

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860949

研究課題名(和文) マウスモデルをプラットフォームとした乾癬の分子標的薬スクリーニングの確立

研究課題名(英文) Evaluation of molecular inhibitors for the treatment of psoriasis using the model mouse system as a platform of drug screening

研究代表者

寺石 美香 (TERAISHI, Mika)

高知大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40437736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規乾癬治療法の開発を目的に、乾癬マウスモデル(K5.Stat3Cトランスジェニックマウス)を用いて有用性が期待される薬剤の治療効果のスクリーニングを行った。抗IL-6抗体、ヒドロキシクロロキン、vascular adhesion protein (VAP)-1 阻害剤について検討を行った結果、いずれの薬剤投与群も乾癬様皮疹の形成そのものは阻害できなかったが、ヒドロキシクロロキンは皮膚の肥厚を抑制する傾向にあり、VAP-1阻害薬は有意な表皮の肥厚抑制効果を認めた。今後更なる投与期間や投与量の検討により、新規治療法としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the development of new therapeutic drugs for psoriasis, we screened the effect of the prospective molecular inhibitors using K5.Stat3C transgenic mouse, which is the established psoriasis model mouse. Although any of the inhibitors including anti-IL-6 antibody, hydroxychloroquine or VAP-1 inhibitor could not prevent the development of psoriasis-like lesion, considerable and marked attenuation of epidermal hyperplasia were obtained by the treatment with hydroxychloroquine and the VAP-1 inhibitor, respectively. Further investigation will be needed to optimize the doses and duration of treatment with the VAP-1 inhibitor, since this would be a potential drug for psoriasis therapy.

研究分野：皮膚科学

キーワード：乾癬モデルマウス IL-6 ヒドロキシクロロキン VAP-1

1. 研究開始当初の背景

乾癬治療は近年の生物学的製剤の出現によりパラダイムシフトを迎えているが、一方で非応答群や反応低下群の存在、副作用や副反応の出現、高額な医療費などの問題も抱えている。これらは乾癬の病態の更なる解明や、より安全で廉価な治療法イノベーションによって克服すべき問題であるが、乾癬がヒト以外の動物に自然発症しないことから効果や副反応について動物実験によるスクリーニングが進んでいない。我々は自然発症あるいは誘導発症にて乾癬に酷似した皮疹を発症する乾癬モデルマウス(K5.Stat3Cマウス)を開発しており、このマウスがヒト同様、IL-23/Th17軸に依存した皮疹を発症し、この軸を標的とした抗体療法によって皮疹形成が抑制されることを見出している。この乾癬モデルマウスは基礎実践、臨床研究という双方向性の研究を行う上で、非常に優れたツールである。

2. 研究の目的

乾癬モデルマウスを用い、臨床応用が期待される薬剤のうち入手可能なものについて、その効果と副作用のスクリーニングを行い、乾癬に対する新規治療法を開発する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 乾癬モデルマウスへの評価薬剤の投与および乾癬様皮疹の誘導

評価薬剤もしくは陰性/陽性コントロールはK5.Stat3Cマウスに腹腔内投与した。乾癬様皮疹の誘導は、マウス耳介の一侧に12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、他側にコントロールとしてアセトン を反復塗布した。各薬剤の投与、TPA塗布および塗布部位のサンプリングのタイミングは薬剤の作用機序などを考慮し、以下の様に行った。

抗IL-6R抗体：陽性コントロールに抗IL-12/23p40抗体、陰性コントロールにコントロールIgGを用い、1回投与した3日後、5日後にTPA塗布、6日後にサンプリングを行った。

ヒドロキシクロロキン：陰性コントロールにPBSを用い、連日投与4日目、6日目にTPA塗布、7日目にサンプリングを行った。

VAP-1 (vascular adhesion molecule-1) 阻害剤(化合物A)：陰性コントロールに生食を用い、連日投与2日目、4日目にTPA塗布、5日目にサンプリングを行った。

(2) 乾癬様皮疹の病理組織学的解析

耳介皮膚病理組織の効果判定は、ヒト乾癬皮疹の特徴的な病理組織像である表皮肥厚、角質増殖、顆粒層消失、炎症細胞浸潤について対照群と比較した。

(3) 乾癬様皮疹におけるサイトカインの

mRNA発現の定量的解析

耳介皮膚より抽出したmRNAより、定量的real-time PCR法を用いたサイトカインの測定を行った。検討するサイトカインとしては、IL-23/Th17軸系(IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-23)や、乾癬の病態形成に関与している各種サイトカイン(-defensin、S100A8、S100A9、TNF-)とした。

4. 研究成果

(1) 抗IL-6R抗体による治療効果の検討

炎症性サイトカインであるIL-6のレセプター抗体(抗IL-6R抗体)の乾癬治療効果について検討を行った。結果、病理組織学的に明らかな乾癬様皮疹発生抑制効果は認めず、IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-23、-defensin、S100A8、S100A9の遺伝子発現において、乾癬様皮疹形成を抑制していることを示す抗IL-12/23p40抗体群の結果に対し、抗IL-6R抗体投与群はコントロールIgG投与群といずれの項目においても有意差を認めなかった。抗IL-6R抗体の投与量を増量して行った検討でも同様の結果であり、抗IL-6R抗体に乾癬様皮疹形成に対する抑制効果は見出せなかった。

(2) ヒドロキシクロロキンによる治療効果の検討

抗炎症作用、免疫調整作用をもつヒドロキシクロロキンの乾癬抑制効果について検討を行った。TPA塗布部位の皮膚の厚さはヒドロキシクロロキン投与群でやや薄い傾向があった(図1)が、明らかな有意差は得られなかった。Real-time PCR法によるIL-17A、IL-17F、IL-22、-defensin、S100A8の遺伝子発現においても、陰性コントロール群といずれの項目においても有意差を認めず、ヒドロキシクロロキンに乾癬様皮疹形成に対する抑制効果を明らかににはできなかった。

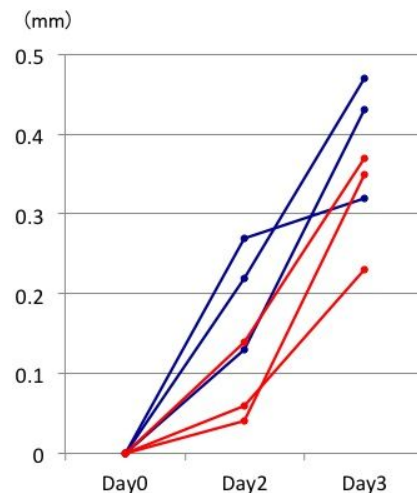


図1. 耳介の厚さ変化

(Day0: TPA初回塗布時、青: 陰性コントロール群、赤: ヒドロキシクロロキン投与群)

(3) VAP-1 阻害剤による検討

VAP-1 は血管内皮接着分子として同定された分子であり、炎症性疾患の病変部で白血球遊走やサイトカインの放出に与するとされ、乾癬患者では健常人に比べ、血清中および皮膚組織中の血管壁の VAP-1 タンパクの増加が確認されている。この VAP-1 阻害剤について乾癬様皮疹への作用を検討した。

耳介の臨床所見、厚さ

化合物 A 投与群、コントロール群共にアセトン塗布側に明らかな変化はなく、TPA 投与側では臨床的に鱗屑を伴う紅斑の形成、耳介の肥厚を認めた(図2)。紅斑の色調は化合物 A 投与群でやや淡かったが、マイクロメーターによる耳介の厚さの計測(図3)では両群の変化に有意差は認めなかった。

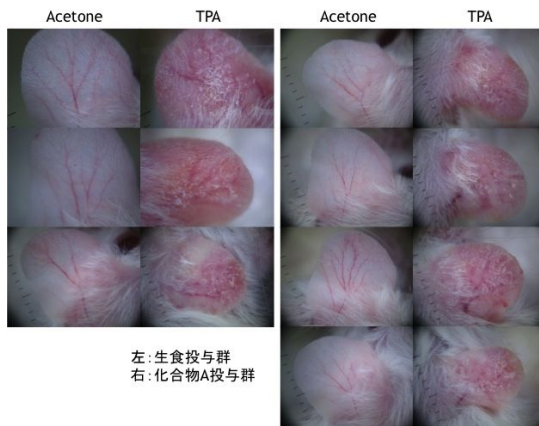


図2. サンプリング時の耳介の臨床所見

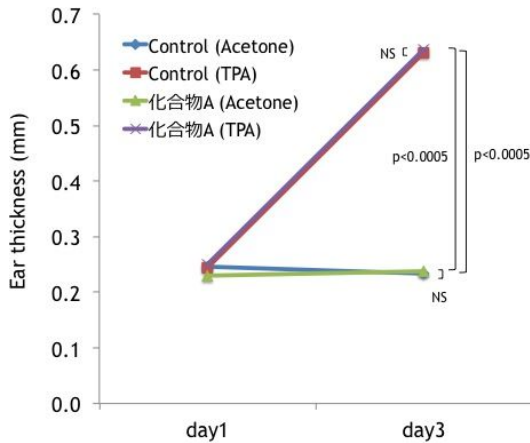


図3. 耳介の厚さ (Day1: TPA 初回塗布時)

組織学的変化

耳介の病理組織像は、TPA 塗布側でコントロール群、化合物 A 投与群共にヒト乾癬に酷似した組織像を呈していた。しかし表皮の厚さに関しては、化合物 A 投与群でコントロール群に比べて約 30% 肥厚を抑制していた(図4)。一方で真皮内に浸潤する炎症細胞数は、有意差は認めないものの、化合物 A 投与群でむしろ増加する傾向を認めた(図5)。

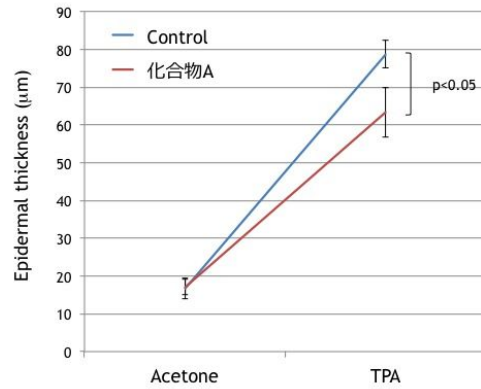


図4. 表皮の厚さ

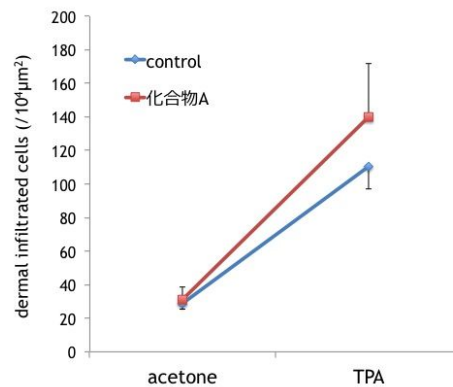


図5. 真皮内浸潤細胞数

遺伝子的変化

耳介皮膚より抽出した mRNA より定量的 real-time PCR 法にて各サイトカイン発現について検討を行った(図4)。結果、いずれのサイトカインも TPA 塗布で誘導された乾癬様皮疹で発現の増加を認めたが、コントロール群と化合物 A 投与群の間で塗布前、塗布後共に発現量に明らかな有意差を認めなかった。

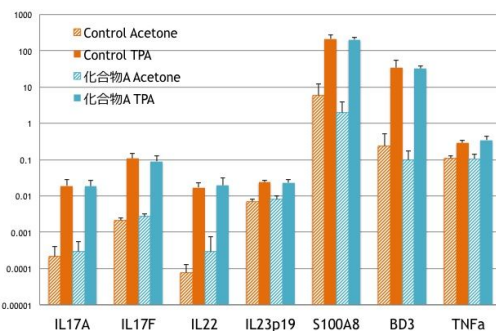


図4. 皮疹部の遺伝子発現

以上より、乾癬様皮疹における VAP-1 阻害による炎症細胞浸潤抑制効果は明らかではなかったが、表皮肥厚の抑制効果があることが示された。今回の投与方法は皮疹形成に対する抑制効果を観察する設定であり、投与期間や投与量について更なる検討を加えることで、乾癬に対する新しい治療戦略の一つとなり得る事が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

Teraishi M, Kataoka S, Murakami M, Daibata M, Sano S. Human T-cell lymphotropic virus type 1(HTLV-1) infected cells identified by flow cytometry and HTLV-1 proviral load. 73rd American Academy of Dermatology Annual Meeting 2015, 23/3/2015, The Moscone Center, San Francisco, CA, USA

Teraishi M, Nakajima H, Kataoka S, Sano S. Aberrant expression of chemokine receptors in lymphoma cells through flow cytometry-based segregation in patients with mycosis fungoides. 第39回日本研究皮膚科学会、2014年12月12日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府、大阪市

Teraishi M, Kataoka S, Murakami M, Daibata M, Sano S. Adult T-cell Leukemia/Lymphoma cells identified by flow cytometry and HTLV-1 proviral load. 3rd Eastern Asia Dermatology Congress, 24/9/2014, International Convention Center Jeju, Jeju, Korea

寺石美香、高橋綾、中島英貴、佐野栄紀、市川和加、C1インヒビター製剤の定期投与で良好な経過を経た遺伝性血管性浮腫の1例、第113回日本皮膚科学会総会、2014年5月31日、京都国際会議場(京都府、京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺石 美香 (TERAISHI, Mika)
高知大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：40437736