

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K17351
研究課題名(和文) 表皮角化細胞Toll様受容体3を標的とした皮膚ウイルス感染症の新規外用薬の開発
研究課題名(英文) Development of an external medicine which targets Toll-like receptor 3 in keratinocytes
研究代表者
梶田 藍(Kajita, Ai)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：80770320
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは皮膚ウイルス感染症における表皮角化細胞の自然免疫応答に注目してきた。そのなかでも、Toll様受容体3(TLR3)を介して抗ウイルス活性を増強するpoly(I:C)に着目した。本研究では、表皮角化細胞におけるTLR3を標的とし、短鎖2本鎖RNAを用いた皮膚ウイルス感染症に対する新しい外用治療薬を開発することを目的とし、研究を進めている。今回、短鎖2本鎖RNAによるTLR3依存性抗ウイルス因子誘導能を検討した。比較的分子量の小さい短鎖RNAが抗ウイルス因子誘導に強い活性をもつことが示唆された。現在、短鎖2本鎖RNAが表皮角化細胞の抗ウイルス活性に与える影響について検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では短鎖2本鎖RNAの表皮角化細胞におけるTLR3依存性抗ウイルス遺伝子誘導能について検討してきた。現在も研究を継続しており、短鎖2本鎖RNAが表皮角化細胞の抗ウイルス活性に与える影響や、皮膚ウイルス感染症モデルマウスを用いた実験結果を明らかにしていく予定である。これらの研究結果は新たな皮膚ウイルス感染症に対する外用治療薬として臨床応用される可能性が非常に高い。さらにMRSA伝染性膿痂疹などの細菌感染症や難治性爪白癬などの真菌感染症の外用治療薬としても応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the innate immunity mechanism of skin viral infection in keratinocytes. Especially poly(I:C) enhances anti-viral activity via Toll-like receptor 3 (TLR3). The aim of this project is the creation of new external medicine with short chain double-strands RNA which targets TLR3 in keratinocytes. We have shown that anti-viral factor was induced by short chain RNA with small molecular weight. We are currently investigating the effect of short chain RNA on antiviral activity in keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮角化細胞 Toll様受容体3(TLR3) 短鎖2本鎖RNA サイトカイン 抗菌ペプチド 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚科診療では尋常性疣贅や単純疱疹をはじめとする様々なウイルス性皮膚疾患に遭遇する。単純ヘルペスウイルス感染症、水痘帯状疱疹ウイルス感染症に対してはバラシクロビル、ファムシクロビル、アシクロビルなどの抗ウイルス剤が使用可能である。しかしながら尋常性疣贅、尖圭コンジローマなどのヒト乳頭腫ウイルス(HPV)感染症、また伝染性軟属腫などのポックスウイルス感染症は未だ特効する抗ウイルス剤がなく、液体窒素による凍結療法や撮子を用いた摘除術を施行することが多い。本邦では2007年に尖圭コンジローマの治療薬としてイミキモドが承認されているが、他のウイルス性皮膚疾患には効果が乏しく、保険適応もない。そのような背景より全てのウイルス性皮膚疾患に使用可能な画期的な新規外用剤の登場が待望されている。

ウイルス感染症では自然免疫応答が重要な役割を果たすことは以前よりよく知られており、なかでも pattern recognition receptors の一つである Toll 様受容体(Toll-like receptors TLRs) 3、7、9 がウイルスセンサーとして重要な役割を果たしている (*Nat Immunol.* 2001 ; 2 : 675-80)。加えて、細胞内には RIG-I、MDA5、LGP2 といった RIG-I 様受容体が存在し、細胞内ウイルスセンサーとして機能している。イミキモドは一本鎖 RNA 受容体である TLR7 を介して樹状細胞、単球に作用し、炎症性サイトカイン、ケモカインを介して、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を示す。

一方、私たちは皮膚ウイルス感染症における表皮角化細胞の自然免疫応答に注目し研究を進めてきた。表皮角化細胞を TLR3 のリガンドである合成二本鎖 RNA の poly(I:C)で刺激すると、非常に強力な炎症反応が誘導される。この効能に着目し、私たちはこれまでに、表皮角化細胞において Th1 サイトカインである IFN- γ が TLR3 の発現と機能を増強していることを見出した (*J Invest Dermatol.* 35(8):2005-2011, 2015)。さらに、表皮角化細胞に IFN- γ と poly(I:C)で刺激すると相加相乗的に IFN- γ や抗菌ペプチドである デフェンシン 2 の発現を増強することを発見した。これらのサイトカインと抗菌ペプチドは抗ウイルス活性を有する。さらに、表皮角化細胞を用いたウイルスプラークアッセイでも poly(I:C)で刺激するとウイルスのプラーク数が激減することを確認した。

他の論文では、poly(I:C)は MDA5 や RIG-I によっても認識され (*J Immunol.* 2008 ; 181 : 2694-704, *J Dermatol Sci* 2012 ; 66 : 64-70)、ウイルス疣贅の原因となる HPV ファミリーの排除に働くことも示唆されている (*J Virol.* 2011 ; 85 : 11372-380)。以上より我々は、TLR3、MDA5、RIG-I といった pattern recognition receptors (PRRs) を介して抗ウイルス活性を増強する poly(I:C)に皮膚ウイルス感染症に対する有効な治療薬となる可能性を見出した。しかし、これまでに poly(I:C)の抗ウイルス作用を利用する新規外用剤の実用化に向けた詳細な検討はなされていないため、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は表皮角化細胞の TLR3 を標的として、短鎖二本鎖 RNA を用いた皮膚ウイルス感染症に対する新しい外用治療薬を開発することである。

3. 研究の方法

市販されている poly(I:C)は 0.2~8kb と分子量が非常に大きい。皮膚透過性の観点から外用薬の分子量は 500 以下が望ましいため、モノヌクレオチド (イノシン酸 $C_{10}H_{13}N_4O_8P$ とシチジン酸

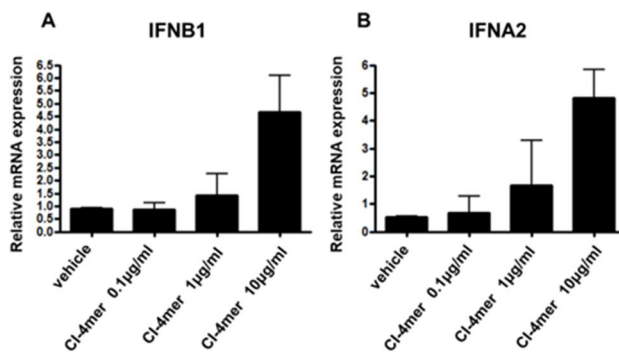
C₉H₁₄N₃O₈P)を用いて、以下の二本鎖 RNA の合成を行った。

(1:C)の二量体 (1:C)の四量体 (1:C)の六量体 (1:C)の八量体
(1:C)の十量体 (1:C)の二十量体 (1:C)の三十量体

短鎖二本鎖 RNA による TLR3 依存性抗ウイルス因子誘導能を検討するため、培養ヒト正常表皮角化細胞 (NHEKs) を $10^{-9} \sim 10^{-6} \text{M}$ で刺激後、RNA と培養上清を回収した。IFN- γ 、デフェンシン 2 などのサイトカイン、抗菌ペプチドの発現量をリアルタイム PCR 法および ELISA 法で評価した。当検討から、どの短鎖 RNA が抗ウイルス因子誘導に強い活性を持つのかを知り、そのシグナル経路を同定することができると思った。

4. 研究成果

NHEKs に $10^{-9} \sim 10^{-6} \text{M}$ の合成短鎖二本鎖 RNA で刺激をし、四量体では IFN- γ や IFN- β の発現が濃度依存性であることを確認した (図 A、B)。



現在、抗ウイルス活性を評価するためウイルスプラークアッセイを行っている。表皮顆粒層レベルにウイルス感染細胞が存在することを考慮し、分化させて表皮角化細胞にも二本鎖 RNA を作用させて検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------