

石川 博士 論文内容の要旨

主 論 文

Human β -Defensin-2 Expression by Keratinocytes is Induced by Co-Culture
with *Trichophyton rubrum* Through Toll-Like Receptors 2 and 4

(Toll 様受容体を介した、白癬菌によるヒトディフェンシン 2
の角化細胞における発現)

石川博士, SangJae Bae, 片山一郎

(The Open Dermatology Journal, 2009, 3, 81-85)

長崎大学大学院医学研究科皮膚専攻
(指導教授：宇谷厚志教授)

緒 言

皮膚糸状菌は皮膚、髪、爪など角化性組織に慢性感染を引き起こす。皮膚糸状菌は角層より深部の皮膚組織には侵入できないため、皮膚糸状菌症は一般に角層に局限して生じる。皮膚糸状菌症の約 90%は *Trichophyton mentagrophytes* と *T. rubrum* によって引き起こされる。真菌感染症に対して表皮細胞は生体防衛で重要な役割を果たす。微生物により刺激された表皮細胞は、様々なサイトカインとケモカインのみでなく、自然免疫に重要な物質である抗菌ペプチドを分泌する。皮膚糸状菌が角層より深部の組織に侵入できない理由の一つとして、表皮細胞から産生されるリゾチームや defensin などの抗菌ペプチドの存在が考えられている。Defensin は細菌や真菌両方に幅広い抗菌作用を有するペプチドである。Human β -defensin (HBD)は約 35 のアミノ酸残基からなり、HBD-1 から HBD-4 までが同定されている。HBD-2 は乾癬患者の皮膚より同定されたものであり、細菌のみならず *Candida albicans* や *Malassezia furfur* といった真菌によっても、その発現が誘導される。しかしながら、皮膚糸状菌が表皮細胞に HBD-2 の発現を誘導しうるかどうかは不明である。また、細菌感染は、微生物を幅広く認識する自然免疫を司る受容体である toll-like receptor (TLR)-2 を介して HBD-3 発現を誘導することが示されている。さらに、*M. furfur* による HBD-2 発現の誘導に TLR2 が関与するという報告もなされている。そこで、今回我々は、主要な皮膚糸状菌である *T. rubrum* によって表皮細胞が HBD-2 を発現するかどうか、そして HBD-2 発現に対する TLR の関与について検討した。

対象と方法

Sabouraud's dextrose agar で培養した *T. rubrum* および *C. albicans* のコロニーから小分生子を回収した。この小分生子 (2×10^5 細胞) によって、非発癌性の表皮細胞由来細胞株である HaCaT 細胞 (1×10^5 細胞) を 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 24 時間刺激した。HaCaT 細胞より RNA を抽出し、HBD-1、HBD-2、 β -actin のプライマーを用いてそれぞれの mRNA の発現について reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて解析した。

真菌による HaCaT 細胞の HBD-2 発現に対する TLR の関与を調べるため、抗 TLR2 抗体あるいは抗 TLR4 抗体を HaCaT 細胞と小分生子との共培養を開始した時点で投与し、48 時間後に HBD-2 mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。

真菌細胞壁のどの成分が HBD-2 発現に関与しているかを検討するため、小分生子を 100°C (タンパク質を変性)、 70% エタノール (脂質を除去)、Concanavalin A (Con A; mannosyl 残基や glucosyl 残基をブロック) で各 10 分間処理を行い、HaCaT 細胞と共培養した。48 時間後に HBD-2 mRNA 発現を RT-PCR にて解析した。

結 果

T. rubrum は、共培養開始 18 時間後までに HaCaT 細胞における HBD-2 mRNA の有意に発現を増加させた。対照的に、HBD-1 発現誘導は認められなかった。同様に、*C. albicans* 刺激によっても HaCaT 細胞の HBD-2 mRNA 発現は有意に増加したが、それは共培養の 12 時間以内であった。このように、HBD-2 mRNA 発現誘導の時期は異なっていたものの、*T. rubrum* と *C. albicans* によって、HaCaT 細胞における HBD-2 mRNA 発現増加が誘導された。

抗 TLR2 抗体や抗 TLR4 抗体によって、*T. rubrum* による HBD-2 mRNA 発現増加は有意に抑制された。これとは対照的に、*C. albicans* によって誘導される HBD-2 mRNA 発現増加に対しては、抗 TLR2 抗体と抗 TLR4 抗体は影響を与えなかった。従って、TLR2 と TLR4 は、*T. rubrum* による HaCaT 細胞の HBD-2 mRNA 発現増加には関与するものの、*C. albicans* による HBD-2 mRNA 発現増加には関与しないことが明らかとなった。

HBD-2 mRNA 発現増強は、小分生子を Con A で予め処理することによって有意に抑制された。 100°C 処理とエタノール処理は、HBD-2 mRNA 発現増加に影響しなかった。従って、真菌細胞壁の糖質成分である mannosyl 残基や glucosyl 残基が、*T. rubrum* による HBD-2 mRNA 発現増加に部分的に関与していることが示唆された。

考 察

本研究の結果より、*T. rubrum* は TLR2 と TLR4 を介した経路により HBD-2 発現を誘導することが明らかとなり、HBD-2 が皮膚糸状菌感染症に対する生体防御において重要な役割を果たすことが示唆された。今回の研究では、*T. rubrum* が TLR2 と TLR4 に直接結合することを示してはいないが、TLR2 や TLR4 に対する抗体によって HBD-2 の発現増加が抑制された事実は、*T. rubrum* が TLR2 と TLR4 によって認識されたことを示唆している。