

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591235

研究課題名（和文） 皮膚自然免疫機構からみた掌蹠膿疱症の発症機序に関する研究

研究課題名（英文） The role of skin innate immune system in the pathogenesis of palmoplantar pustulosis

研究代表者

村上 正基 (Murakami Masamoto)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20278302

研究成果の概要（和文）：

掌蹠膿疱症の病態生理については未だ不明な点が多く、故に決定的な治療方法の開発が全く進んでいない。本研究では、掌蹠膿疱症の最も初期症状である水疱形成の場が表皮内汗管であるという事実を元に、エクリン汗に関する自然免疫系（TLR 発現様式、IL17 関連サイトカイン発現様式、膿疱内抗菌ペプチド発現様式、KLK 発現様式）の動態を観察評価し、本疾患が自然免疫系の異常を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

There is no gold standard treatment for palmoplantar pustulosis yet because the pathogenesis of the disease is still unknown. Based on the recent finding that the acrosyringium is the main site of the vesicle formation in palmoplantar pustulosis, the role of skin innate immune systems in this disease such as TLRs, IL-17 relating cytokines, the antimicrobial peptide in pustule, and KLKs was observed. This investigation shows that the pathogenesis in palmoplantar pustulosis includes the different manner in the skin innate immune reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学、掌蹠膿疱症

1. 研究開始当初の背景

掌蹠膿疱症は手掌・足底に生じる無菌性膿疱を主徴とする慢性・再発性・難治性皮膚疾患である。1958年に本邦で本疾患概念が受け入

れられ、以後今日まで多数の報告がなされているものの、未だ本疾患の本態・原因については明らかではない。病巣感染説（扁桃起源説）・金属アレルギー説などが報告されてい

るが、これらの原因と推察される物質除去を行っても多数の再発患者が存在し、本疾患が一元的に説明できないことを示している。

掌蹠膿疱症患者の病理組織を詳細に検討した結果、研究代表者は本疾患における病変の主座は表皮内汗管であるとの考えに至り、手掌足底部のダーモスコープによる観察、発汗量測定汗腺系・上皮系マーカーの免疫組織化学、さらに汗腺由来抗菌ペプチド dermcidin 及び cathelicidin(hCAP-18/LL37)の発現に関する検討を行ったところ、表皮内汗管に小水疱が発生することが明らかとなり、本疾患の病変の主座が明らかとなった。

自然免疫に含まれる物質のひとつとして殺菌作用を示す非常に小さなペプチド群が抗菌ペプチドと呼ばれているもので、皮膚の抗菌ペプチドとしては α -helix 構造を有する“cathelicidin”と β -sheet 構造を有する” β -Defensin“が特に注目されている。研究代表者はこの Cathelicidin がヒトエクリン汗腺の管腔上皮に持続的に発現していることを見出し、次いで汗と同じ生理的環境下においてこのペプチドが殺菌能を示すことを証明した (Murakami M, *J Invest Dermatol* 2002, Murakami M, *J Immunol* 2006)。またこれに先んじて、エクリン汗腺より持続的に分泌される抗菌ペプチドとして、dermcidin (Schitteck, B, *Nat Immunol*, 2001)が報告され、エクリン汗の抗菌ペプチドによる自然免疫防御機構が存在することが明白となった。

近年の報告で、抗菌ペプチドは本来の殺菌能に加えて chemoattractant としての作用や血管新生促進機能などを有し、広く創傷再生機転や炎症の場において重要な役割を果たしていることが明らかとなった(LEE PH, *PNAS*. 2005)。さらに LL37 は自己 DNA と結合することにより、その後 plasmacytoid dendric cell (pDC)の Toll Like Receptor (TLR) 9 が活性化

され、I 型インターフェロンの産生に寄与することが報告された (Lande, *Nature* 2007)。抗菌ペプチドとしての殺菌作用のみならず、TLR を介した自然免疫システムの signal molecule として深く関わることを示されてから、皮膚科領域においては尋常性乾癬などの難治性炎症性疾患の発症メカニズムにおける TLR シグナリングの関与が注目されてきた。

2. 研究の目的

掌蹠膿疱症は表皮内汗管を炎症の主座とするという点から、本疾患における局所でのエクリン汗自然免疫システムを中心とした自然免疫系の異常の関与を検索し、この結果を元に新規治療法への展開を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 掌蹠膿疱症病変部の水疱天蓋を採取し、total RNA 及び蛋白質の抽出を行った。抽出された total RNA を用いて Realtime PCR により TLR ファミリーの発現形式の変化・異常のスクリーニングを行う。その後 RT² profiler PCR array を用いて細胞内シグナルの動態を解析した。

(2)TLR の発現形式が尋常性乾癬における発現パターンと異なることが明らかとなり、IL-17 関連サイトカインの関与の検討が必要となったため、引き続き(1)のサンプルを用いて Realtime PCR による IL-17 関連サイトカインの検討を行った。

(3)掌蹠膿疱症が掌蹠外病変や骨関節症状を呈することから、血清中 IL-17 関連サイトカインプロファイルを ELISA 法により検索・検討した。

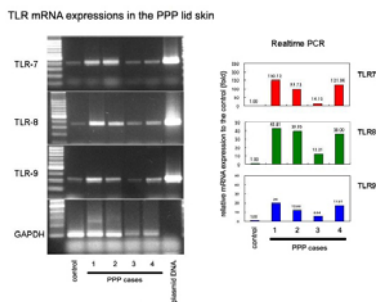
(4)膿疱内に存在する好中球内の cathelicidin の発現パターンの検討を行うため

に、患者膿疱及び末梢血からの好中球を採取し、Western blotting による検討を施行した。

(5)エクリン汗内に含まれるセリンプロテアーゼが病変部組織に及ぼす影響をみるために病変部組織における kallikrein related peptidase(KLK)の免疫組織学的検索、realtime PCR による mRNA 発現の検索、角層内 KLK 発現評価のために Western blotting、セリンプロテアーゼ活性を評価するために in situ zymography を施行した。

4. 研究成果

(1)掌蹠膿疱症における病変部での Toll Like Receptor (7,8,9)に関する発現の検討を行った。患者の水疱天蓋部組織を用いて検討を行ったところ、健常人皮膚に対して、病変部皮膚では検索した TLR に関して mRNA 及び蛋白発現の増加が認められ、その発現の局在は免疫組織化学により確認された(文献4)。尋常性乾癬病変部組織では TLR9 の過剰発現を認めるものの、TLR7,8 についての発現増強は認められないことから(文献2)、自然免疫機構からみた両者の病態が異なる可能性が示唆された。



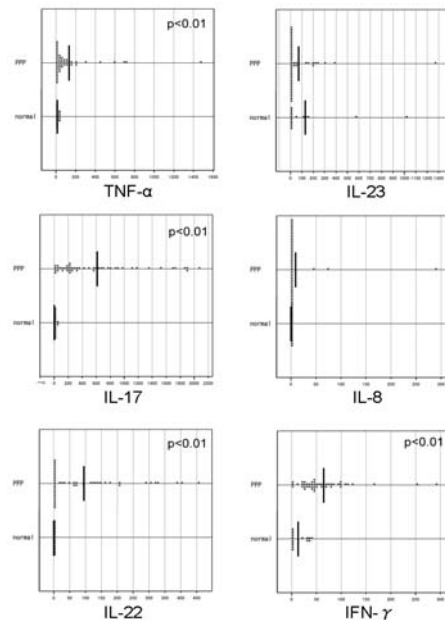
(2)尋常性乾癬と掌蹠膿疱症の病態を比較するために IL-17 関連サイトカインの関与の検

Symbol	Fold Change (comparing to control group)
IFNG	14.1232
IL10	35.5062
IL12B	16.9123
IL17A	6.8211
IL17C	38.5859
IL17D	1.7901
IL17F	12.9063
IL17RB	1.1975
IL17RC	0.2045
IL17RD	38.0546
IL17RE	0.1088
IL22	17.5087
IL23A	23.5883
IL23R	28.6408
IL27	8.5742
IL8	15.1359
TNF	11.0809

討が必要だったため、IL-17 関連サイトカイン及びリセプターの mRNA 発現様式について検討を施行した。Realtime PCR 及び RNA microarray による検索の結果、IL-17C, IL-17F, IL-17RD, IL-12p40, IL-23p19, IL-23R, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-10 に関して、健常組織コントロールに比して相対比 10 倍以上の mRNA 発現増強が認められた(文献1)。

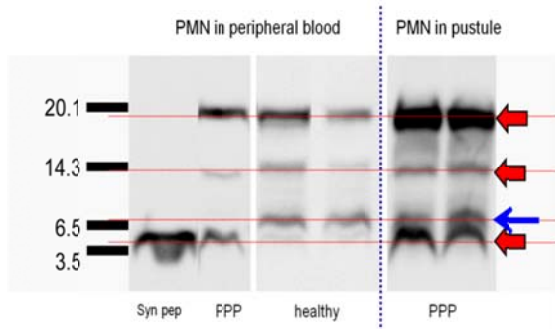
(3)患者血清中 IL-17 関連サイトカインプロファイルを ELISA 法により検索・検討したところ、IL-17, TNF- α , IL-22 の高値を認めたが、IL-23, IL-8, IFN- γ については差を認めず、既報論文における尋常性乾癬の血清中サイトカインプロファイルと異なることが明らかとなった(文献1)

(4)掌蹠膿疱症膿疱内に存在する好中球内の cathelicidin の発現パターンを患者及び健常者末梢血好中球内 cathelicidin の発現パターンと比較したところ、cathelicidin の cleavage パ

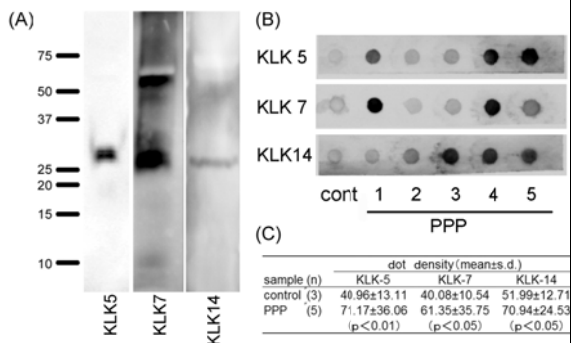


ターンに差が認められ、掌蹠膿疱症患者においては、末梢血および膿疱に存在する好中球内では mature type LL37 の発現増強が生じていることが明らかとなった。Mature LL37 の

炎症誘導作用については既報論文にて多く論じられていることから、LL37 が掌蹠膿疱症における二次的な炎症誘導に大きく関わっていることが示唆された(学会発表(3))において報告、国際英文雑誌投稿準備中)。



(5)掌蹠膿疱症病変部水疱内に含まれると思われるエクリン汗由来セリンプロテアーゼの病変部組織に及ぼす影響を評価した。患者及び健康人から角層を採取し、タンパク抽出後エクリン汗関連 KLK (KLK5、7、14) の発現を Western blotting 及び半定量的 dot blotting にて評価したところ、正常人平均量よりも高濃度の KLK が含有されていることが明らかとなった (文献 3)。



ウェスタンブロットにて抗体の特異性を示した後(A)、5µg のタンパクをフィルターにアプライし、半定量的ドットブロットにて角層内含有タンパクを計測した(B)。ドットはデンストメトリーにより、数値化され比較検討された(c)。

病変部組織内の KLK mRNA の発現は定量的リアルタイム PCR 法にて計測され、KLK5、7、14 の mRNA 発現の増加が確認され、免疫組織学的検索により、KLK5、7、14 の角層から顆粒層上層における発現とその局在も確認された。

In situ zymography により有棘層上層でのセリンプロテアーゼ活性が確認され、これらのことから掌蹠膿疱症の病変部組織では KLK5、7、14 の活性が増強していることにより、異常な剥離現象が生じている可能性が示唆された。

以上のことから、掌蹠膿疱症の病態に関するいくつかの新しい知見を得ることができたが、TLR および cathelicidin の異常な発現パターンから推察した原因蛋白の同定に至ることができなかった。現在、いくつかの候補を培養角化細胞にさせて絞り込みを試みている。しかしながら、本研究成果は、掌蹠膿疱症の病態について殆ど知られていなかった、自然免疫との関連について新たな知見をもたらし、今後この疾患の発症メカニズム及び病態解析に貢献することが期待される。

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) Kaneko T, Murakami M, Kishibe M, Brattsand M, Morhenn VB, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Over-Expression of Kallikrein Related Peptidases in Palmoplantar Pustulosis. *J Dermatol Sci.* 2012; 67(1):73-76.9. 査読有
- (2) 村上正基 : 掌蹠膿疱症研究における最近の知見、*皮膚病診療* 34(5); 426-431、2012. 査読無
- (3) 村上正基 : 汗管と掌蹠膿疱症の関係 (汗

管内水疱の発達)、J Visual Dermatol 11: 1056-1058、2012. 査読無

(4) 村上正基 : 掌蹠膿疱症とニコチン性アセチルコリン受容体、kallikrein related peptidase (KLK)と鱗屑について、J Visual Dermatology 11: 1059-1063、2012. 査読無

(5) Murakami M, et al. The patients with palmoplantar pustulosis have increased IL-17 and IL-22 levels both in the lesion and serum. Exp Dermatol 2011; 20(10): 845-847. 査読有

(6) Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 in Psoriasis Enables Keratinocyte Reactivity against TLR9 Ligands. J Invest Dermatol. 2011; 132(1): 135-143. 査読有

(7) 村上正基 : 膿疱症の診療に役立つ知識 掌蹠膿疱症研究における最近の話題、日本皮膚科学会雑誌 121(13); 2674~2675、2011. 査読無

(8) 村上正基 : 掌蹠膿疱症発症メカニズムの解明、旭川医科大学研究フォーラム 11(1); 67-68、2010. 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) Murakami M, et al. The cathelicidin (hCAP-18/LL-37) expression in the granules of leukocytes in the pustules and periphheral blood with palmoplantar pustulosis. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okinawa, Japan, Dec 7-9, 2012.20.

(2) 村上正基 ; 掌蹠膿疱症と汗 (エクリン汗関連物質) (シンポジウム5・汗と皮膚アレルギー) : 第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、2012/7/13~15, 軽井沢

(3) Murakami M, et al. Multiple over-expression of kallikrein related peptidases contributes to the inflammatory hyperkeratotic change with abnormal desquamation in lesions of palmoplantar pustulosis. 75th Annual Meeting of The Society for Investigative Dermatology, Raleigh, NC, May 9-12, 2012. Scottsdale, USA

(4) Murakami M, et al. Different expression pattern of IL-17 related cytokines between lesional skin tissue and serum in the patients with palmoplantar pustulosis. 36th Annual Meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, Japan, Dec 9-11, 2011.

(5) 村上正基 ; 掌蹠膿疱症研究に関する update (ランチョンセミナー4) : 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会、2011.2.11-12、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 正基 (Murakami Masamoto)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20278302

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし