

20030663

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

表皮自然免疫機構の解明とその

皮膚アレルギー治療への応用

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐山 浩二

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I 総括研究報告

表皮自然免疫機構の解明とその皮膚アレルギー治療への応用	-----1
佐山浩二	

II 分担研究報告

1 カルヌウムによる ASK1-p38 経路の活性化機構	-----11
一條秀憲	
2 ヒト角化細胞の産生する抗菌ペプチドの 黄色フトウ球菌に対する効果に関する研究	-----15
菅井基行	
3 浮遊培養法を用いた表皮角化細胞の重層化に伴う分化に関する研究	
橋本公二	-----19

III 研究成果の刊行に関する一覧表	-----24
--------------------	---------

IV 研究成果の刊行物・別冊	-----31
----------------	---------

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
総括研究報告書

表皮自然免疫機構の解明とその皮膚アレルギー治療への応用

主任研究者 佐山 浩二 愛媛大学医学部 助教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎では表皮角化細胞の分化異常があるか、病変部表皮で ASK1、抗菌ペプチドの発現が低下していた。分化機構ではカルヌムによる ASK1 の活性化機構、および PI3 kinase が角化細胞の分化を制御していることを明らかにした。また、895 株の臨床分離黄色フトウ球菌の解析から、MRSA は抗菌ペプチドに対して低感受性であることを明らかにした。抗菌ペプチドを外用剤として使用できる可能性がある。

分担研究者

一條秀憲・東京大学大学院薬学系
研究科・教授
菖井基行・広島大学大学院医歯薬
総合研究科・教授
橋本公二・愛媛大学医学部・教授

A 研究目的

表皮角化細胞は種々のサイトカイン、ケモカイン、細胞成長因子を産生し、アトピー性皮膚炎の発症に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、その作用機序については十分に解明されておらず、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。MAPKKK ファミリーに属する ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) は表皮細胞内の重要な分化誘導因子であるか、我々はすでに、ASK1 を中心とした表皮の分化機構が皮膚における MIP3- α および抗菌ペプチドの産生を制御し、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てきた。すなわち、従来別個と考えられてきた表皮のハリア形成と免疫機能（自然・獲得）の獲得

といった、いわば構造的な分化と機能的な分化は、いずれも同じ分化機構が制御することか明らかとなった。アトピー性皮膚炎では表皮ハリア障害が見られるか、その原因になっている表皮細胞の分化制御機構の異常か、表皮におけるアレルギー炎症の発症にも関与する可能性がある。また、表皮細胞の産生する抗菌ペプチドの産生も ASK1 が制御することより、アトピー性皮膚炎の細菌感染にも関与している可能性がある。さらに、アトピー性皮膚炎は Th2 優位のアレルギー疾患として知られているか、その研究の中心はリンパ球を中心とする免疫系であり、表皮角化細胞の関与はほとんど検討されていない。

従来の研究で、表皮角化細胞は ASK1 による分化に伴い MIP3- α 、抗菌ペプチドに加えて Th1 に対するケモカインである MIP1 α 、MIP1 β を産生することを明らかにした。すなわち、皮膚では Th1/Th2 バランスは表皮の分化により制御されている可能性が示唆された。これまでに抗菌ペプチド単独での黄色フトウ球菌に対する抗菌効果について報告してきたか、平成 15 年度の研究では抗菌ペプチド間および抗生剤との併用による相乗効果があることが明らかとなった。

すなわち、これらの抗菌ペプチドが従来型の化学療法を相補する新たな治療剤となりうることを示された。これらの研究成果をもとに、本年度は、①重層化に伴う表皮分化機構の解明②カルニウムによるASK1の活性化機構③臨床分離黄色ブドウ球菌 895 株に対する抗菌ペプチドに対する感受性についての検討④皮膚細菌感染モデルマウスを用いた *in vivo* における抗菌ペプチド機能の解明とアトピー性皮膚炎治療薬としての基礎的検討。以上の4項目に関して検討することを目的とする。以上の如く、本研究は従来の皮膚アレルギー研究に、角化細胞の分化という視点から新たに取り組むものである。研究体制については、ASK1の基礎的研究は東京大学一條か、 β -defensinの基礎的研究は広島大学菅井か、重層化表皮角化細胞の分化に関する研究は愛媛大学橋本か、皮膚細菌感染モデルの研究は佐山か担当し、佐山かこれらの研究を統括する。本研究により、アトピー性皮膚炎におけるアレルギー炎症発症機序および細菌感染機序の解明が可能となり、新たなアトピー性皮膚炎の治療薬開発へとつながると考えられる。

B 研究方法

- 1) 愛媛大学、橋本は浮遊培養法を確立し、表皮角化細胞の重層化に伴う分化制御機構を検討する。そのため、まず Polyhydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA)を用いて浮遊培養法を確立する。また分化マーカーの発現は Rinonuclease protection assay (RPA)法を用いて検討する。Phosphatidylinositol (PI)-3 kinase 活性は薄層クロマトグラフィーを用いて測定する。
- 2) 東京医科歯科大学、一條はカルニウムによるASK1-p38経路の活性化機構を検討する。ASK1 JNK p38 MAPK のリン酸化は抗ASK1 JNK、p38 MAPK 抗体および抗リン

酸化 ASK1 JNK、p38 MAPK 抗体を用いて、Western blot を行い検討した。また、ヒトCaMKIIbに対する二重鎖 siRNA を作成し、Oligofectamin (Invitrogen)を用いて細胞にトランスフェクトした。

3) 広島大学、菅井は臨床分離株 895 株に対する抗菌ペプチドに対する感受性についての検討を行い、メチンリン耐性度、分離部位、コアクラーゼ型、種々の抗菌剤の感受性等との関連性について検討した。菌株は臨床分離された黄色ブドウ球菌 895 株（メチンリン耐性菌 623 株）を用いた。薬剤感受性試験は微量液体希釈法による最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

4) 愛媛大学、佐山は皮膚細菌感染モデルを用いた抗菌ペプチド軟膏の抗菌作用を検討した。まず、皮膚細菌感染の実験モデルを作成した。新生児マウスに黄色ブドウ球菌を塗布し、乾燥させる。その後、一定時間の後、PBS 中で超音波を用いて菌を回収し、TSB 培地に播種する。24 時間後に colony をカウントし、colony forming unit (cfu)を算出した。抗菌ペプチド含有軟膏の作成には、CAP18 を用いた。合成した CAP18 を親水軟膏、白色ワセリン基剤と混合し、抗菌ペプチド含有軟膏を作成した。

C 結果

平成 15 年度の研究によって得られた結果は以下のとおりである。

- 1) Poly-HEMA でコートしたプレートを用いて培養したところ、角化細胞はほとんど付着せず、浮遊状態で培養できることが明らかとなった。浮遊培養後、分化マーカーの発現を RPA 法にて検討したところ、transglutaminase-1 involucrin loricrin keratin-1-10 の mRNA 発現が増強しており、さらにタンハクレヘルでも involucrin keratin-1-10 の発現が増加していた。この分化マーカーは BHE を培地に添加しない条件で発現が増

強していた。ついで、PI3 kinase の活性を測定した。その結果、単層培養の条件では、PI3 kinase の活性が認められたか、浮遊培養を行うと、PI3 kinase の活性は著しく低下した。(橋本公二)。

2) Mitotoxin (MTX)を用いて MEF にカルシウム influx を誘導したところ、p38 は活性化された。しかし、ASK1^{-/-}の細胞では、p38 の早期の活性化は低下していた。この結果を確認するために、ASK1^{-/-}の細胞にアデノウイルスベクターを用いて、ASK1 を発現させたところ、低下していた p38 の早期の活性化は回復した。さらに、CaMKII をトランスフェクトしたところ、p38 は活性化された。しかし、ASK1^{-/-}の細胞では、p38 の活性化は起こらなかった。ついで、カルシウムによる ASK1 p38 の活性化における CaMKII の必要性を CaMKII に対する siRNA を用いて検討した。その結果、CaMKII の発現が低下するとカルシウムによる ASK1 p38 の活性化が低下すること明らかとなった(一條秀憲)。

3) ①合成ペプチド hBD-3 (2μg/ml) CAP18 (1μg/ml) を用いて 895 株の臨床分離株に対する抗菌力を検討した結果、これらの抗菌ペプチドに対して感受性の高い菌、低い菌等その感受性は多様であった。しかし、高濃度 (10μg/ml)においてはいずれの菌株に対しても抗菌力は認められた。②メチンリン感受性菌 (MSSA) と耐性菌 (MRSA) について抗菌ペプチドの感受性を検討したところ、MRSA のほうが2つのペプチドに対し低感受性を示す菌株の割合が高い傾向を示した。また、MRSA の中でもメチンリン高感受性株においてその傾向は著明に認められた。③分離した部位と抗菌ペプチドの感受性との関連性は認められなかった。④コアクラーセ型別と抗菌ペプチドの感受性との関連性は認められなかった。⑤895 株の中から54株ランダムに抽出した株の

種々の抗菌剤について抗菌力を測定したところ、その感受性は菌株により様々であったか、抗菌ペプチドとの感受性との関連性は認められなかった(菅井基行)。

4) 細菌感染モデルでは 1×10^9 cfu/ml の黄色ブドウ球菌液を用いて、新生児マウスに塗布したところ、1時間後に菌は $3-5 \times 10^9$ cfu/匹と定着しており、皮膚の細菌感染モデルとなりうることも明らかとなった。この細菌感染モデルマウスを用いて抗菌ペプチド軟膏の効果を検討した。CAP18 含有の親水軟膏外用で、cfu は低下した。すなわち、実際の皮膚細菌感染でも抗菌ペプチド含有軟膏は抗菌効果を示すことが明らかとなった。(佐山浩二)。

D 考察

アトピー性皮膚炎では、表皮の分化異常に基づくと考えられる表皮バリア機能の破綻がある。さらに、表皮の分化により、自然免疫、獲得免疫が制御されていると考えられるので、表皮の分化異常はアトピー性皮膚炎の病態の中でも非常に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、従来のアレルギー研究においては表皮の分化と関連つ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、表皮角化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。

ASK1 は表皮角化細胞の分化を制御することはすでに明らかにしているか、カルシウムは角化細胞の分化制御に重要であることが明らかとなっていることから、カルシウムによる ASK1 の活性化機構を検討した。その結果、ASK1 はカルシウムによる早期の p38 の活性化に必須であることが明らかとなった。さらに、カルシウムによる ASK1-p38 の活性化には、CaMKII が必須で

あることを明らかにした。表皮の自然免疫においても、カルヌウム-CaMKII-ASK1-p38の経路が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。一方重層化表皮では細胞外基質への接着により分化が制御されている可能性がある。Polk-HEMA コートしたティンニュを用いた浮遊培養で、角化細胞の分化が誘導できることが明らかとなった。また、PI3 kinase の活性は細胞外基質への接着により制御されており、PI3 kinase の活性が分化を制御している可能性があることが明らかとなった。以上のことから、ASK1に加えて、PI3 kinase も表皮の分化を介して自然免疫を制御している可能性があることが明らかとなった。

低濃度の hBD3 CAP18 の黄色フトウ球菌に対する感受性は菌株により様々であることが示されたことから、黄色フトウ球菌は菌株により宿主への感染能力が異なる可能性が示された。しかし、比較的高濃度 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のペプチドに対してはすべてこの菌株において抗菌力が認められたことから、抗菌ペプチドに対する耐性菌は存在しないことが示された。MSSA に比較して MRSA はこれらの抗菌ペプチドに対して感受性が低い菌が多く認められたことから、MRSA は種々の薬剤に耐性を示すだけでなく、生体に対する抗菌ペプチドに対しても低感受性を示すことで宿主への感染能力が高いことが考えられた。

アトピー性皮膚炎患者の表皮上層では ASK1 の発現が低下していることからアトピー性皮膚炎における分化異常には ASK1 の発現低下が関与している可能性がある。さらに、抗菌ペプチドも表皮上層での発現が低下しており、アトピー性皮膚炎患者の病変部皮膚における易感染性は抗菌ペプチドの減少が原因である可能性がある。ASK1 は抗菌ペプチドの産生を制御することから、ASK1 の発現低下により抗菌ペプチドの産生が低

下し、易感染性を来している可能性が考えられる。そこで本研究では、抗菌ペプチドを皮膚感染モデルマウスに外用することにより、実際の皮膚細菌感染でも抗菌ペプチド軟膏は抗菌効果を示すことを明らかにした。これまでに抗菌ペプチドの黄色フトウ球菌に対する抗菌効果について報告してきたが、今年度の研究では抗菌ペプチド含有軟膏が皮膚細菌感染に対して有効であることが明らかとなった。

E 結論

基底膜より遊離することにより重層化する表皮角化細胞は、基底膜への接着により PI3 kinase を介して分化を制御していると考えられる。従って、ASK1-p38に加えて、PI3 kinase も自然免疫の細胞内制御因子である可能性があることが明らかとなった。

895 の臨床分離株の解析結果から、黄色フトウ球菌の抗菌ペプチドに対する感受性は菌株により様々であるか、MSSA より MRSA の方が低感受性を示す菌が多く認められた。

抗菌ペプチド含有軟膏は皮膚の細菌感染に対して有効であることが明らかとなったことから、抗菌ペプチドの発現が低下しているアトピー性皮膚炎患者に用いて、感染に伴う増悪をコントロールできる可能性がある。

1 健康危険情報
なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Galvan, V Logvinova, A Sperandio S, **Ichjo, H**, Bredesen, D.E Type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)

J Biol Chem., 278, 13325-13332 (2003)

2 Yamagishi S Yamada M, Koshimizu, H, Takai S, Hatanaka, H Takeda, K. **Ichjo, H**

- Shimoke K. and Ikeuchi T Apoptosis-Signal Regulating Kinase-1 Is Involved in Low Potassium- Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun in Cultured Cerebellar Granule Neurons *J Biochem.*, 133 719-724 (2003)
- 3 Machino, T, Hashimoto, S, Maruoka S Gon Y, Hayashi, S Nishitoh H **Ichjo, H** and Horie, T Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide -induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells *Crit Care Med.*, 31, 2776-2781 (2003)
- 4 Huang H, Shj, L., Dilling M B, Easton, J, Harwood, F C, **Ichjo, H.** and Houghton, P J Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/ p21^{Cip1} *Mol Cell*, 11 1491-1501 (2003)
- 5 Matsuzawa, A, Nishitoh, H, Takeda, K. and **Ichjo, H** "MAP Kinases in Redox Signaling" in "Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species Pathways and Chemical Principles" ed by Forman, HJ, Kluwer Academic, 223-236 (2003)
- 6 Takeda, K., Matsuzawa, A, Nishitoh, H and **Ichjo, H.** Roles of MAPKKKASK1 in Stress-Induced Cell Death *Cell Struct Funct*, 28, 23-29 (2003)
- 7 Oberst A Baehrecke E, Mehmet H, **Ichjo, H** and Gupta, S A place to die for apoptosis in cancer and infection Capri 2002 *Cell Death Differ* 10 393-395 (2003)
- 8 Tashiro K Nagao T Kurose, H Ichjo H and Urushidani T Role of Rho in Rabbit Parietal Cell *J Cell Physiol*, 197 409-17 (2003)
- 9 Hashimoto, Y Nukura T Chiba, T Tsukamoto E Kadowaki H, Nishitoh, H, Yamaguchi Y Ishizaka M Yamada M Nawa M Terashita K. Aiso S, **Ichjo, H** and Nishimoto I The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained ASK1/JNK mediated neurotoxic signal via dimerization *J Pharmacol Exp Ther.*, 306 889-902 (2003)
- 10 Yamaguchi S Zhorov, B S, Yoshioka K Nagao T, Ichjo H, and Adachi-Akahane S Key roles of Phe¹¹¹² and Ser¹¹¹⁵ in the pore-forming IIISS-S6 linker of L-type Ca²⁺ channel α_1C subunit (CaV1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca²⁺ channel agonists *Mol Pharmacol* 64 235-248 (2003)
- 11 Maruoka S Hashimoto, S, Gon Y, Nishitoh, H Takeshita, I Asai, Y, Mizumura, K., Shimizu, K., Ichjo, H and Horie, T ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death *Biochem Biophys Res Commun*, 307 870-876 (2003)
- 12 Matuskawa, J, Nakayama, K., Nagao, T Ichjo, H and Urushidani, T Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion *J Biol Chem* 278, 36470-36475 (2003)
- 13 Izumi, Y Kim, S, Yoshiyama, M, Izumiya Y, Yoshida, K., Matsuzawa, A, Koyama, H, Nishizawa Y, Ichjo, H Yoshikawa J and Iwao H Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Injured Artery And Its Critical Role in Neointimal Hyperplasia *Circulation*, 108 2812-2818 (2003)
- 14 Cho, S-G Kim J W Lee YH Hwang, H S, Kim M-S Ryoo, K. Kim M J Noh K.T, Kim E K Cho J-H, Yoon K.W Cho E-G Park, H-S Chi, S W, Lee M-J Kang, S S Ichjo, H, and Choi E-J Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities *J Cell Biol* 163 71-81 (2003)
- 15 Izumiya Y Kim S Izumi Y Yoshida K. Yoshiyama M Matsuzawa A Ichjo H Iwao

- H Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Remodeling *Circulation Res* , 93 874-883 (2003)
- 16 Song S, Kim, S Y, Hong, Y M Jo, D G Lee J Y, Shim S M, Chung, C W, Seo, S.J, Yoo YJ Koh, J Y, Lee, M C, Yates, A.J, Ichijo, H, Jung, Y.K. Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity *Mol Cell*, 12, 553-563 (2003)
- 17 Takamatsu, H, Nagao, T Ichijo, H and Adachi-Akahane S L-type Ca^{2+} channels serve as a sensor of the SR Ca^{2+} for tuning the efficacy of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in rat ventricular myocytes *J Physiol* , 552, 415-424 (2003)
- 18 Yamaguchi, O, Higuchi, Y, Hirota, S, Kashiwase, K., Nakayama, H, Hikoso, S, Takeda, T, Watanabe, T, Asahi, M, Tamike, M, Matsumura, Y, Tsujimoto, I, Hongo, K., Kusakari, Y, Kurihara, S, Nishida, K., Ichijo, H Hori, M and Otsu, K. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15883-15888 (2003)
- 19 Omura, T, Yoshiyama, M Kim, S, Matsumoto, R, Nakamura, Y, Izumi, Y, Ichijo H Sudo, T, Akioka, K, Iwao, H, Takeuchi, K. and Yoshikawa, J Involvement of Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 on Angiotensin II-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 24, 1-6 (2004)
- 20 Takeda, K., Matsuzawa, A, Nishitoh H, Tobiume K., Kishida, S Ninomya-Tsujii, J Matsumoto K., and Ichijo, H Involvement of ASK1 in Ca^{2+} -induced p38 MAP kinase activation *EMBO rep* 5 161-166 (2004)
- 21 Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria R Yamano, M Ohara S Nishikubo, T Fujiwara, T Kawamoto, Y Ueno, H Komatsuzawa, K. Okuda, H Kurihara H Suganaka E Oswald, K. Tanne M Sugai **Journal of Clinical Microbiology** 41:1391-1398, 2003
- 22 *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, β -defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes K. Midonkawa, K. Ouhara, H Komatsuzawa, T Kawai, S Yamada, T Fujiwara, K. Yamazaki, K. Sayama M.A Taubman, H Kurihara, K. Hashimoto, M Sugai **Infection and Immunity** 71: 3730-3739, 2003
- 23 Outer membrane protein 100 (Omp100), a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* R Asakawa, H Komatsuzawa, S Yamada, S Izumi, T Fujiwara, T Kawai, Y Uchida, K. Ouhara, H Shiba, MA Taubman, H Kurihara, M Sugai **Molecular Microbiology**, 50 (4):1125-1139, 2003
- 23 An N-terminal segment of the active component of bacterial genotoxin CDTB directs the CDTB into the nucleus S Nishikubo, M Ohara, M Ikura H Kurihara H Komatsuzawa, E Oswald, M Sugai **Journal of Biological Chemistry**, 278 (50) 50671-50681 , 2003
- 24 Moenomycin-resistance is associated with vancomycin-intermediate susceptibility in *Staphylococcus aureus* H Nishi, H Komatsuzawa, S Yamada, T Fujiwara, M Ohara, K. Ohta M Sugiyama, T Ishikawa, M Sugai **Microbiology and Immunology** 47, 927-935, 2003
- 25 Macrophage inflammatory protein 3 α and α -defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells H Shiba Y Mouri, H Komatsuzawa, K. Ouhara K. Takeda M Sugai, D F Kinane, H Kurihara **Biochemical and Biophysical Research Communications** 306, 867-871, 2003

- 26 Enhancement of alkaline phosphatase synthesis in pulp cells co-cultured with epithelial cells derived from lower rabbit incisors H Shiba Y Mouri H Komatsuzawa N Mizuno W Xu T Noguchi, S Nakamura, M Sugai, Y Kato H Kurihara **Cell Biology International**, **27(10)**, **815-23 2003**
- 27 Syntheses of Prostaglandin E2 and E-cadherin, and Gene Expression of β -defensin-2 by Human Gingival Epithelial Cells in Response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Takuji Noguchi,1 Hideki Shiba,1 Hitoshi Komatsuzawa 2 Noriyoshi Mizuno, Yuushi Uchida, Kazuhisa Ouhara1, Ryuji Asakawa,1 Seiji Kudo,1 Hiroyuki, Kawaguchi,1 Motoyuki Sugai,2 Hidemi Kurihara1 **Inflammation** **27**, **341-349, 2003**
- 28 Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition O Marches T N Ledger M Boury, M Ohara, X Tu F Goffaux, J Mainil, I Rosenshine, M Sugai, J D Rycke, E Oswald **Molecular Microbiology**, **50 (5):1553-1567, 2003**
- 29 Caspase-2 and Caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T-cell lines M Ohara, T Hayashi, Y Kusunoki, M Miyauchi, T Takata and M Sugai **Infection and Immunity in press 2004**
- 30 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* CDT induces cell cycle arrest in primary culture of human gingival fibroblasts M Ohara Y Ueno H Shiba S Nishikubo, M Ikura, H Kurihara H Komatsuzawa, M Sugai **Dentistry in Japan in press 2004**
- 31 Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M Human herpesvirus 6 and drug allergy **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 2003 **3** 255-60
- 32 Nanba D Mammoto A, Hashimoto K, Higashiyama S Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF **J Cell Biol** 2003 **163** 489-502
- 33 Iwamoto R Yamazaki S Asakura M Takashima S, Hasuwa H Miyado K, Adachi S Kitakaze M Hashimoto K, Raab G Nanba D Higashiyama S, Hori M Klagsbrun M Mekada E Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function **Proc Natl Acad Sci USA** 2003 **100** 3221-6
- 34 Yahata Y Shirakata Y Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for VEGF-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation **J Biol Chem** 2003, **278** 40026-31
- 35 Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y Shirakata Y, Nishikawa SI, Hashimoto K, Yoshida N Takenawa T Phospholipase Cdelta(1) is required for skin stem cell lineage commitment **EMBO J** 2003 **22** 2981-2991
- 36 Masaki T, Fukunaga A, Tohyama M, Koda Y, Okuda S Maeda N Kanda F Yasukawa M, Hashimoto K, Horikawa T Ueda M Human herpes virus 6 encephalitis in allopurinol-induced hypersensitivity syndrome **Acta Derm Venereol** 2003 **83** 128-31
- 37 Tsuda T Tohyama M, Yamasaki K, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S Sayama K, Hashimoto K. Lack of evidence for TARC/CCL17 production by normal human keratinocytes in vitro **J Dermatol Sci** 2003 **31** 37-42
- 38 Shibata R, Kai H Seki Y Kato S, Wada Y Hanakawa Y Hashimoto K, Yoshimura A, Imaizumi T Inhibition of STAT3 prevents neointima formation by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of neointimal smooth muscle cells **Hum Gene Ther** 2003 **14** 601-10

- 39 Yamasaki K, Hanakawa Y Tokumaru S, Shirakata Y Sayama K, Hanada T Yoshimura A, Hashimoto K. SOCS1/JAB and SOCS3/CIS3 negatively regulate the STATs signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes **J Invest Dermatol** 2003, 120 571-80
- 40 Yamasaki K, Torii N, Hanakawa Y Shirakata Y Sayama K, Takayanagi A, Ohtsubo M, Gamou S Shimizu N, Fujii M, Miyazono K, Hashimoto K Keratinocyte growth inhibition by high-dose epidermal growth factor is mediated by transforming growth factor β autoinduction A negative feedback mechanism for keratinocyte growth **J Invest Dermatol** 2003, 120 1030-1037
- 41 Hamada K, Kohno S, Iwamoto M, Yokota H, Okada M, Tagawa M Hirose S, Yamasaki K, Shirakata Y, Hashimoto K, Ito M Identification of the Human IAI.3B Promoter Element and Its Use in the Construction of a Replication-selective Adenovirus for Ovarian Cancer Therapy **Cancer Res** 2003, 63 2506-12
- 42 Yanai F, Ishii E, Kojima K, Hasegawa A, Azuma T, Hirose S, Suga N, Mitsudome A, Zaitu M, Ishida Y, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K, Yasukawa M Essential roles of perforin in antigen-specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas-deficient target cells **J Immunol** 2003, 170 2205-13
- 43 Shirakata Y, Tamai K, Nakaoka H, Tokumaru S, Sayama K, Murakami S, Hashimoto K. Severe Palmo-plantar Hyperkeratosis in Koebner Epidermolysis Bullosa Simplex **J Dermatol** 2003, 30 135-40
- 44 Wada T, Shirakata Y, Takahashi H Murakami S, Izuka H, Suzuki H, Hashimoto K. A Japanese Case of Segmental Darier's Disease Caused by Mosaicism for the ATP2A2 Mutation **Br J Dermatol** 2003 149 185-8
- 45 Shirakata Y, Tokumaru S Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K So-called biological dressing effects of cultured epidermal sheets are mediated by the production of EGF family TGF- β and VEGF **J Dermatol Sci** 2003, 32 209-15
- 2 学会発表
- 1 Saegusa K Matsuzawa, A Nishitoh H Kohsuke T and Ichijo H Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate immunity Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4) 2003 1/30 Keystone USA
- 2 Saegusa K Matsuzawa, A, Nishitoh, H, Kohsuke T and Ichijo, H Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate immunity Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4) 2003 1/30, Keystone USA
- 3 Nishitoh, H Kadowaki, H Ichijo H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1 Keystone Syposia "Conformational Diseases of the Secretory Pathway" 2003 3/1-6 Keystone, USA
- 4 Ichijo H Stress Responses mediated by the ASK1-SAPK Signals 2003 Gordon Research Conferences "Molecular Therapeutics of Cancer" 2003 7/16 Gordon UK
- 5 Ichijo H Stress responses by the ASK1-MAP kinase Signals Quebec Satellite Meeting ' Stress Signaling in Cancer" 2003 7/27 Quebec Canada
- 6 Nishitoh H Kadowaki H and Ichijo H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1 Keystone Symposia Apoptosis in Development (J5) 2004 2/3-8 Colorado USA
- 7 Kadowaki H Nishitoh H and Ichijo H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK

- activation and apoptosis through ASK1
Key stone Symposia Apoptosis in Development
(J5) 2004 2/3-8 Colorado USA
- 8 Staphylococcal blistering skin diseases-etiology
and epidemiology -Motoyuki Sugai Gordon
Research Conference Oxford United Kingdom
September 7-12 2003
- 9 Nation-wide molecular epidemiological study
of Staphylococcus aureus causing bullous
impetigo Takayuki Yamaguchi Yasuyuki
Fudaba Junko Sawada Motoyuki Sugai
Gordon Research Conference Oxford United
Kingdom September 7-12 2003
- 10 Crystal structural analysis of cell wall
targeting domain of ALE-1, which specifically
targets *S. aureus* peptidoglycan Zhiqiang Jeff
Lu Tamaki Fujiwara Hitoshi Komatsuzawa,
Joshua Sakon Motoyuki Sugai Gordon
Research Conference Oxford, United Kingdom
September 7-12 2003
- 11 Influence of Factors Associated with Cell Wall
Synthesis on the Methicillin and Vancomycin
Resistances in Staphylococcus aureus Hitoshi
Komatsuzawa, Hiromi Nishi Tamaki Fujiwara
and Motoyuki Sugai Gordon Research
Conference Oxford United Kingdom
September 7-12 2003
- 12 Lipid modification and subsequent processing
of CDTA are important for production of
Actinobacillus actinomycetemcomitans CDT
holotoxin into culture supernatant Masaru Ohara,
Yoko Ueno Toru Kawamoto Tamaki Fujiwara
Hitoshi Komatsuzawa, Eric Oswald Motoyuki
Sugai 11th European Conference on Bacterial
Protein Toxins, June 28-July 2 2003
- 13 Nuclear transport of bacterial toxin CDTB
subunit which arrests target cell cycle at G2/M
phase Shuichi Nishikubo Masaru Ohara Masae
Ikura Eric Oswald Hidemi Kurihara Motoyuki
Sugai 11th European Conference on Bacterial
Protein Toxins June 28-July 2 2003
- 14 Yamasaki K Dai X, Nanba D Shiraishi K
Yahata Y Tokumaru S Tohyama M Shirakata Y
Savama K Higashiyama S Hashimoto K PLZF
regulates and suppresses melanoma proliferation
and tumor growth International Investigative
Dermatology 2003 Miami Beach May 2003
USA
- 15 Ishii K Harada R, Matsuo I Shirakata Y
Hashimoto K Amagai M In vitro keratinocyte
dissociation assay to evaluate blister-inducing
activity of pemphigus IgG autoantibodies
International Investigative Dermatology 2003
Miami Beach May 2003 USA
- 16 Yahata Y Shirakata Y Tokumaru S, Yamasaki
K Hashimoto K Novel role of angiotensin II in
fibroblasts induction of fibroblast migration by
angiotensin II via HB-EGF-mediated EGF
receptor transactivation International
Investigative Dermatology 2003 Miami Beach
May 2003 USA
- 17 Shirakata Y Tokumaru S Yamasaki K Yahata
Y Tohyama M Savama K Higashiyama S
Hashimoto K Keratinocyte-specific HB-EGF-
deficient mice show marked retardation of skin
wound healing International Investigative
Dermatology 2003 Miami Beach May 2003
USA
- 18 Nanba D Shirakata Y Nakanishi Y Hieda Y
Ishiguro H Higashiyama S Hashimoto K
Epidermal hyperplasia and impaired
morphogenesis of hair follicles in mice
overexpressing a soluble form of heparin-binding
EGF-like growth factor International
Investigative Dermatology 2003 Miami Beach
May 2003 USA
- 19 Dai X, Yamasaki K Yahata Y Tokumaru S
Tohyama M Shirakata Y Savama K Hashimoto
K All trans-retinoic acid induces production of
IL-8 in human keratinocytes via increased

phosphorylation of I κ B α in the NF κ B pathway
International Investigative Dermatology 2003
Miami Beach May 2003 USA

20 Tohyama M Shirakata Y Yamasaki K
Savama K Tsuda T Tan E Hashimoto K
production of MIP-1 α /CCL3 is mediated via toll-
like receptor 3 in human keratinocytes
International Investigative Dermatology 2003
Miami Beach May 2003 USA

21 Savama K Komatsuzawa H Yamasaki K
Shirakata Y Dai X Sugai M Ichijo H
Hashimoto K Epidermal differentiation regulates
the production of innate antimicrobial peptides in
the skin International Investigative Dermatology
2003 Miami Beach May 2003 USA

22 Tokumaru S Shirakata Y, Yamasaki K, Yahata
Y Tohyama M Sayama K Hashimoto K EGF
receptor transactivation by UV-irradiation is
mediated via HB-EGF shedding in human
keratinocytes International Investigative
Dermatology 2003 Miami Beach May 2003
USA

23 Hashimoto K Drug induced hypersensitivity
syndrome (DIHS) 13th Korea-Japan Joint
Meeting of Dermatology Daejeon Oct 2003
Korea

H 知的財産権の出願 登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防 治療研究事業）
分担研究報告書

カルシウムによる ASK1-p38 経路の活性化機構

分担研究者 一條秀吉 東京大学大学院薬学系研究科・教授

研究要旨

カルシウムは角化細胞の分化に必須であるか、カルシウムによる ASK1 の活性化機構は明らかでない。そこで、Calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMKII) に着目して、カルシウムによる ASK1 活性化機構を明らかにした。その結果 ASK1 はカルシウムによる早期の p38 の活性化に必須であり、またカルシウムによる ASK1-p38 の活性化には、CaMKII が必須であることが明らかとなった。

A 研究目的

ASK1 の活性化には、Thr845 のリン酸化が重要な役割を果たしていることをすでに我々は明らかにしてきた。表皮の自然免疫においては表皮角化細胞からの抗菌ペプチド、ケモカイン産生が重要な役割を果たしている。角化細胞からのケモカイン、抗菌ペプチドの産生は ASK1 による分化機構が制御していることを愛媛大学、佐山かすてに明らかにしている。一方、カルシウムは表皮角化細胞の分化制御に重要であると考えられているか、カルシウムによる ASK1 の制御機構は明らかではなく、この点を明らかにすれば、表皮自然免疫機構の解明につながる。そこで、Calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMKII) に着目して、カルシウムによる ASK1 活性化機構を明らかにすることを目的とした。

B 研究方法

1) MEF の培養

ASK1 遺伝子の 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 ASK1 ノックアウトマウスおよび wild type マウスを用いた。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 CO₂ 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。

2) ASK1, JNK, p38 MAPK のリン酸化

細胞を刺激後、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 ASK1, JNK, p38 MAPK 抗体および抗リン酸化 ASK1 JNK, 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。

3) siRNA の作成

ヒト CaMKIIβ に対する二重鎖 siRNA を作成し、Oligofectamin (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクトした。

4) アデノウイルスヘクターの作製

COS-TPC 法を用いてアデノウイルスヘクターを作製した。Wild type ASK1 を組み込んだアデノウイルスヘクター (Ad-ASK1-HA) を 293 細胞へ感染させ、大量に増殖させた後、超音波処理、塩化セシウム希度勾配法にて精製・濃縮し PBS に対して透析したものを使用した。

C 結果

Maitotoxin (MTX)を用いて MEF にカルシウム influx を誘導したところ、p38 は活性化された。しかし、ASK1^{-/-}の細胞では、p38 の早期の活性化は低下していた。この結果を確認するために、ASK1^{-/-}の細胞にアテノウイルスベクターを用いて、ASK1 を発現させたところ、低下していた p38 の早期の活性化は回復した。さらに、CaMKII をトランスフェクトしたところ、p38 は活性化された。しかし、ASK1^{-/-}の細胞では、p38 の活性化は起こらなかった。次いで、カルシウムによる ASK1, p38 の活性化における CaMKII の必要性を CaMKII に対する siRNA を用いて検討した。その結果、CaMKII の発現が低下するとカルシウムによる ASK1, p38 の活性化が低下することが明らかとなった。

D 考察

ASK1 はカルシウムによる早期の p38 の活性化に必須であり、またカルシウムによる ASK1-p38 の活性化には、CaMKII が必須であることを明らかにした。カルシウムは角化細胞の分化制御に重要であることが明らかとなっており、表皮の自然免疫におけるケモカイン、抗菌ペプチドの産生においても、カルシウム-CaMKII-ASK1-p38 の経路が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

E 結論

カルシウムによる ASK1-p38 活性化機構が明らかになった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Galvan, V Logvinova, A, Sperandio, S, **Ichjo, H**, Bredesen DE Type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)

J Biol Chem, 278, 13325-13332 (2003)

2 Yamagishi S, Yamada M, Koshimizu H Takai S Hatanaka, H, Takeda, K, **Ichjo, H** Shimoke K. and Ikeuchi T Apoptosis-Signal Regulating Kinase-1 Is Involved in Low Potassium- Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun in Cultured Cerebellar Granule Neurons

J Biochem, 133 719-724 (2003)

3 Machino, T, Hashimoto, S, Maruoka, S Gon, Y, Hayashi, S, Nishitoh, H, **Ichjo, H** and Horie, T Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated signaling pathway regulates hydrogen peroxide -induced apoptosis in human pulmonary vascular endothelial cells

Cn Care Med, 31 2776-2781 (2003)

4 Huang, H, Shj, L, Dilling, MB, Easton, J, Harwood FC **Ichjo, H** and Houghton, PJ Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21^{Cip1}

Mol Cell, 11, 1491-1501 (2003)

5 Matsuzawa, A, Nishitoh, H, Takeda, K. and **Ichjo, H** "MAP Kinases in Redox Signaling" in "*Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species Pathways and Chemical Principles*" ed by Forman, HJ Kluwer Academic, 223-236 (2003)

6 Takeda, K Matsuzawa A Nishitoh, H and **Ichjo, H** Roles of MAPKKK ASK1 in Stress-Induced Cell Death

Cell Struct Funct 28, 23-29 (2003)

7 Oberst A Baehrecke E, Mehmet, H **Ichjo, H** and Gupta S A place to die for apoptosis in

cancer and infection Capri 2002

Cell Death Differ 10 393-395 (2003)

8 Tashiro K, Nagao, T, Kurose H, Ichijo H and Urushidani, T Role of Rho in Rabbit Parietal Cell

J Cell Physiol 197 409-17 (2003)

9 Hashimoto, Y, Niikura T, Chiba, T, Tsukamoto, E, Kadowaki, H, Nishitoh H, Yamaguchi, Y, Ishizaka, M, Yamada, M, Nawa, M, Terashita, K., Aiso, S, **Ichijo, H** and Nishimoto I The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained ASK1/JNK mediated neurotoxic signal via dimerization

J Pharmacol Exp Ther, 306, 889-902 (2003)

10 Yamaguchi, S, Zhorov, BS, Yoshioka, K, Nagao T, Ichijo, H, and Adachi-Akahane, S Key roles of Phe¹¹¹² and Ser¹¹¹⁵ in the pore-forming IIS5-S6 linker of L-type Ca²⁺ channel $\alpha 1C$ subunit (CaV1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca²⁺ channel agonists

Mol Pharmacol, 64, 235-248 (2003)

11 Maruoka, S, Hashimoto, S, Gon Y, Nishitoh, H, Takeshita, I, Asai, Y, Mizumura, K., Shimizu, K, Ichijo, H and Horie T ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death **Biochem Biophys Res Commun**, 307 870-876 (2003)

12 Matuskawa J, Nakayama, K., Nagao T, Ichijo, H and Urushidani T Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion

J Biol Chem 278 36470-36475 (2003)

13 Izumi Y, Kim S, Yoshiyama M, Izumiya Y, Yoshida K, Matsuzawa, A, Koyama H, Nishizawa Y, Ichijo, H, Yoshikawa J and Iwao H Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Injured Artery And Its Critical Role in Neointimal Hyperplasia

Circulation, 108, 2812-2818 (2003)

14 Cho, S-G, Kim, JW, Lee YH, Hwang HS, Kim M-S, Ryoo, K., Kim MJ, Noh K.T, Kim, E.K, Cho, J-H, Yoon, K.W, Cho, E-G, Park, H-S, Chi, S.W, Lee, M-J, Kang, S.S, Ichijo, H, and Choi, E-J Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities

J Cell Biol, 163, 71-81 (2003)

15 Izumiya, Y, Kim, S, Izumi, Y, Yoshida, K., Yoshiyama, M, Matsuzawa, A, Ichijo H, Iwao, H Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Remodeling

Circulation Res, 93, 874-883 (2003)

16 Song S, Kim, S Y, Hong, Y.M, Jo, D.G, Lee, J Y, Shim, S.M, Chung, C.W, Seo, S.J, Yoo, Y.J, Koh, J Y, Lee, M.C, Yates, A.J, Ichijo, H, Jung, Y.K. Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity

Mol Cell 12, 553-563 (2003)

17 Takamatsu H, Nagao T, Ichijo, H and Adachi-Akahane, S L-type Ca²⁺ channels serve as a sensor of the SR Ca²⁺ for tuning the efficacy of Ca²⁺ -induced Ca²⁺ release in rat ventricular myocytes

J Physiol 552 415-424 (2003)

18 Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirota S

Kashiwase K., Nakayama, H Hikoso, S Takeda, T, Watanabe, T, Asahi M, Tanike, M Matsumura, Y Tsujimoto, I, Hongo K., Kusakari, Y, Kunihara, S, Nishida, K., Ichijo, H, Hon, M and Otsu, K. Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling

Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 15883-15888 (2003)

19 Omura, T, Yoshiyama, M, Kim, S, Matsumoto, R, Nakamura, Y, Izumi, Y, Ichijo, H, Sudo, T, Akioka, K., Iwao, H, Takeuchi, K. and Yoshikawa, J Involvement of Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 on Angiotensin II-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24, 1-6 (2004)

20 Takeda, K., Matsuzawa, A, Nishitoh, H, Tobiume, K, Kishida, S, Ninomiya-Tsuji, J, Matsumoto, K., and Ichijo, H Involvement of ASK1 in Ca²⁺-induced p38 MAP kinase activation

EMBO rep, 5, 161-166 (2004)

2 学会発表

1 Saegusa, K., Matsuzawa, A, Nishitoh, H, Kohsuke, T and Ichijo, H (Oral) Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate immunity, Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4), 2003 1/30, Keystone, USA

2 Saegusa, K., Matsuzawa A, Nishitoh, H, Kohsuke T and Ichijo, H (Poster) Roles of ASK1-p38 MAPK cascade in mammalian innate

immunity Keystone Symposia "Linking Innate with Adaptive Immune Responses (J4), 2003 1/30, Keystone USA

3 Nishitoh, H, Kadowaki, H, Ichijo, H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1, Keystone Symposia "Conformational Diseases of the Secretory Pathway", 2003.3/1-6, Keystone, USA

4 Ichijo, H Stress Responses mediated by the ASK1-SAPK Signals., 2003 Gordon Research Conferences "Molecular Therapeutics of Cancer", 2003 7/16, Gordon, UK.

5 Ichijo, H Stress responses by the ASK1-MAP kinase Signals Quebec Satellite Meeting "Stress Signaling in Cancer", 2003 7/27 Quebec, Canada

6 Nishitoh, H, Kadowaki, H and Ichijo, H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1, Keystone Symposia, Apoptosis in Development (J5), 2004 2/3-8, Colorado USA

7 Kadowaki H, Nishitoh H and Ichijo H Molecular mechanism of ER stress-induced JNK activation and apoptosis through ASK1, Keystone Symposia, Apoptosis in Development (J5), 2004.2/3-8, Colorado, USA

II 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防 治療研究事業）
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フトウ球菌に対する
効果についての検討

分担研究者 菅井基行 広島大学大学院医歯薬総合研究科・教授

研究要旨

臨床分離株 895 株に対する抗菌ペプチドに対する感受性についての検討を行った。MSSA に比較して MRSA は抗菌ペプチドに対して感受性が低い菌が多く認められたことから、MRSA は種々の薬剤に耐性を示すだけでなく、生体に対する抗菌ペプチドに対しても低感受性を示すことで宿主への感染能力が高いことが考えられた。

A 研究目的

これまでの研究により、ヒト角化細胞は抗菌ペプチド hBD1, hBD2, hBD3 と CAP18 を産生しており、黄色フトウ球菌の接触により hBD1 以外の抗菌ペプチドは誘導的に産生することを明らかにした。また、これらの抗菌ペプチドは抗菌力を認め、その中でも hBD3 CAP18 は高い抗菌力を発揮した。しかし、これらの抗菌ペプチドが種々の黄色フトウ球菌臨床分離株に対して効果があるかについての研究はない。また、菌株により抗菌ペプチドに対する感受性が異なることが予想される。そこで本研究では、様々な部位から分離した臨床分離株 895 株に対する抗菌ペプチドに対する感受性についての検討を行い、メチンリン耐性度、分離部位、コアクラーセ型、種々の抗菌剤の感受性等との関連性について検討した。

B 方法

- 1 菌株 県立広島病院において分離された黄色フトウ球菌 895 株（メチンリン耐性菌 623 株）を用いた
- 2 薬剤感受性試験 微量液体希釈法による最小発育阻濃度（MIC）を測定した。薬剤は methicillin polymyxin bacitracin,

vancomycin, ofloxacin, gentamicin tetracycline, erythromycin を用いた。

3 コアクラーセ型別試験 型別判定用キット（テンカ生研）を用いて判定した。

4 抗菌活性の検討 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フトウ球菌を 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。

C 結果

1 合成ペプチド hBD-3 (2 μ g/ml) CAP18 (1 μ g/ml) を用いて 895 株の臨床分離株に対する抗菌力を検討した結果、これらの抗菌ペプチドに対して感受性の高い菌、低い菌等その感受性は多様であった。しかし、高濃度 (10 μ g/ml) においてはいずれの菌株に対しても抗菌力は認められた。

2 メチンリン感受性菌 (MSSA) と耐性菌 (MRSA) について抗菌ペプチドの感受性を検討したところ、MRSA のほうが 2 つのペプチドに対し低感受性を示す菌株の割合が高い傾向を示した。また、MRSA の中でもメチンリン高耐性株においてその傾向は著明に認められた。

3 分離した部位と抗菌ペプチドの感受性と

に関連性は認められなかった。

4 コアクラーゼ型別と抗菌ペプチドの感受性に関連性は認められなかった

5 895株の中から54株ランダムに抽出した株の種々の抗菌剤について抗菌力を測定したところ、その感受性は菌株により様々であったか、抗菌ペプチドとの感受性との関連性は認められなかった。

D 考察

低濃度の hBD3, CAP18 の黄色フトウ球菌に対する感受性は菌株により様々であることか示されたことから、黄色フトウ球菌は菌株により宿主への感染能力が異なる可能性が示された。しかし、比較的高濃度 (10 μ g/ml) のペプチドに対してはすべての菌株において抗菌力が認められたことから、抗菌ペプチドに対する耐性菌は存在しないことか示された。MSSA に比較して MRSA はこれらの抗菌ペプチドに対して感受性が低い菌が多く認められたことから、MRSA は種々の薬剤に耐性を示すだけでなく、生体に対する抗菌ペプチドに対しても低感受性を示すことで宿主への感染能力が高いことか考えられた。

E 結論

黄色フトウ球菌のヒト上皮細胞の産生する抗菌ペプチドに対する感受性は菌株により様々であることか示された。また、抗菌ペプチドの感受性は MSSA より MRSA の方が低感受性を示す菌が多く認められた。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

Prevalence of cytolethal distending toxin production in periodontopathogenic bacteria

R Yamano, M Ohara, S Nishikubo, T Fujiwara, T Kawamoto, Y Ueno, H Komatsuzawa, K.

Okuda, H, Kurihara, H, Suganaka, E, Oswald, K, Tanne, M, Sugai

Journal of Clinical Microbiology 41:1391-1398, 2003

Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, β -defensins and CAP18 expressed by human keratinocytes

K. Midonkawa, K. Ouhara, H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, T. Fujiwara, K. Yamazaki, K. Sayama, M.A. Taubman, H. Kurihara, K. Hashimoto, M. Sugai

Infection and Immunity 71: 3730-3739, 2003

Outer membrane protein 100 (Omp100), a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

R. Asakawa, H. Komatsuzawa, S. Yamada, S. Izumi, T. Fujiwara, T. Kawai, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M.A. Taubman, H. Kurihara, M. Sugai

Molecular Microbiology, 50 (4):1125-1139, 2003

An N-terminal segment of the active component of bacterial genotoxin CDTB directs the CDTB into the nucleus

S. Nishikubo, M. Ohara, M. Ikura, H. Kurihara, H. Komatsuzawa, E. Oswald, M. Sugai

Journal of Biological Chemistry, 278 (50):50671-50681, 2003

Moenomycin-resistance is associated with vancomycin-intermediate susceptibility in *Staphylococcus aureus*

H. Nishi, H. Komatsuzawa, S. Yamada, T. Fujiwara, M. Ohara, K. Ohta, M. Sugiyama, T. Ishikawa, M. Sugai

Microbiology and Immunology 47, 927-935, 2003

Macrophage inflammatory protein 3 α and γ -defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells

H Shiba, Y Mouri, H Komatsuzawa, K. Ouhara, K. Takeda, M Sugai, D F Kinane, H Kurihara

Biochemical and Biophysical Research Communications 306, 867-871, 2003

Enhancement of alkaline phosphatase synthesis in pulp cells co-cultured with epithelial cells derived from lower rabbit incisors

H Shiba, Y Mouri, H Komatsuzawa, N Mizuno, W Xu, T Noguchi, S Nakamura, M Sugai, Y Kato, H Kurihara

Cell Biology International, 27(10), 815-23.2003

Syntheses of Prostaglandin E2 and E-cadherin, and Gene Expression of

γ -defensin-2 by Human Gingival Epithelial

Cells in Response to

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Takuji Noguchi,¹ Hideki Shiba,¹ Hitoshi Komatsuzawa,² Noriyoshi Mizuno,¹

Yuushi Uchida,¹ Kazuhisa Ouhara,¹ Ryuji Asakawa,¹ Seiji Kudo,¹ Hiroyuki

Kawaguchi,¹ Motoyuki Sugai,² Hidemi Kurihara¹

Inflammation 27, 341-349, 2003

Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition

O Marches, T N Ledger, M Boury, M Ohara, X Tu, F Goffaux, J Mainil, I Rosenshine, M Sugai, J D Rycke, E Oswald

Molecular Microbiology, 50 (5)·1553-1567,

2003

Caspase-2 and Caspase-7 are involved in cytolethal distending toxin-induced apoptosis in Jurkat and MOLT-4 T-cell lines

M Ohara, T Hayashi, Y Kusunoki, M Miyauchi, T Takata and M Sugai

Infection and Immunity in press 2004

Actinobacillus actinomycetemcomitans CDT induces cell cycle arrest in primary culture of human gingival fibroblasts

M Ohara, Y Ueno, H Shiba, S Nishikubo, M Ikura, H Kurihara, H Komatsuzawa, M Sugai

Dentistry in Japan in press 2004

2 学会発表

Staphylococcal blistering skin diseases-etiology and epidemiology-

Motoyuki Sugai

Gordon Research Conference Oxford United Kingdom September 7-12 2003

Nation-wide molecular epidemiological study of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo

Takayuki Yamaguchi, Yasuyuki Fudaba, Junko Sawada, Motoyuki Sugai

Gordon Research Conference, Oxford, United Kingdom September 7-12, 2003

Crystal structural analysis of cell wall targeting domain of ALE-1, which

specifically targets *S. aureus* peptidoglycan

Zhiqiang Jeff Lu, Tamaki Fujiwara, Hitoshi Komatsuzawa, Joshua Sakon, Motoyuki Sugai

Gordon Research Conference Oxford, United Kingdom September 7-12, 2003

Influence of Factors Associated with Cell Wall Synthesis on the Methicillin

and Vancomycin Resistances in Staphylococcus aureus (poster)

Hitoshi Komatsuzawa Hiromi Nishi Tamaki Fujiwara and Motoyuki Sugai

Gordon Research Conference Oxford, United Kingdom, September 7-12, 2003

Production of innate antimicrobial peptides in the skin is regulated by epidermal differentiation

Sayama, K Komatsuzawa, H Yamasaki K Shirakata, Y Dai X Sugai M Ichijo H Hashimoto K

International Investigative Dermatology Miami USA May 2003

Lipid modification and subsequent processing of CDTA are important for production of Actinobacillus actinomycetemcomitans CDT holotoxin into culture supernatant

Masaru Ohara, Yoko Ueno Toru Kawamoto, Tamaki Fujiwara, Hitoshi Komatsuzawa, Eric Oswald Motoyuki Sugai

11th European Conference on Bacterial Protein Toxins (poster) June 28-July 2 2003

Nuclear transport of bacterial toxin CDTB subunit which arrests target cell cycle at G2/M phase

Shuichi Nishikubo Masaru Ohara, Masae Ikura, Eric Oswald Hidemi Kurihara, Motoyuki Sugai

11th European Conference on Bacterial Protein Toxins (poster) June 28-July 2 2003

H 知的財産権の出願 登録状況
なし