

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461703

研究課題名(和文)皮膚由来抗菌ペプチドであるカテリシジンLL-37の皮膚バリア機能調節に対する役割

研究課題名(英文)Effect of skin-derived antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 on the regulation of skin barrier function

研究代表者

ニヨンサバ フランソワ (NIYONSABA, Francois)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授

研究者番号：60365640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：LL-37のタイトジャンクション(TJ)バリア機能に及ぼす影響を調べた結果、LL-37がケラチノサイトの分化マーカーとTJ構成タンパクの発現を増加し、さらに、TJバリア機能を強化した。また、 α -デフェンシン-3がLL-37同様にRac1、非定型的PKC、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3とPI3Kの経路を介して、TJバリア機能を調整することが分かった。また、LL-37等の抗菌ペプチドがバリア機能の調節だけではなく、痒みの抑制と抗炎症作用にも関与することを確認した。これらの結果は、LL-37等が皮膚の感染防御とアトピー性皮膚炎等の病変形成のメカニズムと治療法に大きなインパクトを与えらる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effects of LL-37 on regulation of keratinocyte tight junction (TJ) barrier function. We found that LL-37 increased the expression of TJ proteins and keratinocyte differentiation markers, and markedly strengthened the TJ barrier function via Rac1, atypical protein kinase C, glycogen synthase kinase-3 and PI3 kinase pathways. Similar to LL-37, human α -defensin-3 also enhanced the TJ barrier function. In addition, LL-37 induced the expression of semaphorin 3A, an itch inhibitor, implying LL-37 possible application to pruritus. Taken together, our findings that LL-37 and α -defensin-3 enhance TJ barrier function, inhibit itch and inflammation suggest the potential use of skin-derived antimicrobial peptides for the understanding atopic dermatitis pathological mechanism and treatment.

研究分野：皮膚免疫学

キーワード：ケラチノサイト 抗菌物質 タイトジャンクション 皮膚免疫 アトピー性皮膚炎 痒み 炎症

1. 研究開始当初の背景

皮膚には種々の抗菌ペプチドが存在し、微生物感染から生体を守るために重要な働きをしている。抗菌ペプチドの中で、カテリシジン LL-37 や α -デフェンシン(hBD)、ソラヤシン、ダームシジン等が注目されている。近年、乾癬の皮膚と比較すると、アトピー性皮膚炎では、第二種皮膚バリア(タイトジャンクション TJ)の機能に障害があることが報告された。抗菌ペプチドは乾癬の皮膚で産生が亢進しており、アトピー性皮膚炎で減少していることが明らかにされ、そのことが乾癬で皮膚感染症の少ない一つの要因とされている。そこで、本研究では、私は、皮膚由来抗菌ペプチドが皮膚の TJ バリア機能を調節するか否か、また、アトピー性皮膚炎の TJ バリア機能障害の改善をできるか否かを明らかにしたい。抗菌ペプチドの皮膚バリア機能に及ぼす影響を調べることで、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し、さらに、皮膚疾患のメカニズムと治療法の応用へつなげたい。

抗菌ペプチドは、私と他の国内研究者によって世界をリードした研究が精力的に行われている。これまでに、抗菌ペプチドが抗菌作用のほかに、創傷治癒の促進、血管新生、細胞遊走能、細胞分化、細胞増殖、サイトカインやケモカインの産生とアポトーシスの調節等の機能を誘導することを明らかにした(J Immunol 175:1776-84,2005; J Invest Dermatol 127:594-604,2007; J Immunol 184:3526-34,2010)。また、抗菌ペプチドがエンドトキシンショックにおいて防御的に作用することを証明した(J Immunol 167:3329-38,2001)。一方、国外では、LL-37 や hBD 等の抗菌ペプチドは乾癬皮膚での産生が亢進しており、アトピー性皮膚炎では減少していることが明らかにされ、そのことが乾癬で皮膚感染症の少ない一つの要因とされている(N Engl J Med 347:1151-60,2002; J

Immunol 171:3262-9,2003)。また、LL-37 のマウスホモログ CRAMP 欠損マウスは皮膚等の感染を起こしやすくなるから、LL-37 は感染に対する防衛機構として重要な役割を果たしていることが証明された(Nature 414:454-7,2001)。LL-37 と hBD が抗菌作用のほかに、ケラチノサイトのアポトーシスを抑制し、さらに、免疫のアジュバント効果の強化と様々な免疫担当細胞の遊走能、増殖と分化を促進することで、免疫調節に重要な働きをしていることが明らかにされた(Crit Rev Immunol 26:545-76,2006)。

2. 研究の目的

乾癬の皮膚との比較において、アトピー性皮膚炎の皮膚では、TJ バリア機能に障害があることが明らかになった。そこで、皮膚が産生する抗菌ペプチドである LL-37 の TJ バリア機能に対する調節作用の詳細な検討を実施するために、ヒトケラチノサイト及びマウスの皮膚を用いて次の7点について調べる予定： LL-37 刺激によるケラチノサイトからの TJ 構成タンパク質と分化マーカーの発現、LL-37 の TJ バリア機能の調節に及ぼす影響と LL-37 による TJ バリア機能の調節メカニズム。さらに、LL-37 のマウスホモログである CRAMP 欠損マウスを用いて、TJ 構成タンパク質と分化マーカーの発現変化と CRAMP 欠損マウスの TJ バリア機能の検討。

アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga マウスを用いて、LL-37 のアトピー性皮膚炎の皮膚バリア機能に及ぼす影響を検討する。最後に、他の皮膚由来抗菌物質である α -デフェンシン、ソラヤシン、ダームシジン等が TJ バリア機能に対する調節を調べる。

以上のことから、LL-37 の TJ バリア機能の調節の研究におけるアプローチの有効性が確認されれば、皮膚の感染防御とアトピー性皮膚炎等の皮膚病変形成のメカニズムと治

療法の研究の方向性にも大きなインパクトを与えられよう。

3. 研究の方法

LL-37 刺激による TJ の構成タンパク質と分化マーカーの発現: 新生児包皮由来正常ヒトケラチノサイトを培養し, LL-37 で刺激した後, () TJ の主要な構成タンパク質である claudin-1~25, occludin, junctional adhesion molecule (JAM)-1~3 と zonula occludens (ZO)-1~3 と () ケラチノサイト分化マーカーであるケラチン-1, -10, -14, インボルクリン, ロリクリン, フィラグリン, トランスグルタミナーゼ 1, 3 の発現量をリアルタイム PCR 法, ウェスタンブロット法或いは免疫染色法で検討する。

LL-37 の TJ バリア機能に及ぼす影響: ケラチノサイトをカルチャーインサートでコンフルエントになるまで培養し, ケラチノサイト単層に LL-37 を加えた後, () 経上皮電気抵抗値を細胞 TJ リアルタイムモニタリングシステムを用いて測定する。また, () ケラチノサイト単層培養で蛍光デキストランを加え, デキストランの細胞間透過性を蛍光プレートリーダーで測定する。

LL-37 による TJ バリア機能の調節メカニズム: LL-37 による経上皮電気抵抗値と細胞間透過性の調節メカニズムを調べるために, LL-37 の GTP 結合タンパク質 Rac1, 非定型プロテインキナーゼ C, MAP キナーゼ, PI3 キナーゼ/Akt とグリコーゲン合成酵素 GSK-3 / 等の TJ 制御経路に対する活性化をウェスタンブロット法で判断する。実際に, LL-37 が上記の経路を介して経上皮電気抵抗値と細胞間透過性を調節するかどうかを確認するために, 特異的阻害剤, 抗体及び siRNA を用いて検討する。また, これらの阻害剤, 抗体及び siRNA が分化マーカーの発現を抑制するかどうかを調べる。

LL-37 に対する特異的受容体検索と同

定: ⑦ LL-37 を Na¹²⁵I を用いて標識する。⑧ ¹²⁵I-LL-37 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。⑨ LL-37 結合タンパクの同定: LL-37 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タンパクを分離する。得られたタンパクをアミノ酸配列分析等で解析することにより, LL-37 に対する受容体を同定する。⑩ また, これまで知られている LL-37 の受容体である FPRL-1, P2X7, EGFR, MrgX2 等の受容体の特異的な抗体及び siRNA を用いて, これらの受容体の関与を確認する。

CRAMP 欠損マウスでの TJ の構成タンパク質と分化マーカーの発現: LL-37 のマウスホモログである CRAMP 欠損マウスと野生型マウスの皮膚 TJ の構成タンパク質とケラチノサイト分化マーカーの発現変化を調べるために, 皮膚の組織標本作製し, TJ の構成タンパク質と分化マーカーの特異的抗体を用いて免疫染色法で解析する。

CRAMP 欠損マウスの TJ バリア機能: CRAMP 欠損マウスの皮膚バリア機能障害の有無を確認するために, CRAMP 欠損マウスと野生型マウスの皮膚の経表皮水分喪失量 (TEWL) をテヴァメーターで評価する。また, マウスの皮膚から精製したケラチノサイトを培養し, 経上皮電気抵抗値と細胞間透過性を測定する。

LL-37 のアトピー性皮膚炎の皮膚バリア機能に及ぼす影響: アトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Nga マウスに, CRAMP を 5 日間 1 日 1 回発生部位の皮下投与し, 皮膚の組織標本作製し, 投与していないマウスに比べ, TJ の構成タンパク質とケラチノサイト分化マーカーの発現量の変化を調べる。さらに, TJ バリア機能障害の改善の有無を確認するために, TEWL と培養したマウスのケラチノサイト単層の経上皮電気抵抗値と細胞間透過性を測定する。また, 皮膚の炎症反応の

変化の有無も判断する。

他の皮膚由来抗菌物質のTJバリア機能の調節に及ぼす影響：皮膚が産生する他の抗菌物質である -デフェンシン，ソラヤシン，ダームシジン等が TJ バリア機能を調節するかどうかを確認するために，上記の抗菌物質の構成タンパク質と分化マーカーの発現に対する効果，TJバリア機能の調節（経上皮電気抵抗値と細胞間透過性），さらに，その作用メカニズムについて調べる。

他の皮膚由来抗菌物質のアトピー性皮膚炎の皮膚バリア機能に及ぼす影響：アトピー性皮膚炎モデルマウス NC/Nga マウスに，マウス -デフェンシン及びソラヤシンのマウスホモログである S100A15 を皮下投与し，皮膚の組織標本を作製し，TJの構成タンパク質とケラチノサイト分化マーカーの発現量の変化を調べる。また，TJバリア機能障害の改善の有無を確認するために，TEWLと培養したマウスのケラチノサイト単層の経上皮電気抵抗値と細胞間透過性を測定する。

4. 研究成果

(1) 先ず，LL-37等の抗菌ペプチドは乾癬の皮膚では増加しており，アトピー性皮膚炎の皮膚では抑制されているため，LL-37がヒトケラチノサイトにおいて，TJバリアの機能を調整しているのではないかと考えた。ここでは，LL-37が選択的に claudin，occludin といった TJ 構成タンパクの mRNA 発現とタンパク発現を増加させることを示した。さらに，LL-37が TJバリア機能を増強することを，ケラチノサイトモノレイヤーの経上皮電気抵抗と細胞間透過性という TJバリア機能のパラメーターを用いることで示した。この効果は，claudin 阻害剤であるオクラトキシン A により抑制された。また，LL-37が Rac1，非定型的プロテインキナーゼ C (α PKC)，グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK-3) と PI3 キナーゼ (PI3K) 経路を活性化し，それぞれ

の経路の特異的阻害剤が LL-37 を介した TJバリア機能を阻害することが分かった。さらに，LL-37は TJ 構成タンパクを増強するだけではなく，ケラチン-1，ケラチン-10，インボルクリン，フィラグリン，トランスグルタミナーゼ 1 とトランスグルタミナーゼ 3 といったケラチノサイト分化マーカーの発現も増強し，ケラチノサイトの分化にも関与していると考えられた (J Innate Immun, 6:739-753, 2014)。

(2) さらに，-デフェンシン hBD-1~hBD-4 が LL-37 同様に TJバリア機能を調節するかどうか調べた結果，hBD-3のみが TJバリア機能を増強した。hBD-3による TJバリア機能の調節は CCR6 受容体 Rac1，αPKC および GSK-3 経路の活性化が不可欠であると考えられる (J Invest Dermatol, 134:2163-2173, 2014)。LL-37 が特異的受容体を介してケラチノサイトのバリア機能を調節するか否かを調べたが，受容体は同定できなかった。また，LL-37のマウスホモログである CRAMP の TJバリア機能に対する効果を見られなかった。抗菌ペプチドがほかの受容体を介してケラチノサイトを活性化するかどうか調べるために，MrgX 受容体に注目した。その結果，hBD-2，LL-37 と新規の抗菌ペプチドである AG-30/5C が MrgX1 と MrgX2 ではなく，MrgX3 と MrgX4 受容体を介してケラチノサイトのサイトカインやケモカインの産生，細胞遊走能や細胞増殖を促進することが分かった (J Dermatol Sci, 83:190-199, 2016)。

(3) さらに，抗菌ペプチドのアトピー性皮膚炎の痒みに及ぼす影響について検討した。その結果，LL-37 と -デフェンシン hBD-1~hBD-4 の中で，LL-37 のみが痒み抑制因子である semaphorin 3A の発現と産生を増強した。この効果は，MAP キナーゼ ERK のシグナル伝達経路が関与することを示した。これらの結果は，皮膚が産生する抗菌ペプチドがバリア機能の調節だけではなく，痒みの抑制にも関

与することが示唆された (J Invest Dermatol, 135:2887-2890, 2015).

(4) また, LL-37 と α -デフェンシン hBD-1 ~ hBD-4 の中で, hBD-3 のみが乾癬の皮膚に過剰に発現する抗炎症性サイトカインである IL-37 の発現を増強した. サイトカイン TNF- α , EGF (上皮成長因子) および Toll 様受容体 3 のリガンドである poly (I:C) と hBD-3 併用すると, IL-37 の mRNA 発現はさらに相乗的高まったが, タンパク発現には影響しなかった. また, hBD-3 はケラチノサイト培養上清への IL-37 放出量を増加させた. hBD-3 のシグナル伝達機構の検討を行った結果, hBD-3 が誘導する IL-37 の発現には CCR6 受容体, カスパーゼ-1/-4, Smad3, MAP キナーゼおよび NF- κ B の活性化が不可欠であることが分かった. 以上の結果は, hBD-3 等の抗菌ペプチドは炎症性皮膚疾患の病態解明および治療において新たな標的とされる IL-37 の発現および放出を促進するとの知見を得たことは, IL-37 の発現および放出調節を介して炎症反応や自然免疫反応の抑制に抗菌ペプチドが寄与することの証拠となる (J Dermatol Sci, 77:46-53, 2015).

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5件)

1. Akiyama T, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Nguyen TT, Ushio H, Fujimura T, Ueno T, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. J Innate Immun, 査読有, 6(6):739-753, 2014. doi: 10.1159/000362789.
2. Kiatsurayanon C, Niyonsaba F,

Smithrithee R, Akiyama T, Ushio H, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H. Host defense (antimicrobial) peptide, human α -defensin-3, improves the function of the epithelial tight junction barrier in human keratinocytes. J Invest Dermatol, 査読有, 134(8):2163-2173, 2014. doi: 10.1038/jid.2014.143.

3. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Cathelicidin LL-37 induces Semaphorin 3A expression in human epidermal keratinocytes: implications for possible application to pruritus. J Invest Dermatol, 査読有, 135(11):2887-2890, 2015. doi: 10.1038/jid.2015.243.
4. Smithrithee R, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Ushio H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Human α -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. J Dermatol Sci, 査読有, 77(1):46-53, 2015. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.12.001.
5. Kiatsurayanon C, Niyonsaba F, Chieosilapatham P, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H. Angiogenic peptide (AG)-30/5C activates human keratinocytes to produce cytokines/chemokines and to migrate and proliferate via MrgX receptors. J Dermatol Sci, 査読有, 83(3):190-199, 2016. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.006.

【学会発表】(計5件)

1. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Akiyama T, Hattori F, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Host defense (antimicrobial) peptides are multifunctional regulators of the

skin immunity. 3rd Eastern Asia Dermatology Congress. 2014年9月25日, Jeju International Convention Center, 濟州島, 韓国.

2. Niyonsaba F. Antimicrobial (host defense) proteins in the skin immunity: Friends or foes? 2nd Xi ' an International Forum on Psoriasis. 2015年5月14日. Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 西安, 中国.
3. Niyonsaba F. Multifunctions of antimicrobial (host defense) proteins in the skin immunity. The 2nd Indochina Conference of Dermatology. 2015年11月26日, Sokha Angkor Resort Hotel, シェムリアップ, カンボジア.
4. Niyonsaba F, Ikeda S, Ogawa H. Skin-derived antimicrobial (host defense) peptides are multifunctional regulators of the skin immunity. 4th Eastern Asia Dermatology Congress. 2016年11月17日, 東京ベイ舞浜ホテルクラブ リゾート, 千葉県浦安市.
5. Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Chieosilapatham P, Okumura K, Ikeda S, Ogawa H. Immunomodulatory activities of novel synthetic host defense peptide, angiogenic peptide (AG)-30/5C, in human keratinocytes. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2016年12月9日, 仙台国際センター, 宮城県仙台市.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: アクアポリン遺伝子発現促進剤
発明者: ニヨンサバ フランソワ, 池田 志孝, 小川 秀興, 服部 文弘, 岡本 暉公彦
権利者: 御木本製薬株式会社・順天堂大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-240869
出願年月日: 平成 27 年 12 月 10 日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 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・先任准教授
研究者番号: 60365640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

1. 秋山 俊洋 (AKIYAMA, Toshihiro)
2. キアツラヤノン チャニサ (KIATSURAYANON Chanisa)
3. 梅原 芳恵 (UMEHARA, Yoshie)
4. スミスリッティ リッティ (SMITHRITHEE, Rithee)
5. 池田 志孝 (IKEDA, Shigaku)
6. 奥村 康 (OKUMURA, Ko)
7. 小川 秀興 (OGAWA, Hideoki)