

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591353

研究課題名（和文）：殺菌物質 Psoriasin と Dermcidin の皮膚の自然免疫に対する役割

研究課題名（英文）：Roles of antimicrobial agents Psoriasin and Dermcidin in skin innate immunity

研究代表者

ニヨンサバ フランソワ（NIYONSABA FRANCOIS）

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60365640

研究成果の概要（和文）：皮膚が産生する β -デフェンシンと LL-37 以外に psoriasin、dermcidin と catestatin などの殺菌物質を産生することが知られている。本研究では、上記の殺菌物質がヒトケラチノサイトやマスト細胞の様々な機能の活性化を調節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、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。

研究成果の概要（英文）：In addition to human β -defensins and LL-37, the cutaneous tissue also generates other antimicrobial agents, including psoriasin, dermcidin and catestatin. In this study project, we found that above antimicrobial agents activate and regulate various functions of human keratinocytes and mast cells. Thus, besides their microbiocidal properties, skin-derived antimicrobial agents might also participate in cutaneous host defense, inflammation and innate immune system.

交付決定額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	360,000	1,260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,140,000	4,640,000

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：ケラチノサイト、Psoriasin、Dermcidin、殺菌物質、サイトカイン・ケモカイン、自然免疫、感染防御

1. 研究開始当初の背景：

(1) 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。それは皮膚の物理的なバリアだけではなく、皮膚の上皮細胞が産生する殺菌物質による自然免疫作用である。近年、上皮組織由来殺菌物質の中で、強い抗菌作用を持つ低分子性殺菌ペプチドであるヒト β -デフェンシン (human β -defensin, hBD)

と cathelicidin LL-37 が注目されている。これらのペプチドが皮膚、気道、腸管などにおいて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 hBD と LL-37 の働きが注目されている。さらに、hBD と LL-37 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 hBD や LL-37 が関与する可能性が示唆されている (Crit Rev Immunol 26: 545-76,

2006)。

(2) 最近、皮膚が hBD と LL-37 以外に Psoriasin や Dermcidin などの殺菌物質を産生することが報告された。これら殺菌物質が正常皮膚に発現し、さらに創傷、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に関与していることは明らかになった (*J Leukoc Biol* 77:476-86, 2005; *Cell Mol Life Sci* 63:469-86, 2006)。Psoriasin や Dermcidin を含めてヒト殺菌物質においては、今までに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知られている。これらの殺菌物質は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 Psoriasin と Dermcidin が、殺菌作用以外の機能は詳細な検討はなされていない。

(3) 申請者は、hBD と LL-37 が殺菌作用の他に、マスト細胞、好中球やケラチノサイトを活性化し、自然免疫、炎症反応とアレルギー反応に関与していることを見だしており (*Eur J Immunol* 31:1066-75, 2001; *Int Immunol* 14:421-6, 2002; *Immunology* 106:20-6, 2002; *Eur J Immunol*, 37:434-44, 2007; *J Invest Dermatol* 127:594-604, 2007, *Crit Rev Immunol* 26:545-76, 2006; *J Immunol* 175: 1776-84, 2005)、Psoriasin や Dermcidin が同様の作用を有する可能性がある。

2. 研究の目的 :

(1) ケラチノサイトが創傷、乾癬やアトピー性皮膚炎の病態に関与していることは、Psoriasin や Dermcidin がケラチノサイトに作用していると考えられる。Psoriasin や Dermcidin 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、これら殺菌物質の正常ヒトケラチノサイトに対する①炎症性サイトカイン、ケモカインと成長因子の産生、②遊走作用、増殖と分化、③Psoriasin や Dermcidin の創傷治癒過程における直接的関与、④ケラチノサイトにおける Psoriasin や Dermcidin 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、⑤Psoriasin や Dermcidin 以外の上皮細胞由来殺菌物質 (RNase 7、Elafin、Adrenomedullin、Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI)) のケラチノサイトに対する作用と、⑥他の殺菌物質との相乗効果の検討。⑦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、Psoriasin や Dermcidin のヒト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、上皮組織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、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

自然免疫に関与する可能性が考えられる。

(2) 従来、Psoriasin や Dermcidin などの殺菌物質は殺菌蛋白として感染防御に役立つとされてきた。本研究は、これらの殺菌物質がケラチノサイトを刺激し、炎症性のサイトカイン、ケモカインや成長因子の産生を引き起こすことによって、自然免疫に関与する可能性を示す点で独創的である。また、創傷治癒、乾癬やアトピー性皮膚炎の病変部位における Psoriasin や Dermcidin の役割について検討することは、創傷治癒の過程とこれらの疾患における皮膚病変形成メカニズム、さらに、皮膚の恒常性の解明に新たな手がかりを与える。さらに、上皮組織が産生する殺菌物質の相乗作用を調べることによって、皮膚における未知の感染防御機構を証明することが期待される。

3. 研究の方法 :

(1) Psoriasin や Dermcidin の刺激によるサイトカイン、ケモカインや成長因子産生作用

正常ヒトケラチノサイトを培養し、Psoriasin や Dermcidin で刺激する。ケラチノサイトが産生する①サイトカイン②ケモカインや③成長因子 (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、ケモカインや成長因子の産生経路を検討する。

(2) Psoriasin や Dermcidin のケラチノサイトに対する遊走作用

①培養した正常ヒトケラチノサイトの遊走能は chemotaxis microchamber (Boyden's chamber)を用いて、Psoriasin や Dermcidin に対する遊走活性として測定する。②Psoriasin や Dermcidin の特異的抗体を用いて、これらの殺菌物質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。③Psoriasin や Dermcidin 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。④Psoriasin や Dermcidin 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 蛋白とホスホリパーゼ C 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) Psoriasin や Dermcidin のケラチノサイトに対する増殖と分化に及ぼす影響

①細胞増殖は、5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU) 取り込みで解析する。培養した正常ヒトケラチノサイトを Psoriasin や Dermcidin 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、②Psoriasin や Dermcidin 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、ケラチノサイトをこれら殺菌物質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) Psoriasis や Dermcidin 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 1~2.5 mm の円形創傷を作る。Psoriasis や Dermcidin 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。

(5) ケラチノサイトにおける Psoriasis や Dermcidin の発現

ケラチノサイトを PMA、Butyrate、炎症性サイトカインあるいは Toll-Like Receptor (TLR) の ligand で刺激し、Psoriasis や Dermcidin 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。また、TLR の役割を調べるために、それぞれの TLR の SiRNA を用いて検討する。

(6) Psoriasis や Dermcidin に対する特異的レセプター検索と同定

①Psoriasis や Dermcidin を、Na¹²⁵I を用いて標識する。②¹²⁵I-Psoriasis と¹²⁵I-Dermcidin 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。③Psoriasis あるいは Dermcidin 結合蛋白質の同定:Psoriasis あるいは Dermcidin 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、Psoriasis や Dermcidin に対する受容体を同定する。

(7) 他の皮膚由来殺菌物質のケラチノサイトに及ぼす影響

①培養したヒトケラチノサイトを RNase 7、Elafin、Adrenomedullin、Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) で刺激し、サイトカイン、ケモカインや成長因子の産生を ELISA キットを用いて調べる。さらに、これら殺菌物質の作用メカニズムを検討する。また、②RNase 7、Elafin、Adrenomedullin、Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) は Psoriasis や Dermcidin 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。

(8) Psoriasis や Dermcidin のヒトマスト細胞や好中球などの細胞に対する作用

①培養したヒトマスト細胞 (LAD2 cell line) 及び正常ヒト好中球を用いて、Psoriasis や Dermcidin の発現を Real-Time PCR と Western blot (ELISA あるいは免疫染色法) で解析する。また、②Psoriasis や Dermcidin がヒトマスト細胞や好中球の活性化(炎症性メディエーターの放出、殺菌物質と ROS 産生、サイトカインやケモカインの産生、遊走とそのメカニズム)について調べる。

(9) 他の皮膚由来殺菌物質のヒトマスト細胞や好中球に対する作用

①ヒトマスト細胞 (LAD2 cell line) 及び正常ヒト好中球を RNase 7、Elafin、adrenomedullin、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) で刺激し、これらの殺菌物質のマスト細胞や好中球に対する作用とそのメカニズムを調べる。また、②RNase 7、Elafin、Adrenomedullin、Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)、Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) は Psoriasis や Dermcidin 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) 先ず Dermcidin のヒトケラチノサイトに対する効果を調べたところ、その結果、Dermcidin 由来ペプチド DCD-1L や DCD-1 が、G 蛋白受容体や MAP キナーゼ p38 と ERK の経路を介して、ケラチノサイトのサイトカインやケモカイン (IL-8、TNF- α 、IP-10 と MIP-3 α) の蛋白産生を誘導した。しかし、これらのペプチドが IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、MCP-1 と RANTES に対する作用はなかった。また、DCD-1L や DCD-1 がケラチノサイトの MAP キナーゼ p38 と ERK のリン酸化を誘導することがわかった。最後に、DCD-1L や DCD-1 がケラチノサイトの NF- κ B の活性化を誘導することがわかった。(Br J Dermatol 160:243-9, 2009)。

(2) 次に、ケラチノサイトにおける Dermcidin 由来ペプチドの mRNA 発現と蛋白発現を検討したが、これらペプチドがケラチノサイトに発現しないことがわかった。また、Dermcidin や Psoriasis が創傷治癒に対する影響はほとんどないことが確認した(未発表結果)。さらに、ケラチノサイトに Dermcidin や Psoriasis に対する受容体の有無を確認ところ、これらのペプチドに対する特異的な受容体が存在しないことがわかった。皮膚由来抗菌物質の更なる機能を検討するために、hBD と LL-37 のヒトマスト細胞に対する作用を調べた。hBD と LL-37 が *in vitro* や *in vivo* でヒトとラットマスト細胞からの IL-31 などの数多くの痒み誘導因子の放出を増強することを見出した。また、乾癬やアトピー性皮膚炎由来皮膚マスト細胞が IL-31 の蛋白を過剰に発現することが確認した (J Immunol 184: 3526-34, 2010)。

(3) また、皮膚の上皮細胞が産生する抗菌物質の更なる新免疫調節機能を検討するために、神経内分泌性の抗菌物質である catestatin のヒトマスト細胞に対する作用を調べた。その結果、catestatin がマスト細胞を脱顆粒させるだけでなく、脂質メディエーター、サイトカインやケモカインの産生を惹起することがわかった。さらに、catestatin はマスト細胞に遊走作用も有することが明らかとなった。catestatin によるマスト細胞の活性化を G タンパク質、ホスホリパーゼ C と MAP キナーゼの経路を介して、マスト細胞に作用することが明らかとなった (Immunology 132:527-39, 2011)。また、catestatin が MAP キナーゼの活性化を介して、ヒトケラチノサイトの IL-8 の産生

を誘導することを見出した(*J Dermatol Sci*, 61: 142-4, 2011)。よって、皮膚の障害によって放出される catestatin を介したヒトのマスト細胞と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アレルギーなどの皮膚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。

以上 (1)、(2)、(3) の結果をまとめると、皮膚が産生する hBD、LL-37、psoriasin、dermcidin と catestatin などの殺菌物質は体内で単に殺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。今回の研究におけるアプローチの有効性が確認したことによって、皮膚の創傷治癒、感染防御機構、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚病変形成メカニズムの研究の方向性にも大きなインパクトを与えると考えられる。

5. 主な発表論文等：

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* (査読あり) 160, 2009: 243-9.
2. Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi N, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. Antimicrobial peptides human β -defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine interleukin-31 by human mast cells. *J Immunol* (査読あり) 184, 2010: 3526-34.
3. Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology* (査読あり) 132, 2011: 527-39.
4. Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Hoq MI, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci* (査読あり) 61, 2011: 142-4.

[学会発表] (計 10 件)

1. Niyonsaba F. Endogenous antimicrobial peptides human β -defensins and cathelicidin LL-37 increase IL-31 production in human mast cells. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology, 2008 年 10 月 31 日、Hangzhou, China.
2. Niyonsaba F, Ushio H, Ogawa H, Okumura K. Human β -defensins and cathelicidin LL-37 on IL-31 production in human mast cells. 第 58 日本アレルギー学会、2008 年 11 月 27 日、東京.
3. Niyonsaba F, 牛尾博子, 小川秀興, 奥村 康. Human β -defensins and cathelicidin LL-37 increase IL-31

production in human mast cells. 第 38 日本免疫学会総会、2008 年 12 月 2 日、京都.

4. Niyonsaba F, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. The antimicrobial human β -defensins mediate secretion of pruritogenic factors in human mast cells. Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, and International Society for Interferon and Cytokine Research, 2009 年 10 月 21 日、Lisbon, Portugal.
5. Niyonsaba F, 牛尾博子, 小川秀興, 奥村 康. Human β -defensins and cathelicidin LL-37 on VEGF production in human mast cells. 第 59 日本アレルギー学会、2009 年 10 月 31 日、秋田.
6. Niyonsaba F, 牛尾博子, Aung Gyi, 小川秀興, 奥村 康. 抗菌ペプチド β -デフェンシンと LL-37 のヒトマスト細胞からの VEGF 産生に及ぼす影響. 第 39 日本免疫学会総会、2009 年 12 月 4 日、大阪.
7. Niyonsaba F, Madera L, Hancock RE. Synthetic innate defense regulator (IDR) peptides IDR-HH2, IDR-1002 and IDR-1018 modulate various functions of human neutrophils. Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 2010 年 10 月 8 日、Vancouver, Canada.
8. Nagaoka I, Suzuki K, Murakami T, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M. Evaluation of the effects of α -defensins a human neutrophil peptides on neutrophil apoptosis. Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology & the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 2010 年 10 月 9 日、Vancouver, Canada.
9. Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatins activate human mast cells. 第 60 日本アレルギー学会、2010 年 11 月 25 日、東京.
10. Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S. A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, activates multiple functions in human mast cells. 日本研究皮膚科学会第 35 回年次学術大会・総会、2010 年 12 月 4 日、和歌山.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

5. 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) 連帯研究者：なし