

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12514

研究課題名(和文)免疫抑制薬を超越する新規Physical Medicineとその受容体の発見

研究課題名(英文)Immunosuppressive effect of novel physical medicine and identification of its receptor

研究代表者

甲斐 広文(Kai, Hirofumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：30194658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室では、特定条件の微弱パルス電流(MES-55 pps)と42℃の温熱刺激であるHeat shock(HS)との併用(MES+HS)が、ヒト及びマウスにおける種々の疾患の炎症病態を改善することを見出してきた。本研究では、種々の免疫過剰疾患のうち、難治性皮膚疾患である乾癬に着目し、Physical medicineを用いた種々の検討を行った。乾癬モデルに対して、MES+HS処置は、imiquimod塗布により惹起された表皮の肥厚化、各種病態関連遺伝子発現(Keratin6A, IL-17A, IL-22, S100A8, Reg3)およびAktリン酸化を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Our laboratory has comprehensively studied the biological effects of mild electrical stimulation(MES, 0.1-ms pulse width, 55-pps) with heat shock(HS, 42℃). Specifically, MES+HS improved the inflammatory symptom in mouse models of diabetes and chronic kidney disease. To determine whether MES+HS suppresses psoriasis pathology, I used imiquimod-induced psoriasis mouse model. Notably, MES+HS(10 min, daily) significantly suppressed imiquimod-induced psoriasis-like skin hyperplasia, activation of Akt and expression of psoriasis-related genes(Krt6a, IL-17A and IL-22). Taken together, MES+HS improves psoriasis, at least in part, by suppressing the expression of cytokines.

研究分野：総合領域

キーワード：物理療法 アルツハイマー病 免疫制御

1. 研究開始当初の背景

物理刺激の作用を疾患へ応用する試みは古くから行われており、温熱療法としては、湯治やお灸、電気療法としては、鍼治療や電気マッサージなどが知られており民間療法として定着している。このような物理刺激を用いた治療法は物理療法 (Physical Medicine) と呼ばれ、経験的に高い病態改善効果を有することが明らかになっている。しかし、物理療法は積極的な臨床応用には至っておらず、その大きな原因に科学的エビデンスの不足が挙げられる。Physical Medicine が生体に与える作用の解明は、既存の薬剤療法に代わる新規治療法創出の可能性を秘めている。本分野では、物理刺激の中でも、電流刺激が有する生理活性に着目し、細胞条件に効率的に影響を与える特定条件の微弱パルス電流 (MES),⁴² の温熱 (HS) の併用を基本原理とする医療機器 Biometronome を開発した。その特定条件の MES とは、0.1 ms, 55 pps であり、Akt のリン酸化や Hsp72 の発現上昇を最も効率的に促進することが明らかにされてきた。MES+HS 処置は、型糖尿病、肥満、慢性腎臓病 (Alport 症候群)、および肝虚血性再灌流など病態モデルマウスを用いた検討で有効性を示した。特に、病態時の炎症マーカーの抑制が顕著に見られ、MES+HS は抗炎症効果を有することが明らかになった。MES+HS 処置は炎症が主体の疾患にも有効であると考えられた。

本研究計画時は、TRP ファミリーが電流刺激の受容体であると仮定して検討したが、結果的に想定した TRPC6 は関係しないことが明らかになった。さらに、*in vivo* の免疫過剰モデルに対する予備検討を実施するために、計画書にある種々のモデルに対する効果について検討した。自己免疫疾患モデル MRL/lpr マウスについては入手不能であり、心臓移植モデルは評価に値するレベルの手法が到達できなかったが、皮膚移植モデル、COPD モデル、アルツハイマーモデルマウスについては、検討を行ったが、明確な有効性が認められなかった。そこで、以下の理由から乾癬病態に対する効果について検討した。

近年、マウス正常皮膚のマイクロアレイ解析より、MES+HS 処置が皮膚の多数の遺伝子の発現を変動させることが明らかになった。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、ケラチノサイトの角化に関わる経路を始めとした複数の経路の変動が確認された。このように、MES+HS は遺伝子変動に伴う皮膚の機能への直接的な影響が考えられるが、皮膚の疾患治療への有効性は未解明であった。皮膚は我々の外面を覆う最大の臓器であり、角質層で構成される皮膚バリアは外的刺激を遮蔽する働きをしている。この皮膚バリアの機能維持に、皮膚の表皮における 15-50 mV の

微弱な電流が関わっていることが報告されている。さらに、この微弱電流は皮膚の角質層に存在するカルシウムやマグネシウムなどのイオン局在の制御を介して、皮膚バリアの恒常性を保つ働きをしているという。

そこで、本研究では、炎症性皮膚疾患である乾癬に着目した。乾癬は、免疫応答によって活性化したケラチノサイトが過増殖することで発症する慢性の皮膚疾患である。現在、世界では人口の約 0.5 - 4.6% が罹患していると推定されている。人種により発症頻度は異なるが、性別や年齢に偏りは見られない。発症すると、皮膚や爪に紅斑や鱗片などの病態が現れる。皮膚病変は炎症を呈し、掻痒感や刺激感の原因になる。関節部に病態が見られるものもあり、乾癬性関節炎として知られている。また、病変部が露見することによる患者の精神ストレスが大きな問題になっており、社会的差別の対象にもなりやすい。この疾患の特徴は、難治性にある。乾癬病態が慢性の経過をたどるにあたり、主に二つの原因が挙げられる。一つ目の原因は、病態の誘導因子が複数存在することであり、皮膚はストレスや外傷など外的因子に加え、生活習慣病を始めとする内的因子の影響を受けやすい。もう一つの原因は、病態増悪のループが形成されていることである。樹状細胞-T 細胞-ケラチノサイトが相互に刺激し合うことで、恒常的な炎症が引き起こされていることが想定される。現在、乾癬治療は、光線療法や外用剤、内服薬などが用いられており、近年は、強い効果を有する生物学的製剤も市場に回りつつある。これらの薬は症状に合わせ、単独または組み合わせて治療に用いられているが、症状が悪化と寛解を繰り返すため、症状に合わせた投与量やタイミングの選択が困難である。そのため、長期の治療に適した薬が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、乾癬病態に対する新規治療法の確立を行うことを究極の目的とし、imiquimod 誘導性乾癬モデルマウスに対する、Physical Medicine (MES+HS) の有用性について検討を行った。

3. 研究の方法

imiquimod 誘導性乾癬モデルの作製に当たって、imiquimod を 5% 含有するベセルナクリームを使用した。コントロール群には白色ワセリンを塗布した。投与は耳 (内側) に 15 mg、背中に 62.5 mg のクリームを毎日塗布した。imiquimod 含有クリームの塗布は、マウスへの負担を考慮し、無麻酔下で行った。また、背中に塗布する際には、2 日前にバリカンと除毛クリームを用い、2 x 2 cm の範囲の体毛を除去した。

in vitro 実験を行うに当たり、Function generator (NF) を用い、パルス電流の出力を行った。この出力装置は、電流の波形 (パルス波、直流、交流等)、電圧の調節が可能である。更に、電極として、カーボン製の電極 (プライムテック) を使用した。恒温槽を用い、水の温度を 42 に設定した。そこに、電極を上から被せた培養 plate (6 well plate) を水面に浸し、電流と温熱の処置を同時に行った。条件は MES が 1 v/cm, 55 pps (pulse per second), 0.1 ms のパルス波であり、HS は 42 の温熱である。これらを 10 分間処置した。なお、免疫抑制作用を有した電流条件 (5,500 pps) についても同時に検討したが、こちらは明確な効果を示さなかったため、55 pps の電流条件の研究結果のみを示した。

in vivo 実験を行うに当たり、Biometronome を用い、パルス電流の出力を行った。この出力装置は、温熱に加え、0.1 ms のパルス電流 (電圧は調節可能) を発生させることができる。更に、電極として、ゴム製の電極パッドを使用した。このゴム電極パッドは、電流に加え、Biometronome で設定した温熱を処置できる。また、これらを発生させる機材を布で覆っているため、水で十分に湿らせて用いた。処置の際、マウスを高さ 10 cm, 直径 12 cm の円柱型プラスチック容器に入れ、上下面に電極パッドを設置した。パッドは事前に加温し、中央部が 42 ± 2 になるように確認した。処置は無麻酔下で行い、マウスは自由に動ける状態であった。コントロール群の個体も同様に、プラスチック容器に入れ、パッドを上下面に設置した。電流、温熱の条件は MES が 6 v/cm, 55 pps (pulse per second), 0.1 ms のパルス波であり、HS は 42 の温熱である。実験期間中は、毎日同時刻に、10 分間の処置を行った。

4. 研究成果

まず、imiquimod 誘導性乾癬モデルマウスを用い、MES+HS 処置が乾癬病態の一つである耳の肥厚化二度のような影響を与えるか検討した。その結果、MES+HS 処置は imiquimod により誘導される耳の肥厚化を処置開始後 3 日目から有意に抑制した。更に、8 日目の耳を採取し、切片作成後、HE 染色を行ったところ、MES+HS 処置群の表皮の肥厚化が imiquimod 単独処置群と比較して抑制されていることが分かった。

一般に表皮の肥厚化は、ケラチノサイトの過増殖が主な原因となるため、次に、ケラチノサイトの増殖マーカーである KRT6A の mRNA 発現量を Q-RT-PCR 法を用い定量した。その結果、MES+HS 処置は、コントロールの約 7.8 倍に上昇した KRT6A の発現を有意に減少させた。以上の結果より、MES+HS 処置はケラチノサイト増殖の抑制を介し、表

皮の肥厚化を抑制することが示唆された。

次に、病変部の皮膚組織で炎症の増悪化に関わるサイトカイン、ケモカインに着目し、MES+HS 処置がこれらの分子の mRNA 発現に与える影響を検討した。病変部の皮膚組織における mRNA 発現を定量したところ、imiquimod 塗布により IL-17A および IL-22 の発現が顕著に増加していた。興味深いことに、MES+HS 処置は、IL-17A 及び IL-22 の発現上昇を、統計学的に有意でなかったものの、50%以上抑制していた。加えて、IL-1 β の mRNA 量の減少傾向が見られたものの、IL-6, IL-8, IL-23 に関しては mRNA の発現に差は見られなかった。本結果より、MES+HS 処置による炎症性サイトカインの発現抑制が、病態改善に一部関与することが示唆された。

一般に、抗菌タンパク質は抗菌活性が良く知られているが、免疫の活性化を惹起することで乾癬病態を進行させる。そこで、病変部の皮膚組織における抗菌タンパク質の産生に着目した。その結果、MES+HS 処置は S100 family に属する S100A7 の mRNA 発現の上昇に影響を示さなかったものの、S100A8 の発現増加を約 30%程度であるが、抑制する傾向にあることが分かった ($P=0.08$)。更に、ヒト Reg3A のホモログである Reg3 γ の mRNA 発現を比較したところ、MES+HS 処置は発現を有意に抑制した。次に、Reg3 γ は乾癬や創傷治癒時の皮膚で発現が上昇する抗菌タンパク質であり、Akt のリン酸化を介してケラチノサイトの増殖を強力に亢進させる点に着目し、まず、imiquimod 塗布による皮膚組織の Akt のリン酸化を western blotting 法を用い定量した。その結果、塗布群においてリン酸化が有意に上昇していたが、MES+HS 処置はその Akt のリン酸化の亢進を有意に抑制した。以上の結果より、MES+HS 処置は、病変部の皮膚組織における抗菌タンパク質、特に Reg3 γ の過剰な発現を抑制し、さらに、Reg3 γ の下流分子の Akt のリン酸化を抑制することが分かった。

最後に、MES+HS 処置が recombinant IL-17A 誘導性の抗菌タンパク質の遺伝子発現に与える作用を、HaCaT 細胞を用いて検討した。その結果、IL-17A により、LL-37 以外の抗菌タンパク質 S100A7, S100A8, S100A9, β defensin2 の発現が顕著に増加した。MES+HS 処置は、その増加した S100A7, S100A8, S100A9, β defensin2 の発現を有意に抑制した。以上の検討より、MES+HS はケラチノサイト直接的に作用し、抗菌タンパク質の発現を抑制することが明らかになった。

以上、本研究は MES+HS 処置が乾癬病態に有効であることを初めて明らかにした。今回、MES+HS を受容する実体の同定までは至らなかったが、本研究結果は、MES+HS が乾

癬の新規治療法になりうることを示す重要な基礎的知見である。

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7件)

1. Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. *BMC Biotechnol.* 2017;17(1):14. 査読有
2. Tasaki Y, Wang WY, Konduru AS, Komatsu K, Matsuyama S, Kai H, Li JD. cAMP-dependent protein kinase A acts as a negative regulator for nontypeable Haemophilus influenzae-induced GM-CSF expression via inhibition of MEK-ERK signaling pathway. *Integr Mol Med.* 2017, in press 査読有
3. Kondo T, Goto R, Ono K, Kitano S, Suico MA, Sato M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E. Activation of heat shock response to treat obese subjects with type 2 diabetes: a prospective, frequency-escalating, randomized, open-label, triple-arm trial. *Sci Rep.* 2016;6:35690. 査読有
4. Fukuda R, Suico MA, Kai Y, Omachi K, Motomura K, Koga T, Komohara Y, Koyama K, Yokota T, Taura M, Shuto T, Kai H. Podocyte p53 Limits the Severity of Experimental Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):144-57. doi: 10.1681/ASN.2014111109. 査読有
5. Kai Y, Tsurekawa Y, Fukuda R, Omachi K, Piruzyan M, Okamoto Y, Motomura K, Suico MA, Shuto T, Kondo T, Araki E, Kai H. The effect of mild electrical stimulation with heat shock on diabetic KKAY mice. *Integr Mol Med.* 2015.; 3: DOI: 10.15761/IMM.1000190. 査読有
6. 甲斐 広文. 医療機器と薬学. **薬剤学** 2016;76(2):92-98. 査読有
7. 甲斐 広文, 近藤 龍也, 荒木 栄一. 最適化された微弱パルス電流と温熱の併用療法 (physical medicine)の基礎と臨床. **ファルマシア**.2015; 51(11):1033-1037. 査読有

[学会発表](計5件)

1. 甲斐 広文, 大町 紘平, Mary Ann Suico, 首藤 剛. タンパク質フォールディングは遺伝性腎炎アルポート症候群の新たな標的

- となり得るか. 第90回日本薬理学会年会. 2017.3.15-17. 長崎ブリックホール(長崎)
2. 甲斐 広文. 「遺伝性プロテインミスフォールディング病に対する創薬」第37回日本臨床薬理学会学術総会. 2016. 12.1-3. 米子コンベンションセンター(鳥取)
3. Tsurekawa Y, Kai Y, Morita M, Takada M, Moriuchi M, Okita G, Suico MA, Shuto T, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock suppresses skin hyperplasia in imiquimod-induced psoriasis model. 16th International Congress of Immunology (ICI2016). 2016.8.21-26. Merborne, Australia
4. H. Kai, T. Kondo, M.A. Suico, T. Shuto E. Araki. Beneficial effects and the molecular mechanisms of specific mild electrical stress as physical medicine. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015). 2015.10.16-17. Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan
5. 甲斐 広文. 最適化された微弱パルス電流と温熱の臨床応用. 日本薬学会第136年会. 2016.3.26-29. パシフィコ横浜(神奈川)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 炎症及び過剰免疫を抑制する装置、並びに炎症及び過剰免疫を抑制するための剤及び方法

発明者: 甲斐広文、首藤 剛、メリー アン スイコ、荒木栄一、近藤龍也

権利者: 国立大学法人 熊本大学

種類:

番号: PCT/JP2016/080443 (特願 2015-203033)

出願年月日: 2016年10月13日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://molmed730.org/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲斐 広文 (KAI, Hirofumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬学系)・教授
研究者番号 : 30194658

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :