奈実 竹尾直子 西田陽登 石井宏治 杉浦一充 波多野豊 |
| 2. 発表標題 ヒドロキシクロロキンによる急性汎発性発疹性膿疱症の1例 |
| 3. 学会等名 第70回日本皮膚科学会西部支部学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 酒井貴史 佐藤崇興 齋藤華奈実 島田浩光 広瀬晴奈 波多野豊 杉浦一 |
| 2. 発表標題 ステロイド全身投与で著しく悪化し、インフリキシマブ投与で寛解を得た、急性汎発性発疹性膿疱症と考えられる1例 |
| 3. 学会等名 第104回日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 広瀬 晴奈, 正 百合子, 竹尾 直子, 波多野 豊, 高田 寛之, 緒方 正男, 西田 陽登, 横山 繁生 |
| 2. 発表標題 骨髄移植後に緊満性水疱を生じ、急性GVHDと考えられた1例(会議録) |
| 3. 学会等名 日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 園田 光, 玄同 淑子, 尾崎 貴士, 野口 香緒里, 広瀬 晴奈, 佐知 望美, 神山 長慶, 飛弾野 真也, 水上 一弘, 村上 和成, 小林 隆志 |
| 2. 発表標題 アンピシリンとバンコマイシン投与による腸内細菌叢とグルタミン酸、酪酸代謝経路の異常が腸炎を誘導する |
| 3. 学会等名 癌・炎症と抗酸化研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 尾崎 貴士, 後藤 亮, 園田 光, 広瀬 晴奈, 玄同 淑子, 野口 香緒里, 神山 長慶, 飛弾野 真也, 石井 宏治, 柴田 洋孝, 小林 隆志 |
| 2. 発表標題 新規脂質メディエーターのOEA及びPEAIは、Toll様受容体9 (TLR9) 刺激による樹状細胞とB細胞の活性化を抑制する |
| 3. 学会等名 癌・炎症と抗酸化研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤村 春奈, 山手 朋子, 酒井 貴史, 広瀬 晴奈, 生野 知子, 波多野 豊, 上原 幸, 清水 史明, 花岡 拓哉, 松原 悦朗 |
| 2. 発表標題 Charcot-Marie-Tooth病の末梢神経障害に伴い足底の胼胝下に潰瘍を形成した1例 |
| 3. 学会等名 第100回日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 広瀬 晴奈, 正 百合子, 竹尾 直子, 波多野 豊, 高田 寛之, 緒方 正男, 西田 陽登, 横山 繁生 |
| 2. 発表標題 骨髄移植後に緊満性水疱を生じ、急性GVHDと考えられた1例 |
| 3. 学会等名 第100回日本皮膚科学会大分地方会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Matsuda-Hirose H, Yamate T, Goto M, Katoh A, Kouji H, Yamamoto Y, Sakai T, Uemura N, Kobayashi T, Hatano Y |
| 2. 発表標題 Selective inhibition of β -catenin/co-activator cyclic-AMP-response-element-binding protein β -dependent signaling prevents the emergence of hapten-induced atopic dermatitis-like dermatitis. |
| 3. 学会等名 International Investigative Dermatology (IID 2018) |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|