

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10130

研究課題名(和文)好中球機能からみた炎症性皮膚疾患の病態解明とその治療法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology of inflammatory skin disease from the viewpoint of neutrophil function and establishment of its treatment

研究代表者

東 裕子(Higashi, Yuko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：00381179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好中球性皮膚疾患患者の顆粒球吸着除去療法前後の血清を用いて、microRNA(miRNA)の網羅的解析を行った。特に発現量の変化が大きかった数種類のmiRNAを選択し、発現量を測定したところ、コントロール群に比較して疾患群は有意に高値を呈し、治療後に減少する傾向がみられた。ヒト前骨髄系白血病細胞株をall-trans retinoic acidで刺激したところ、細胞は、形態的に好中球様細胞に変化し、好中球表面活性化マーカーの発現を認めた。この変化過程で、選択したmiRNAの発現量が増加していた。これらのmiRNAは好中球性皮膚疾患の病勢マーカーとして用いることができる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球性皮膚疾患のほとんどが原因不明の疾患であり、既存の治療に抵抗を示す難治例も多い。本研究で、好中球性皮膚疾患で高値を示すmiRNAを探りだし、これらが治療により減少することを見出した。また、好中球の活性化とともにmiRNAの発現も増加することが示唆された。これらは好中球性皮膚疾患の病勢マーカーとして用いられる可能性とmiRNAを標的とする治療法の開発へつながる新たな展開も伺える成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis of microRNAs(miRNAs) was performed using sera before and after granulocyte and monocyte adsorption apheresis for patients with neutrophilic skin disease. Several miRNAs significantly increased in patients compared to controls. The expression of these miRNAs decreased after apheresis, suggesting that these miRNAs might be involved in the pathogenesis of neutrophilic skin disease. When the human promyelocytic leukemia cell lines, including HL60, were stimulated with all-trans retinoic acid, the cells were morphologically changed to neutrophil-like cells. The expression of selected miRNAs increased during the differentiation of these neutrophil-like cells. Moreover, the role of these miRNAs in regulating proliferation of cultured keratinocytes was proved. These data suggested that these miRNAs could be used as neutrophilic skin disease marker.

研究分野：好中球性皮膚疾患、乾癬

キーワード：microRNA 好中球 乾癬 顆粒球吸着除去療法

## 1. 研究開始当初の背景

好中球は一般に感染組織に遊走し活性化され、この活性化好中球は(1)細菌の貪食、(2)活性酸素の産生、(3)殺菌の機序で生体防御をしている。近年、活性化した好中球は核内クロマチンを細胞外に放出する多数の報告がなされ (Science, 2004)、このクロマチン網 = neutrophil extracellular traps (NETs)形成は好中球主体の病態への関与がクローズアップされている。細菌感染では、最近の局所捕捉、殺菌効果増強を通じて感染防御の中心的役割を果たし、NETsは血小板捕捉による血栓形成の助長、がん転移や自己免疫疾患への関与などの働きがある。このNET形成の過程で、多くの遺伝子発現の調節が行われており、様々な炎症性サイトカイン、ヒストン、核酸(DNA、RNA)などが放出されている。

微生物の侵入とは関係なく、好中球が無菌的に活性化され皮膚組織に浸潤・集積する病態があり、壊疽性膿皮症、ベーチェット病、スウィート病、隆起性持久性紅斑などいわゆる好中球性皮膚疾患、尋常性乾癬、膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症、関節症性乾癬、膿疱症関連骨関節症など乾癬とその類縁疾患群がこの範疇に含まれる。免疫細胞や、炎症メディエーターなどが病態に関連していることは、既知のことだが、浸潤している好中球の機能・役割については依然、不明な点が多い。好中球の免疫応答は自然免疫で、Toll-like receptors (TLRs) などパターン認識受容体 (PRRs) を介する異物認識と、サイトカイン産生、活性酸素産生による異物排除が主体である。異物には、外来性の細菌 (PAMPs) 以外に、組織障害に伴い放出される内因性物質 (DAMPs) が存在する。好中球性皮膚症は無菌性ゆえに、DAMPs の関与が疑われるが、未だ世界共通の認識はない。

応募者は、好中球浸潤を主体とする皮膚疾患の治療として、活性化好中球を特異的に排除するカラムを用いた顆粒球吸着除去療法を、世界に先駆けて臨床応用し、皮膚病変の炎症緩和、病態の軽減に良好な成果を報告してきた。

顆粒球吸着除去による効果は迅速かつ劇的であるが、患者の全身的負担は否めない。また、代替の治療として、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤、生物学的製剤などが多用されているが、根治的治療は確立していない。

## 2. 研究の目的

炎症性皮膚疾患には無菌的に活性化された好中球が皮膚に浸潤してくる疾患群 (好中球性皮膚疾患) があり、それらは、免疫機構の異常がその原因と考えられるが、いまだその病態は不明である。本研究では、これら疾患の治療効果をさらに向上させるため、好中球性皮膚疾患患者の血清中の microRNA (miRNA) を測定検討することで、miRNA を標的とした新たな治療への挑戦を試みた。

好中球における miRNA の機能と役割を検討することで、活性化した好中球の皮膚浸潤と局所炎症に関連する miRNA を模索し、これまで皮膚疾患と miRNA の研究は少なく、好中球の miRNA の知見を皮膚炎症性疾患の分野に展開することで、好中球がもたらす炎症性病態の解明とその発症メカニズムに基づく好中球性皮膚疾患の新しい治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

顆粒球吸着療法を行った乾癬性関節炎の患者 3 名の治療前後の血清と健常人コントロール 3 名の血清を用い、Human miRNA microarray (Agilent 社) を使用して 3 種類のプロファイリングを行って発現の比較を行った。

この解析結果から、治療前に比べて治療後で減少し、かつコントロール群より高値であった miRNA を複数個選択し研究を進めた。

得られたいくつかの miRNA について、文献的な考察も加えて、好中球性皮膚疾患患者の血清を用い、これらの miRNA の発現を real time PCR で検討した。

ヒト前骨髄系白血病細胞株 (HL-60) を用いて in vitro での実験をおこなった。All-trans retinoic acid (ATRA) の刺激で HL-60 が好中球様細胞に分化しているか確認した。刺激 4 日後の細胞を H E 染色し、形態を観察した。またフローサイトメトリーで CD 11b、CD 18 の表面マーカーを測定した。

この好中球様細胞での miRNA の発現を real time PCR で観察した。また、臨床上演用されている炎症性サイトカインで細胞を刺激し、miRNA 発現の変化を同様に測定した。

ケラチノサイトと好中球が産生する miRNA との相関を観察するために、不死化角化細胞株 HaCaT 細胞を用いた。miRNA 投与による HaCaT 細胞の増殖を MTT 法で測定した。

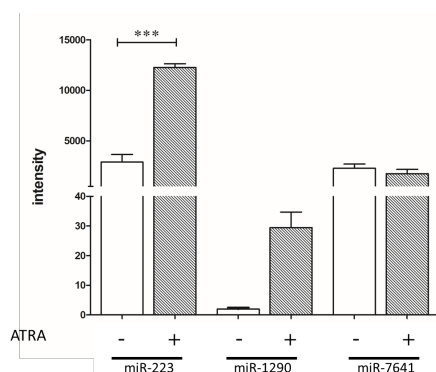
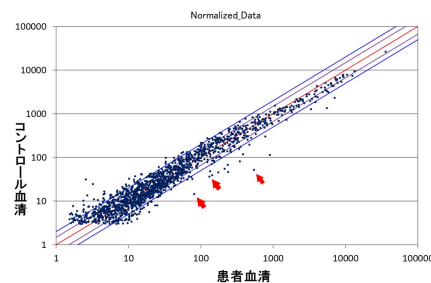
## 4. 研究成果

### (1) miRNA プロファイリング

倫理委員会で承認されたプロトコールにしたがって、好中球性皮膚疾患患者の顆粒球吸着除去療法 (GMA) 前後と、健常者 (コントロール群) の血清を用いて、microRNA (miRNA) の網羅的解析を行った。解析に用いた約 2500 種類の miRNA の中で、およそ 500 種類の miRNA で発現量に有意差を認めた。

この一群の miRNA の中から、特に発現量の変化が大きい数種類の miRNA を選択して、それぞれ real time RT-PCR を用いて発現量を測定した (右図、赤 ➡ の miRNA3 種類)。

右図のように、miR-223 と miR-1290 はコントロール群に比較して疾患群は有意に高値を呈し、疾患の治療後に減少する傾向がみられた。この中で好中球成熟に重要と考えられる miR-223 の発現は比較的大きな変動がみられた。miR-223 は好中球の分化に関連する可能性を過去の文献で示唆されており、今回の治療による変化が、好中球の動員によるものか、それとも炎症刺激に関わる変化なのか、がポイントと考えられた。



### (2) miRNA の機能解析

前述の結果より、未分化の培養細胞から好中球への分化を試みた。in vitro の培養系実験で、ヒト前骨髄系白血病細胞株の HL-60 を all-trans retinoic acid (ATRA) で刺激したところ、細胞は、形態的に好中球様細胞に変化し、好中球表面活性化マーカーである CD11b と CD18 の発現を認めた。ATRA で刺激した HL-60 細胞では、miR-223、miR-1290 の発現が亢進していた。この現象から、好中球の分化成熟にこれらの miRNA が関与している可能性が示唆された。

活性化好中球で、上昇していたこれら 2 つの miRNA についてさらに機能的な側面から検討を行った。临床上、様々なサイトカインの関与が報告されている中で、特に IL-17, TNF, IL-1, IL-23 などに注目し、これらのサイトカインにより、3 つの miRNA の発現が変化するかを観察した。IL-17 刺激で miR-223 は、発現量が有意に増加した。miR-1290 についても上昇の傾向が見られた。TNF や IL-1, IL-23 では、有意な変化はなかった。これらのデータから、IL-17 は疾患の病態の中心にあると考えられているが、その下流にあるこれら miRNA も何らかの機能的な役割を持っていると考えられた。

最後に、その機能的な役割を調べるために皮膚のケラチノサイトに対するこれら miRNA の役割を培養系で検討した。2 つの miRNA のケラチノサイトに対する増殖能について 1 - 4 日の培養で検討したところケラチノサイトの増殖は、miR-1290 の投与で亢進し、miR-223 では抑制されることがわかった。

### (3) まとめ

本研究で、好中球性皮膚疾患で高値を示す miRNA を探りだし、これらが治療により減少することを見出した。また、好中球の活性化とともに miRNA の発現も増加することが示唆された。これらは好中球性皮膚疾患の病勢マーカーとして用いられる可能性と miRNA を標的とする治療法の開発へつながらる新たな展開も伺える成果であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Higashi Y, Yamakuchi M, Fukushige T, Ibusuki A, Hashiguchi T, Kanekura T. High-fat diet exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. peer reviewed, *Exp Dermatol*. 2018; 27: 178-184. DOI: 10.1111/exd.13484.

Aryal B, Yamakuchi M, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Gejima K, Komokata T, Hashiguchi T, Imoto Y. Deciphering Platelet Kinetics in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Hepatocellular Carcinoma. peer reviewed, *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 2018: 9142672. DOI: 10.1155/2018/9142672.

Yamakuchi M, Hashiguchi T. Endothelial Cell Aging: How miRNAs Contribute? *J Clin Med*. 2018; 7. pii: E170. DOI: 10.3390/jcm7070170.

Arimura A, Fujii K, Ibusuki A, Hatanaka M, Sakanoue M, Higashi Y, Kanekura T. Granulocyte and monocyte adsorption apheresis for palmo-plantar pustulosis with

extra-palmoplantar lesions and pustulotic arthro-osteitis. peer reviewed, J Dermatol. 2018; 45:e167-e168. DOI: 10.1111/1346-8138.14191.

Takagi K, Yamakuchi M, Matsuyama T, Kondo K, Uchida A, Misono S, Hashiguchi T, Inoue H. IL-13 enhances mesenchymal transition of pulmonary artery endothelial cells via down-regulation of miR-424/503 in vitro. peer reviewed, Cell Signal. 2018; 42: 270-280. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.10.019.

Tanaka K, Salunya T, Motomiya Y, Motomiya Y, Oyama Y, Yamakuchi M, Maruyama I. Decreased Expression of Thrombomodulin in Endothelial Cells by Fibroblast Growth Factor-23/ -Klotho. peer reviewed, Ther Apher Dial. 2017; 21: 395-404. DOI: 10.1111/1744-9987.12524.

Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Kitazono I, Koriyama C, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. Post-Resection Exhaustion of Intra-Platelet Serotonin: Also an Indicator of Early Hepatocellular Carcinoma Recurrence? peer reviewed, J Cancer. 2017; 8: 3984-3991. DOI: 10.7150/jca.20971.

Sakanoue M, Higashi Y, Kanekura T. Inhibition of Inflammatory Cytokines and Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells by the Effects of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis. peer reviewed, Ther Apher Dial. 2017; 21: 628-634. doi: 10.1111/1744-9987.12580.

Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. peer reviewed, Biochem Biophys Res Commun. 2017; 483: 803-809. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.096.

Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans. peer reviewed, PLoS One. 2016; 11: e0150446. DOI: 10.1371/journal.pone.0150446.

Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. peer reviewed, Obesity. 2016; 24: 1913-21. DOI: 10.1002/oby.21549.

#### [学会発表](計10件)

##### 国際学会

Munekazu Yamakuchi, Koichi Takagi, Takahiro Matsuyama, Kiyotaka Kondo, Akifumi Uchida, Shunsuke Misono, Kazunori Takenouchi, Yoko Oyama, Hiromasa Inoue, Teruto Hashiguchi. The role of IL-13 in regulating pulmonary artery endothelial cell migration. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, 2018

Yuko Higashi, Munekazu Yamakuchi, Tomoko Fukushige, Teruto Hashiguchi, Takuro Kanekura High fat diet exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion by inducing IL-17A and inflammasomes in mice. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference, 2016

Munekazu Yamakuchi. Integration of All Laboratory Data System for Supporting the Analysis of Target Pathological Conditions in the Hospital. The 10th Cherry Blossom Symposium. April 22, 2016, Seoul, Korea.

##### 国内学会

東裕子, 山口宗一, 坂ノ上正直, 福重智子, 金蔵拓郎 好中球性皮膚疾患の病勢マーカーとしてのmicroRNAの検索 第48回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会、2018年

東裕子 乾癬性関節炎の新しい治療-顆粒球吸着除去療法- 第117回日本皮膚科学会総会、2018年

郡山豊泰, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 政元いずみ, 橋口照人 ヒト巨核芽球細胞株における高血糖時のGLP-1受容体発現と機能の解析 臨床検査医学会、2018年

アリアルビベック, 清水利昭, 門野潤, 風呂井彰, 槐島健太郎, 菰方輝夫, 郡山千早, 山口宗一, 橋口照人, 井本浩 Depleted PDGF-BB Kinetic in Post-Resection HCC Recurrence- A Risk Factor or Merely an Indicator? 臨床検査医学会、2018年

東裕子 関節症性乾癬のアフェレシス治療 第38回日本アフェレシス学会学術大会、2017年

Yuko Higashi, Munekazu Yamakuchi, Tomoko Fukushige, Teruto Hashiguchi, Takuro Kanekura High fat diet exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion by inducing IL-17A and inflammasomes in mice 日本研究皮膚科学会 第41回年次学術大会・

総会、2016年

山口宗一 miRNAによる自然免疫制御機構の解明 第63回日本臨床検査医学会総会 学術  
推進プロジェクト研究成果 最終報告シンポジウム 2016年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山口 宗一

ローマ字氏名：(YAMAKUCHI, munekazu)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20325814

### (2) 研究協力者

研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。