短 報

表皮ケラチノサイトのIL-8産生に対する真菌成分の影響と、 抗真菌薬リラナフタートによる抑制効果

小 林 美 和 梶 島 健 治 戸 倉 新 樹

産業医科大学皮膚科学

〔受付：9月28日，2007年，受理：8月7日，2008年〕

要 旨

表在性皮膚真菌症では，角質層に真菌成分が存在することで炎症が引き起こされる．この表在性皮膚真菌症モデルとして，培養正常ヒト表皮ケラチノサイトを用い， β -D-グルカンおよび*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*由来のトリコフィチン液を加え刺激し炎症に関わるサイトカイン／ケモカインの産生を検討した．培養液中のサイトカイン／ケモカイン濃度を測定した結果，IL-1 α ，IL-8の産生亢進が認められた．この結果より，表皮ケラチノサイトは真菌成分と接触するのみで，炎症反応を惹起しうることが分かった．次に，チオカルバミン酸系抗真菌外用薬であるリラナフタートが，ケラチノサイトからのサイトカイン／ケモカイン産生に対してどのような影響を及ぼすかを検討した．結果，リラナフタートは表皮ケラチノサイトのIL-8産生亢進を濃度依存性に抑えることが分かった．IL-8は強力な好中球遊走因子であることから，リラナフタートは殺真菌作用だけでなく，表皮ケラチノサイトのケモカイン産生を抑制することで，炎症に伴う好中球浸潤をも抑制しうることが示唆された．

Key words： 表皮ケラチノサイト (epidermal keratinocyte)， β -D-グルカン (β -D-glucan)，トリコフィチン (trichophytin)，サイトカイン／ケモカイン (cytokine/chemokine)，IL-8，リラナフタート (liranaftate)

序 文

皮膚は，身体の最も外側を覆い，外界からの防護壁としての役割を果たしている．物理的，化学的刺激からの防御はもちろんのこと，外敵である病原体の侵入も防ぐために免疫学的な機能も併せ持っている．抗原提示能を持つランゲルハンス細胞を有すのみならず，表皮の多数を占めるケラチノサイト (KC) も様々なサイトカインやケモカインを産生し，ランゲルハンス細胞の抗原提示能の活性化を促し，真皮，表皮内に好中球やT細胞の浸潤を誘導するなど重要な役割を担っている．

また，表皮では獲得免疫のみならず自然免疫が発動されていることが容易に想像され，特に最表層に存在する表皮に自然免疫が強く発動されていると考えられる．これまでにすでに β -defensinをはじめとする抗菌ペプチドの存在，Toll-like receptor (TLR) がKCにも発現

していることが報告されている．ヒトの表層に感染する真菌への防御機構でも自然免疫が関与していると予想され，特に表在性皮膚真菌症では真菌成分が表皮に付着するのみで炎症が惹起されると考えられる．

実際に白癬菌は表皮の角質層に感染，寄生している．感染した菌は角質層直下の生きたKCを刺激し，その結果KCがサイトカイン，ケモカインを分泌し，炎症細胞を引き付けていると予想される．KCは，真菌成分である β -D-グルカンやトリコフィチンを認識して，どのようなサイトカインやケモカインを産生分泌しているのだろうか．我々は，培養表皮KCを β -D-グルカン，トリコフィチンで刺激し，炎症を惹起するサイトカイン，ケモカインの産生について検討した．

β -D-グルカンは白癬菌を含む真菌類の細胞壁の成分として広く知られており，白血球の遊走，単核球の食作用の刺激，および各種細胞よりサイトカイン，ケモカインの産生を引き起こすことが知られている．さらに，最近の研究結果では， β -D-グルカンが自然免疫を誘導することが報告され，その機構が注目されている．トリコフィチンは白癬菌から抽出された炭水化物タンパク質複

Fig. 1. Augmented production of IL-1 α and IL-8 by β -glucan and trichophyitin in normal human epidermal keratinocytes (NHEK).

NHEK were cultured in quadruplicate for 3 days in the absence or presence of β -glucan (A) or trichophyitin extracted from *T. rubrum* or *T. mentagrophytes* (B) at the indicated concentration. Culture supernatants were subjected to ELISA for quantification of IL-1 α and IL-8.

* $P < 0.05$.

合物であり、真皮内に浸潤した白癬を診断する抗原として皮内テスト試薬に使用されている。

一方で、いくつかの炎症性皮膚疾患に、抗真菌薬が有効であることが知られている。例えば、扁平苔癬にグリセオフルビンを投与して有効であった報告¹⁾や、アトピー性皮膚炎²⁾と脂漏性皮膚炎³⁾に、ケトコナゾールが有効であった報告などがある。アゾール系の免疫抑制剤も存在することから、抗真菌薬が種々の程度に免疫調整作用を持つことが予想される。抗真菌薬が抗炎症作用を持つならば、かゆみを伴う表在性皮膚真菌症の治療に相加効果をもたらすかもしれない。そこで我々は、表皮ケラチノサイトが真菌成分により惹起された炎症反応を、抗真菌薬が抑制できるのかをチオカルバミン酸系抗真菌薬であるリラナフタート⁴⁾を用いて検討した。

材料と方法

細胞培養：正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK; Cascade Biologics, Portland, OR) を、無血清のケラチノサイト培地 EpiLife (Cascade Biologics) で培養し、実験に用いた。マルチプレート (Corning Glass Works, Corning, NY) に播種した NHEK を、70～80%コンフルエントの状態に培地中の成長因子を除き、1～100 μ g/ml の β -D-グルカン (Curdlan: 和光純薬, 東京), *Trichophyton* (*T.* *rubrum* または *T. mentagrophytes* 由来のトリコフィチン液 (Greer Laboratories, Lenoir, NC) 10⁻⁵～10⁻³ protein nitrogen unit (PNU) で刺激した。リラナフタート (全薬工業, 東京) は DMSO で溶解したものを培養液にて希釈し使い、溶解可能濃度である 10 μ g/ml (DMSO 0.01%) 以下を刺激と同時に添加した。72時間培養した培養液をサイトカイン、ケモカ

イン測定に用いた。

サイトカイン、ケモカインの測定：サイトカイン、ケモカインの測定には ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN) を使用し、インターロイキン (IL)-1 α , IL-8, monokine induced by interferon-gamma (Mig), および macrophage derived chemokine (MDC), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) をマイクロプレートリーダー, Immuno-Mini NJ-2300 (Nihon InterMed, 東京) を用いて測定した。

解析：得られた実験結果は、Student または Welch の *t*-テストで統計学的解析をおこなった。

結 果

β -D-グルカン 0.01～100 μ g/ml を添加することによって IL-1 α と IL-8 の産生が亢進し、特に 10 μ g/ml で IL-8 の増加が顕著にみられた (Fig. 1A)。培養 24 時間、48 時間、72 時間でサイトカイン/ケモカインの産生量を比較、最も多くなる 72 時間培養で検討することとした。

次にトリコフィチンによる刺激を 10⁻⁷～1 PNU/ml でおこなったところ、IL-8 産生は 10⁻⁵～10⁻³ PNU/ml で亢進した (Fig. 1B)。*T. rubrum* と *T. mentagrophytes* の違いに有意な差はなかった。一方、IL-1 α の産生は、*T. mentagrophytes* 由来のトリコフィチン 10⁻⁵ PNU/ml のみで亢進がみられたが、濃度依存性とはいえないものであった。

β -D-グルカン、*T. rubrum* および *T. mentagrophytes* 由来のトリコフィチン液による刺激はいずれも、NHEK の Mig, MDC, RANTES の産生に影響しなかった。

Fig. 2. Suppression of fungal element-promoted production of IL-1 α and IL-8 by liranafate in NHEK.

NHEK were cultured in quadruplicate for 3 days with liranafate at the indicated concentration in 10 $\mu\text{g/ml}$ of β -glucan (A) or 10⁻⁵ PNU of trichophyten extracted from *T. rubrum* or *T. mentagrophytes* (B). Culture supernatants were subjected to ELISA for quantification of IL-1 α and IL-8. The concentrations of IL-1 α and IL-8 in the absence of the fungal element were 40.95 $\pm$ 28.57 pg/ml and 174.55 $\pm$ 20.25 pg/ml, respectively. (mean $\pm$ S.D.) * P <0.05

(data not shown).

これらの結果から、 β -D-グルカンの至適濃度を 10 $\mu\text{g/ml}$ 、トリコフィチンの至適濃度を 10⁻⁵ PNU/ml とし、以下の実験はこれらの濃度で NHEK を刺激した。

NHEK からの IL-8、IL-1 α 産生に対するリラナフタートの影響を検討するため、 β -D-グルカンまたはトリコフィチンで NHEK を刺激すると同時にリラナフタートを添加培養し、72 時間後の培養上清を回収し解析した。Fig. 2A で示されるように、 β -D-グルカンにより産生亢進した IL-8 はリラナフタートを加えることにより容量依存的に抑制された。IL-1 α 産生に対する抑制効果もリラナフタート 10 $\mu\text{g/ml}$ でみられたが、これ以上の濃度のリラナフタート液は溶解不能であったため今回の実験では検討できなかった。

同様に、トリコフィチン刺激によって亢進した IL-8 産生に対してもリラナフタートは 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上で抑制した (Fig. 2B)。

考 察

我々はこの実験で、真菌成分が培養ケラチノサイトからサイトカインとケモカインの産生を亢進させることを示した。白癬菌は角質層の中に存在していて、通常は表皮の living layer に侵入することができない。これは、ケラチノサイトが菌または菌体成分に接触すると、強い炎症反応が生じ、生体から排除されてしまうためであると説明されてきた。今回の結果から、我々はケラチノサイトから産生される前炎症性サイトカインの IL-1 α と好中球遊走を促す IL-8 が、炎症を喚起し菌排除に働いていると考えた。一方で、Th1 ケモカインである Mig、Th2 ケモカインである MDC、好酸球遊走に関わる

RANTES の産生には亢進が認められなかった。これまでもトリコフィチンによりケラチノサイトの cell line の一つである HaCaT 細胞から IL-8 の産生が亢進することは既に報告されている⁶⁾。ケモカイン産生に関しては HaCaT 細胞と NHEK で異なる面があるが⁷⁾、我々の実験結果も IL-8 が真菌成分に対してケラチノサイトから産生されることを裏付けるものとなった。

β -D-グルカンによる刺激とは異なり、トリコフィチンによる刺激では、サイトカイン/ケモカイン産生に与える影響が容量依存的ではなかった。これは、トリコフィチン液そのものが単一の物質ではないため、炎症ならびに免疫反応を回避させるような物質が含まれているためではないかと考えた。Tani らは、生菌、死菌、菌体から産生および溶出した成分、それぞれにより惹起される反応に差があると報告しており⁸⁾、刺激物質およびそれを抑制する物質に関しても今後の検討が必要と思われる。

β -D-グルカンは病原物質として、マクロファージにおいて Toll-like receptor 2 と Dectin-1 のリガンドとして認識されている⁹⁾。我々は、NHEK においても β -D-グルカンが認識され、その結果 TLRs、Dectin-1 の発現および抗菌ペプチドである β -defensin の発現、また IL-1 α と IL-8 の産生が亢進することを報告した¹⁰⁾。今回の実験では、トリコフィチン刺激により IL-1 α と IL-8 が特異的に産生されたことから、ケラチノサイト自身が TLR 2 や Dectin-1 などの自然免疫に関わる受容体で白癬菌を認識し、炎症を惹起していると考えられる。

一方、臨床的な問題点として、足白癬や体部白癬の場合、炎症症状そのものやそれに伴う強いそう痒感に対し、抗真菌療法に加えて抗炎症治療を必要とすることが時折

ある。副腎皮質ホルモン外用剤の使用は、炎症症状の緩和には効果的であるが、患部の真菌の量を増加させ、結果的に病変を拡大させてしまう可能性があり懸念される。そういう意味では、白癬の治療において、適度な抗炎症効果を併せ持つ抗真菌外用薬があれば理想的である。

我々は、リラナフタートが好中球遊走を促すケモカインであるIL-8産生を抑制する効果を持つことを示した。IL-8産生の抑制は、表皮内への好中球浸潤を減少させる。リラナフタートは殺真菌作用に加え、このような抗炎症効果を有しており、理想的な抗真菌外用薬になれる可能性を秘めた薬剤であると思われる。

文 献

- 1) Sehgal VN, Abraham GJ, Malik GB: Griseofulvin therapy in lichen planus. A double-blind controlled trial. *Br J Dermatol* **87**: 383-385, 1972.
- 2) Back O, Scheynius A, Johansson SG: Ketoconazole in atopic dermatitis: therapeutic response is correlated with decrease in serum IgE. *Arch Dermatol Res* **287**: 448-451, 1995.
- 3) Ford GP, Farr PM, Ive FA, Shuster S: The response of seborrheic dermatitis to ketoconazole. *Br J Dermatol* **111**: 603-607, 1984.
- 4) 奥 幸夫, 佐久間慶太, 横山耕治, 宮治 誠: *Trichophyton rubrum* に対する liranaftate の殺菌活性. *真菌誌* **43**: 181-187, 2002.
- 5) Koga T, Ishizaki H, Matsumoto T, Toshitani S: Enhanced release of interleukin-8 from human epidermal keratinocytes in response to stimulation with trichophytin in vitro. *Acta Derm Venereol* **76**: 399-400, 1996.
- 6) Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM: Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**: 1107-1117, 2003.
- 7) Tsuda T, Tohyama M, Yamasaki K, Shirakawa 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* **31**: 37-42, 2003.
- 8) Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, Kanda N, Watanabe S: The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **299**: 381-387, 2007.
- 9) Brown GD, Gordon S: Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature* **413**: 36-37, 2001.
- 10) Kobayashi M, Yoshiki R, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y: Expression of TLR2, NOD2 and Dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*: *in press*.

Anti-fungal Drug Liranaftate Suppresses Fungal Element-promoted Production of IL-8 in Normal Human Keratinocytes

Miwa Kobayashi, Kenji Kabashima, Yoshiki Tokura

Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health,
1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

Dermatophytes reside in the stratum corneum of the epidermis, and one scenario in superficial dermatophytosis is that fungi stimulate keratinocytes to secrete chemokines, thereby attracting inflammatory cells. We investigated the effect of the cytokine/chemokine production of keratinocytes solely stimulated by fungal elements. The fungal elements β -D-glucan and trichophytin from *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* augmented production of IL-8 and IL-1 α of cultured normal human epidermal keratinocytes. It was found that keratinocytes can recognize elements of dermatophytes as a pathogen.

Next we examined the effect of liranaftate, a representative Japanese thiocarbamate antifungal agent, on the production of IL-8 and IL-1 α . Keratinocytes were incubated with this antifungal drug in the presence of β -glucan or trichophytin. Augmented production of IL-8 was profoundly suppressed by the addition of liranaftate to the culture in a dose-dependent manner. Clinically, liranaftate an antifungal drug with IL-8-decreasing activity may reduce infiltration of neutrophils in the skin and their invasion into the epidermis.