

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860887

研究課題名(和文)AD患者皮膚における皮膚バリアタンパク・シスタチンAの発現解析

研究課題名(英文)Expression of skin barrier protein cystatin A analysis in the AD patients skin

研究代表者

菅 裕司(KAN, YUJI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50552064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：シスタチンAは皮膚に存在し抗ウイルス作用を有するタンパクとして知られている。30症例のアトピー性皮膚炎(AD)患者皮膚のシスタチンAを免疫染色したところ、AD皮膚病変部、健常部ともに、シスタチンAの発現が正常皮膚に比し有意に減弱していた。HaCaT細胞にヘルペスウイルス1,2型、アデノウイルス5型を感染させたところ、シスタチンAがこれらのウイルスDNA量、タンパク合成量を抑制した。バリア機能が低下しているADではその減少の結果、カポジ水痘様発疹症をはじめとするヘルペスウイルス感染症にきたし易くなると考えられた。将来的にシスタチンAはこれらの感染症の新たな治療法となりうる。

研究成果の概要(英文)：Cystatin A is present in skin and known as protein with the antiviral effect. After immunostaining cystatin A of the atopic dermatitis (AD) patients skin of 30 cases, we compared AD lesion and normal AD skin with healthy part. Both cystatin of AD skin lesion and the healthy part was found to have attenuated as compared with normal skin in expression of cystatin A. After transmitting a herpesvirus 1, 2 and adenoviral type 5 to HaCaT cells, cystatin A inhibited these viral DNA and protein synthesis. It was thought to become easy to develop for herpesvirus infection including the Kaposi varicelliform eruption as a result of decrease of barrier function. Cystatin A can become the new therapy for these infections in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アトピー性皮膚炎 シスタチンA ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、ADの病態においてフィラグリン遺伝子異常 (Visser MJ *et al*: Br J Dermatol 2012) に代表されるように皮膚バリア機能異常が注目されている。その結果、AD皮膚はHSV-1や黄色ブドウ球菌に感染しやすい状態となることが推測される。皮膚バリア機能に関わるタンパクは数多く、シスタチン、ディフェンシンなどが知られているものの、感染時のAD皮膚におけるそれら皮膚バリアタンパクの機能やメカニズムは未知な点が多い。

一方、1997年米国で開発された免疫誘導体イミキモドは、免疫細胞のToll-like receptor 7 (TLR7) に結合し作用することで局所にIFNをはじめ各種サイトカインを産生し、免疫反応を誘発する。国内外からそのウイルス増殖抑制効果が相次いで報告され、現在注目の化合物である。

イミキモド処理したFL細胞では、シスタチンAの発現が亢進しHSV-1の増殖が著明に抑制された (Kan Y *et al*: J Virol 2012)。この研究でイミキモドの抗HSV-1作用は、イミキモドによるシスタチンAの発現誘導に依存すること、意外にもTLR7阻害剤に影響されずアデノシンレセプター1 (AdAR1)を介することが初めて明らかとなった。この結果より、AD皮膚ではシスタチンAの発現が低下し、HSV-1が感染しやすくなり、カボジ水痘様発疹症を発症しやすい皮膚状態であると着想に至った。

2. 研究の目的

シスタチンのウイルス増殖抑制作用は皮膚における生体防御の観点から注目すべきであり、特にバリア機能の低下しているAD皮膚では主要な存在意義の1つであると考えた。このような背景のもと、今後皮膚バリアタンパク・シスタチンAのHSV-1感染制御機構を調べるためにイミキモド、シスタチンA、それらのアゴニスト、アンタゴニストを用いることや、またはシスタチンA遺伝子を

ノックアウトすることでAD皮膚における皮膚バリア因子・シスタチンAの臨床応用への研究基盤を確立することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究ではAD患者皮膚のシスタチンAの発現を解析し、ADにおけるHSV-1の易感染過程の解明を進める。シスタチンAは皮膚バリア因子として認識されているが、皮膚でのウイルス増殖抑制作用は検討されていない。

具体例を1) 2) 3) に示す。

1) シスタチンAのHSV-1増殖抑制効果の検討

HSV-1を24時間前に種々の濃度で感染させたヒトケラチノサイト細胞株 (HaCaT) において0、12、24、48時間後に上清と感染細胞を回収しウイルスDNAをRT-PCR、タンパク合成量をウエスタンブロット法で、産生粒子量をプラークアッセイ法にて、それぞれシスタチンAの有無別で測定し、そのHSV-1増殖抑制効果を調べる。同時にFL細胞における結果と比較する。FL細胞はウイルス感染時にIFNなどのサイトカインを産生する細胞株である。ヒト皮膚培養細胞上清中のIFNの有無を調べることでHaCaT細胞におけるシスタチンAの抑制効果にIFN系が関連するかその可能性を検討する。

2) シスタチンAの汎用性の検討

シスタチンAがHSV-1以外のDNAウイルス (HSV-2、アデノウイルス) の増殖を抑制するか HaCaT細胞での感染系を用い検討する。アデノウイルスは標準的な実験室株であるAd5を用いる。シスタチンAを処理したHaCaT細胞にAd5を感染させ、継時的に感染細胞中のウイルスmRNA、タンパク合成量、産生粒子量を解析する。それによりシスタチンAがHSV-2、Ad5に対しても抑制効果を有するのか検討する。

3) アトピー性皮膚炎(AD)患者皮膚におけるシスタチンAの解析

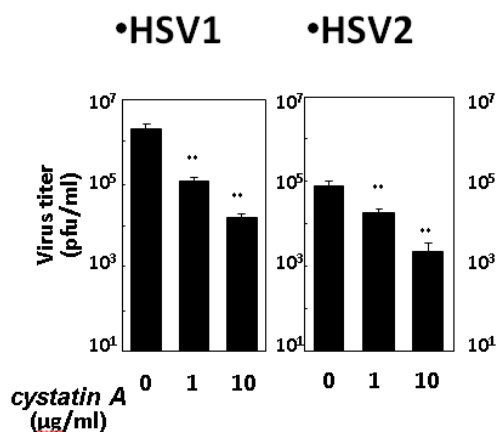
AD 皮膚ではバリア機能低下のため、シスタチンAの分布が表皮内で減少し、または消失していると予想される。対照として、同じく炎症性疾患である尋常性乾癬皮膚と、正常コントロール、そして AD 無疹部を設定した。AD では一見病変が見られない状態においてもバリア機能異常を呈していると考えられているため、これらを含め免疫染色学的に検討する。

4. 研究成果

1) シスタチンAのHSV-1増殖抑制効果の検討

シスタチンAの有無別でHaCaT細胞にヘルペスウイルス1、2型を以下の濃度で感染させたところ、シスタチンAがこれらのウイルスDNA量、タンパク合成量を有意に抑制した。

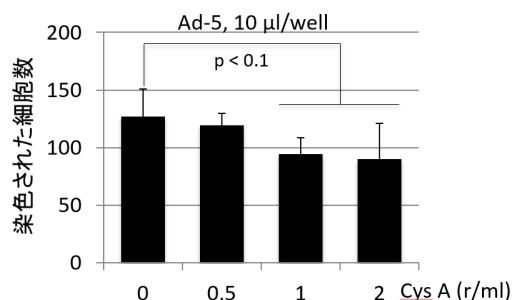
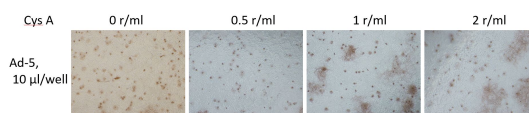
HSV-1に対する抑制効果はFL細胞を用いた際とほぼ同等であった。上清中のIFNはELISA法ではFL細胞を用いた際と有意差はなかった。HSV-2については)で記載する。



2) シスタチンAの汎用性の検討

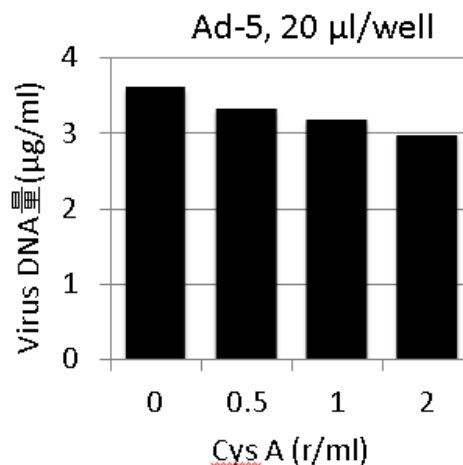
HaCaT細胞にHSV-2、アデノウイルス5型を感染させたところ、シスタチンAがこれらのウイルスDNA量、タンパク合成量を抑制した。やや抑制効果は弱いものであったが、シスタチンAはHSV-1以外のDNAウイ

ルスに対する抑制効果は汎用性を有する可能性を示唆した。



測定には Adeno-X™ Rapid Titer kit、Z2250N、Clontech を用いた。

蛍光染色法による Titer 測定

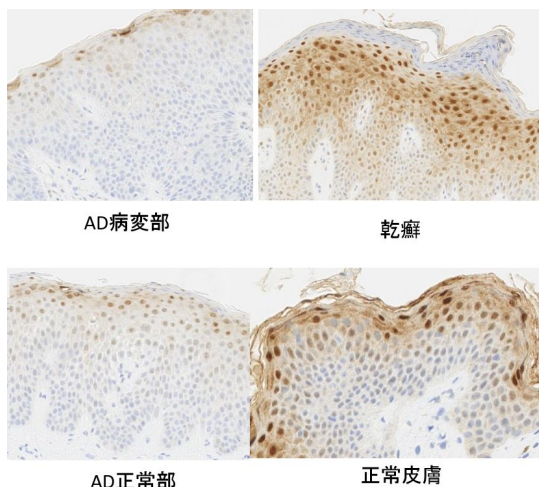


測定には QuickTiter™ Adenovirus Quantitation Kit、VPK-106、Cell Biolabs Inc. を用いた。

3) アトピー性皮膚炎(AD)患者皮膚におけるシスタチンAの解析

シスタチンAは皮膚に存在し抗ウイルス作用を有するタンパクとして知られている。30症例のアトピー性皮膚炎(AD)患者皮膚のシスタチンAを免疫染色したところ、AD皮膚病変部、健常部ともに、シスタチンAの発

現が正常皮膚に比し有意に減弱していた。



バリア機能が低下している AD ではその減少の結果、カポジ水痘様発疹症をはじめとするヘルペスウイルス感染症にきたし易くなると考えられた。将来的にシスタチン A はこれらの感染症の新たな治療法となりうる。

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)

菅 裕司、イミキモドで治療した難治性疣贅の11例：皮膚科の臨床、査読有、58巻11号、2016、1647-1650

菅 裕司、イミキモドで治療したポーエン病の12例、皮膚科の臨床掲載予定、査読有

[学会発表](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅 裕司 (KAN, YUJI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：50552064

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山下利春 (YAMASHITA, Toshiharu)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：50167706
澄川靖之 (SUMIKAWA, Yasuyuki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：00555526
横田伸一 (YOKOTA, Shinichi)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：10325863

(4)研究協力者

なし