

# Physical Medicine を用いた乾癬治療法の探索と 治療の最適化に向けた基礎的研究

創薬・生命薬科学専攻 HIGO 専門コース 遺伝子機能応用学 連川 雄

物理刺激を疾患治療に応用した *physical medicine* は低侵襲かつ処置条件の調節が容易であり、慢性疾患の新規治療法として期待されている。

本研究室では *physical medicine* を用いた画期的治療を行うために、生体が応答しうる特定条件の微弱パルス電流である MES の存在を世界に先駆けて明らかにした。MES は 0.1 ms, 55 pps の条件の微弱電流であり、AMPK などの細胞内シグナル分子の活性化を介し、様々な生体応答を誘導する。このような MES とその作用を増強させる 42°C の温熱 (HS; heat shock) の併用 (MES+HS) は、II型糖尿病、慢性腎臓病、肝虚血性再灌流障害のモデルマウスの病態を改善した。これらのモデルに共通して、炎症パラメータの改善が認められたことから、炎症性疾患に対する有効性が示唆された。また、MES+HS はII型糖尿病患者を対象とした臨床試験において病態改善効果と安全性が認められたため、さらなる処置条件の最適化と治療効果の判定や安全性の予測ができるバイオマーカーの同定により治療効果の最大化を図ることで、臨床への応用が近づくと予想される。

このような背景のもと、本研究では MES+HS が皮膚の炎症性疾患に与える作用の解明を目的に、乾癬のマウスモデル (imiquimod 誘導性乾癬モデル) を用いた有効性の検討を行った (研究 1)。次に、本研究では MES+HS 治療の臨床応用を見据え、治療効果の最大化を目的に、概日リズムを考慮した MES+HS の処置タイミングの最適化とメタボロミクスを用いたバイオマーカー探索を行った (研究 2, 3)。

## 1. 乾癬病態に対する MES+HS の有効性の検討

乾癬は炎症性皮膚疾患であり、その原因であるケラチノサイトの過増殖は T 細胞とケラチノサイトが産生する炎症関連分子により誘導される。高率に慢性化するため、長期の疾患治療に適した安全かつ有効性の高い治療薬の開発が望まれている。そこで本研究は、MES+HS が乾癬病態に与える作用を解明するために、imiquimod 誘導性乾癬マウスモデルを作成した。Toll-like receptor 7, 8 のリガンドである imiquimod 含有クリーム (15 mg) をマウスの耳に塗布することで、ケラチノサイトの過増殖と乾癬様の炎症が惹起された。本モデルに対し MES+HS を毎日 10 分間処置したところ、imiquimod 塗布により誘導される耳の肥厚化が処置後 2 日目から有意に抑制された。MES+HS 処置による肥厚の抑制率は、単独処置群 (MES, HS) と比較してより高いことが分かった。さらに、MES+HS 処置群の病変皮膚では炎症性サイトカインである IL-17A のタンパク質発現の有意な減少と CD3 陽性 T 細胞の浸潤の減少が認められた。MES+HS 処置は、乾癬の炎症増悪因子である抗菌タンパク質 (*S100A8*, *Reg3γ*) 発現の抑制作用を示した。さらに、*Reg3γ* の下流分子である AKT のリン酸化も有意に抑制されていたことから、ケラチノサイト過増殖の抑制に *Reg3γ*-Akt 経路が一部関与していることが示唆された。また、ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT cells) を用いた *in vitro* 評価系においても、MES+HS は IL-17A 誘導性の抗菌タンパク質 (*S100A7*, *S100A8*, *S100A9*, *β-defensin2*) の遺伝子発現を有意に減少させた。これらの結果より、MES+HS は炎症関連分子の発現を減少させ、乾癬病態の進行を抑制することが明らかになった。

## 2. 概日リズムを考慮した MES+HS の薬理作用の効率化

ヒトを含めた地球上の多くの生物は 24 時間の概日リズムを有している。概日リズムを構成する時計遺伝子は薬物動態や感受性に関わる分子の発現を調節するため、薬効発現は投薬時間により大きく影響を受ける。そこで本研究は、概日リズムが MES+HS のインスリンシグナル活性化作用に与える影響を明らかにし、概日リズムを考慮した MES+HS の薬理作用の最大化を行うことを目的にした。まず、明期開始 1 時間後 (ZT1) と暗期開始 1 時間後 (ZT13) における時計遺伝子 (*Bmal1*, *Per2*) の mRNA 発現を比較したところ、ZT1 において *Bmal1* の有意な発現上昇と *Per2* の顕著な発現減少が認められた。次に、MES+HS 処置タイミングの違いが C57BL/6J マウスのインスリンシグナル活性化作用に与える影響を検討した。興味深いことに、ZT1 に MES+HS を処置したマウス骨格筋においてインスリンシグナルの有意な活性化 (p-AKT, p-GSK3 $\beta$  の増加) が認められた一方で、ZT13 に処置を行った骨格筋ではシグナル活性化作用が消失した。同様に、マウス肝臓においても、処置タイミングによる MES+HS の効果の差異が認められた。次に、*in vitro* の条件下において時計遺伝子が MES+HS のシグナル活性化作用に直接的な影響を及ぼすかを明らかにするため、*Bmal1* をノックダウンした骨格筋細胞株 (C2C12 cells) に MES+HS 刺激を与えたところ、AKT 経路の活性化 (p-AKT の増加) が見られなくなることが分かった。以上の結果より、MES+HS が概日リズムに依存したインスリンシグナル活性化作用を示すことが明らかになった。

## 3. メタボロミクスを用いた MES+HS のバイオマーカー探索

本研究室は、医療機器メーカーとの連携による MES+HS のデバイス開発を行い、社会実装を目指している。しかしながら、MES+HS は初期の糖尿病への適応が予想されるものの、治療効果や安全性を判別できる指標が少ないという課題がある。そこで、MES+HS のバイオマーカーの同定を目的にマウスの血中代謝物の網羅解析を行った。C57/BL6J マウスを使用し、通常食 (ND) コントロール群、MES+HS-ND 群、高脂肪食 (HFD) コントロール群、MES+HS-HFD 群に群分けした。まず、MES+HS が初期の糖代謝異常に与える作用を評価するために、短期間 (3 週間) の HFD 負荷を行ったところ体重の顕著な増加、空腹時血糖値の上昇、脂肪蓄積が誘導された。MES+HS 処置は体重増加、脂肪蓄積には大きな影響を与えなかったものの、空腹時血糖値の上昇を抑制した ( $p=0.052$ )。次に、血清中の代謝物を CE-MS 法を用いて解析したところ、214 (カチオン 136, アニオン 78) の代謝物が検出された。得られた代謝物の中から、ND 負荷および HFD 負荷条件で MES+HS 処置により顕著な変動が認められた serotonin をバイオマーカー候補として同定した。さらに、MES+HS-ND 群において、生合成原料である tryptophan の濃度が減少していたことから、MES+HS が serotonin 生成に影響を与えたことが示唆された。次に、測定した全代謝物を対象に主成分解析を行ったところ、PC3 軸において、Control-ND, MES+HS-ND 群の間にスコア分布の違いが認められ、その中から因子負荷量が高い 42 代謝物を同定した。さらに、HFD 負荷群において 42 代謝物の濃度を比較したところ、MES+HS 処置で有意な変動が認められた succinic acid, glucose-6-phosphate をバイオマーカー候補として同定した。以上より、本研究は MES+HS の治療において、serotonin と succinic acid, および glucose-6-phosphate がバイオマーカーになりうることを示した。

以上、研究 1 では乾癬における MES+HS 治療の有用性を明らかにした。さらに、研究 2, 3 では概日リズムを考慮した MES+HS 処置タイミングの効率化とメタボロミクスによるバイオマーカー候補同定を行い、治療効果の最大化への基礎的知見を提示した。これらの研究は、新規 physical medicine である MES+HS の臨床応用に貢献する重要な知見である。