

## 2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	<b>創傷治癒の細胞間クロストークにおける抗菌ペプチドの役割</b>
キーワード	①抗菌ペプチド、②創傷治癒、③線維芽細胞

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ウメハラ ヨシエ 梅原 芳恵
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター・助教
現在の所属先・職位等	同上
プロフィール	北里大学理学部生物科学科、北里大学大学院理学研究科生物科学専攻で分子発生学を学び、博士（理学）の学位を取得。 2013年4月より順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所の博士研究員として、皮膚科学、難治性かゆみの研究に従事。2018年より現職。特にアトピー性皮膚炎や創傷治癒に着目し、皮膚における抗菌ペプチドの機能解析を行っている。

### 1. 研究の概要

皮膚の創傷治癒は誰もが体験することであるが、基礎疾患などの要因により正常な創傷治癒が起こらない場合、創傷は慢性化し、生活の質を著しく低下させるため、慢性皮膚創傷の新規治療戦略の開発は喫緊の課題である。最近、我々は皮膚に存在する抗菌ペプチドであるヒトβ-ディフェンシン (hBD)-3 が線維芽細胞を活性化し、創傷治癒を促進する可能性を報告した。創傷治癒を速やかに完結させるためには線維芽細胞の活性化に続き、表皮角化細胞の遊走と増殖による上皮化が必要であるが、その過程における hBD-3 の役割は解明されていない。そのため本研究では、hBD-3 により線維芽細胞から産生される上皮細胞成長因子の産生量が変化するか、およびそのメカニズムについて解析を行った。その結果、hBD-3 は線維芽細胞からの AREG および HB-EGF の産生を誘導し、表皮角化細胞の増殖を促進することが示唆された。

### 2. 研究の動機、目的

創傷治癒は免疫細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、表皮角化細胞など多くの細胞が複雑に関与する過程である。健常者における皮膚の創傷は自然に治癒するが、基礎疾患などの要因により正常な創傷治癒が起こらない場合、創傷は慢性化し、化膿して生活の質を著しく低下させる。特に糖尿病患者においては神経障害、末梢血管障害、局所の高血糖状態、患者の活動性低下等により創傷治癒が阻害され、糖尿病性潰瘍を生じる。厚生労働省の調査によれば、日本の糖尿病患者は 2016 年時点で推計 1000 万人を突破したと報告されている。また、高齢社会に伴い寝たきりの患者が増加し、褥瘡（床擦れ）等の慢性創傷を有する患者も急増している。糖尿病患者の増加および高齢化率の上昇は世界規模でも起きており、慢性皮膚創傷の治癒を促進する治療法の開発は喫緊の課題となっている。

皮膚には種々の抗菌ペプチドが存在し、病原体の排除機構として重要な働きをしている。ヒトの皮膚で発現する抗菌ペプチドとして、ヒトβ-ディフェンシン (hBD-1、hBD-2、hBD-3、hBD-

4) と LL-37 が最もよく知られている。表皮角化細胞において hBD-1 は恒常的に発現しているが、hBD-2、hBD-3、hBD-4 および LL-37 は感染や炎症により発現が誘導される。近年、我々を含めた多くの研究者により抗菌ペプチドの抗菌活性以外の生理作用が見出されており、抗菌ペプチドは炎症反応の調節、細胞増殖、皮膚バリア機能の調節に関与することが示唆されている。我々は最近、hBD の中でも hBD-3 がマウス創傷モデルにおいて創傷治癒を促進することを報告した (*Front Immunol* 2021, 12: 712781)。これまで hBD-3 はオートクライン作用が注目され、表皮角化細胞に関する研究が主体であった。しかし、創傷治癒過程や他の皮膚疾患においては皮膚構造の恒常性が失われており、その正常化には細胞間のクロストークが重要である。そのため、我々は hBD-3 のパラクライン作用として線維芽細胞に対する作用を解析し、hBD-3 が線維芽細胞の増殖および遊走を誘導することを報告した (*Front Immunol* 2021)。また、hBD-3 は線維芽細胞からの血管新生因子 Angiogenin、血管内皮増殖因子 VEGF、血小板由来増殖因子 PDGF などの分泌を促進し、血管新生に関与することを明らかにした (*Int J Mol Sci* 2022, 23: 8800; *Front Immunol* 2021)。

創傷治癒を速やかに完結させるためには線維芽細胞の活性化に続いて、表皮角化細胞の遊走と増殖による上皮化が必要である。しかし、それらの過程における hBD-3 の役割は未だ解明されていない。本研究では、創傷治癒に重要な線維芽細胞と表皮角化細胞の相互作用における hBD-3 の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の結果

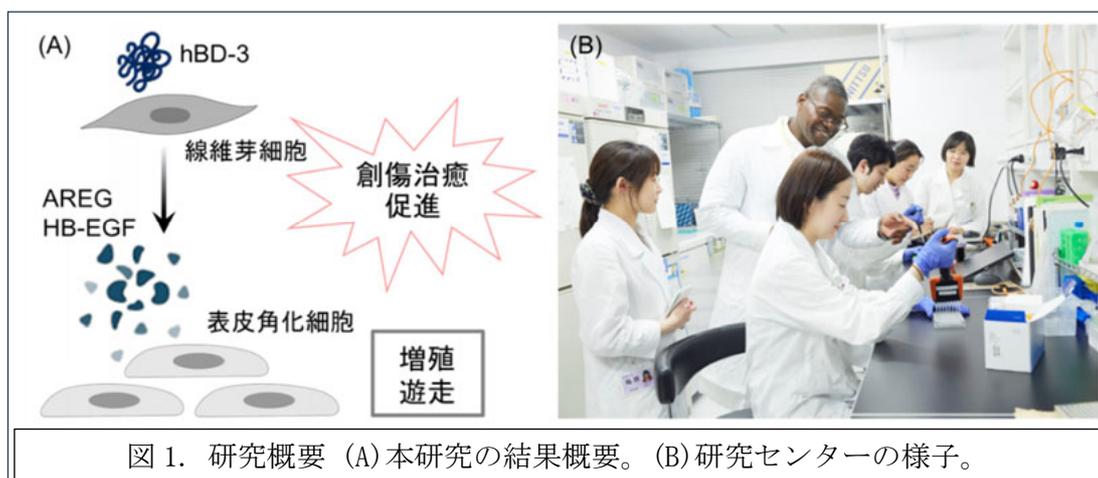
- (1) 表皮角化細胞は様々な上皮細胞成長因子 (EGF) ファミリーリガンドにより活性化されることが知られている。はじめに、hBD-3 刺激により線維芽細胞から産生される EGF リガンドの同定を行った。

培養ヒト真皮線維芽細胞を hBD-3 で刺激し、細胞内の mRNA 量をリアルタイム PCR で、細胞上清中のタンパク量を ELISA により測定した。EGF、ベータセルリン、アンフィレグリン (AREG)、エプレグリン、TGF- $\alpha$ 、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) について解析した結果、hBD-3 は AREG および HB-EGF の産生を誘導した。

- (2) hBD-3 が AREG および HB-EGF の産生を誘導するシグナル伝達経路を明らかにするため、各種シグナル伝達阻害剤を用いた解析を行った。まず、G タンパク質共役受容体の阻害剤で前処理し、AREG および HB-EGF の産生を ELISA により測定した結果、hBD-3 による産生誘導は抑制されなかった。

さらに先行研究を参考に、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、Jun-N-terminal kinase、p38 mitogen-activated protein kinase、NF-kappaB 経路のシグナル伝達阻害剤を用いて解析を行った。その結果、ERK 経路、p38 経路を阻害した場合に AREG の産生量が低下した。一方、HB-EGF の産生はこれらの経路の阻害剤には影響を受けなかった。

本研究により、hBD-3 が線維芽細胞からの AREG 産生および HB-EGF 産生を誘導することが明らかになった。また、hBD-3 による AREG の産生には ERK 経路、p38 経路の活性化が関与することが示唆された。現在、他の受容体やシグナル伝達経路について解析を行っている。



#### **4. 研究者としてのこれからの展望**

今回の研究では、抗菌ペプチドである hBD-3 の新たな機能として、線維芽細胞からの上皮細胞成長因子産生誘導を見出しました。今後の研究を通じて、創傷治癒における hBD-3 の生理学的役割とその作用機序が解明されるとともに、他の皮膚疾患の病態理解にも貢献できると考えております。最終的には難治性創傷の治療薬開発に貢献することを目指します。これからも目の前に現れる課題と真摯に向き合い、基礎医学の研究を続けてゆきたいと思っております。

#### **5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ**

この度は女性研究者奨励金の御支援を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。本奨励金をいただき、新たな試薬の購入や学会参加が可能となり研究を進めることができました。多くの皮膚疾患はすぐに生命を脅かすものではありませんが、慢性化や重症化により患者さんやご家族の quality of life (QOL) を著しく障害することが少なくありません。今回の経験を励みに、皮膚科学研究の発展に貢献できるよう、より一層研究に邁進して参ります。