

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08282

研究課題名(和文) 乾癬の炎症におけるグリコサミノグリカンの役割の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the role of glycosaminoglycan in cutaneous inflammation of psoriasis and development of new therapies

研究代表者

武藤 潤 (Muto, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30338131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚に多量に存在し、細胞外マトリックスを構成する主なグリコサミノグリカンであるヒアルロン酸は皮膚の自然免疫における炎症、特に樹状細胞の機能調節において非常に重要な役割を担っていることが知られている。本研究ではヒアルロン酸分解が、乾癬の病態に及ぼす影響について研究した。ヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスでのイミキモド誘発性乾癬モデルを用いて、皮膚の炎症におけるヒアルロン酸分解酵素の影響、樹状細胞を用いた実験により、ヒアルロン酸分解の乾癬の病態への関与について検討した。今後、ヒアルロン酸分解をターゲットとした新規治療法を開発して臨床応用へと展開したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は代表的な炎症性角化症だが根本的な原因は不明である。今回、我々は乾癬の皮膚病変部においてヒアルロン酸が高発現して沈着していることを確認した。乾癬初期に重要な役割を果たす樹状細胞を用いた実験では、ヒアルロン酸処理で乾癬の初期の炎症を司るサイトカインを上昇させることを明らかにした。また、マウスを用いた実験で、ヒアルロン酸分解が、乾癬モデルマウスの炎症を有意に抑制することがわかった。以上より、ヒアルロン酸の分解により乾癬の炎症を修飾することができることが分かったため、今後ヒアルロン酸分解をターゲットとした新規治療法を開発して臨床応用へと展開したい。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronic acid, which is abundant in the skin and is the main glycosaminoglycan that constitutes the extracellular matrix, plays a crucial role in inflammation in the skin's innate immunity, especially in the regulation of dendritic cell function. In this study, we investigated the effect of hyaluronan degradation on the pathophysiology of psoriasis. Using a model of imiquimod-induced psoriasis using hyaluronidase 1 overexpressing mice, the effects of hyaluronan degrading enzyme on skin inflammation were investigated. Furthermore, the involvement of hyaluronan degradation in the pathophysiology of psoriasis were investigated by in vitro experiments using dendritic cells. In the future, we will develop a new treatment method targeting hyaluronic acid decomposition and create it for clinical application.

研究分野：炎症性皮膚疾患

キーワード：乾癬 ヒアルロン酸 自然免疫 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乾癬は代表的な炎症性角化症で、角化細胞のターンオーバーの亢進 (正常では 45 日だが 4-7 日と短縮している)と表皮の炎症を認める疾患であるが、根本的な原因は不明である。遺伝的素因とともに物理的刺激や感染症といった誘因が外的要因として存在する。免疫学的にも従来は TNF $\alpha$  などの Th1 優位の免疫反応が原因として考えられていたが、近年 IL-17 など Th17 優位の免疫反応が病変部で生じており病態形成に重要であるということが分かってきた。健常皮膚部に摩擦や日光などの刺激が加わると病変を生じるケプネル現象が乾癬の特徴とされるが、これは外的刺激による自然免疫の賦活化によるものと考えられ、乾癬の病態形成における自然免疫の重要性を表している。これは、Toll-like receptor 7 のリガンドであるイミキモドを複数回外用することでマウス皮膚に乾癬様皮膚炎を生じることからも理解できる。また、皮膚の樹状細胞がイミキモドによる乾癬様皮疹の形成に必要なことも知られている。

ヒアルロン酸は皮膚の細胞外基質を構成する主な糖鎖である。ヒアルロン酸合成酵素により合成され、ヒアルロン酸分解酵素 (ヒアルロニダーゼ)により様々なサイズに分解される。親水性が強く、水分保持や関節での衝撃吸収などの役割を主なものと考えられてきたが、近年、自然免疫における役割が注目されてきている。自然免疫においては、微生物由来の分子が Toll-like receptors を刺激し免疫を賦活化するとされるが、近年ヒアルロン酸などの宿主由来の生体分子(Damage-associated molecular patterns, DAMPs)も同様の役割を担っていることが明らかになってきている。これまで、申請者らはヒアルロン酸およびその分解産物が Damage-associated molecular patterns (DAMPs)であるとの仮説のもと、研究を重ねてきた。申請者らはヒアルロン酸の分解産物であるオリゴ糖型低分子ヒアルロン酸が皮膚の表皮および真皮の樹状細胞を活性化し、その所属リンパ節への遊走を促進すること、その分解が接触皮膚炎反応に重大な影響を及ぼす事を明らかにした(Muto et al., 2014)。また、申請者らのグループは、分解されたヒアルロン酸が炎症反応に関与することを報告した(Kim et al., 2013; Muto et al., 2009)。さらに、申請者らのグループはハプテン反復塗布によるアトピー性皮膚炎病態モデルマウスにおいて、LL37 によるアレルギー反応抑制のターゲットがヒアルロン酸であることも報告した(Morioka et al., 2008)。最近のトピックだが、LL37 は乾癬皮膚病変における樹状細胞により抗原提示されている重要な分子として報告されている(Fuentes-Duculan et al., 2017)。

このように、ヒアルロン酸およびその分解産物は自然免疫に於いて非常に重要な役割を担っていることが知られている。しかしながらサイズの小さなものと大きなものでその作用が異なり、場合によっては逆になることもあるため、ヒアルロン酸の *in vivo* における生理的作用はその分解を考慮すると非常に複雑であり、未だ解明されていない。

‘ヒアルロン酸調節が乾癬病態形成に影響を与えるか?’に関する基礎研究を完成しヒアルロン酸分解または合成をターゲットとした新しい治療法への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

## 2. 研究の目的

皮膚に多量に存在し、その主な細胞外マトリックスであるヒアルロン酸は皮膚の自然免疫において重要な役割を担っているが、本研究では、ヒアルロン酸の動態が乾癬の病態におよぼす影響について解明し、さらにこれを新規治療法として臨床応用へ展開するための研究を行うことが目的である。

## 3. 研究の方法

ヒアルロニダーゼ 1 過剰発現マウスはカリフォルニア大学サンディエゴ校皮膚科にて我々のグループが作成したマウス精子を輸送し、日本にて再度作成して繁殖した。これら及び WT マ

ウスを用いてイミキモド反復塗布による乾癬モデルマウスの実験を施行し、ヒアルロン酸分解が乾癬類似病態発症に与える影響を検討した。この系ではタモキシフェン誘導性ヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスも作成した。タモキシフェンにより遺伝子発現調節のタイミングを調節し、イミキモド反復塗布による乾癬類似病態におけるヒアルロン酸分解による炎症反応調節機構をより正確に *in vivo* で検討した。また、乾癬病変部及び健常人正常部におけるヒアルロン酸の発現につき、免疫組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

乾癬病変部において、健常人非病変部皮膚と比較してヒアルロン酸の発現が亢進していた(図1)。特に、病理組織学的に表皮突起が反応性変化により規則的に延長を示す部でヒアルロン酸の発現が増強していた。また、好中球の集塊がみられている部でもヒアルロン酸の沈着が著明であった。以上より乾癬の病変部においてはヒアルロン酸合成が亢進し、特に病理学的に表皮肥厚を呈する部位でそれらが沈着していることがわかった。

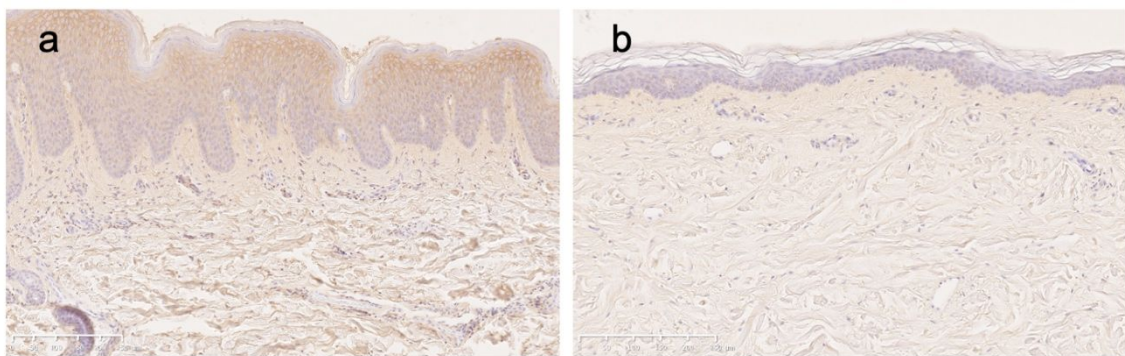


図 1. 乾癬病変部(a)では健常人非病変部皮膚(b)と比較してヒアルロン酸の発現が増強する。

次にヒアルロン酸の分解が乾癬の病態におよぼす影響について検討するため、上述のヒアルロニダーゼ1過剰発現マウスを用いた乾癬モデルマウスを作成した。ヒアルロニダーゼ1を過剰発現させたマウスに5% イミキモドクリームを反復塗布した。図2のように、マウス耳介の厚みを計測したところヒアルロニダーゼ過剰発現マウスにおいて、コントロール群のマウスと比較して、有意に耳介の厚さが低下した。

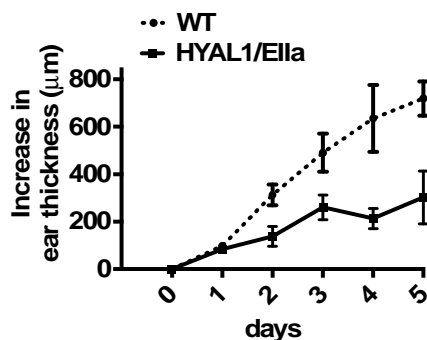


図 2. ヒアルロニダーゼ過剰発現マウスに於ける乾癬モデルでは耳介の厚みが有意に減少した。

さらに、ヒアルロン酸の分解が乾癬の病態におよぼす動的な影響について詳細に検討するため、タモキシフェンにより遺伝子発現調節のタイミングを調節することで、イミキモド反復塗布による乾癬類似病態におけるヒアルロン酸分解による炎症反応調節機構をより正確に *in vivo* で検討した。タモキシフェン投与により皮膚においてヒアルロニダーゼ1を過剰発現させたのちに5% イミキモドクリームを反復塗布した。マウス耳介の厚みを計測したところヒアルロニダ

ーゼ過剰発現マウスにおいてもコントロール群のマウスと比較して、有意に耳介の厚さが低下した。

我々はヒアルロン酸の分解産物であるオリゴ糖型低分子ヒアルロン酸が皮膚の表皮および真皮の樹状細胞を活性化し、その所属リンパ節への遊走を促進することをこれまでに報告している (Muto et al., 2014)。乾癬病変部の炎症においては樹状細胞が重要な役割を担っているため、乾癬モデルマウスに於いてもヒアルロン酸分解が樹状細胞へ何らかの影響を与えていることが推測されたため、マウス樹状細胞を用いて *in vitro* の実験を行った。ヒアルロン酸で処理したマウス樹状細胞をイミキモドで刺激したところ、乾癬の皮膚における炎症反応に於いて重要な役割を果たすとされるサイトカイン A は高分子ヒアルロン酸 (L-HA) 処理及び低分子ヒアルロン酸 (O-HA) 処理にて有意に発現上昇していることが分かった。

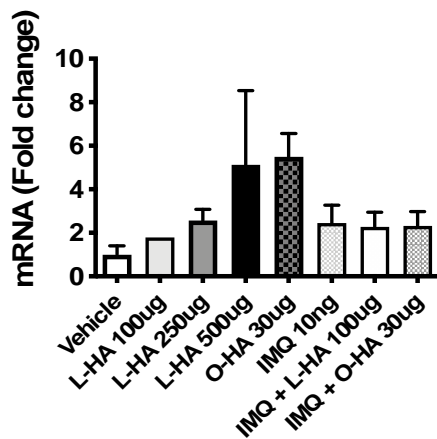


図 3. 樹状細胞は各種ヒアルロン酸処理でサイトカイン A の mRNA 発現が有意に上昇した。

しかしながら、イミキモドの受容体である TLR7 はイミキモド処理で mRNA 発現量は低下傾向であったが、各種ヒアルロン酸処理では特に有意な変化はみられなかった。

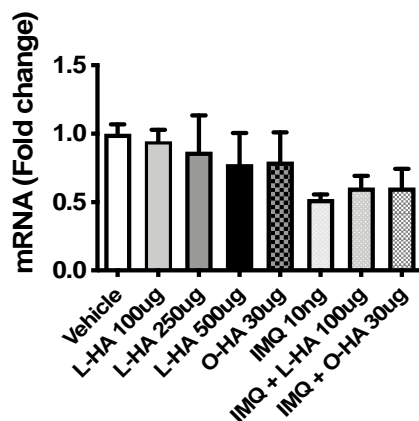


図 4. 樹状細胞は各種ヒアルロン酸処理でも TLR7 の mRNA 発現に変化はみられなかった。

また、以下のように皮膚の炎症反応に重要な役割を果たすサイトカイン B は、イミキモド処理にて上昇したが、同時に低分子ヒアルロン酸及び高分子ヒアルロン酸でも処理すると有意に低下させる作用があることが明らかになった。

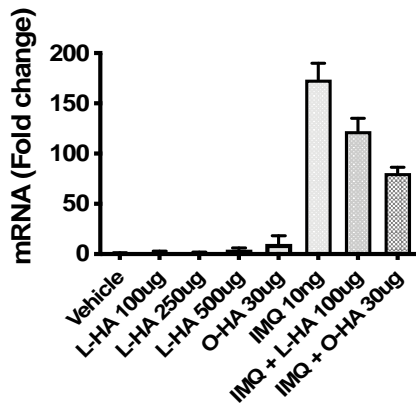


図 5. 樹状細胞の IMQ と各種ヒアルロン酸処理でサイトカイン B の mRNA 発現は低下した。

さらに、この機序を解明するために、マウス樹状細胞を各種ヒアルロン酸で処理した後に次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を施行した。これら樹状細胞の遺伝子発現を網羅的に調べたところ、ある一群の免疫細胞を増強することのできる分子がヒアルロン酸処理後に高発現していることが明らかとなっている。これについても qPCR にて確認している。これらの結果からヒアルロン酸分解は、乾癬における病変部の炎症と関連があることが示唆された。

現在、ヒアルロン酸レセプターである TLR をノックアウトしたヒアルロニダーゼ過剰発現マウスを作成中であり、このマウスにイミキモドを反復塗布することで乾癬モデルマウスを作成し、ヒアルロン酸による乾癬炎症の修飾作用について、さらに明らかにしてゆく。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Muto J, Sayama K, Gallo RL, Kimata K. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. J Dermatol Sci. 2019. April. Doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.01.009. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Muto J, Watanabe D, Gallo RL, Sayama K. Cutaneous degradation of hyaluronan induces suppressive effect to chronic allergic dermatitis. 24<sup>th</sup> World Congress of Dermatology. 2019. 6. 10-15, Milan, Italy

〔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：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Muto Jun, Sayama Koji, Gallo Richard L., Kimata Koji	4. 巻 94
2. 論文標題 Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 190 ~ 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2019.01.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Muto, Daisuke Watanabe, Richard L. Gallo, Koji Sayama
2. 発表標題 Cutaneous degradation of hyaluronan induces suppressive effect to chronic allergic dermatitis.
3. 学会等名 24rd World Congress of Dermatology（第24回世界皮膚科学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------