

令和 3 年 5 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：2018～2020

課題番号：18K09485

研究課題名(和文)皮膚常在菌及びHMGB1 A-BOXによる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 treatments for indigenous skin flora and intractable skin ulcers caused by HMGB1 A-BOX

研究代表者

森 秀樹 (Mori, Hideki)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60325389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：難治性皮膚潰瘍に対して、皮膚常在菌(表皮ブドウ球菌)による競合的制菌作用に加えて、抗HMGB1抗体を補助的に用いることによる抗菌・抗炎症効果を同時に目論んだ新しい治療方法の開発を試みた。ヒト角化細胞の単層培養細胞に対しては抗炎症効果を示したが、マウスの皮下膿瘍に対しては予想された抗炎症効果を得ることができなかった。その原因として、今回我々が用いたヒト正常角化細胞においてはTLR4が発現しておらず、マウスではTLR4や人にはないTLRが反応し、炎症抑制効果を制限していた可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷遅延の原因の一つに、創部での持続する病原性細菌感染とそれに伴う炎症反応の持続が挙げられる。通常は抗菌物質の全身投与が行われるが、そもそも遷延性難治性潰瘍周囲は癒痕形成などにより血流が悪く、血液中の抗生物質の到達効率が著明に低下している。また、局所的な抗菌物質投与は耐性菌の早期出現を促すため、消毒剤や殺菌性外用剤が用いられることが多いが、これらは同時に細胞毒性を有するため、細胞毒性による創傷遅延を生ずる要因となっている。今回我々が提案する新規治療法は、細胞障害性を有さず、従来の抗菌物質投与と併用可能な新たな治療オプションとしても期待される。

研究成果の概要(英文)：For intractable skin ulcers, we tried to develop a new treatment method that simultaneously aims at antibacterial and anti-inflammatory effects by using anti-HMGB1 antibody as a supplement, in addition to competitive bacteriostatic action by skin flora (Staphylococcus epidermidis). It showed an anti-inflammatory effect on monolayer cultured cells of human keratinocytes, but could not obtain the expected anti-inflammatory effect on subcutaneous abscesses in mice. The cause may be that TLR4 was not expressed in the human normal keratinized cells that we used this time, but that TLR4 and TLR not found in humans reacted in mice, limiting the anti-inflammatory effect.

研究分野：創傷治癒

キーワード：HMGB1 難治性皮膚潰瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遷延性皮膚潰瘍における創傷治癒においては、上皮再生に加えて、遷延因子となりうる病原菌叢、それに伴う炎症反応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。全身性の感染症に対してはむしろ抗生剤の全身投与が中心となるが、局所的加療としては殺菌作用をもつ薬剤が用いられ、これらは時として細胞毒性を持つためにむしろ創傷遅延を起こす要因となる。

2. 研究の目的

創傷遅延の原因の一つに、創部での持続する病原性細菌感染とそれに伴う炎症反応の持続が挙げられる。通常は抗菌物質の全身投与が行われるが、そもそも遷延性難治性潰瘍周囲は癒痕形成などにより血流が悪く、血液中の抗生物質の到達効率が著明に低下している。また、局所的な抗菌物質投与は耐性菌の早期出現を促すため、消毒剤や殺菌性外用剤が用いられることが多いが、これらは同時に細胞毒性を有するため、細胞毒性による創傷遅延を生ずる要因となっている。故に現在は、消毒・殺菌を行うのではなく、生理食塩水などを用いた洗浄処置による細菌量を減少させる方法が主流となってきた。しかしながら細菌増殖能が強く、これを制御できない場合は、やむなく消毒剤や殺菌性外用剤を選択・使用せざるを得ない現状にたびたび遭遇する。

今回我々が提案する新規治療法は、細胞障害性を有さず、従来の抗菌物質投与と併用可能な新たな治療オプションとしても期待される。この方法が効果的と判断されれば、臨床現場での新規の強力な治療オプションとして還元される可能性は極めて大きいと見込まれる。

3. 研究の方法

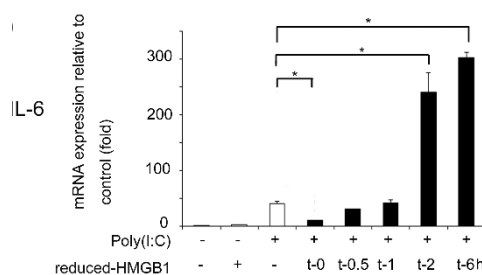
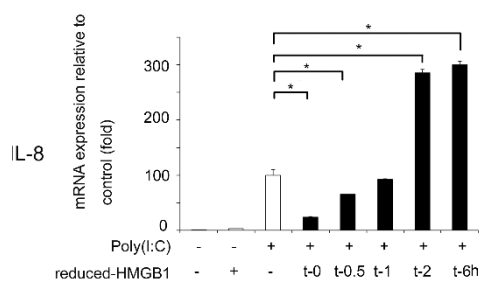
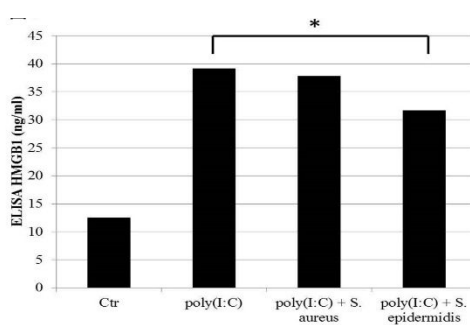
正常人角化細胞を用いた単層培養細胞、三次元培養表皮(図4: Living skin equivalent; LSE)を用いて、物理的創傷作成後に皮膚科領域細菌群(e.g., Group B Streptococcus, Group A streptococcus, S aureus, MRSA)を作用させ、これらによる創傷遅延の評価を行う。次に、既に作成された HMGB1 A-box のプラスミドを使用し(Yang et al., PNAS, 2004)、愛媛大学プロテオサイエンスセンターにて、コムギ無細胞タンパク質合成技術により Recombinant peptide 合成を行う。次に表皮ブドウ球菌と HMGB1 A-box 合成ペプチドによる創傷遅延の改善につき評価検討を行う。正常マウス(Balb/c)、TLR-2 ノックアウトマウスの背部または耳介に形成した皮下膿瘍および創傷モデル(感染有群・無群)を作製したのち、表皮ブドウ球菌死菌含有外用剤、HMGB1 A-box 合成ペプチドの効果と細胞毒性をそれぞれ評価した後、両者の混合軟膏を作製する。

4. 研究成果

(1) ヒト表皮角化細胞の単層培養シートにおいて、還元型 HMGB1 である Reduced-HMGB1 が poly(I:C)に誘導される炎症性サイトカインの産生を抑制することがわかった。

また同様に表皮ブドウ球菌も炎症性サイトカインの産生を抑制することがわかった。

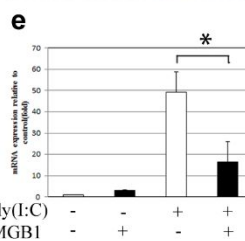
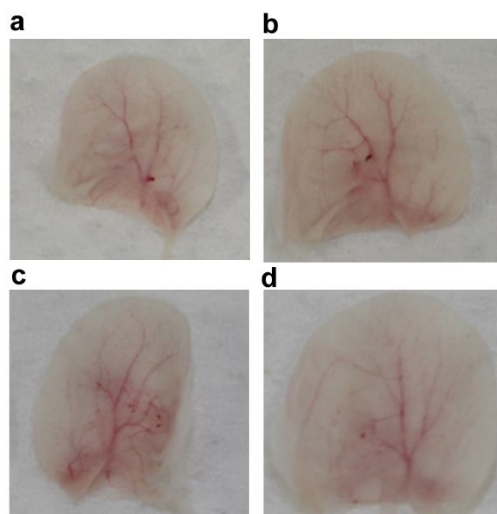
この2者を混合し、同時に投与おこなっても抑制作用は継続することがわかった。



(2) マウスの耳介に poly(I:C) と reduced-HMGB1 の局所注射を行ったところ、reduced-HMGB1 による抗炎症効果がみられた。

しかし、表皮ブドウ球菌による抗炎症効果はみられず、また、HMGB1 との混合による両者の相乗効果もみられなかった。

(3) 次に LPS を用いて炎症を起こし、両者の抗炎症作用を確認しようとしたが、当教室で使用している正常皮膚角化細胞には TLR4 が発現しておらず、これによる炎症誘導が不可能であった。またマウスでも同様の結果となった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori Hideki, Murakami Masamoto, Tsuda Teruko, Kameda Kenji, Utsunomiya Ryo, Masuda Kana, Shiraishi Ken, Dai Xiuju, Tohyama Mikiko, Nakaoka Hiroki, Sayama Koji	4. 巻 90
2. 論文標題 Reduced-HMGB1 suppresses poly(I:C)-induced inflammation in keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 154 ~ 165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2018.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideki Mori
2. 発表標題 Suppressive effect of HMGB1 A-box for inflammation in keratinocytes.
3. 学会等名 European society for dermatological research (ESDR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 秀樹
2. 発表標題 表皮角化細胞に対するHMGB1 A-boxおよびB-boxの作用効果
3. 学会等名 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Mori
2. 発表標題 The mechanism of suppressive effect of reduced-HMGB1for inflammation in keratinocytes.
3. 学会等名 International investigative dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	村上 正基 (MURAKAMI MASAMOTO) (20278302)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------