

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10941

研究課題名(和文) マイクロバイオームを用いた遷延性難治性皮膚潰瘍に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy of protracted refractory skin ulcer by using microbiome

研究代表者

森 秀樹 (Hideki, Mori)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60325389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト角化細胞に対して直前に表皮ブドウ球菌を添加した後に黄色ブドウ球菌で刺激したところ、炎症性サイトカインの産生が抑制された。マウスの耳介に死菌による皮下膿瘍を作製したところ、黄色ブドウ球菌による皮下膿瘍では膿瘍内の炎症細胞の細胞質内に核内タンパクの一つであるHigh Mobility Group Box 1(以下HMGB1)が強陽性発現していたのに対し、表皮ブドウ球菌による皮下膿瘍では発現がみられなかった。dsRNAであるpoly(I:C)を用いてヒHMGB1の還元型であるreduced-HMGB1を前投与することで、poly(I:C)による炎症誘導効果を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：S. epidermidis inhibited production of inflammatory cytokines induced by S. aureus in keratinocyte. High Mobility Group Box 1(HMGB1), which is one of nuclear protein, was strongly expressed in abscess of mouse ear induced by S. aureus, but not by S. epidermidis. Poly(I:C), which is synthesized dsRNA, induced inflammatory cytokines in keratinocyte. We found that reduced-HMGB1 suppressed poly(I:C) induced inflammation in keratinocyte.

研究分野：皮膚の免疫

キーワード：マイクロバイオーム HMGB1

1. 研究開始当初の背景

S. aureus (黄色ブドウ球菌)が、皮膚炎症病態を重症化させることが報告され (Na SY et al, *Ann Dermatol* 2012)、黄色ブドウ球菌に対する臨床的対応が益々重要となってきた。通常の抗菌物質を多用・長期使用することは、薬剤耐性及び MRSA の出現リスクを増加する。また一旦殺菌することに成功しても、再びコロニー形成することも多く、遷延性潰瘍の場における病原菌とのせめぎ合いは、今もって大きな課題である。そこで着眼したのが黄色ブドウ球菌に対する片利共生生物となる *S. epidermidis* (表皮ブドウ球菌)である。表皮ブドウ球菌は正常皮膚に生息するが、角化細胞の炎症を惹起することはなく、更に表皮ブドウ球菌より分泌される細胞外セリンプロテアーゼが鼻粘膜において黄色ブドウ球菌のバイオフィームやコロニー形成を阻止することが明らかとされた (Sugimoto S et al, *J Bacteriol* 2013)。皮膚が損傷すると破壊された細胞から RNA が遊離し、TLR3 がこれを認識してケラチノサイトにおける IL-6 や TNF- α の発現を促し、炎症を悪化させる。しかしながら皮膚に常在する表皮ブドウ球菌由来の D-アラニン含有 LTA (TLR2 リガンド) を用いて、TLR2 の刺激を介した TLR3 のシグナル抑制分子 TRAF-1 の発現を誘導することで、上記の炎症を抑制することが可能となることが明らかとなった。

自然免疫に含まれる物質の一例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皮膚角化細胞の hCAP-18/LL-37 (cathelicidin) と α -Defensin、エクリン汗中の dermcidin が特に注目されている (村上正基、佐山浩二: 表皮自然免疫(2)-表皮角化細胞が産生する抗菌ペプチド- 西日皮膚 2014)。特に hCAP-18 は本来約 18KDa のペプチドで proteinase 3 により C-末端側 37 アミノ酸が processing され mature peptide である LL-37 として殺菌作用を呈し、炎症状態に陥った皮膚角化細胞から高濃度に発現されることが知られていたが、さらにヒトエクリン汗腺から持続的に発現していることと、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が報告された (Murakami M, *J Invest Dermatol*. 2002)。しかしながら、これら抗菌ペプチドも感染後の細菌からの各種プロテナーゼにより分解されることが報告され、抗菌ペプチドと細菌由来プロテナーゼとのせめぎ合いが生じていることが明らかとなり (Schmidtchen A et al, *Molecular Microbiol* 2002、下図)、従来の抗生剤による薬剤耐性と同様に、単独の抗菌ペプチドによる生理的環境下での細菌感染コントロールが容易ではないことが明らかとなった。

2. 研究の目的

遷延性皮膚潰瘍においては、上皮再生のみ

ならず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、薬剤耐性を逃れて十分に効果を発揮しうる物質が期待されていたが、未だ決定打となる薬剤は開発されていない。我々は、既存の抗菌物質ではなく、皮膚の常在菌(片利共生生物)と抗菌ペプチド群による相乗効果を用いて、病原菌増殖抑制効果と抗炎症効果の両者を保持した遷延性(難治性)皮膚潰瘍に対する新規局所療法の開発を試みる。

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 (Living skin equivalent; LSE)、皮膚科領域細菌群による創傷遅延モデル作成の検討を行う。

(2) 表皮ブドウ球菌(生菌・死菌)及び D-アラニン含有 LTA (TLR2 リガンド)、抗菌ペプチド (cathelicidin, α -defensin) 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い、最終的には表皮ブドウ球菌存在下での黄色ブドウ球菌の発育阻害環境を構築し、その後創傷治癒促進のための至適条件を決定する。

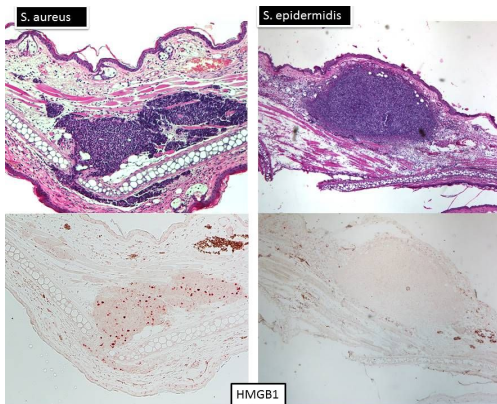
(3) CRAMP (cathelicidin homologue) ノックアウト、mBD (human α -defensin homologue) 2, 3 ノックアウト、TLR2 ノックアウト及びコントロールマウスを用いて、各種創傷モデル(感染有群・無群)を作成したのち、表皮ブドウ球菌死菌含有軟膏あるいは TLR2 リガンド含有外用剤を作成、これによる感染制御を比較検討する。

(4) これら外用剤のヒト細胞に対する毒性を検討する。最終的に倫理委員会の承認が得られれば、表皮ブドウ球菌死菌含有、LL-37 含有、あるいは TLR2 リガンド含有外用剤による難治性潰瘍での試験的使用を検討する。

4. 研究成果

1) ヒト角化細胞に対して黄色ブドウ球菌の死菌で刺激実験を行ったところ、IFN- γ 、IL-1 などの各種炎症性サイトカインの産生がみられたが、直前に表皮ブドウ球菌による刺激を行ったところ、黄色ブドウ球菌による炎症性サイトカインの産生が抑制された。

2) 次にマウスの耳介に死菌による皮下膿瘍を作製したところ、黄色ブドウ球菌による皮下膿瘍では膿瘍内の炎症細胞の細胞質内に核内タンパクの一つである High Mobility Group Box 1 (以下 HMGB1) が強陽性発現していたのに対し、表皮ブドウ球菌による皮下膿瘍では発現がみられなかった。この結果から表皮ブドウ球菌は HMGB1 の細胞内および細胞外への誘導を抑制することで炎症反応を抑制すると推測し、HMGB1 を用いた抗炎症効果の実験を行った。



3) 細菌膜タンパクの一種である LTA や LPS, および dsRNA である poly(I:C) を用いてヒト角化細胞に炎症性サイトカインを誘導させ、細胞外から HMBG1 が炎症作用に対してどのように反応するか調べたところ、HMBG1 の還元型である reduced-HMBG1 を前投与することで、poly(I:C) による炎症誘導効果を抑制することが明らかとなった。また、さらに poly(I:C) の細胞内シグナル系においては、NF- κ B 経路と IRF3 経路を抑制しており、MAPK 経路は抑制されていなかった。HMBG1 は細胞外に放出されると容易に酸化されて Disulfide-HMBG1 に変化するとされるが、この Disulfide-HMBG1 を用いて同様の実験を行ったところ、抑制効果はみられず、むしろ炎症効果を増幅する作用がみられた。以上のことから HMBG1 はその酸化還元型により、角化細胞における炎症反応に対して抑制効果および増幅効果を持つことが明らかとなった。

4) 次に reduced-HMBG1 がどのように抑制効果をもたらすかを解明するために、reduced-HMBG1 と disulfide-HMBG1 が細胞膜のレセプターである TLR2, TLR4, RAGE を活性化するかどうか調べたところ、disulfide-HMBG1 が TLR2 の mRNA を誘導することが明らかとなったが、reduced-HMBG1 はいずれにレセプターの mRNA を誘導しなかった。一方 HMBG1 は他のサイトカインなどと結合して炎症作用を増強するとの報告が多数あるため、各 HMBG1 と poly(I:C) の結合を免疫沈降反応を用いて調べたところ、disulfide-HMBG1 は poly(I:C) と結合するが、reduced-HMBG1 は結合しないことが分かった。また、Flow cytometry や免疫蛍光染色の結果、reduced-HMBG1 が poly(I:C) の細胞内への取り込みを阻害していることが明らかとなった。

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 3 件)

1. Mori H, Murakami M, Tsuda T, Kameda K, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Nakaoka H, Sayama K:

Reduced-HMBG1 suppresses poly(I:C)-induced inflammation in keratinocytes. *J Dermatol Sci.*, 90, 154-165, 2018

2. Tohyama M, Shirakata Y, Hanakawa Y, Dai X, Shiraishi K, Murakami M, Miyawaki SM, Mori H, Utsunomiya R, Masuda K, Hashimoto K and Sayama K: Bcl-3 induced by IL-22 via STAT3 activation acts as a potentiator of psoriasis-related gene expression in epidermal keratinocytes. *Eur. J. Immunol.*, 48(1), 168-179, 2018

3. Murakami M, Kameda K, Tsumoto H, Tsuda T, Masuda K, Utsunomiya R, Mori H, Miura Y, Sayama K.: TLN-58, an Additional hCAP18 Processing Form, Found in the Lesion Vesicle of Palmoplantar Pustulosis in the Skin. *J Invest Dermatol.*, 137(2), 322-331, 2016

[学会発表](計 3 件)

1. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama K. Newly discovered function of reduced-HMBG1 as an inflammatory suppressor in keratinocyte. 42th Annual meeting of JSID; Kochi, Japan, Nov 15-17, 2017

2. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama K. Newly discovered function of reduced-HMBG1 as an inflammatory suppressor in keratinocyte. 47th Annual ESDR Meeting; Salzburg, Austria, Sep 27-30, 2017

3. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, et al.: Suppressive effect of HMG1 via poly(I:C) induced inflammation in keratinocyte 46th Annual ESDR Meeting; Munich, Germany, Sep 7-10, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀樹 (Mori, Hideki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60325389

(2)研究分担者

中岡 啓喜 (Hiroki, Nakaoka)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30172266

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし