

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790807

研究課題名（和文） なぜ白癬菌は表皮角層内に存在するだけで炎症を惹起するのか
—自然免疫から探る—研究課題名（英文） Does the epidermal keratinocyte recognize the pathogens,
as for dermatophyte, by itself?

研究代表者

小林 美和 (KOBAYASHI MIWA)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00341503

研究成果の概要：体の表面を覆う皮膚は、体を外敵から守る重要な臓器である。その最も外側にある表皮の大部分を占める表皮角化細胞には、物理的に体を守るバリアとしての働き以外にも、病原微生物の成分を認識する自然免疫の働きがあることが分かって来た。本研究にて、表皮角化細胞の受容体の発現は、病原微生物成分の刺激を受けて亢進することが分かった。従来免疫担当細胞として認識されていなかった表皮角化細胞においても、これらの受容体が機能しており、病原体を排除するための生体反応の引き起こすことが分かった。さらに、ヒスタミンが、表皮角化細胞の自然免疫活性化に影響を与えることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

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・皮膚感染症

キーワード：表皮ケラチノサイト、 β -glucan、白癬菌、ヒスタミン、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、身体の最も外側を覆い、外界からの防護壁としての役割を果たしている。物理的、化学的刺激からの防御はもちろんのこと、外敵である病原体の侵入も防ぐために免疫学的な機能も併せ持っている。皮膚は感染防御の最前線にあるため、自然免疫が発動されていることが容易に想像され、特に最表層に存在する角層、表皮に自然免疫が強く発動されていると考えられる。これまでもすでに β -defensinをはじめとする抗菌ペプチドの存在、Toll-like receptor

(TLR) が表皮ケラチノサイト (KC) にも発現していることが報告されている。ショウジョウバエにおける Toll receptor の発見の経緯から、当然ヒトの表層に感染する真菌に対する防御機構の上でも TLR が関与していると予想される。

2. 研究の目的

真菌成分で刺激をおこない、

- (1) 表皮ケラチノサイトからのサイトカイン、ケモカイン産生およびその変動をみる。
- (2) 表皮ケラチノサイトにおける innate immune protein の発現の有無、またその変動をみる。

3. 研究の方法

- (1) 真菌成分を添加した培養ケラチノサイト (KC) 産生サイトカイン・ケモカインの検討

正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) を培養し、培養液中に *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* 由来の、各濃度のトリコフィチン液および精製 β -glucan を添加する。得られた培養上清中の IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-8, IP-10, Mig, I-TAC, MDC, RANTES を ELISA にて測定する。

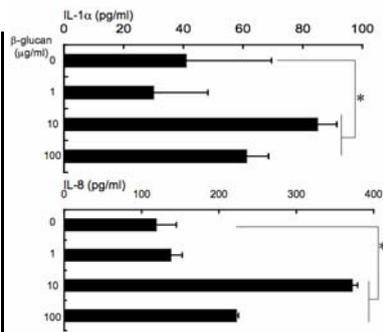
また、TLR2 のリガンドとされている ペプチドグリカン、MALP-2 も刺激物として使用する。

- (2) 真菌成分を添加した培養 KC における TLR2 の発現

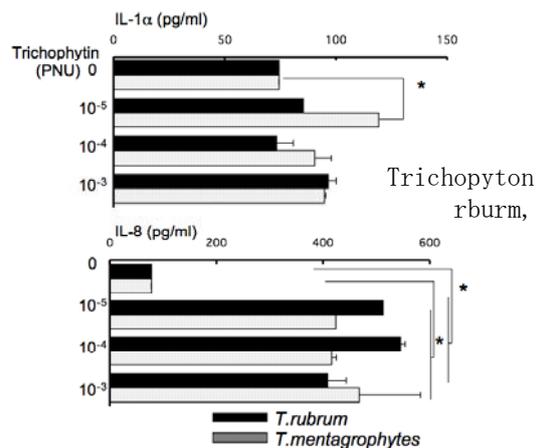
同じ培養系で得られた KC の TLR1, TLR2, TLR6, NOD2, Dectin-1, β -defensin について mRNA の発現量を調べる。また、細胞表面または細胞内を抗 TLR2 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行う。また、シート状に培養した KC を、蛍光抗体法で染色し、発現した TLR2 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析する。

4. 研究成果

- (1) β -glucan で KC を刺激すると、IL-1 α , IL-8 の産生が亢進した。



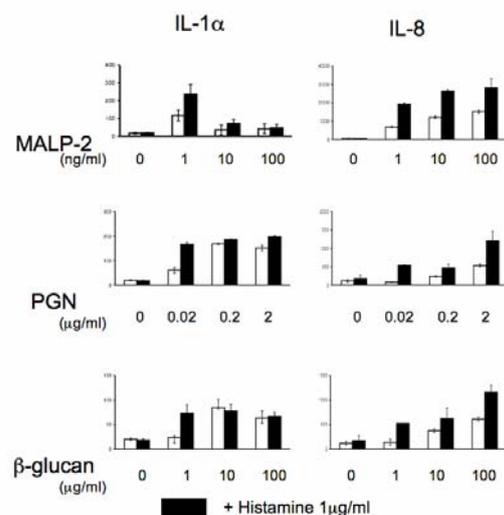
また、トリコフィチン液で刺激した際には、IL-8 の産生が亢進した。



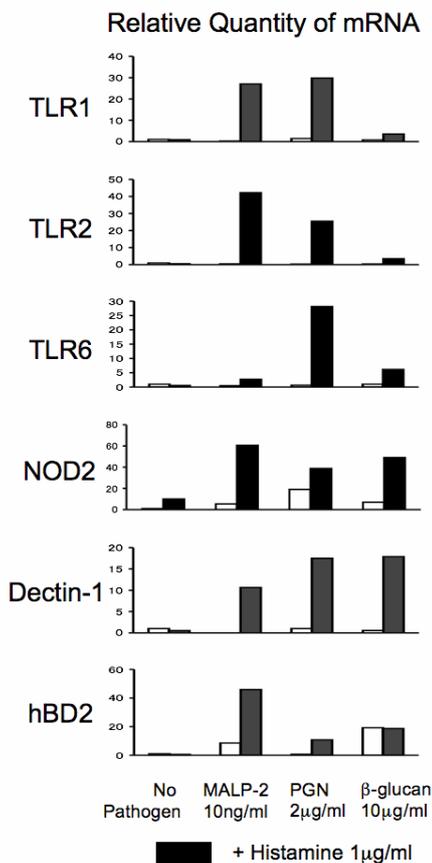
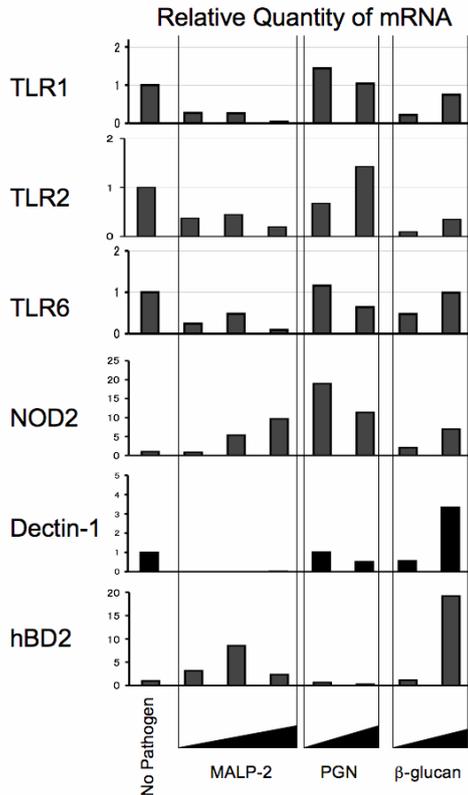
T. mentagrophytes 由来のトリコフィチン液を用いたが、2 種間の差を特徴的づける結果は得られなかった。

β -glucan に着目し、TLR2 を刺激する他の病原微生物成分であるペプチドグリカン、MALP-2 についても検討したところ、やはり IL-1 α , IL-8 の産生が亢進した。

この、サイトカイン、ケモカイン産生はヒスタミンを同時に添加する事により、その産生量が相乗的に増加する事が分かった。



(2) Real-time PCRによる解析にて、KCのTLR1, TLR2, TLR6, NOD2, Dectin-1, β -defensin2のmRNA発現量の変動をみた。



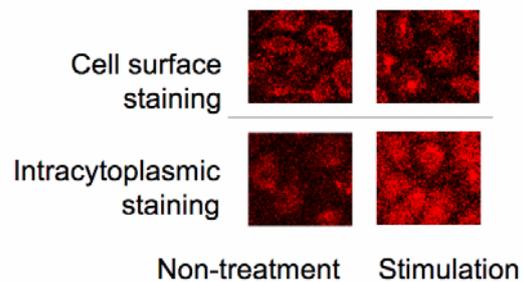
それぞれの刺激によりこれら mRNA の発現量に増減したが、特に β -glucan の刺激により、Dectin-1, β -defensin2 の発現が亢進した。

この mRNA 発現は、ヒスタミンを加える事により相乗的に亢進した。

次にフローサイトメトリー解析により、TLR2 の発現量をみたところ、細胞内の TLR2 を染色した方が、発現量の変化をより捉えやすい事が分かった。



共焦点レーザー顕微鏡を用いて、TLR2 の局在を可視的に捉えたところ、やはり、細胞内の方が細胞表面より発現量の変化を捉えやすい事が分かった。



これらの結果より、表皮ケラチノサイトの自然免疫関連受容体は、TLRs だけでなく、NOD, dectin も発現しており、これらは機能的であることが分かった。このことから、表在性皮膚真菌症のような、皮膚の表面に菌が存在し、いわゆる免疫担当細胞との接触がなくとも、表皮ケラチノサイト自身が病原体を認識し、排除機構を働かせる事が説明できる。

また、表皮ケラチノサイトの自然免疫発動には、ヒスタミンの存在が重要であることも分かった。

さらに、表皮ケラチノサイトでは、細胞表面の受容体数の変動は微小であることが分かった。この事は、体表に存在し、常に微生物と接触している上皮細胞が、過剰に自然免疫を発動しない理由の1つとして考えられる。

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2件)

- ①. M Kobayashi, R Yoshiki, J Sakabe, K Kabashima, M Nakamura, Y Tokura. Expression of Toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *British Journal of Dermatology* 2009; 160 :297-304 査読有り
- ②. 小林美和、椛島健治、戸倉新樹. 表皮ケラチノサイトのIL-8 産生に対する真菌成分の影響と、抗真菌薬リラナフタートによる抑制効果. *日本医真菌学会雑誌* 2008; 49: 319-322 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ①. 小林 美和. β -glucanとヒスタミン刺激によるケラチノサイトの自然免疫発動. 第51回日本医真菌学会総会. 2008年11月9-10日,岐阜
- ②. M. Kobayashi. Histamine as a key enhancer for skin innate immunity to fungi. *International Investigative Dermatology* 2008; 2008年5月14-17日 京都
- ③. Miwa Kobayashi. Augmentation of Intracellular TLR2 Expression by Peptidoglycan, β -Glucan, and Histamine in Human Keratinocytes. 37th Annual European Society for Dermatological Research Meeting2007.Sep.6-8 Zurich

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 美和

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00341503

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

坂部 純一

産業医科大学・皮膚科学・大学院生