

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08582

研究課題名(和文) 各種皮膚疾患に対するエンジュレクチンの治療薬としての可能性に関する検討

研究課題名(英文) lectin-derived from Maackia amurensis as a novel therapeutic option for treatment of skin diseases.

研究代表者

本間 大 (Honma, Masaru)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50344578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エンジュ由来レクチンであるMASLがポドプランニン分子の発現・機能抑制を介して乾癬皮疹に対する治療効果を発揮する可能性が示唆された。この作用機序については、今後さらに詳細な検討が必要と考えられるが、腫瘍進展抑制実験などの過去の報告ではMASLの強い毒性が示されておらず、今後、経口剤としての応用可能性が本研究により示された。

研究成果の概要(英文)：MASL, a lectin-derived from Maackia amurensis, can work as a therapeutic agent on psoriasis via regulation of podoplanin-expression and the function. The precise functional mechanism has not been fully elucidated. However, results acquired in this study and safety of oral MASL administration to mice in previous reports suggest the possibility of MASL as a novel therapeutic option for the treatment of psoriasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：podoplanin 乾癬 エンジュ ポドプランニン

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬は皮膚科日常診療において最も頻度が高い炎症性皮膚疾患の一つであり、欧米よりも少ないものの、日本人における罹病率は0.2%程度と報告されている(文献1)。尋常性乾癬は、外的刺激を受けやすい四肢伸側を中心として生じる、雲母状鱗屑を付着する紅色局面を特徴とするが、皮疹のみならず、乾癬性関節炎や、肥満、メタボリック症候群(文献2)に起因する心血管病変(文献3)などの合併症のリスクが高いことが示唆されており、全身性炎症性疾患としての理解が進んでいる。従来、重症度を問わず、外用療法を中心に治療が行われてきたが、特に重症例では治療アドヒアランスを維持できず(文献4)十分な治療効果を長期に得ることは非常に困難であった。最近では、乾癬の病態の分子生物学的機序の解明により、病態に関与する分子を標的とした生物学的製剤の開発が進み、その高い有効性が示されている。その一方で、治療効果の継続性が大きな課題となっている。この継続性については、薬剤の問題点として抗薬剤抗体の出現などによる2次無効の問題と、乾癬皮疹そのものの再燃のしやすさがある。前者については、薬剤の改良が大きな課題になるものの、後者については再燃を抑制するような新規治療の開発が望まれる。最近の検討では、組織定住性記憶性Tリンパ球(tissue-resident memory T cell, 以下 T_{RM}) が関与していることが示唆されており、この T_{RM} を中心とした乾癬皮疹再燃の機序は新規治療ターゲットとしても期待される。

ポドプランिन(podoplanin, 以下 PDPN)は膜型糖タンパクで、他の分子との結合を介して、種々の機能を発揮することが知られている(引用文献5)。Clec-2分子との結合を介して血小板凝集やリンパ管形成に関与することが当初明らかとなっていたが、近年、特に主要分野での機能解析が進んでいる。腫瘍細胞において、ポドプランिन分子は遊走能、浸潤能を亢進させることが知られているが、皮膚悪性腫瘍でも同様の機能が示されている。有棘細胞癌、悪性黒色腫の浸潤病変先端部で発現亢進が確認されている(引用文献6)有棘細胞癌由来細胞株においては、EGF受容体活性化を介して、培養環境における細胞密度がSTAT3依存性のポドプランिन分子の発現に関与すること、この細胞密度依存性のポドプランिन分子発現誘導が、実際に、腫瘍細胞の浸潤能亢進に寄与することがあきらかとなった(引用文献6)。このような皮膚腫瘍におけるポドプランिन分子の発現調節は、腫瘍の初期段階である表皮内癌から浸潤癌への進展過程で特に重要と考えている。

皮膚においては、炎症性皮膚疾患である乾癬病変部、皮膚潰瘍周辺表皮(引用文献7)に加え、正常表皮角化細胞においては、ポドプランिन分子発現が、乾癬病態の根幹と考えられている Th17 細胞由来のサイトカイン

(IL-22)などによって STAT3 シグナル依存性に誘導される(引用文献7)。

しかしながら、こうした皮膚疾患の病態形成におけるポドプランिन分子の機能の詳細については、現時点で、必ずしも明らかとなっていない。

加えて、腫瘍進展機構におけるポドプランिनの機能解析においてはエンジュ由来レクチン(Maackia amurensis seed lectin, MASL)がポドプランिन分子に結合しその機能を抑制することが示されている(引用文献8)。このようなポドプランिनに特異的な分子を用いて、培養細胞のみならず、実際のモデル動物においても機能解析が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

これまでにあきらかとなっているポドプランिनの発現様式に加え、表皮角化細胞および表皮における機能を明らかとし、さらに、乾癬モデルマウスでの治療効果の有無について検討することでポドプランिनが乾癬の治療ターゲットとなりうるか、あるいは MASL の乾癬治療薬の可能性を探るものである。具体的には以下の項目が挙げられる。

培養細胞におけるポドプランिन分子の機能について、特に幹細胞保持に関わる細胞接着分子 β 1-integrinの機能調節作用について明らかにする。

培養表皮角化細胞および皮膚疾患類似3次元培養モデルに対して、エンジュ由来精製レクチン(MASL)を投与した際の表現系の変化を明らかにする。

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する MASL 投与が皮疹の表現型に与える離京について明らかにすることで MASL が乾癬治療薬となりうる可能性について明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞、3次元培養表皮およびイミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対し、ポドプランिन分子特異的 shRNA コンストラクト、ポドプランिन過剰発現コンストラクトを組み込んだ組み換えアデノウィルスベクターあるいは MASL を用いてポドプランिन分子の発現、機能を抑制した際の表現型について、組織学的、分子生物学的に解析を行った。上記研究目的に対応し、下記の研究を実施した。

培養細胞におけるポドプランिन分子の β 1-インテグリン機能調節作用について

培養表皮角化細胞および不死化表皮角化細胞(HaCaT細胞)に対してポドプランिन分子の過剰発現、あるいは発現抑制を行い、 β 1-インテグリンの機能について細胞接着能に注目し解析を実施した。

IL22-誘導乾癬類似3次元培養モデルに対する MASL の機能解析について

IL-22 処理により肥厚した乾癬類似3次元培養モデルに対して MASL の投与を行

い、細胞増殖、表皮肥厚抑制効果について、MTT アッセイ、組織学的評価を実施した。

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する MASL 投与による治療実験

MASL を皮内あるいは経口で投与した B6 マウスに対し、イミキモドにより乾癬様皮膚炎誘導を実施し、皮膚炎の程度を病理組織学的な評価を行った。

4. 研究成果

- (1) **培養細胞におけるポドプラニン分子のβ1-インテグリン機能調節作用について** (Shibuya T, Honma M et al. Podoplanin suppresses cell adhesion of epidermal keratinocytes via functional regulation of β1-integrin. *in submission*)

ポドプラニン分子による表皮角化細胞の I 型コラーゲンコート培養皿に対する接着能の調節効果

通常培養下において、不死化表皮角化細胞である HaCaT 細胞ではほとんどポドプラニンの発現がないが、正常表皮角化細胞では乾癬表皮基底層の細胞に類似してポドプラニン分子発現が亢進していることから、前者でポドプラニンを過剰発現、後者で shRNA を用いた発現抑制を行ったところ、前者では無処置群と比し、細胞接着能が低下し、後者では I 型コラーゲンに対する細胞接着能が亢進することが明らかとなった。この結果から、表皮角化細胞においてポドプラニン分子は I 型コラーゲンに対する接着を抑制することが示された。

ポドプラニン分子発現抑制による表皮角化細胞の I 型コラーゲンへの接着亢進へのβ1-インテグリンの関与について

ポドプラニン分子発現抑制による細胞接着亢進は I 型コラーゲンの主たる接着分子であるβ1-インテグリン中和抗体を用いることで消失した。また、ポドプラニン分子発現抑制時に HUTS21 抗体で認識される機能型β1-インテグリンの発現が亢進した。以上から、ポドプラニンによる細胞接着制御機構はβ1-インテグリンの機能調節を介することが示された。

乾癬表皮におけるポドプラニン分子と機能型β1-インテグリンの発現パターンについて

以上の検討から、ポドプラニン分子の発現とβ1-インテグリンの機能については逆相関の関係にあることが予想されたが、この予想通り、成熟した乾癬表皮では、真皮乳頭層直上の表皮に限局して、機能型β1-インテグリンが発現するが、ポドプラニン分子は表皮稜基底層の細胞で発現が亢進していた。

結果のまとめ

乾癬表皮では、活発な細胞増殖とともに、角質細胞への分化が方向づけられた細胞の表皮

への供給が亢進した状況と表現することができる。この意味では、細胞外マトリックスである基底層との接着が一定の細胞で緩められることが必要であり、ポドプラニンはこうした表皮角化細胞の分化調節に寄与するのではないかと考えられた。

- (2) **IL22-誘導乾癬類似 3 次元培養モデルに対する MASL の機能解析について**

培養表皮角化細胞に対する MASL の機能について
通常培養条件下で、培養表皮角化細胞はポドプラニン分子を強く発現するが、この条件下に MASL を添加すると、ポドプラニン分子発現が抑制されることが示された。

IL22-誘導乾癬類似 3 次元培養表皮におけるポドプラニン発現誘導について

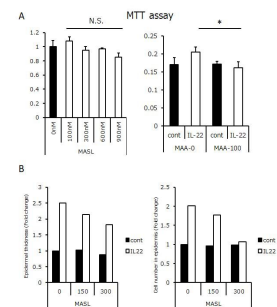
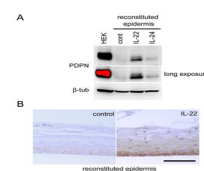
通常培養条件下の 3 次元培養表皮に IL-22 を添加し培養を継続すると、表皮は肥厚し、錯角化を伴う過角化を生じる。さらにこの乾癬類似培養表皮基底層ではポドプラニンの発現が通常条件下の培養表皮と比し、増強する(右図)。この病理所見は乾癬表皮で見られる変化に炎症細胞浸潤を除き合致する。

MASL による IL22-誘導乾癬類似 3 次元培養表皮の肥厚抑制効果について

種々の濃度で MASL の添加を行ったところ、通常条件下では明らかな表皮増殖の抑制効果はみられなかったが、IL22 添加培養表皮では MASL 依存性に表皮細胞数および表皮厚に抑制効果が得られた(右図)。

結果のまとめ

以上の結果から、MASL はポドプラニン分子の発現が亢進した IL22 誘導性培養 3 次元表皮では表皮角化細胞の増殖抑制効果を示すが、ポドプラニン分子の発現が弱い通常培養条件下の表皮では増殖抑制は生じず、MASL の表皮への作用はポドプラニン分子の発現に依存し、比較的特異性が高い可能性が示された。



(3) イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する MASL 投与による治療実験について

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する MASL 皮下投与と実験

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスへの皮疹抑制効果を評価するため、皮下に MASL の投与を行ったところ、MASL 自体が炎症反応を惹起することが明らかとなった。このため、皮膚病変に対する抑制効果を確認することはできなかった。

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎モデルマウスに対する MASL 経口投与と実験

皮下投与と実験で MASL が炎症を惹起したため、経口投与実験に切り替え、検討を行った。経口投与は過去の腫瘍進展抑制研究でも実施されている(引用文献 8)。この研究では、マウスの数が十分ではないものの、イミキモド処理による皮膚肥厚が抑制される傾向があることが示唆された。

結果のまとめ

以上の結果から MASL は病変部への直接投与では炎症を惹起するため、治療応用が難しいと考えられたが、経口投与では乾癬皮疹抑制効果があることが示唆された。

研究成果からみた本研究の発展性

以上の検討から、エンジュ由来レクチンである MASL がポドプランニン分子の発現・機能抑制を介して乾癬皮疹に対する治療効果を発揮する可能性が示唆された。この作用機序については、今後さらに詳細な検討が必要と考えられるが、腫瘍進展抑制実験などの過去の報告では MASL の強い毒性が示されておらず、今後、経口剤としての応用可能性が本研究により示された。

<引用文献>

Kubota K et al. Epidemiology of psoriasis and palmoplantar pustulosis: a nationwide study using the Japanese national claims database. *BMJ Open*. 2015; 5: e006450.
Takahashi H, Honma M et al. Prevalence of metabolic syndrome in Japanese psoriasis patients. *J Dermatol Sci*. 2010; 57: 143-4.

Honma M et al. Prevalence of coronary artery calcification in Japanese patients with psoriasis: A close correlation with bilateral diagonal earlobe creases. *J Dermatol*. 2017; 44: 1122-1128.

本間 大ほか 生物学的製剤投与中の乾癬患者を対象とした外用療法に関するアンケート調査 - 旭川医科大学乾癬外来における検討 - 皮膚科の臨床 60 巻 (2018 年 3 月)

Krishnan H et al. Podoplanin - an emerging cancer biomarker and therapeutic target. *Cancer Sci*. 2018 Mar 25. doi: 10.1111/cas.13580.

Fujii M, Honma M et al. Intercellular contact augments epidermal growth factor receptor (EGFR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-activation which increases podoplanin-expression in order to promote squamous cell carcinoma motility. *Cell Signal*. 2013; 25: 760-5.

Honma M et al. Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF- and STAT-3 activating cytokines, IFN- , IL-6, and IL-22. *J Dermatol Sci*. 2012;65:134-40.

Ochoa-Alvarez JA et al. Plant lectin can target receptors containing sialic acid, exemplified by podoplanin, to inhibit transformed cell growth and migration. *PLoS One*. 2012;7:e41845.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

1. 本間 大ほか 生物学的製剤投与中の乾癬患者を対象とした外用療法に関するアンケート調査 - 旭川医科大学乾癬外来における検討 - 皮膚科の臨床 60 巻 (2018 年 3 月)
2. Saito N, Honma M et al. RIPK1 downregulation in keratinocyte enhances TRAIL signaling in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2018 Apr 10. pii: S0923-1811(18)30161-0. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.04.007. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29661487.
3. Shibuya T, Honma M et al. Alteration of serum thymus and activation-regulated chemokine level during biologic therapy for psoriasis: Possibility as a marker reflecting favorable response to anti-interleukin-17A agents. *J Dermatol*. 2018 Apr 14. doi: 10.1111/1346-8138.14308. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29655215.
4. Shibuya T, Honma M et al. Persistent pruritus in psoriatic patients during administration of biologics. *J Dermatol*. 2018 Mar 6. doi: 10.1111/1346-8138.14284. [Epub ahead of print] PubMed PMID:29512183.
5. Ohnishi H, Kadowaki T, Mizutani Y, Nishida E, Tobita R, Abe N, Yamaguchi

- Y, Eto H, Honma M et al. Genetic background and therapeutic response in generalized pustular psoriasis patients treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis. *Eur J Dermatol.* 2018; 28: 108-111.
6. Iinuma S, Matsuo R, Fujii M, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Psoriasis verrucosa complicated by generalized pustular psoriasis. *J Dermatol.* 2018 Mar;45(3):e57-e58.
 7. Kanekura T, Seishima M, Honma M et al. Therapeutic depletion of myeloid lineage leukocytes by adsorptive apheresis for psoriatic arthritis: Efficacy of a non-drug intervention for patients refractory to pharmacologics. *J Dermatol.* 2017; 44: 1353-1359.
 8. Iinuma S, Minami-Hori M, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Acquired hemophilia A following generalized pustular psoriasis of pregnancy. *J Dermatol.* 2017; 44: e324-e325.
 9. Honma M et al. Prevalence of coronary artery calcification in Japanese patients with psoriasis: A close correlation with bilateral diagonal earlobe creases. *J Dermatol.* 2017; 44: 1122-1128.
 10. Igawa S, Kishibe M, Minami-Hori M, Honma M et al. Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2017; 137: 449-456.
 11. Iinuma S, Kishibe M, Saito N, Igawa S, Honma M, Bando Y, Yoshida S, Ishida-Yamamoto A. Kallikrein-related peptidase 6 promotes psoriasisiform skin inflammation through a protease-activated receptor 2-independent mechanism. *Exp Dermatol.* 2017; 26: 289-291.
 12. Honma M et al. Close correlation of bone mineral density and body mass index in Japanese psoriasis patients. *J Dermatol.* 2017; 44: e1-e2.
 13. Honma M et al. Aberrant LIM-kinase 1 expression in hyperproliferative psoriatic epidermis. *J Dermatol.* 2017; 44: 91-92.
 14. Imafuku S, Honma M et al. Efficacy and safety of secukinumab in patients with generalized pustular psoriasis: A 52-week analysis from phase III open-label multicenter Japanese study. *J Dermatol.* 2016; 43: 1011-7.
 15. Honma M et al. Serum carcinoembryonic antigen (CEA) as a clinical marker in acquired idiopathic generalized anhidrosis: a close correlation between serum CEA level and disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016; 30: 1379-83.
 16. Iinuma S, Kishibe M, Saito N, Igawa S, Honma M, Takahashi H, Bando Y, Yoshida S, Iizuka H, Ishida-Yamamoto A. KLK8 is required for microabscess formation in a mouse imiquimod model of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2015; 24: 887-9.
 17. Honma M et al. Accelerated nail elongation speed in psoriasis patients during treatment. *J Dermatol.* 2015; 42: 910-1.
 18. Ochoa-Alvarez JA, Krishnan H, Pastorino JG, Nevel E, Kephart D, Lee JJ, Retzbach EP, Shen Y, Fatahzadeh M, Baredes S, Kalyoussef E, Honma M et al. Antibody and lectin target podoplanin to inhibit oral squamous carcinoma cell migration and viability by distinct mechanisms. *Oncotarget.* 2015; 6: 9045-60.
- [学会発表](計7件)
1. 本間 大ほか 汎発型膿疱性乾癬患者対象セクキヌマブ第III相臨床試験：継続投与試験における有効性と安全性の解析第31回日本乾癬学会年次学術大会、東京
 2. Honma M et al. *Maackia amurensis* seed lectin can suppress IL-22-induced hyperproliferative reconstituted epidermis. 日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会、2016年12月、仙台
 3. Shibuya T, Honma M et al. IPAS 日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会、2016年12月、仙台
 4. 澁谷貴史、本間 大ほか 乾癬患者における大腿骨骨密度の検討 第30回日本乾癬学会学術集会、2016年9月、宇都宮
 5. 本間 大ほか 後天性特発性全身性無汗症における臨床マーカーとしての血清CEA値の検討 第79回日本皮膚科学会東京支部東部支部合同学術大会、2016年2月、東京
 6. Honma M et al. Serum carcinoembryonic antigen (CEA) as a clinical marker in idiopathic pure sudomotor failure: a close correlation between serum CEA level and disease activity (*Concurrent oral session*). 日本研究皮膚科学会第40回年次学術大会・総会、2015年12月、岡山
 7. 本間 大ほか 乾癬患者における爪甲伸長速度の検討 第30回日本乾癬学会学術集会、2015年9月、名古屋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本間 大 (HONMA, Masaru)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50344578