

令和 5 年 10 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20984

研究課題名（和文）表皮細胞を標的とした強皮症に伴う難治性皮膚潰瘍の新規治療薬開発

研究課題名（英文）Development of Novel Therapeutic Drugs for Refractory Skin Ulcers Associated with Scleroderma, Targeting Epidermal Cells

研究代表者

尾松 淳 (Omatsu, Jun)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70908334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の線維化と血管障害を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。多臓器線維化の背景には創傷治癒機転の異常が存在し、皮膚においては硬化と難治性皮膚潰瘍が主要な臨床症状である。表皮細胞の増殖・抑制に関わる複数のシグナルの抑制・活性化を実現するために比較的安価であるDNAアプタマーの作成を検討した。表皮細胞の増殖に関わるIL-17やEGF受容体などの各受容体に結合するDNAアプタマーの取得を網羅的に行った。結合するいくつかの有用なDNAアプタマーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮細胞は皮膚の最外層にあるため外用薬などで容易にアクセスでき、治療ターゲットとして最適です。特に強皮症では傷の上皮化障害がありますが、その原因である複数の表皮細胞由来蛋白の発現異常を是正するような核酸アプタマーを開発し外用剤とすることで、強皮症での難治性皮膚潰瘍に対する新規治療薬に繋がっていきます。その礎を今回の研究では行えたと考えております。

研究成果の概要（英文）：Systemic sclerosis is a systemic autoimmune disease characterized by fibrosis of the skin and various internal organs, as well as vascular damage. The background of multi-organ fibrosis involves an abnormality in wound healing mechanisms, with skin hardening and refractory skin ulcers being the primary clinical symptoms. We considered creating DNA aptamers, which are relatively inexpensive, to achieve the inhibition and activation of several signals related to the proliferation and suppression of epidermal cells. We carried out a comprehensive acquisition of DNA aptamers that bind to various receptors involved in the proliferation of epidermal cells, such as IL-17 and EGF receptors. We identified several useful DNA aptamers that bind

研究分野：皮膚科

キーワード：全身性強皮症 表皮細胞 DNAアプタマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

身性強皮症(以下、強皮症)は皮膚および内臓諸臓器の血管障害と線維化を特徴とする全身性の自己免疫疾患(膠原病の一つ)である。他の膠原病に比して免疫抑制療法の効果が乏しく、現時点では確立された治療法はない。膠原病領域の最後の難病と認識されており、その病態理解と治療開発は医学研究者に課された喫緊の課題の一つである。

多臓器線維化の背景には創傷治癒機転の異常が存在し、皮膚においては硬化と難治性皮膚潰瘍が主要な臨床症状である。

強皮症の病態理解と治療開発が遅れている要因の一つとして、その病態を忠実に再現する動物モデルが過去に存在しなかったことが挙げられる。

2014年に我々の研究グループでは強皮症の主要3病態を「免疫異常 血管障害 線維化」の列序性をもって再現する Klf5^{+/-};Fli1^{+/-}マウスを作成した。FLI1の発現低下が各種細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞、表皮細胞、B細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞)において強皮症特有の形質を誘導することが示されている。

特に表皮細胞については、上皮細胞特異的 Fli1 欠失マウス(Fli1^{flox/flox};K14-Cre^{+/-}マウス)において興味深い知見を我々は得ている。同マウスでは、重層扁平上皮の活性化により皮膚と食道の線維化が生じる、胸腺髄質上皮で autoimmune regulatory の発現が低下し、中枢性免疫寛容が破綻することで間質性肺疾患が生じる、の2点が明らかとなっており、強皮症の線維化病変の臓器選択性(皮膚、食道、肺)に上皮細胞の形質異常が背景因子として機能している可能性を示した。そして、強皮症では、表皮細胞における複数の分子の発現異常がその増殖と遊走を阻害し、再上皮化を抑制していることから創傷治癒が遅延し、難治性皮膚潰瘍が生じると考えられている。実際に強皮症患者の難治性皮膚潰瘍では、肉芽形成が得られても上皮化に時間を要する場合が多い。また健常人であれば容易に上皮化するような微小な外傷であっても、強皮症患者では上皮化が遅延し、傷が拡大して難治性皮膚潰瘍に進展する 경우가多々ある。このように強皮症では傷の上皮化障害があることは明確だが、複数の表皮細胞由来蛋白の発現異常を是正することができれば、強皮症の難治性皮膚潰瘍に対する新規治療薬の開発に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

強皮症の表皮細胞を標的とした創傷治癒障害に対する新規治療薬の開発が本研究の目的である。表皮細胞は皮膚の最外層にあり外用薬で容易にアクセスできるため、外用薬基剤中で安定であり、かつ浸透性に優れた薬剤の標的細胞として最適である。そして、表皮細胞の増殖・抑制に関わる複数のシグナルの抑制・活性化を実現するうえで、核酸アプタマーに注目することとした。核酸アプタマーは軟膏やクリーム基剤中で安定であることが知られており、複数のアプタマーを混合しても個々の活性は維持されるため、複数の治療標的に対する混合外用薬の開発が可能である。比較的安価である DNA アプタマーを用いて外用薬をベースとした強皮症の難治性皮膚潰瘍に対する新規治療薬の開発を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

複数の標的分子に対する DNA アプタマーの開発を行い、実際にこれらの DNA アプタマーが標的分子の機能を抑制するか、あるいは標的分子が作用する受容体に対して agonist として作用するかについて、培養細胞を用いて検討を行った。表皮細胞の増殖・抑制に関わる複数のシグナルの抑制・活性化を実現するために比較的安価である DNA アプタマーの作成は SELEX 法をもちいた。表皮細胞の増殖に関わる IL-17 や EGF 受容体などの各受容体に結合する DNA アプタマーの取得を網羅的に行った。合成一本鎖 DNA 核酸ライブラリーを基に核両端にプライマー配列を持つ 40 塩基のランダム DNA を化学合成し、各受容体細胞外ドメインの組み換えタンパク質と混合し、結合配列を単離して PCR 増幅する一連のサイクルを行い、配列解析を行った。

DNA アプタマーを用いて複数の標的分子のシグナルを阻害あるいは活性化するか否かをモデルマウスを用いて、検討を行なった。

4. 研究成果

表皮細胞の増殖・抑制に関わる複数のシグナルの抑制・活性化を実現するために比較的安価である DNA アプタマーの作成を、SELEX 法をもちいて検討した。表皮細胞の増殖に関わる IL-17 や EGF 受容体などの各受容体に結合する DNA アプタマーの取得を網羅的に行った。合成一本鎖 DNA 核酸ライブラリーを基に核両端にプライマー配列を持つ 40 塩基のランダム DNA を化学合成し、各受容体細胞外ドメインの組み換えタンパク質と混合し、結合配列を単離して PCR 増幅する一連のサイクルを行い配列解析を行い、結合する複数の DNA アプタマー配列の単離に成功した。次に上皮細胞特異的 Fli1 欠失マウスより採取した表皮細胞をもちいて IL-17A、EGF などの結合活性を確認した。その結果、IL-17A に対する有用な DNA アプタマーを 2 種類取得した。

取得した同定した IL-17A Aptamer を強皮症モデルマウスである BLM-induced skin fibrosis

model に投与した。具体的には、IL-17A Aptamer を 2 日に 1 回皮内投与、計 4 週間投与し、28 日時点において、HE 染色にて Dermal thickness を、Masson Trichrome 染色にて線維化の程度を、Sircol Collagen assay にて Skin collagen を検討した。Skin collagen および fibrosis area においては IL-17A aptamer 投与により抑制傾向であったがいずれも有意差は認められず、BLM マウスでの皮膚硬化抑制作用は限定的であった。そのため、IL-17A のみならず IL-23 も含めた新しいアプタマーを取得予定である。また、DNA アプタマーを強皮症モデルマウスに塗布するために、ナノリポソームカプセル含有クリームへの最終的な応用を視野に、外用剤の種類や塗布方法の検討を行った。次に強皮症モデルマウスを用いて潰瘍を人工的に作成し、創傷治癒において同定した DNA アプタマーが与える影響について多角的に検討している。今後、これらのマウスを用いた薬効評価の知見を蓄積することにより、DNA アプタマーが細胞内を標的とする潰瘍治療薬として展開されることが期待される。

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