

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21370

研究課題名(和文)ニコチン受容体修飾因子SLURP-1による乾癬の新規治療戦略

研究課題名(英文)A novel therapeutic strategy against psoriasis by using nicotinic acetylcholine receptor modulator, SLURP-1

研究代表者

森脇 康博(Moriwaki, Yasuhiro)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師

研究者番号：00392150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性掌蹠角化症の一種であるMal de Meleda病(MDM病)の原因遺伝子としてSLURP-1が同定されている。最近、SLURP-1欠損マウスがMDM病と同様の病態を引き起こすことが確認され、SLURP-1が皮膚の恒常性を維持する上で必要不可欠な分子であることが示された。一方で、SLURP-1の乾癬などのMDM病以外の皮膚疾患との関連については未だ明らかにされていなかった。我々は、乾癬モデルマウスを用いてSLURP-1が乾癬の病態形成に関与していることを明らかにした。また、SLURP-1が乾癬の病態増悪因子である黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：SLURP1 is the causal gene for Mal de Meleda (MDM), an autosomal recessive skin disorder characterized by diffuse palmoplantar keratoderma and transgressive keratosis. Recently, SLURP1-deficient mice show MDM-like symptoms such as severe palmoplantar keratoderma characterized by increased keratinocyte proliferation and water barrier defects. Although SLURP1 likely serves as an important proliferation/differentiation factor in keratinocytes, the possible relation between SLURP1 and other skin diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, has not been studied. In our experiment, we found SLURP1 expression is greatly increased within the skin lesions in a psoriatic mouse model. In addition, recombinant SLURP1 suppressed the growth of *S. aureus*, which is associated with disease severity in psoriasis. These results suggest that SLURP1 may contribute to the pathogenesis of psoriasis.

研究分野：神経免疫

キーワード：乾癬 SLURP-1 黄色ブドウ球菌 抗菌活性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、これまでにリンパ球が自らアセチルコリン(ACh)を産生し、自己および抗原提示細胞などのムスカリン性およびニコチン性 ACh 受容体(それぞれ、mAChR および nAChR)を刺激し、免疫機能の調節に関与しているとのアイデアを提示し、立証してきた。具体例としては、M<sub>1</sub>/M<sub>5</sub> mAChR ノックアウト(KO)および $\alpha 7$  nAChR-KO マウスを卵白アルブミン(OVA)で免疫する実験を行い、M<sub>1</sub>/M<sub>5</sub> mAChR は抗体産生の促進、他方 $\alpha 7$  nAChR は抗体産生の抑制に働いていることを証明した。また、免疫動物の脾臓から単離した単核白血球を OVA で刺激する実験により、M<sub>1</sub>/M<sub>5</sub> mAChR は炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  および IL-6 産生を促進する方向に働き、 $\alpha 7$  nAChR はこれらの炎症性サイトカイン産生を抑制することを発見した。我々が発見した、T細胞が産生した ACh がマクロファージに発現する $\alpha 7$  nAChR に作用して、炎症性サイトカイン産生を抑制するという知見は、最近、“cholinergic anti-inflammatory pathway”という概念にも用いられている。“cholinergic anti-inflammatory pathway”とは、迷走神経刺激により T 細胞が産生・遊離した ACh がマクロファージの $\alpha 7$  nAChR を刺激して、TNF- $\alpha$  の産生と遊離を抑制し炎症反応を和らげるという概念である。

(2) 最近、遺伝性掌蹠角化症の一種である Mal de Meleda 病(MDM 病)の原因遺伝子として、SLURP-1 が同定された。SLURP-1 は、nAChR の機能修飾能とヘビ毒類似構造を有する分泌型タンパクである。MDM 病はケラチノサイトの異常増殖により引き起こされる皮膚角化症であり、稀に精神遅滞を伴うことが知られている。また、MDM 病は症状として苔癬化を特徴とし、これには炎症反応が深く関与している。SLURP-1 は、その後の解析により、 $\alpha 7$  nAChR の Positive Allosteric Ligand (PAM)として機能することが報告された。一方で、我々は、組換え SLURP-1 タンパクの精製を行い、組換え体が単独で生理活性を有すること、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 などの産生抑制能を有することを明らかにしてきた。また、我々は、単核白血球や胸腺および脾臓などの免疫関連組織において SLURP-1 遺伝子が発現することや、Substance P (SP)やカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を含む一次感覚神経線維の一部における SLURP-1 蛋白質の発現を発見した。更に、リンパ節血管周囲や脾柱動脈周囲の神経にも SLURP-1 の発現を認めた。これらの結果は、迷走神経刺激が感覚神経線維から SLURP-1 を逆行性に遊離し、その SLURP-1 が、マクロファージの $\alpha 7$  nAChR に作用する事で TNF- $\alpha$  の産生と遊離の抑制に関与する可能性を示唆するものである。更に興味深い事に、最近、SLURP-1 欠損マウスが MDM 病と同様の病態を引き起こすことが確認され、SLURP-1 が皮

膚の恒常性を維持する上で必要不可欠な分子であることが示された。

## 2. 研究の目的

本研究では、皮膚恒常性維持必須因子であり抗炎症作用を有する SLURP-1 或は、SLURP-1 の標的受容体である $\alpha 7$  nAChR の選択的アゴニスト、GTS-21 が皮膚疾患の治療に用いることが出来るか、その可能性について検証することを目的とした。まず、SLURP-1 のファミリータンパクである SLURP-2 が尋常性乾癬の病変部位において発現が増加していることが報告されていることから、SLURP-1 の尋常性乾癬との関連性について検証した。次に、表皮角化細胞ならびにリンパ球に組換え SLURP-1 タンパク、GTS-21 を作用させた時の増殖や分化、アポトーシスならびに遺伝子発現への影響について解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 乾癬モデルマウスは、イミキモドクリーム (IMQ) を剃毛処理した背中に、4 日間塗布することで作製した。マウスの組織学的な検討は、皮膚の新鮮凍結切片を作製することで行った。

(2) NHEK 細胞を各種炎症性サイトカインおよび組換え SLURP-1 タンパクで刺激を行い、SLURP-1 ならびに皮膚バリア機能関連分の発現変動を real-time PCR ならびに western blot 法を用いて解析した。

(3) 組換え SLURP-1 タンパクの大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を測定した。黄色ブドウ球菌に対しては、 $\alpha$ -Defensin2 を、大腸菌に対しては Magainin を陽性コントロールとして用いた。

(4) マウス脾臓より調整した T 細胞を試験管内で、Th1、Th2 および T-reg 細胞に分化させた。分化誘導時に GTS-21 を作用させ、その影響について FACS を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) **IMQ 塗布による乾癬モデルにおける SLURP-1 の発現変化**：IMQ を背中に塗布されたマウスでは紅斑や鱗屑、角質の肥厚といった乾癬の症状が確認され、その病態変化に伴い SLURP-1 は mRNA およびタンパク質レベルの両方において有意に発現増加が確認された。免疫組織染色の結果より、SLURP-1 は特に有棘層から顆粒層にかけて発現が亢進していることが確認された。

(2) **SLURP-1 発現誘導因子の同定**：正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocyte : NHEK) を用いて SLURP-1 の発現誘導因子の探索を試みた。乾癬では、IL-17、IL-22、IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインの発現が亢進していることが知られている。そこ

で、NHEK を様々な炎症性サイトカインで刺激を行った処、IL-22 のみにおいて SLURP-1 の発現増加が確認された。

**(3) SLURP-1 は乾癬の病態増悪因子である黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する：**IL-22 はケラチノサイトの増殖や上皮の肥厚を制御するだけでなく、Defensin などの抗菌タンパク質の産生を誘導することが報告されている。そこで 組換え SLURP-1 タンパクの抗菌活性を検定した処、乾癬やアトピー性皮膚炎などの病態増悪因子である黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有することが明らかとなった。

**(4) SLURP-1 の NHEK 細胞におよぼす影響：**組換え SLURP-1 タンパクを NHEK 細胞に作用した際、皮膚バリア機能に関連する分子の発現を有意に抑制することを見出した。MDM 病では、苔癬化が観察され、これは角質層の剥離が正常通りに行われないことが一因である。尋常性乾癬では、SLURP-1 の発現が有意に上昇していることから、角質層の剥離が亢進し、バリア機能障害を来す一因となっている可能性が示唆された。

**(5) GTS-21 は T-reg 分化を誘導する：**マウス脾臓から調整した Th0 細胞を Th1, Th2, T-reg 細胞に分化させる実験系を用い、先ず始めに SLURP-1 の標的受容体である  $\alpha 7nAChR$  の選択的アゴニストである GTS-21 の効果について検討を行った。結果、GTS-21 は有意に Th2 および T-reg 細胞への分化を促進することを明らかにした。一方で、 $\alpha 7nAChR$  欠損マウス由来の T 細胞では、GTS-21 の分化促進効果は見られなかった。Th17 細胞が乾癬の発症に深く関与していることが報告されている。また、Th17 細胞の活性化が T-reg 細胞によって抑制されることも報告されている。以上の結果は、SLURP-1 は T-reg 細胞の分化を誘導することで、Th17 細胞の活性化を抑制し、乾癬の病態悪化を食い止めている可能性が示唆された。

**(6) まとめ：**本研究により、SLURP-1 が新たに MDM 病以外の皮膚疾患、尋常性乾癬の病態形成に関与している可能性が示された。また、SLURP-1 は乾癬やアトピー性皮膚炎などの病態増悪因子である黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有することが明らかとなった。更に、SLURP-1 は T-reg 細胞の分化を誘導することで、乾癬の病態形成に深く関与していると報告されている。Th17 細胞の活性化を抑制し、病態悪化を食い止めている可能性が示唆された。一方で、SLURP-1 はケラチノサイトのバリア機能に関連する分子の発現を有意に抑制してしまい、結果、角質層の剥離を亢進させバリア機能障害を来す一因となっている可能性が考えられた。ケラチノサイトに対する SLURP-1 の作用が  $\alpha 7nAChR$  を

介しているかは定かでは無く、仮に  $\alpha 7nAChR$  以外の受容体を介しているのであれば、その受容体に対する阻害薬が新たな乾癬の治療薬候補になると考えられる。

#### 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 8 件)

1. Tsuji, S., Washimi, K., Kageyama, T., Yamashita, M., Yoshihara, M., Matsuura, R., Yokose, T., Kameda, Y., Hayashi, H., Morohoshi, T., Tsuura, Y., Yusa, T., Sato, T., Togayachi, A., Narimatsu, H., Nagasaki, T., Nakamoto, K., Moriwaki, Y., Misawa, H., Hiroshima, K., Miyagi, Y. and Imai, K. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. *Sci. Rep.*, 7, 45768 (2017) doi: 10.1038/srep45768 (査読有)
2. Funakoshi-Tago, M., Miyagawa, Y., Ueda, F., Mashino, T., Moriwaki, Y., Tago, K., Kasahara, T. and Tamura, H. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Int. Immunopharmacol.*, 40, 254-264 (2016) doi: 10.1016/j.intimp.2016.08.031 (査読有)
3. Misawa, H., Inomata, D., Kikuchi, M., Maruyama, S., Moriwaki, Y., Okuda, T., Nukina, N. and Yamanaka, T. Reappraisal of VAcT-Cre: Preference in slow motor neurons innervating type I or IIa muscle fibers. *Genesis*, 54, 568-572 (2016) doi: 10.1002/dvg.22979 (査読有)
4. Morisaki, Y., Niikura, M., Watanabe, M., Onishi, K., Tanabe, S., Moriwaki, Y., Okuda, T., Ohara, S., Murayama, S., Takao, M., Uchida, S., Yamanaka, K. and Misawa, H. Selective Expression of Osteopontin in ALS-resistant Motor Neurons is a Critical Determinant of Late Phase Neurodegeneration Mediated by Matrix Metalloproteinase-9. *Sci. Rep.*, 6, 27354 (2016) doi: 10.1038/srep27354 (査読有)
5. 森脇康博. ニコチン受容体修飾因子 SLURP-1 による乾癬の新規治療戦略. *臨床免疫・アレルギー科*, 66, 45-49 (2016) (査読無)
6. Moriwaki, Y., Takada, K., Nagasaki, T., Kubo, N., Ishii, T., Kose, K., Kageyama, T., Tsuji, S., Kawashima, K. and Misawa, H. IL-22/STAT3-Induced Increases in SLURP1

Expression within Psoriatic Lesions Exerts Antimicrobial Effects against Staphylococcus aureus. PLoS One, 10, e0140750 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0140750 ( 査読有 )

7. Moriwaki, Y., Takada, K., Tsuji, S., Kawashima, K. and Misawa, H. Transcriptional regulation of SLURP2, a psoriasis-associated gene, is under control of IL-22 in the skin: A special reference to the nested gene LYNX1. Int. Immunopharmacol., 29, 71-75 (2015) doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.030 ( 査読有 )
8. Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H. and Horiguchi, K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$  nAChRs. Int. Immunopharmacol., 29, 127-134 (2015) doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.015 ( 査読有 )

[学会発表](計 8件)

1. 長崎俊憲, 森脇康博, 三澤日出巳, 辻祥太郎. 中皮腫マーカー蛋白質, インテレクチン-1 と 1, 2-diol の結合様式の解析. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎パブリックホール (長崎県, 長崎市) 2017/3/15
2. Kawashima K, Mashimo T, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S. Role for  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in naïve T cell differentiation into regulatory T cell. The 46th Annual Meeting, Society for Neuroscienc, San Diego (USA) 2016/11/15
3. 森崎祐太, 渡邊みずほ, 森脇康博, 山中宏二, 三澤日出巳. ALS における運動神経サブタイプ選択的脆弱性を規定するメカニズム. 第 89 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市) 2016/3/10
4. 久保那月, 森脇康博, 杉野太郎, 宮沢祐太, 加藤総夫, 三澤日出巳. 内在性神経毒素類似タンパク質 Ly6H がニコチン受容体を修飾する. 第 89 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市) 2016/3/10
5. Moriwaki Y, Ohno Y, Ishii T, Takamura Y, Sango K, Watabe K, Misawa H. SIMPLE, a causative gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 1C, participates in protein trafficking in trans-Golgi network and recycling endosome. The 45th Annual Meeting, Society for Neuroscienc, Chicago (USA) 2015/10/19
6. K Morisaki Y, Tsubota A, Watanabe M. Moriwaki Y, Yamanaka K, Misawa H. Roles of osteopontin and matrix metalloproteinase-9 in the subtype-selective motor neuron

vulnerability in ALS. The 45th Annual Meeting, Society for Neuroscienc, Chicago (USA) 2015/10/18

7. 小峯起, 山下博史, 藤森典子, 森脇康博, 三澤日出巳, 山中宏二. ALS モデルマウスにおける自然免疫 TRIF 経路の役割. 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場 (兵庫県, 神戸市) 2015/7/30
8. 森崎祐太, 坪田充司, 森脇康博, 山中宏二, 三澤日出巳. 運動ニューロンのサブタイプ選択的脆弱性におけるオステオポンチンとマトリックスメタロプロテアーゼ-9 の役割. 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場 (兵庫県, 神戸市) 2015/7/28

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
森脇 康博 (MORIWAKI, Yasuhiro)  
慶應義塾大学・薬学部・専任講師  
研究者番号: 00392150

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
辻 祥太郎 (TSUJI, Shoutaro)