

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462795

研究課題名(和文)新規抗菌物質Firmocidin及びエクリン汗自然免疫を応用した創傷治癒システム

研究課題名(英文)The wound healing system applied new antibiotic agent Firmocidin and eccrine sweat natural immunity

研究代表者

中岡 啓喜(Nakaoka, Hiroki)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：二次元単層培養系およびLSEの創傷モデル実験において、細菌、ケラチノサイト、抗菌物質のみ(間質因子、免疫応答細胞などは含有されていない)では、創傷部での細菌感染モデルの再現は難しい可能性が示唆された。

CRAMPノックアウトマウスを用いたin vivoでの創傷遅延回復効果に関する検討は、Firmocidinの結晶化に困難を生じたため共同研究者よりの継続的な供給が不可能となり行えなかった。しかし、今後、in vivoでの検討結果がtargetとすべき細胞の同定につながる可能性があるため、firmocidinが供給再開されることを待って、さらなる検討を継続、展開していく予定である。

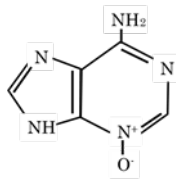
研究成果の概要(英文)：In a wound model of two-dimensional keratinocyte culture system and LSE, it was difficult to reproduce the bacterial infection model in the wound only with bacteria, keratinocyte, and antibacterial agents. The examination about the wound healing delay using the CRAMP knockout mice in vivo could not run, because continuous supply of Firmocidin from the colleague had been impossible. In vivo examination results may lead to the identification of desired cells. We wait for Firmocidin supply and are going to develop further examination continuously.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 自然免疫 エクリン汗

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒において、いかに適切な湿潤環境を維持することができるかという点と、その際の常在菌及び病原菌叢をいかにコントロールするかという点が、非常に重要である。通常の抗菌物質のみの投与では十分な効果が得られず遷延治癒に陥るケースがあり、薬剤耐性を逃れて十分に効果を発揮する物質が期待されていた。自然免疫系の一つである抗菌ペプチドは、この薬剤耐性に関する問題をクリアする有力な候補として注目されて、多数の物質が報告されているが、2010年に皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌由来の新たな抗菌物質 Firmocidin が発見された。(Nakatsuji T, Gallo RL et al, 75th SID Annual Meeting, 2012)



Firmocidin
(Adenine N3-oxide)

この物質の特筆すべき点は、多くの皮膚科領域細菌群(eg, Group B Streptococcus, MRSA, Group A streptococcus, S aureus)に対して抗菌活性を示すが、表皮ブドウ球菌(自分自身)には全く抗菌活性を示さないことと、構造式に示されるようにいわゆるペプチドとは異なる小さな分子量を有する物質であることが挙げられる。

表皮ブドウ球菌はこのほかに TLR2 を介して hBD-2 および hBD-3 の発現を増加させることが知られている(Lai Y, Gallo RL et al, *J Invest Dermatol* 2010)。それに対して、近年 LL-37 が small DNA と結合することにより plasmacytoid dendritic cell(pDC)の TLR-9 に認識されることが報告され(Lande R et al, *Nature* 2007)、さらにこの DNA-LL37 complex が角化細胞の TLR9 の発現増加を生じることにより、尋常性乾癬の病態に深く関与していることも明らかとなった。(Morizane S, Murakami M et al, *J Invest Dermatol.* 2002)。

2. 研究の目的

表皮ブドウ球菌を中心とした firmocidin, 抗菌ペプチド, TLR などの複合的関与により抗菌及び創傷治癒過程のネットワークが形成されていることが示唆され、薬剤耐性の問題を踏まえて、既存の抗生剤に代わる感染制御及び創傷治癒(表皮角化細胞の再生)を同時に進行するシステムを新規創傷治癒促進システムとして確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 正常人角化細胞を用いた単層培養細胞、三次元培養表皮(LSE)及びエクリン汗培養細胞

(NCL-SG3) を用いて、皮膚科領域細菌群による創傷遅延の評価を行うとともに Firmocidin による直接的な創傷治癒促進作用についての評価を行う。

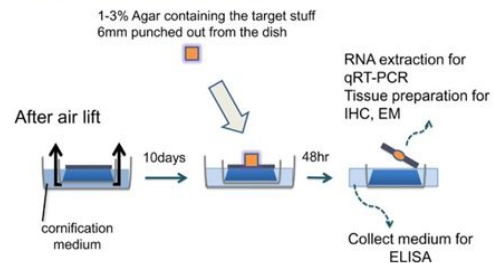
(2) 表皮ブドウ球菌培養時に得られる SECM (conditioned culture medium)、firmocidin 及び正常人エクリン汗を各々(1)で構築されたシステムに作用させ、これらによる創傷遅延の改善につき評価検討を行う。

(3) LL37 マウスホモログである CRAMP Knockout mouse 及びコントロールマウスを用いて、各種創傷モデル(感染有群・無群)を作成したのち、Firmocidin 含有軟膏を作成し、これによる感染制御を比較検討する。

4. 研究成果

(1)微量サンプルによる角化細胞への刺激実験砲: LSE を用いた被刺激実験法の確立。掌蹠膿疱症患者からの手掌・足底部の水疱/膿疱は非常に微量であるため、通常の二次元培養セラチノサイトで刺激実験を行うことは困難である。直接検査物を添加すると直ちに乾燥し、持続刺激が困難になることから、適切な vehicle を検討したところ、アガロースゲルを用いて検査物を被覆あるいは含有させることにより、良好な結果を得ることが可能であることが明らかとなった。

Applying the cylinder gel containing the target stuff onto LSE



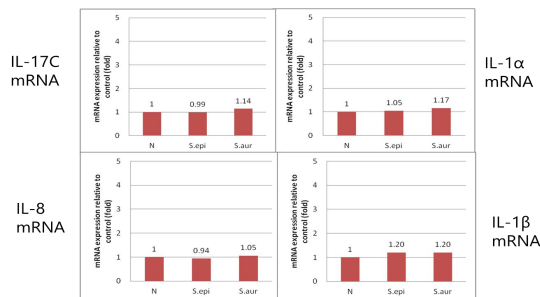
(2) 正常角化細胞、NCL-SG3 に対する細菌感染による創傷遅延効果の評価を行うために二次元単層培養にてそれぞれサブコンフルエントとなるように Dish 内でシート状に増殖させた後、scraper で dish 中心部に 1 cm 幅で細胞剥離(傷を作成)を行った。その後この部位に S. aureus, S. epidermidis, Group A streptococcus を添加し、細胞の修復遅延について評価した。細菌添加群と非添加群では創部の再生に要する時間に若干の差を認めた。

次に、採取されたエクリン汗、fimocidin、LL-37 を創傷作成後に添加し、その後同様に細菌感染を行い、それぞれの物質による創傷遅延回復効果判定を試みた。しかしながら、肉眼的には創部の再生時間に大きな差異をみることはできず、L-17, IL-8, IL-1α, IL-1β mRNA の発現様式にも有意差を見ることができなかった。

(3)LSE を用いた創傷モデル作成

LSE を作成後、18G 注射針を用いて中心部に機械的に線状の傷を作成し、その部位の再生を観察した。二次元単層培養系と同様に *S. aureus*, *S. epidermidis*, Group A streptococcus を創部に添加し、細胞の修復遅延について評価を試みたが、細菌添加群と非添加群では創部の再生に要する時間に差を認めることはできなかった。次に、採取されたエクリン汗、fimocidin、LL-37 を創傷作成後に添加し、その後同様に細菌感染を行い、それぞれの物質による創傷遅延回復効果判定を試みた。やはり今回も肉眼的観察による創部の再生に大きな差異をみることはできず、IL-17, IL-8, IL-1 α , IL-1 β mRNA の発現様式にも有意差を見ることができなかった。

単層培養系の実験結果とこの結果を鑑みて、細菌、ケラチノサイト、抗菌物質のみ(間質因子、免疫応答細胞などは含有されていない)では、創傷部での細菌感染モデルの再現が難しい可能性が示唆された。



LSE における firmocidin 添加による mRNA 発現の比較検討。

この時点で、Firmocidin の結晶化に困難を生じ、共同研究者よりの継続的な供給が不可能となったため、CRAMP ノックアウトマウスを用いた in vivo での創傷遅延回復効果に関する検討については現在 pending となっている。二次元単層培養系および LSE の結果を鑑みて、in vivo での検討結果が、今後 target とすべき細胞の同定につながる可能性があるため、今後、firmocidin が供給再開されることを待って、さらなる検討を継続、展開していく予定である。

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 18 件)

1. 中岡啓喜. 総論: 小児の頭頸部母斑にどのように対処するか? . PEPARS、102 巻、13-18、2015、査読あり
2. Murakami M, et al, Case of palmoplantar pustulosis that developed with acute glomerulonephritis. *Dermatol*, Vol

231, No.4, 304-311, 2015. 査読あり

3. 村上正基, 汗と湿疹. アレルギー・免疫 22 巻、3 号、2015、査読あり
4. 宝道麻由、中岡啓喜、森 秀樹、戸澤麻美 . Kasabach-Merritt 症候群を併発し治療を行った tufted angioma の 3 例 . 日形会誌、34 巻、1 号、53-60、2014、査読あり
5. 中岡啓喜、寶道麻由、森 秀樹、戸澤麻美 . 耳下腺部転移を認めた左前額部浸潤型基底細胞癌の 1 例 . 西日本皮膚科、76 巻、4 号、357-360、2014、査読あり
6. 中岡啓喜、森 秀樹、戸澤麻美 . 内頸静脈血栓症により静脈血流不全をきたした遊離皮弁の 1 例 . 日本頭蓋顎顔面外科学会誌、30 巻、4 号、200-205、2014、査読あり
7. Ishida-Yamamoto A, Furio L, Igawa S, Honma M, Tron E, Malan E, Murakami M, et al. Inflammatory peeling skin syndrome caused by homozygous genomic deletion in the PSORS1 region encompassing the CDSN gene. *Exp Dermatol*, Vol.23, No.1, 60-63, 2014, 査読あり
8. Namba C, Murakami M, et al, Infantile generalized pustular psoriasis: Successful disease control with intermittent etretinate. *J Dermatol*, Vol.41, No.5, 403-406, 2014, 査読あり
9. Murakami M, et al, Vesicular LL-37 Contributes to Inflammation of the Lesional Skin of Palmoplantar Pustulosis *PLoS One*.Vol.9, No.10, e110677, 2014, 査読あり
10. Masuda M, Murakami M, et al, Case of palmoplantar pustulosis that developed with acute glomerulonephritis. *J Dermatol*, Vol.42, No.1, 111-112, 2014, 査読あり
11. 村上正基 汗と掌蹠膿疱症. Monthly book derma、220巻、7号、79-83、2014、査読あり
12. 中岡啓喜、森 秀樹、戸澤麻美 . 骨盤内動静脈奇形の 2 治験例 : Interventional Radiology 下の硬化療法と切除術 . 日形会誌、33 巻、7 号、524-528、2013、査読あり

13. 中岡啓喜 顔面腫瘍(瘤)の分類と特徴 - 受診世代による分類とその特徴 - . 形成外科、56 巻、4 号、367-376、2013、査読あり
14. 戸澤麻美、森 秀樹、中岡啓喜 . 皮膚原発 epithelioid hemangioendothelioma (EHE) の 1 例 . Skin Cancer、28 巻、3 号、329-335、2013、査読あり
15. Murakami M, et al. Acute generalised pustular bacterid. *Lancet Infect Dis*, Vol.13, No.8, 655-656, 2013, 査読あり
16. Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Mikiko Tohyama, Yuji Shirakata, Koji Sayama. Eccrine Sweat Contains IL-1α, IL-1β and IL-31 and Activates Epidermal Keratinocytes as a Danger Signal. *PLoS One*, Vol.8, No.7, e67666, 2013, 査読あり
17. Harder J, Tsuruta D, Murakami M, Kurokawa I. What is the role of antimicrobial peptides (AMP) in acne vulgaris? *Exp Dermatol*, Vol.22, No.6, 386-391, 2013, 査読あり
18. 村上正基、佐山浩二 掌蹠膿疱症：病態解明への新しいアプローチ. 愛媛医学 32 巻、1 号、1-5、2013、査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Murakami M, et al, Vesicular LL-37 contributes to inflammation of the lesional skin of palmoplantar pustulosis. Concurrent Sessions on 44th Annual ESDR Meeting, 2014, Sept. 10-13, the Modern Tivoli Conference Center, Denmark, Copenhagen
2. Murakami M, et al, The Possible Treatment with Cefcapene Pivoxil Hydrochloride for Palmoplantar Pustulosis with Pustuloarthro-osteitis. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2014, June 11-14, Heidelberg Marriott Hotel, Germany, Heidelberg
3. Murakami M, et al, Human cathelicidin (hCAP18/LL37) in pustules contributes to the pathogenesis of palmoplantar pustulosis. International Investigative Dermatology Meeting, 2013, May

8-11, Edinburgh International Conference Centre, Scotland, Edinburgh

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
中岡啓喜 (Nakaoka Hiroki)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30172266
- (2)研究分担者
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
- (3)連携研究者
白方 裕二 (Shirakata , Yuju)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：50226320