

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17304

研究課題名(和文) 乾癬、感染症、メタボリック症候群における抗菌ペプチドカセリサイディンの関与

研究課題名(英文) Antimicrobial peptide, Cathelicidin in psoriasis, infectious disease, and metabolic syndrome

研究代表者

高橋 隼也 (Takahashi, Toshiya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30712195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なDamage-associated molecular patterns (DAMPs)を抗菌ペプチドLL-37とともにヒト培養角化細胞に加えたところ、乾癬の病態形成に重要な炎症性サイトカインが誘導された。またこれらの誘導は、スカベンジャー受容体(SR)の阻害により抑制された。これはLL-37がこれらのDAMPsと結合し、SRから細胞内に取り込まれ、炎症を誘導することを示す。また、乾癬患者皮膚部の組織標本を用いた免疫染色では、真皮にLL-37陽性細胞がみられる症例でのみ、表皮でIL-36 が観察され、生体内でLL-37により表皮角化細胞からのIL-36 産生が促される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は日本で約10万人の患者が存在する主要な皮膚疾患であり、皮膚、関節症状により生活の質を下げるだけでなく、その慢性炎症状態の持続が生命予後にも影響することが知られるが、その病態、分子機序には未だ不明な点が多い。本研究により、乾癬患者の血中、皮膚でみられるLL-37がDAMPsの取り込みを促進し、IL-36 などのサイトカイン分泌を誘導して乾癬の炎症を誘導するという機序が示された。この機序は乾癬に限らず広く炎症性疾患、メタボリック症候群を増悪させると考えられ、LL-37やSRを標的とした治療が、革新的な抗炎症治療方法の開発に発展する可能性を期待する。

研究成果の概要(英文)：In cultured human keratinocytes, the addition of representative damage-associated molecular patterns (DAMPs), together with the antimicrobial peptide LL-37, induced proinflammatory cytokines that are important in the pathogenesis of psoriasis. These inductions were inhibited by scavenger receptor (SR) inhibition. This indicates that LL-37 binds to these DAMPs and is taken up by the SR into the cells followed by inducing inflammation. Immunostaining of tissue specimens from psoriasis patients showed that IL-36 was observed in the epidermis only in cases with LL-37-positive cells in the dermis, implying that LL-37 may stimulate IL-36 production from epidermal keratinocytes in vivo.

研究分野：皮膚科学

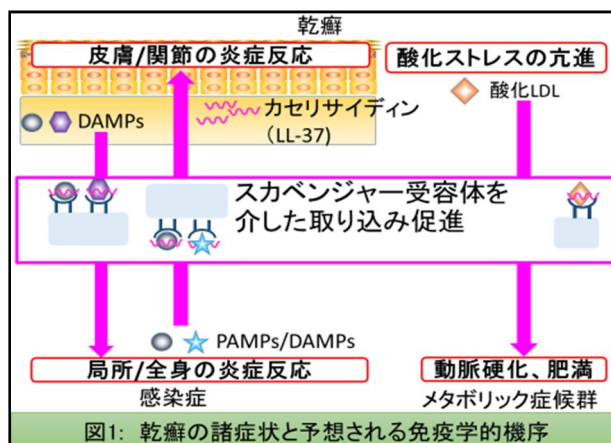
キーワード：抗菌ペプチド カセリサイジン DAMPs/PAMPs 乾癬 感染症 メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

乾癬は紀元前より記録のあるもっとも歴史のある皮膚疾患のひとつであり、欧米での有病率は約2-5%、日本でも約10万人の患者が存在する。近年腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン(IL)-17, IL-12/23といった免疫学的機序が病態に関与することが示され、それらを標的とした生物学的製剤は一定の治療効果を上げており、乾癬慢性病態形成に関与する複数の炎症性サイトカインが確認されてきた。しかしながら、乾癬発症機序や増悪起点に関して鑑みると、複数の遺伝子と後天的な誘発因子が病態に関与するとされるが、未だその分子機序には不明な点が多い。临床上、溶連菌感染やC型肝炎、さらに上気道感染や皮膚創への二次感染などの非特異的感染症により乾癬患者の皮膚、関節症状、発熱等の全身性炎症症状が急速に増悪することはしばしば経験されるが、その機序は明らかでない。また、乾癬は皮膚、関節症状により生活の質を下げるだけでなく、その慢性炎症状態の持続が生命予後にも影響する。乾癬患者では健常者に比し肥満や心筋梗塞、脳血管障害の合併率が高いこと、さらにそれらの罹患率は乾癬の重症度と正の相関があることが知られる (*Nutr Diabetes* 2(12), e54, 2012, *J Am Heart Assoc* 2(2), e000062, 2013)。しかし、皮膚や関節が病態の主座である乾癬で、なぜ全身のメタボリック症候群が関連するのかはやはり明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、感染や環境刺激により誘導される抗菌ペプチドカセリサイジン(LL-37)に着目し、自己免疫性炎症性疾患である乾癬の感染症による増悪、およびメタボリック症候群の合併の機序を探求することを目的として、LL-37がDAMPs/PAMPsおよびLDLのスカベンジャー受容体(SR)を介した細胞内への取り込みを促進してその病態を惹起するという仮説を検討する(図1)。本研究により、乾癬に限らず広く炎症性疾患、メタボリック症候群を増悪させる機序を同定することを目的とする。LL-37は炎症性サイトカイン誘導や自己核酸の取り込みによる自己抗体誘導などの多様な免疫学的機序が報告されているが、DAMPs/PAMPsの細胞内取り込みに関する報告はみられない。また、本研究は乾癬、感染症、メタボリック症候群を対象としているが、LL-37、DAMPs/PAMPs、SRは自然免疫及び炎症性疾患に広く関与する機序である。本研究によりLL-37やSRを標的とした治療が、革新的な抗炎症治療方法の開発に発展することを期待している。



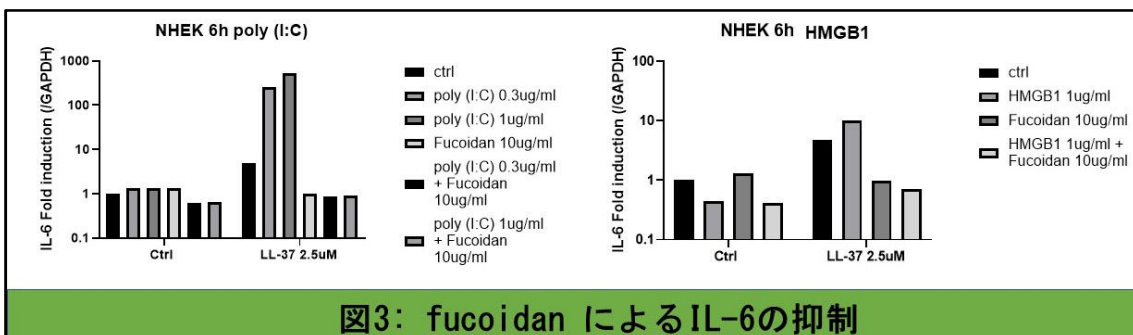
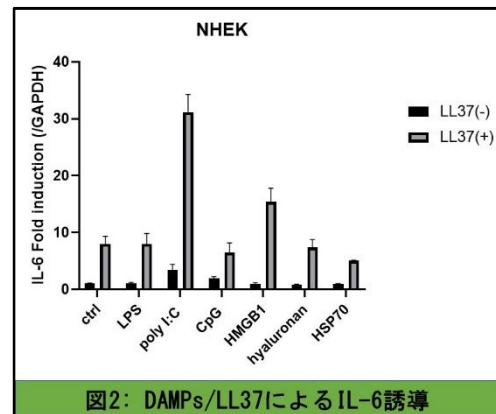
3. 研究の方法

LL-37 が種々の DAMPs/PAMPs の取り込みに与える影響を観察する。まずスカベンジャー受容体(SR)に対するリガンドとして知られる短鎖ヒアルロン酸, high mobility group box 1 protein, heat shock protein、コラーゲン分解産物、フィブロネクチン、C型肝炎ウイルスを検討し、必要に応じて対象を拡大する。最初にヒト培養角化細胞 (NHEK)、線維芽細胞 (3T3-L1)、ヒト末梢血から抽出した形質細胞様樹状細胞 (pDC)に LL-37、DAMPs/PAMPs を加え、SR との結合が LL-37 により増えることを proximity ligation assay (PLA)により確認する。さらにその後の細胞内取り込みも LL-37 により増えることを蛍光免疫染色で、DAMPs/PAMPs の取り込みの結果生じる炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-36 γ , TNF α , インターフェロン β など)の誘導を定量 PCR および ELISA で確認する。また、マウス骨髄由来の未成熟樹状細胞に LL-37 と DAMPs/PAMPs を加えた後、DAMPs/PAMPs の取り込みによる成熟樹状細胞の発現および LL-37 がそれに与える影響をフローサイトメトリーで観察する。成熟を示すマーカーには CD40, CD80, CD86, MHC class II を用いる。

また、乾癬皮膚組織において LL-37 および IL-36 γ の免疫組織化学染色を行い、両者の発現の関連を比較する。最後に、乾癬患者末梢血から採取した単球由来樹状細胞 (MoDC)で同様の実験を行い、健康人と比較する。

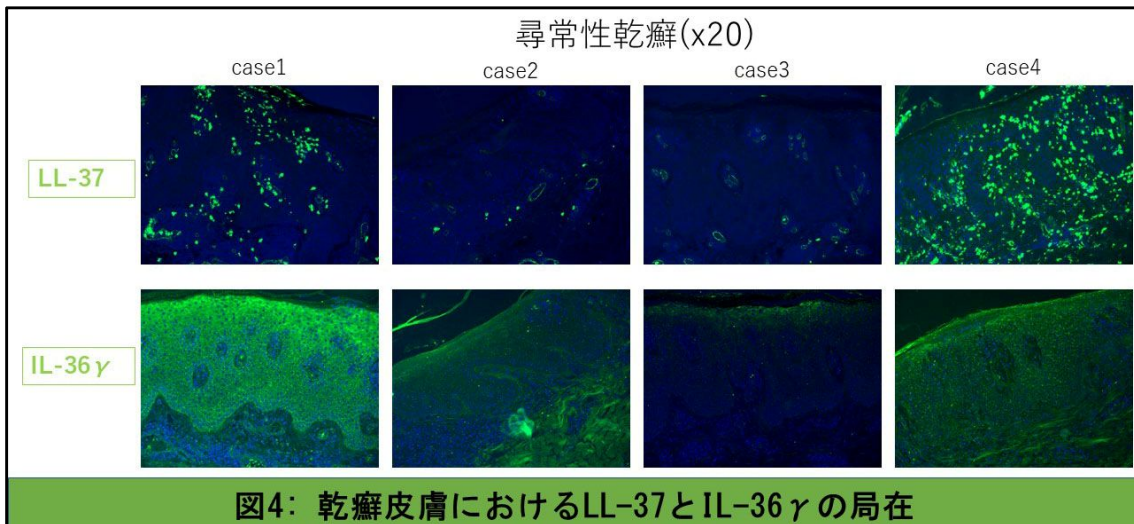
4 . 研究成果

代表的な Damage-associated molecular patterns (DAMPs)であり、スカベンジャー受容体 (SR)リガンドとして知られる dsRNA, dsDNA, high mobility group box 1 protein(HMGB1) を LL-37 とともにヒト培養角化細胞(NHEK)に加えたところ、インターロイキン(IL)-6, IL-36 γ 、インターフェロン(IFN) β 、腫瘍壊死因子(TNF)といった乾癬の病態形成に重要とされる炎症性サイトカインが強く誘導された(図 2)。またこれらの誘導は、SR 阻害剤である fucoidan や、SR に対する siRNA の阻害により抑制された(図 3)。さらに、ヒト単球由来樹状細胞(MoDC)に dsRNA と LL-37 を加えた際、およびヒト単球由来マクロファージに dsDNA と LL-37 を加えた際にも同様のサイトカイン誘導が観察された。これは LL-37 がこれらの DAMPs と結合し、SR から細胞内に取り込まれ、炎症を誘導していることを示唆する。



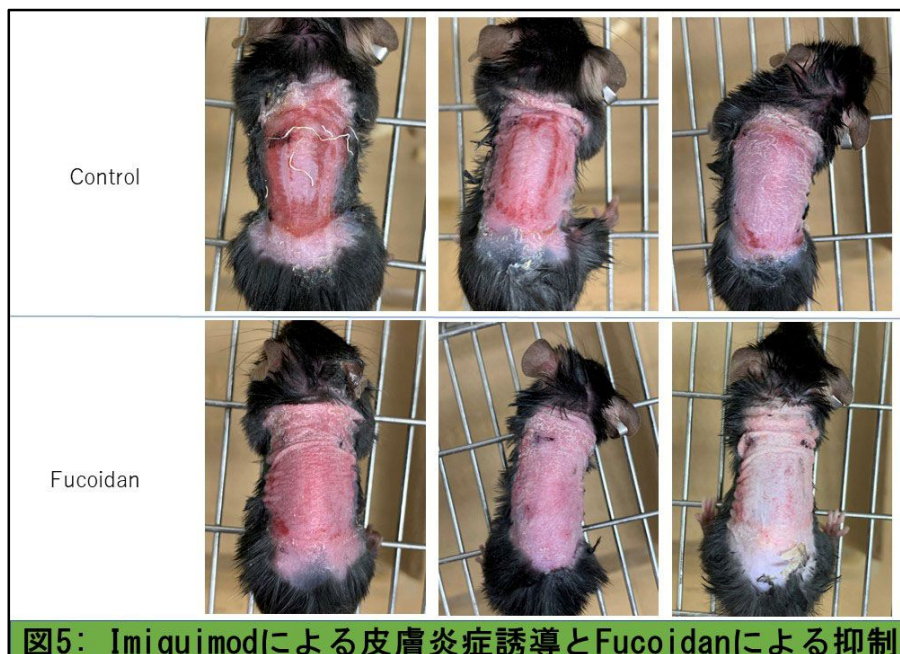
また、乾癬患者皮膚部の組織標本を用いた免疫染色では、真皮に LL-37 陽性細胞がみられる

症例でのみ、表皮で IL-36 γ が観察され、生体内で LL-37 により表皮ケラチノサイトからの IL-36 γ 産生が促される可能性が示唆された(図 4)。また皮膚における LL-37 陽性細胞のほとんどがミエロペルオキシダーゼ染色にも陽性であり、皮膚における LL-37 分泌細胞の多くが好中球で



あると考えられた。

野生型マウス背部皮膚に Toll 様受容体(TLR) 7 のアゴニストであるイミキモドを塗布し、乾癬モデルとされる皮膚炎症を誘発する際、fucoidan を塗布すると皮膚の発赤、肥厚や組織像での表皮肥厚、炎症細胞浸潤が減少していた(図 5)。これはイミキモドによる生体皮膚での炎症誘導にも SR による DAMPs の取り込みが重要であることを示唆する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yumi Hagiya
2. 発表標題 Cathelicidin LL-37 facilitates damage-associated molecular patterns to be bioactive substances by intermediating between scavenger receptors
3. 学会等名 SID annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------