

200/0801

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業

皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の  
解明及びアレルギー疾患の治療に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐山 浩二

平成 14(2002)年 4 月

## 目 次

I	総括研究報告	
	皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の解明 及びアレルギー疾患の治療に関する研究	-----1
	佐山浩二	
II	分担研究報告	
1.	ASK1 による JNK/p38MAPK の持続的な活性化に関する研究	-----6
	一條秀憲	
2.	ヒト上皮細胞の産生する抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する 効果についての研究	-----9
	菅井基行	
3.	角化細胞の培養とアデノウイルスベクターを用いる遺伝子導入法 の確立に関する研究	-----11
	橋本公二	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	-----14
IV	研究成果の刊行物・別冊	-----17

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）  
総括研究報告書

皮膚アレルギー形成機序における表皮機能の解明  
及びアレルギー疾患の治療に関する研究

主任研究者 佐山 浩二 愛媛大学医学部 助教授

研究要旨

ASK1 は表皮細胞内の重要な分化誘導因子であるが、本研究においては、ASK1 を中心とした表皮の分化機構が皮膚における MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin の産生を制御し、獲得免疫、自然免疫の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、JNK, p38MAPK の持続的な活性化には ASK1 が必須であることを示し、ケモカイン、 $\beta$  defensin の産生に JNK, p38 MAPK の持続的な活性化が深く関わっていると考えられた。さらに  $\beta$  defensin の黄色ブドウ球菌に対する作用機序を明らかにした。

分担研究者

一條秀憲・東京医科歯科大学・教授  
菅井基行・広島大学歯学部・教授  
橋本公二・愛媛大学医学部・教授

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎を代表とする皮膚アレルギー疾患の研究は従来リンパ球を中心とした免疫学的研究が中心であったが、最近皮膚アレルギーの発症の場である表皮そのものの機能が注目されるようになった。本研究では、表皮機能、特に表皮の分化機能と皮膚アレルギーの発症機序との関連を解明することを目的とする。表皮は、基底細胞層で角化細胞が増殖し、分化に伴い有棘層を形成し、バリアー機能をもつ多層構造の表皮組織が完成する。この過程で、単層上皮にはない分化という独特の機構が表皮の多層構造を形成する上で決定的なものとなる。生物進化の過程で、生物は水中から陸上生活へと適応する際生物の最外層にある皮膚が水分蒸散を防ぐ物理的なバリアー機能を獲得し、また病原微生物に対しては自然免疫を獲得するに至った。このバリア

ー機能形成と自然免疫獲得は従来別の機構によると考えられてきた。

アトピー性皮膚炎では、バリアー機能の破壊とともに何らかの免疫異常も発症に関与していると考えられている。アトピー性皮膚炎のアレルギー炎症と表皮バリア機能の異常については、表皮バリア機能の異常に伴い、サイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子の産生が増強し、さらに、小さなバリア障害が持続することにより、IL-1 と TNF- $\alpha$  の増加を伴った表皮肥厚が起きることがアトピー性皮膚炎の病態に関係すると報告されている。我々が、表皮角化細胞の細胞内分化誘導因子として同定した MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) ファミリーに属する ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) は、表皮角化細胞の分化という物理的なバリアーを形成する一方で、角化細胞の自然免疫、さらにはランゲルハンス細胞に対するケモカインである MIP3 $\alpha$  を介して、獲得免疫にも関わっている可能性がある。

本年度はアトピー性皮膚炎におけるバリアー機能異常と局所免疫異常に ASK1 が関与

っているかどうか検討するために、1) 自然免疫である抗菌ペプチド  $\beta$ -defensin の角化細胞からの産生、2) 獲得免疫に関わる MIP3  $\alpha$  の、角化細胞からの産生を ASK1 が制御しているかどうか検討する。ASK1 による MIP3  $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 産生を検討することにより、表皮角化細胞の分化機構とアトピー性皮膚炎に関わる免疫異常を明らかにすることを目的とする。そのためまず、愛媛大学、橋本が角化細胞の培養法、アデノウイルスベクターを用いた角化細胞への遺伝子導入の方法を確立し、愛媛大学、佐山が橋本の確立するアデノウイルスベクターを用いた角化細胞への遺伝子導入方法を用いて、角化細胞のケモカイン、 $\beta$  defensin 産生制御機構に ASK1 が関わっているかどうか検討する。東京医科歯科大学、一條が ノックアウトマウスを用いて ASK1 の基礎的な機能を解析し、さらに、広島大学、菅井がアトピー性皮膚炎の増悪因子である細菌感染に対して、黄色ブドウ球菌接触時における皮膚ケラチノサイトの抗菌ペプチド産生性および抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する効果について検討する。

以上のごとく、従来別個と考えられてきた表皮のバリアー機能形成（分化）と、免疫機能（自然・獲得）獲得に着目し、表皮角化細胞においては、ASK1 がいづれも制御しているのではないかと想定し、アトピー性皮膚炎の病態解明につなげることが本研究の特色である。

## B. 研究方法

1) 愛媛大学、橋本は無血清培地を用いた角化細胞の培養法を確立し、増殖能を検討するために、senescence になるまで、培養する。また、アデノウイルスベクターの作成法、293 細胞を用いた大量培養法、およびアデノウイルスベクターを用いた遺伝子発現法を確立する。

2) 愛媛大学、佐山は角化細胞からのケモカイン、デフェンシンの産生を ASK1 が制御しているかどうか検討するために、活性型の ASK1 を組み込んだアデノウイルスベクターを作成する。愛媛大学、橋本が確立する角化細胞への遺伝子導入法を用いて、角化細胞で ASK1 を発現させ、ケモカイン、デフェンシンの産生を ASK1 が制御しているかどうか検討する。MIP3  $\alpha$ 、 $\beta$  defensin の mRNA、タンパクを ribonuclease protection assay 法、Western blot 法、ELISA 法にて検討する。

3) 東京医科歯科大学、一條は ASK1 のノックアウトマウスを作成し、JNK, p38 MAPK 経路における、ASK1 の細胞内シグナル伝達機構を解析する。

4) 広島大学、菅井は hBD-1、2、3 および CAP18 の合成ペプチドを作製し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を検討した。さらに、細菌の接触によりケラチノサイトが、hBD-1、2、3 および CAP18 を発現するかどうか、RT-PCR 法および Real-Time PCR 法で各々の抗菌ペプチド mRNA の発現を検討した。

## C. 結果

平成 13 年度の研究によって得られた結果は以下のごとくである。

1) 角化細胞を効率よく培養する方法を確立し、senescence になるまで培養したところ、population doubling (PD) は 5.7 から 45.2 までと広範囲に分布していた。また、アデノウイルスベクターを効率的に作成することができ、大量培養により力価も  $1.5 \times 10^9$  pfu/ul のウイルスベクターを得ることができた。Multiplicity of infection (MOI) 5-10 で角化細胞に遺伝子導入した時には、Western blot 法にて外来遺伝子の十分な発現が認められ、なおかつコントロールベクターでは、増殖、形態ともにほとんど影響を及ぼさなかった。MOI 5-10 で感染させた時に、遺伝子発現が

十分にあり、コントロールのベクターでは増殖・形態にもほとんど影響を及ぼさないことから、MOI 5-10 を遺伝子発現に用いるのが最も妥当と考えられた。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ASK1 の発現、角化細胞の分化誘導のモデルシステムとして最適であると考えられる (橋本公二)。

2) 愛媛大学、橋本が 1) のごとく確立した角化細胞への遺伝子導入法を用いて、愛媛大学、佐山は ASK1 が角化細胞の MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 産生に関与しているかどうか検討した。角化細胞に ASK1 を発現させると、12 時間以内で、MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin の mRNA の発現が認められた (ribonuclease protection assay 法)。また、ELISA 法、Western blot 法にてタンパク質の産生を検討したところ、MIP3 $\alpha$  の産生が確認できた。次に、ASK1 の下流にあるとされる JNK、p38MAPK がこれらの産生に関わっているかどうか検討した。ASK1 による MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 2, 3 の産生は、p38 MAPK 阻害剤である SB により阻害されたが、JNK 阻害剤である curcumin では阻害されなかった。ASK1 による分化誘導に伴い、MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 2, 3 が産生されることから、表皮では分化、つまりバリア機能形成とあわせて、これらの生体防御機構も形成されてくるものと考えられる。また、この制御機構は ASK1-p38 MAPK を介するものと考えられる (佐山浩二)。

3) ASK1 ノックアウトマウスを用いた ASK1 の細胞内シグナル伝達機構を調べた。その結果 ASK1 は JNK および、p38MAPK の経路で、持続的な活性化に必須であることが明らかとなった (一條秀憲)。

4) hBD-1 の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は hBD-2, 3, CAP18 よりも低かった。MRSA22 株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 22 株に対する抗菌活性を検討したところ、株によって差が認められるが全て

のペプチドに抗菌力が認められた。ケラチノサイトにおける hBD-2, 3, CAP18 の mRNA 発現量は 12 時間まで時間依存的に増加した。角化細胞を用いた感染実験により、表皮角化細胞は黄色ブドウ球菌の感染により、直接的にデフェンシンを産生することが明らかとなった。すなわち、表皮角化細胞はいわゆる免疫担当細胞の関与なしに、みずから抗菌作用を有するデフェンシンを産生し、感染に抵抗することが明らかとなった (菅井基行)。

#### D. 考察

アトピー性皮膚炎を代表とする皮膚アレルギー疾患の研究はリンパ球を中心とした免疫学的研究が中心であり、表皮は単なる物理的なバリアーとしか認識されていなかった。表皮細胞自身が種々のサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子を産生して、アトピー性皮膚炎の発症に重要な役割を果たしている表皮バリア障害において、これらの産生が増加し、アレルギー炎症を増悪させることが明らかになってきた。しかし、その作用機序については解明されておらず、アトピー性皮膚炎の表皮で分化異常が見られることから、表皮の分化機構が何らかの形で関連しているのではないかと想定されているにすぎなかった。近年、角化細胞が Langerhans 細胞に対するケモカインである MIP3 $\alpha$ 、あるいは抗菌作用を持つ  $\beta$  defensin を産生することが明らかになるとともに、皮膚アレルギーの発症の場である表皮そのものの機能が注目されるようになった。しかし、従来の研究は主としてサイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチドの増加といった現象観察に終わっており、その産生機構、特に表皮の分化と関連づけた表皮細胞内シグナル伝達機構に関してはほとんど研究されていない。その理由として、表皮細胞内における分化誘導機構に関しては、PKC の

関与が報告されているのみで、詳細が不明であったためと考えられる。我々はASK1が表皮細胞内における重要な分化誘導因子であることを明らかにしたが、本研究においては、ASK1を中心とした表皮の分化機構そのものが皮膚におけるMIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensinの産生を制御し、獲得免疫、自然免疫の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、JNK、p38MAPKの持続的な活性化にはASK1が必須であることが示され、ケモカイン、 $\beta$  defensinの産生にJNK、p38 MAPKの持続的な活性化が深く関わっていると考えられた。これは、ASK1を中心とする表皮角化細胞の分化制御機構の異常が、分化異常すなわち表皮バリア障害を伴う、アレルギーの発症に関与することを示している。

アトピー性皮膚炎におけるASK1の機能不全が関わる病態としては、次のものが想定される。

1 ASK1が活性化されると、分化が促進され、破綻したバリアー機能が修復されると考えられる。しかし、ASK1の機能に異常があると、修復機構が機能せず、バリアー機能修復が遅れる。

2、ASK1は角化細胞の分化に伴い発現し、分化を遂行する。分化（バリアー機能）の異常により、ASK1の機能不全がある場合は、ASK1により産生されるケモカイン、サイトカインの産生異常が起こり、局所的な免疫異常が起こる。

3、皮膚を細菌感染から保護する $\beta$  defensinを表皮角化細胞は産生するが、分化（バリアー機能）の異常により、ASK1の機能不全が起こり細菌感染が制御できず、細菌感染が増悪する。

以上述べてきたごとく、ASK1により表皮角化細胞は分化し物理的なバリアーを形成し、さらにMIP3 $\alpha$ と $\beta$  defensinを産生することにより機能的な防御機能を獲得する。

すなわち、表皮のバリアー機能異常と免疫反応の接点にはASK1があり、ASK1を中心とする表皮角化細胞の分化制御機構の異常がアトピー性皮膚炎におけるバリアー機能・免疫反応異常に関与する可能性が示唆される。

#### E. 結論

表皮には、外界に対する物理的なバリアーと異物認識・炎症・排除という機能的な側面がある。従来、物理的なバリアー形成（分化）と、皮膚の防御機能（自然免疫、獲得免疫）の形成は、独立したものと考えられてきた。しかし、今年度の研究により、表皮のバリアー形成と防御機能の獲得はASK1を中心とした制御機構により、相互に影響を受けながら制御されている可能性があることが明らかとなった。つまり、ASK1を中心とした制御機構の異常により、分化すなわちバリアー機能破綻、および局所免疫の異常をきたす可能性が考えられる。これらの結果を総合すると、ASK1を中心とした制御機構の異常を修正することにより、アトピー性皮膚炎の治療につながる可能性が考えられる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tohyama M, Shirakata Y, Yamasaki K,

**Sayama K, Hashimoto K. Differentiated**

**keratinocytes are responsible for TNF--a**

**regulated production of macrophage**

**inflammatory protein 3a/CCL20, a potent**

**chemokine for Langerhas cells. J Dermatol Sci;**

**27: 130-139, 2001**

2. **Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y,**

**Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K,**

**Ichijo H, Hashimoto K. Apoptosis signal-**

regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* ;276(2):999-1004, 2001

2. 学会発表

1. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Toriu N, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hashimoto K. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates early phase keratinocyte differentiation. The society for investivative dermatology 62th annual meeting. 2001. 5. (Washington DC, USA)

2. Tohyama M, Sayama K, Tokumaru S, Yamasaki K, Okamoto T, Hashimoto K. RelA-associated inhibitor regulates NF-kB in differentiated keratinocytes. The society for investivative dermatology 62th annual meeting. 2001. 5. (Washington DC, USA)

3. Yamasaki K, Toriu N, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K. Keratinocyte growth inhibition by high doses of epidermal growth factor is mediated through autoinduction of transforming growth factor b. The society for investivative dermatology 62th annual meeting. 2001. 5. (Washington DC, USA)

4. Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Hashimoto K. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) controols keratinocyte differentiation by regulating adhesion signal. The 26th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology. 2001. 9. (Matsuyama, Ehime, Japan)

5. Tohyama M, Sayama K, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tsuda T, Hashimoto K, Okamoto T. Suppression of NF-kB activity in differentiated keratinocytes. The 26th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology. 2001. 9. (Matsuyama, Ehime, Japan)

6. Tokumaru S, Shirakata Y, YHamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. TPA-induced

keratinocyte migratin requires EGF receptor transactivation mediated by proteolytic production of EB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor). The 26th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology. 2001. 9. (Matsuyama, Ehime, Japan)

7. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K. Biological dressing effect of cultured epidermal sheets is mediated by

the production of VEGF and TGF- $\beta$  The 26th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology. 2001. 9. (Matsuyama, Ehime, Japan)

8. Midorikawa K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Sayama K, Tokumaru S, Yamasaki K, Hashimoto K. Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes. The 26th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology. 2001. 9. (Matsuyama, Ehime, Japan)

II. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）  
分担研究報告書

ASK1 による JNK/p38MAPK の持続的な活性化に関する研究

分担研究者 一條秀憲 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

ASK1 ノックアウトマウスを用いて、ASK1 によるシグナル伝達機構を解析した。その結果、 $H_2O_2$ による JNK と p38 MAPK のリン酸化のピークは、30 分以内で認められ、その活性化の程度は wild type のマウスのもものと比較して差が認められなかった。しかし、45 分後には、ノックアウトマウスでは、JNK と p38 MAPK のリン酸化が著しく減弱したが、wild type では、活性化が持続していた。すなわち、ASK1 は  $H_2O_2$  による JNK と p38 MAPK の持続的な活性化に必須であることが明らかとなった。ケモカインあるいはデフェンシン等のタンパク産生制御機構においても ASK1 が関わっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

表皮角化細胞の分化機構と局所免疫異常に ASK1 が関わっているかどうか検討するために、ASK1 の細胞内シグナル伝達機構を解析する。角化細胞の分化を ASK1 が制御していることは、すでに愛媛大学、佐山が明らかにしているが、そのシグナル伝達の詳細は明らかでない。さらに、本年度の研究では、愛媛大学、佐山が角化細胞の MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 産生に ASK1 が関与しているかどうか検討する。そこで、角化細胞の分化機構の詳細な解析、および MIP3 $\alpha$ 、 $\beta$  defensin 産生制御機構の解析には、ASK1 から下流に至る細胞内シグナルの解析が必須となる。そこで、ASK1 ノックアウトマウスを用いて、ASK1 によるシグナル伝達機構を解析する。

B. 研究方法

1) ノックアウトマウスの作成

ASK1 遺伝子のうち、First coding exon と intron の一部を green fluorescence protein に置換し、neomycin-phosphotransferase カセットに組み込んだ。このコンストラクトを J1 ES cell に導入し、Southern blot 法にて組み替えをスクリーニ

ングした。変異体組み込みの ES cell を C57BL/6J blastocysts にマイクロインジェクションし、ノックアウトマウスを作成した。

2) MEF の培養

Mouse embryonic fibroblast (MEF) は 12.5 日の mouse embryo から、DMEM, 10% FCS, 100 units/ml penicillin G を用いて  $CO_2$  インキュベーターで培養した。細胞は、2-5 継代数のものを使用した。

3) JNK, p38 MAPK の活性化の検討

MEF 細胞を  $H_2O_2$  で刺激し、lysis buffer (50 mM, Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM PMSF, 150 units/ml) で回収し、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いて、western blot を行った。Blot は ECL 法で発色し、シグナルを定量化した。

本研究は学内の動物実験委員会の規程にのっとり実験を行った。

C. 結果

JNK と p38 MAPK のリン酸化のピークは、30 分以内で認められ、その活性化の程度は wild type のマウスのもものと比較して差が認



めらなかつた。しかし、45分後には、ノックアウトマウスでは、JNKとp38 MAPKのリン酸化が著しく減弱したが、wild typeでは、活性化が持続していた。すなわち、ASK1はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるJNKとp38 MAPKの持続的な活性化に必須であることが明らかとなった。

#### D. 考察

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるJNK、p38 MAPKの持続的な活性化に、ASK1が必須であったことから、ケモカインあるいはデフェンシン等のタンパク産生制御機構においてもASK1が関わっている可能性が考えられた。さらに、ASK1による角化細胞の分化機構にはp38 MAPKが必須であることから、ASK1を介したp38 MAPK活性化の時間的制御が、角化細胞の分化に重要な働きをしていることが示唆された。

#### E. 結論

角化細胞の分化、ケモカイン、デフェンシンの産生機構には、ASK1によるJNKおよびp38 MAPKの活性化が関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., **Ichijo, H.** and Hashimoto, K. Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 276, 999-1004 (2001).
2. Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., De Vos, K., Sheetz M. and **Ichijo, H.** Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase. *J. Cell Sci.*, 114, 1221-1227 (2001).
3. Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., **Ichijo, H.** and Greene W.C. HIV-1 nef inhibits ASK1- dependent death signaling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*, 410, 834-838 (2001).
4. Noguchi, K, Kokubu, A, Kitanaka, C, **Ichijo H.** and Kuchino, Y. ASK1-Signaling Promotes c-Myc Protein Stability during Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 281, 1313-1320 (2001).
5. Cho, S.-G., Lee, Y., Park, H.-S., Ryoo, K., Kang, K., Park, J., Eom, S.-J., Kim, M., Chang, T.-S., Choi, S.-Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.-S., Lee, M.-J., Kim, S., **Ichijo, H.** and Choi, E.-J. Glutathione s-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal- regulating kinase 1 (ASK1). *J. Biol. Chem.*, 276, 12749-12755 (2001).
6. Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and **Ichijo, H.** ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports*, 2, 222-228 (2001).
7. Zou, X., Tsutsui, T., Ray, D., Blomquist, J.F., **Ichijo, H.**, Ucker, D.S. and Kiyokawa, H. The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *Mol. Cell. Biol.*, 21, 4818-4828 (2001).
8. Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., **Ichijo, H.**, Ogawa, O., Kakehi, Y., and Kakizuka, A. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research*, 61, 5432-5440, (2001).
9. Arvidsson, Y., Hamazaki, T.S., **Ichijo, H.** and Funa, K. ASK1 resistant neuroblastoma is deficient in activation of p38 kinase. *Cell Death and Differ.*, 8, 1029-1037 (2001).
10. Matsuzawa, A. and **Ichijo, H.** Molecular Mechanisms of the Decision between Life and Death: Regulation of Apoptosis by Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *J. Biochem.*, 130, 1-8, (2001).

11. Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and **Ichijo, H.** Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.*, 20, 6028-6036 (2001).
  12. Hatai, T., Yokozeki, M., Funato, N., Baba, Y., Moriyama, K., **Ichijo, H.** and Kuroda, T. Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement. *Oral Diseases*, 7, 287-290 (2001).
  13. Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. and Ichijo, H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxidants and Redox Signal*, in press (2002).
  14. Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J. Cell. Physiol.*, 191, 1091-1099 (2002).
2. 学会発表
    1. Galvan, V., Ichijo, H. and Bredesen, D.E. IGF-IR phosphorylates and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). The meeting of the American Association for Cancer Research on Apoptosis and Cancer, February 13, 2002, U.S.A..
    2. Nishitoh, H. and Ichijo, H.: ASK1 is essential for the ER stress-induced JNK activation and apoptosis. Keystone Symposia "Protein Phosphorylation and Mechanisms of Cellular Regulation", Abstract Book p175, March 5-10, 2002, Keystone, Taos, U.S.A..
    3. Matsuura, H., Nishitoh, H., Yoshioka, K. and Ichijo, H.: Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. Keystone Symposia "Protein Phosphorylation and Mechanisms of Cellular Regulation", Abstract Book p175, March 5-10, 2002, Keystone, Taos, U.S.A..
    4. Takahashi, T., Tobiume, K., Matsuzawa, A. and Ichijo, H.: Impairment of wound induced hair cycling in ASK1-deficient mice. Keystone Symposia "Protein Phosphorylation and Mechanisms of Cellular Regulation", Abstract Book p175, March 5-10, 2002, Keystone, Taos, U.S.A..
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
    - 免疫疾患の予防又は治療剤
    - 整理番号：JP-A0203-0
    - 提出日平成14年1月31日
  - 2.3 実用新案登録、その他
    - なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）  
分担研究報告書

ヒト上皮細胞の産生する抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に  
対する効果に関する研究

分担研究者 菅井基行 広島大学歯学部 教授

研究要旨

ヒト皮膚由来のケラチノサイトは抗菌ペプチドである3種の $\beta$ -defensin と CAP18 を産生しており黄色ブドウ球菌をケラチノサイトに接触させることで2種の $\beta$ -defensin と CAP18 が誘導的に産生されることを認めた。またこれらの抗菌ペプチドについて合成ペプチドを作製し、黄色ブドウ球菌に対する抗菌力を検討した結果、いずれのペプチドにおいても抗菌力が認められた。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は伝染性膿痂疹の原因菌であり、またアトピー性皮膚炎に二次感染を起こす等種々の皮膚感染症の原因菌として知られている。黄色ブドウ球菌感染症の治療法の一つとして化学療法があるがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の出現により難治化傾向にあり、最近では MRSA の治療薬に有効とされるバンコマイシンに低感受性を示す菌も出現しており、その治療はさらに困難になってくることが予想される。近年の耐性菌の増加により、種々の新しい抗菌剤や併用療法などが開発、研究されているがさらなる耐性化を助長する恐れも有り、また副作用などの問題等も考慮すると抗菌剤による化学療法はさらに深刻な問題となる可能性がある。ヒトを含めた哺乳動物は種々の抗菌ペプチド（ディフェンシン、CAP18、ヒスタチン）を産生することが知られている。ヒトの上皮系の細胞が産生する抗菌ペプチドは $\beta$ -ディフェンシン（hBD1-3）、CAP18 が知られている。これらの抗菌ペプチドは比較

的広い抗菌スペクトラムを持ち、またヒトの産生する物質であるため副作用が少ないと考えられることから、これら抗菌ペプチドを応用した黄色ブドウ球菌感染症治療法が期待される。我々はこの上皮系の産生する抗菌ペプチドに着目し臨床応用に向けて抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する作用について基礎的研究を行うため、黄色ブドウ球菌接触時における皮膚ケラチノサイトの抗菌ペプチド産生性および抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する効果について検討した。

B. 研究方法

1. 抗菌活性の検討：hBD-1、2、3 および CAP18 の合成ペプチドを作製し、種々の濃度の合成ペプチドを加えた 10mM リン酸緩衝液の中で黄色ブドウ球菌を2時間作用後、寒天培地にまき、コロニー数をカウントした。
2. keratinocyte における発現の検討：正常ヒト keratinocyte K-42 を confluent まで培養し、菌を 68°C、1時間処理した加熱死菌を  $10^8$ /ml になるよ

う培養液に添加し、種々の時間接触させた。その後、細胞から RNA を抽出、精製し RT-PCR 法および Real-Time PCR 法で各々の抗菌ペプチド mRNA の発現を検討した。

#### C. 研究結果

1. hBD-1 の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は hBD-2、3、CAP18 よりも低かった。MRSA22 株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 22 株に対する抗菌活性を検討したところ、株によって差が認められるが全てのペプチドに抗菌力が認められた。

2. keratinocyte における hBD-1 mRNA の発現は、菌の接触にかかわらず恒常的であった。また hBD-2、3、CAP18 の mRNA 発現量は 12 時間まで時間依存的に増加した。hBD-2 の発現増加量は hBD-3、CAP18 と比較して多かった。

#### D. 考察

hBD1 の抗菌力は他の抗菌ペプチドと比較して劣るものの全ての抗菌ペプチドにおいて比較的低濃度 (1~5 $\mu$ g/ml) で黄色ブドウ球菌に対して抗菌力を発揮した。臨床分離株 44 株について検討した結果、MRSA 株の方が全体的に MSSA 株に比べ感受性がやや低い傾向は認められたが、耐性化を示す菌は認められなかったことから、これら抗菌ペプチドは黄色ブドウ球菌に対して有効な抗菌物質であると考えられる。黄色ブドウ球菌が皮膚ケラチノサイトに接触することにより、hBD2、hBD3 および CAP18 の産生が誘導されることが認められたが、株間で産生量に差が認められた。この産生量の違いがどのような機序により起こるのか、現在検討中である。

#### E. 結論

ヒト上皮細胞は黄色ブドウ球菌の接触により、少なくとも 4 種の抗菌ペプチドを産生することを認め、またこれら抗菌ペプチドは黄色ブドウ球菌に対して抗菌力を発揮したことから有効な抗菌物質であることが示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

ヒト上皮細胞が産生する抗菌ペプチドの *S. aureus* に対する抗菌活性および発現様式 日本細菌学雑誌 57(1), 2002

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金 (感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業)  
分担研究報告書

角化細胞の培養とアデノウイルスベクターを用いる  
遺伝子導入法の確立に関する研究

分担研究者 橋本公二 愛媛大学 教授

研究要旨

角化細胞を効率よく培養する方法を確立し、senescence になるまで培養した。Population doubling (PD) は 5.7 から 45.2 までと広範囲に分布していた。また、アデノウイルスベクターを用いて Multiplicity of infection (MOI) 5-10 で角化細胞に遺伝子導入すると、Western blot 法にて外来遺伝子の十分な発現が認められ、なおかつコントロールベクターでは、増殖、形態ともにほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、MOI 5-10 を遺伝子発現に用いるのが最も妥当と考えられた。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ASK1 の発現、角化細胞の分化誘導のモデルシステムとして最適であると考えられる

A. 研究目的

角化細胞がケモカイン、デフェンシンを産生するかどうか検討するためには、角化細胞の効率的な培養方法の確立が必須である。また、角化細胞での ASK1 の遺伝子発現のためには、高効率で遺伝子発現できるシステムが必要である。が必須である。そこで、この研究では、角化細胞の培養法の確立と、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の確立を目的とする。

B. 研究方法

1) 角化細胞の単層培養

細胞を無血清培地である MCDB153 で懸濁し、100 mm の type I コラーゲンコートシャーレ1枚当たり  $2\sim 3 \times 10^6$  細胞/10 ml medium の割合で播種する。翌日培地交換を行い、以後、培地交換は 2~3 日に一度おこなう。細胞密度が 70~80% 程度になったら継代培養を行う。継代するときは、0.25%トリプシン、0.05% EDTA

混合用液を用い、細胞の回収を行う。播種密度は 100 mm シャーレにつき  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  細胞/10 ml medium がよい。アミノ酸添加 MCDB153 培地にはインスリン 1.0 ug/ml、モノエタノールアミン 0.1 mM、ホスホリルエタノールアミン 0.1 mM、ヒドロコチゾン 0.5 uM を加える。CaCl<sub>2</sub> の最終濃度は 0.1mM に調整する。

2) アデノウイルスベクターの作成、大量培養

活性型 ASK1 は N 末端を一部欠失させた cDNA を PCR 法にて作成後、C 末端に seven c-myc tag を付けプラスミドに導入し E. coli で大量に培養し、精製する。プラスミドを cos 細胞に lipofection により transfect して、変異蛋白の発現を Western blot 法にて確認する。このプラスミドを制限酵素にて切断後、アデノウイルス作成用コスミドカセットに組み込み、EcoT221 切断済アデノウイルス DNA-TPC とともに 293 細胞に co-

transfect する。数日間培養し、相同組み替えにより変異体が組み込まれたウイルスを分離し、さらに 293 細胞に感染させ、大量培養を行う。293 細胞を回収し超音波処理後塩化セシウム密度勾配法にてウイルス液の精製、濃縮を行った上で、PBS-glycerol に対して透析する。ウイルス力価を測定し、 $-160^{\circ}\text{C}$ 保存する。

### 3) 角化細胞での遺伝子発現

上記方法にて作成した変異体を組み込んだアデノウイルスベクターを、ケラチノサイトに 60 分間感染させる。低カルシウム MCDB153 にて数時間培養後、通常 MCDB153 に培地交換し更に、24h から 36h 培養する。変異体発現の確認には c-myc 発現の有無を免疫染色、Western blot 法を用いる。

倫理面への配慮として、本研究は生検ヒト皮膚を用いるが、試料等の保存及び使用方法について十分な説明を行った上で、自由意志に基づく文書による同意(インフォームド・コンセント)を得た上で行った。

### C. 結果

角化細胞を senescence になるまで培養したところ、population doubling (PD) は 5.7 から 45.2 までと広範囲に分布していた。これらの細胞は PD に基づいて short, intermediate, long に分類することができた。アデノウイルスベクターは上記の方法により効率的に作成することができ、大量培養により力価も  $1-5 \times 10^9$  pfu/ul のウイルスベクターを得ることができた。Multiplicity of infection (MOI) 5-10 で角化細胞に遺伝子導入した時には、Western blot 法にて外来遺伝子の十分な発現が認められ、なおかつコントロールベクターでは、増殖、形態ともにほとんど影響を及ぼさなかった。

### D. 考察

MOI 5-10 で感染させた時に、遺伝子発現が十分にあり、コントロールのベクターでは増殖・形態にもほとんど影響を及ぼさないことから、MOI 5-10 を遺伝子発現に用いるのが最も妥当と考えられる。

### E. 結論

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は、ASK1 の発現、角化細胞の分化誘導のモデルシステムとして最適であると考えられる。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiyama S, Kosai K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001 108(12):1781-8

Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 2001 6;20(56):8125-35

Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Hirose S, Kyo S, Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter. *Biochem Biophys Acta* 2001 19;1518(1-2):124-31

Hamada K, Hanakawa Y, **Hashimoto K**, Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M. Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines. *Oncol Rep* 2001 ;8(2):347-54

Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, **Hashimoto K**. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production

of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 2001;27(2):130-9

Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, O **Hashimoto K**: Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276:999-1004, 2001

白方裕司、鳥生信子、橋本公二. 表皮における $\beta 1$  インテグリンの発現 *Excerpta Medica* 4: 4, 2001

白方裕司、橋本公二. 培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療 *Excerpta Medica* 4: 5, 2001

## 2. 学会発表

Y Shirakata, H Oura, K Yano, P Velasco, L Riccardi, M Streit, **K. Hashimoto**, and M Detmar: Inverse regulation of the angiogenesis factor VEGF and the angiogenesis inhibitors thrombospondin-1 and TSP-2 in human epidermal keratinocytes. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

Y. Yahata, S. Tokumaru, Y. Hanakawa, K. Yamasaki, Y. Shirakata, **K. Hashimoto**: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for endothelial cell migration induced by basic FGF: STAT3 phosphorylation is involved in tube formation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

K. Sayama, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, N. Toriu, S. Tokumaru, **K. Hashimoto**: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates early phase keratinocyte differentiation. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

K. Yamasaki, N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, S. Tokumaru, Y. Yahata, M. Tohyama, K. Sayama, **K. Hashimoto**: Keratinocyte growth inhibition by high doses of epidermal growth factor is mediated through autoinduction of transforming growth factor beta: Negative feedback mechanism of keratinocyte growth. 62nd Annual Meeting of the

Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

N. Toriu, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, **K. Hashimoto**: Exogenous gene expression in skin-equivalent keratinocytes using a Cre/loxP adenovirus system. 62nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology May 13, 2001 at Washington DC, USA

Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, **K. Hashimoto**: BIOLOGICAL DRESSING EFFECT OF CULTURED EPIDERMAL SHEETS IS MEDIATED BY THE PRODUCTION OF VEGF AND TGF- $\beta$ . 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

K. Midorikawa, Y. Hanakawa, Y. Shirakata, K. Sayama, S. Tokumaru, K. Yamasaki, **K. Hashimoto**: CRE-LOXPADENOVIRUS-MEDIATED FOREIGN GENE EXPRESSION IN SKIN EQUIVALENT KERATINOCYTES. 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology Sep 7, 2001 at Ehime, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Nagata K, Yoshimura A.	Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis.	J Clin Invest	108(12):	1781-8	2001
Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Herlyn M	Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development	Oncoge	20(56):	8125-35	2001
Hamada K, Shinomiya H, Asano Y, Kihana T, Iwamoto M, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Hirose S, Kyo S, Ito M	Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gene and characterization of its promoter	Biochim Biophys Acta	1518(1-2):	124-31	2001
Hamada K, Hanakawa Y, <b>Hashimoto K</b> , Iwamoto M, Kihana T, Hirose S, Nakamura M, Ito M	Gene expression of human squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in human cell lines	Oncol Rep	8(2):	347-54	2001
Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, Sayama K, <b>Hashimoto K</b>	Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells	J Dermatol Sci	27(2):	130-9	2001
Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, <b>Hashimoto K</b>	Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation	J Biol Chem	276	999-1004	2001
白方裕司、鳥生信子、橋本公二	表皮におけるβ1インテグリンの発現	Excerpta Medica	4	4	2001
白方裕司、橋本公二	培養表皮シート自家移植による劣性栄養障害型表皮水疱症の治療	Excerpta Medica	4	5	2001
Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., De Vos, K., Sheetz M. and Ichijo, H	Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase.	J. Cell Sc	276	1221-1227	2001



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Gelezianus, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. and Greene W.C	HIV-1 nef inhibits ASK1-dependent death signaling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell	Nature	410	834-838	2001
Noguchi, K, Kokubu, A, Kitanaka, C, Ichijo H. and Kuchino, Y	ASK1-Signaling Promotes c-Myc Protein Stability during Apoptosis	Biochem Biophys Res Commun	281	1313-1320	2001
Cho, S.-G., Lee, Y., Park, H.-S., Ryoo, K., Kang, K., Park, J., Eom, S.-J., Kim, M., Chang, T.-S., Choi, S.-Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.-S., Lee, M.-J., Kim, S., Ichijo, H. and Choi, E.-J.	Glutathione s-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)	J. Biol. Chem	276	12749-12755	2001
Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H	ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis	EMBO reports	2	222-228	2001
Zou, X., Tsutsui, T., Ray, D., Blomquist, J.F., Ichijo, H., Ucker, D.S. and Kiyokawa, H	The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)	Mol. Cell. Biol.	21	4818-4828	2001
Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., and Kakizuka, A.	Tumor growth inhibition by arsenic trioxide in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer	Cancer Research	61	5432-5440	2001
Arvidsson, Y., Hamazaki, T.S., Ichijo, H. and Funa, K	ASK1 resistant neuroblastoma is deficient in activation of p38 kinase	Cell Death and Differ.	8	1029-1037	2001
Matsuzawa, A. and Ichijo, H.	Molecular Mechanisms of the Decision between Life and Death: Regulation of Apoptosis by Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1	J. Biochem	130	1-8	2001
Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H.	Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress.	EMBO J.	20	6028-6036	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hatai, T., Yokozeki, M., Funato, N., Baba, Y., Moriyama, K., Ichijo, H. and Kuroda, T.	Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement.	Oral Diseases	7	287-290	2001
Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K. and Ichijo, H.	Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice	Antioxidants and Redox Signal.	in press		2002
Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H.	Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 by the stress induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer	J Cell Physiol	191	1091-1099	2002

20010801

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。