

令和元年6月17日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10128

研究課題名(和文) 皮膚抗菌ペプチド発現異常の改善を利用した掌蹠膿疱症の治療開発

研究課題名(英文) The development a new treatment for Palmoplantar pustulosis with improving the abnormal antimicrobial peptide expression

研究代表者

村上 正基 (murakami, masamoto)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20278302

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)：表皮内水疱に生じているhCAP-18の異常フラグメントとしてTLN-58を同定した。Processingの責任酵素としてneutrophilic elastaseが同定され、proteinase inhibitorとして α 1 antitrypsinを用いたprocessingの抑制に成功した。ヒト角化細胞並びに汗管由来細胞に対してTLN-58合成ペプチドは特にIL-8に関してLL-37に比べてさらに強力なmRNA及びタンパク発現を誘導した。TLN-58合成ペプチドをマウスに投与し同様なサイトカインmRNA及びタンパク発現は確認されたが、これに対する抑制効果を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

掌蹠膿疱症の病態に関わる因子がまた新たに一つ同定された。水疱内容における異常な抗菌ペプチドの発現様式が本疾患の病態に関わることが明らかとなり、将来の治療オプションを考える上で、重要な発見となった。

研究成果の概要(英文)：The abnormal fragment of hCAP-18 in PPP vesicle was searched with several experiments, and TLN-58 was confirmed. The responsible proteinase was searched with MASCOT database, and neutrophilic elastase was found in the database. As a proteinase inhibitor for it, α 1 antitrypsin was selected and tested if it could suppress the protein processing of hCAP-18 to TLN-58, and we could confirm the prevention of processing. TLN-58 synthetic peptide induces the inflammatory response in primary keratinocyte culture and LSE, but not in sweat gland cells (NCL-SG3), especially for IL-8, comparing with LL-37. In the mouse model, the peptide could induce inflammatory changes in skin tissue, too. However, the proteinase inhibitor induced inflammatory response as an irritant, so that we failed to establish it as a new treatment for PPP.

研究分野：皮膚科学

キーワード：掌蹠膿疱症 抗菌ペプチド hCAP-18 TLN-58

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

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、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。現時点で本疾患に対する一般的な加療を施行しても、実際の現場ではなかなか完治を見ることが難しく、診療現場での治療法はこの20年来変わっていない。多数の罹患者からの早期病態解明および治療法の開発を望む声は非常に大きい。

申請者は、掌蹠膿疱症患者から得られた病理組織・免疫組織化学、手掌足底部のダーモスコープ所見、病変部での発汗量の低下、水疱内容に汗腺由来 dermcidin 及び hCAP-18/LL37 の発現を確認したことなどから、本症の病変は表皮内汗管で生じることを報告した(J Invest Dermatol. 2010)。その後、膿疱を形成する好中球内の hCAP-18/LL37 は、通常の fragmentation のパターンと異なり、酒さでみられる異常現象(Nat Med. 2006)と同様に、掌蹠膿疱症の炎症性角化局面を生じる可能性があること(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、シンポジウムにて報告)病変部局所での IL-17 及び IL-8 mRNA などが高値を呈し、血清中の IL-17 関連サイトカインの発現パターンは尋常性乾癬患者の報告と異なること(Murakami M et al, Exp Dermatol. 2011)病変部組織での TLR 発現様式は、既報の尋常性乾癬での発現様式と異なることを見出した。これらのことにより、掌蹠膿疱症が、エクリン汗、エクリン汗内抗菌ペプチド、IL-17 関連サイトカイン、及び TLR 発現様式などが関連しあって、その病態を構成することが次第に明らかとなってきた。

2. 研究の目的

我々は、難治性皮膚疾患である掌蹠膿疱症が、表皮内汗管に水疱形成が生じることで本疾患が始まること、掌蹠膿疱症に生じる表皮内水疱が抗菌ペプチド hCAP-18 を含有すること、processing された LL37 により表皮角化細胞に対して、種々の炎症性サイトカインを誘導することを明らかとしてきた。この水疱・膿疱内の hCAP-18 発現に関する詳細な processing pattern を検討したところ、過去に報告のない新たな processing form の存在を見出したため、これを同定し、このペプチドによるエクリン汗腺細胞及びヒト角化細胞に対する炎症惹起性に関して検討を行う。さらにこの異常な processing を生じる責任酵素を同定し、これを制御することによる治療応用への可能性を模索する。

3. 研究の方法

掌蹠膿疱症病変部水疱内に見出された新たな hCAP-18 abnormal processing form の同定を行う。ペプチドシーケンスが決定されたのち、internet data base にて候補となる proteinase を検索する。

hCAP-18 合成ペプチドを作製し、決定された proteinase による processing 再現を行い、作用を確認する。

同定された peptide を合成し、皮膚角化細胞、LSE (living skin equivalent, 3D 培養表皮) 並びに汗管由来細胞 (NCL-SG3) に対する炎症誘導能を評価する。

マウスモデルと用いて、表皮内に TLN-58 (mouse homolog) を注射し、表皮化水疱を人工的に形成し、その炎症部位に対して候補となる責任 proteinase を作用させた後、proteinase inhibitor を投与して rescue を試みる。

4. 研究成果

表皮内水疱に生じている hCAP-18 の異常フラグメント(図1、矢印)の同定を行うために、水疱を採取し直接 HPLC による分離、mass spectrometry、アミノ酸シーケンスを試みたが十分量のサンプルを得ることができず同定に至らなかった。

ここで発想を変えて、水疱内容に異常フラグメントを生成しうる proteinase が含有されているとら

んで、愛媛大学学術支援センターにて開発された無細胞タンパク質合成法にて hCAP-18 合成ペプチドを作製し、水疱内容物で incubation を行った後、改めて同定を試みたところ、TLN-58 を同定することに成功した(図2: J Invest Dermatol 2017)。

MASCOT データベース検索により理論的に考えられる proteinase の候補を複数絞り込むことができた。そのうち理論的に表皮内に産生しうる proteinase を用いて、hCAP-18 の消化実験を行ったところ、neutrophilic elastase (ELA2)が有力候補として同定された。さらにこの酵素に対する proteinase inhibitor として $\alpha 1$ antitrypsin を用いた processing の抑制に成功した。TLN-58

図 1

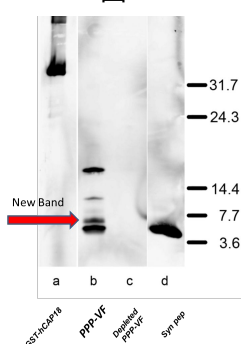


図 2

(a)

Band	Start-End	Sequence	Modifications	Cleavages	Conf (Ident)	Prac mit	Theor mit	dMass
1	119-131	GFDFSCDKDNKR	Cys¹¹⁹MeC(87)		99.0	1450.71	1450.69	0.01
	119-131	GFDFSCDKDNKR			99.0	1449.72	1449.68	0.04
	119-131	GFDFSCDKDNKR	ProteinaseM(C)G7		99.0	1320.71	1320.66	0.04
	119-131	GFDFSCDKDNKR	ProteinaseM(C)G7		99.0	1550.72	1550.72	0.01
	122-140	FALLGDFPR			99.0	1095.59	1095.58	0.01
	141-151	KSKENKGEPR	cleaved K-S(8)-term		99.0	1321.82	1321.78	0.03
	141-152	KSKENKGEPR			99.0	1471.83	1471.88	0.04
	144-152	SREKKGDFPR	cleaved K-S(8)-term		99.0	1349.81	1349.78	0.02
	144-152	EKKKGEPR	cleaved K-E(8)-term		99.0	1134.68	1134.66	0.02
	153-170	NLVVPTES	missed C-T(8)		99.0	910.51	910.49	0.02

(b)

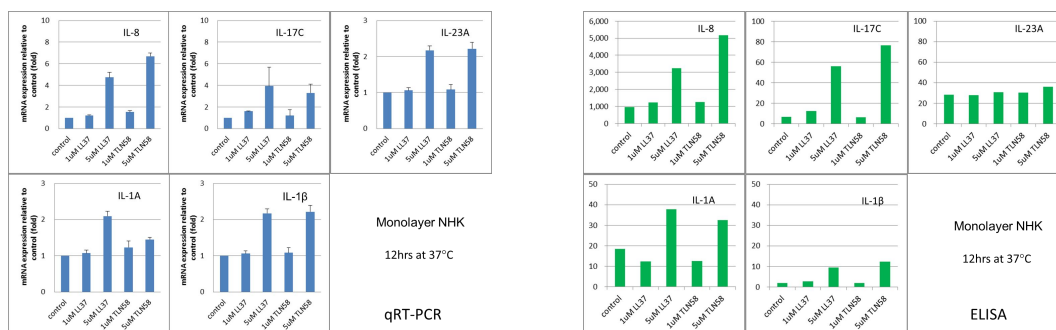
```
001 MKTQRDGHSL GRWSIVLILL GIVMPLAIIA QVLSYKEAVL RAIDGINQRS
051 SDANLYRLLD LDPRPTMDGD FDFPKFVSET VKETVCFRPT QSPEDCDFK
101 RDGLVRCMGS TVTLNQRANGS FDFISCDKDKK RFALLGDFPR KSKKIKGKRF
151 KRIVQRIRKDF LRNLVPRPES
```

(c)

T: Thr	L: Leu	N: Asn	Q: Gln	A: Ala
001	MKTQRDGHSL	GRWSIVLILL	GIVMPLAIIA	QVLSYKEAVL RAIDGINQRS
051	SDANLYRLLD	LDPRPTMDGD	FDFPKFVSET	VKETVCFRPT QSPEDCDFK
101	RDGLVRCMGS	TVTLNQRANGS	FDFISCDKDKK	RFALLGDFPR KSKKIKGKRF
151	KRIVQRIRKDF	LRNLVPRPES		

(d)

合成ペプチドを作製し、LSE (living skin equivalent, 3D 培養表皮) 並びに汗管由来細胞 (NCL-SG3) に対する炎症誘導能に関する評価を行った。ヒト角化細胞及び LSE においては特に IL-8 に関して LL-37 に比べてさらに強力な mRNA 及び protein expression を誘導することが明らかとなり、この fragment が生成されることにより、より水疱が膿疱形成への傾向に動くことがあきらかとなった (下図左: mRNA 誘導結果、下図右: タンパク発現結果)。



マウスモデルにこの合成ペプチドを投与して炎症性サイトカインの発現を確認したところ、in vitro の実験と同様にサイトカイン mRNA 及び protein expression が確認された。この proteinase inhibitor が治療オプションとして有望視されたが、実際にマウスモデルにおける proteinase inhibitor による抑制実験では、結果として接触皮膚炎を生じ、むしろ炎症惹起性の結果となり、外用剤による抑制効果の確認はできなかった。

さらに、今回我々の実験に用いたエクリン汗管由来細胞(NCL-SG3)に関しては、ヒト角化細胞に見られた炎症性サイトカイン誘導を認めることはできなかったため、再現実験を反復していたところ、NCL-SG3 が本来のエクリン汗分泌に関する機能を失っており、生理活性が異なる状態にあるという報告が散見され(Klala P et al, PlosOne 2017)、この細胞を用いた実験結果に疑問が生じた。現在この細胞に代替できる cell line の報告がないため、独自に primary culture によるエクリン汗細胞の培養を行うこととし、期間中に正常皮膚より得られたエクリン汗腺細胞による primary culture に成功した。今後はこの細胞を用いて、エクリン汗細胞に対する TLN58 による炎症性サイトカインの誘導に関する再評価を行い、病態に関する知見を模索する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Murakami M, Kameda K, Tsumoto H, Tsuda T, Masuda K, Utsunomiya R, Mori H, Miura Y, Sayama K. TLN-58, newly discovered hCAP18 processing form, found in the lesion vesicle of palmoplantar pustulosis in the skin. *J Invest Dermatol* 2017; 137(2): 322-331. 査読有
2. Mori H, Murakami M, Tsuda T, Kameda K, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Nakaoka H, Sayama K. Reduced-HMGB1 suppresses poly(I:C)-induced inflammation in keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2018, 90(2):154-165. 査読有
3. Terui T, Kobayashi S, Okubo Y, Murakami M, Hirose K, Kubo H. Efficacy and Safety of Guselkumab, an Anti-interleukin 23 Monoclonal Antibody, for Palmoplantar Pustulosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol*. 2018; 154(3): 309-316. 査読有
4. Utsunomiya R, Dai X, Murakami M, Okazaki H, Tsuda T, Mori H, Shiraishi K, Tohyama M, Sayama K. Heparinoid suppresses Der p-induced IL-1β production by inhibiting ERK and p38 MAPK pathways in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2018; 27(9): 981-988. 査読有
5. Masuda-Kuroki, K, Murakami M, Tokunaga N, Kishibe M, Mori H, Utsunomiya R, Tsuda T, Shiraishi K, Tohyama M, Sayama, K. The microbiome of the “sterile” pustules in palmoplantar pustulosis. *Exp Dermatol*, 2018; 27(12): 1372-1377.

6. Masuda-Kuroki K, Murakami M, Kishibe M, Kobayashi S, Okubo Y, Yamamoto T, Terui T, Sayama K. Diagnostic histopathological features distinguishing palmoplantar pustulosis from pompholyx. *J Dermatol.* 2019; 46(5): 399-408. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Dai X, Tohyama M, Nakaoka H, Sayama K. Suppressive effect of HMGB1 via poly(I:C) induced inflammation in keratinocyte. 46th Annual ESDR Meeting ; Munich, Germany, Sep 7-10, 2016
2. Kishibe M, Murakami M, Kurosu T, Shibuya T, Saito N, Igawa S, Uehara J, Honma M, Radek K.A, Ishida-Yamamoto A. Impact of nicotine treatment on cultured human sweat gland cells. 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology ; Sendai, Miyagi, Dec 9-11, 2016.
3. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama K. Newly discovered function of reduced-HMGB1 as an inflammatory suppressor in keratinocyte. 47th Annual ESDR Meeting ; Salzburg, Austria, Sep 27-30, 2017.
4. Utsunomiya R, Okazaki H, Dai X, Murakami M, Masuda K, Mori H, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama K. Novel function of heparinoid as an anti-inflammatory agent. 47th Annual ESDR Meeting ; Salzburg, Austria, Sep 27-30, 2017.
5. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama K. Another role of exogenous HMGB1 on poly (I:C)-induced inflammation in keratinocyte. 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology ; Kochi, 2017.12.15-17.
6. Mori H, Murakami M, Utsunomiya R, Masuda K, Shiraishi K, Dai X, Tohyama M, Sayama. New role of exogenous HMGB1 for human keratinocyte under acute inflammatory event. 2018 International Investigative Dermatology Meeting, Orlando, Florida, May 16-19, 2018.
7. Masuda K, Murakami M, Tokunaga N, Kishibe M, Mori H, Utsunomiya R, Tsuda T, Shiraishi K, Tohyama M, Sayama K. The microbiome exists in the 'sterile' pustule of palmoplantar pustulosis. 2018 International Investigative Dermatology Meeting, Orlando, Florida, May 16-19, 2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津田照子

ローマ字氏名：Teruko Tsuda

研究協力者氏名：丹えり子

ローマ字氏名：Eriko Tan

研究協力者氏名：亀田健治

ローマ字氏名：Kenji Kameda

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。

研究成果の概要：

表皮内水疱に生じている hCAP-18 の異常フラグメントとして TLN-58 を同定した。Processing の責任酵素として neutrophilic elastase が同定され、proteinase inhibitor として α 1 antitrypsin を用いた processing の抑制に成功した。ヒト角化細胞並びに汗管由来細胞に対して TLN-58 合成ペプチドは特に IL-8 に関して LL-37 に比べてさらに強力な mRNA 及びタンパク発現を誘導した。TLN-58 合成ペプチドをマウスに投与し同様なサイトカイン mRNA 及びタンパク発現は確認されたが、これに対する抑制効果を得ることはできなかった。

The abnormal fragment of hCAP-18 in PPP vesicle was searched with several experiments, and TLN-58 was confirmed. The responsible proteinase was searched with MASCOT database, and neutrophilic elastase was found in the database. As a proteinase inhibitor for it, alpha one antitrypsin was selected and tested if it could suppress the protein processing of hCAP-18 to TLN-58, and we could confirm the prevention of processing. TLN-58 synthetic peptide induces the inflammatory response in primary keratinocyte culture and LSE, but not in sweat gland cells (NCL-SG3), especially for IL-8, comparing with LL-37. In the mouse model, the peptide could induce inflammatory changes in skin tissue, too. However, the proteinase inhibitor induced inflammatory response as an irritant, so that we failed to establish it as a new treatment for PPP.

研究成果の学術的意義や社会的意義

掌蹠膿疱症の病態に関わる因子がまた新たに一つ同定された。水疱内容における異常な抗菌ペプチドの発現様式が本疾患の病態に関わることが明らかとなり、将来の治療オプションを考える上で、重要な発見となった。