

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591661

研究課題名(和文)魚鱗癬様紅皮症の病態に関する研究

研究課題名(英文)Various phenotypes and pathophysiology of congenital ichthyoses

研究代表者

山西 清文(Yamanishi, Kiyofumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：魚鱗癬様紅皮症の病態に関わるメカニズムの解明を目指し、疾患表現型と遺伝子変異の関連、魚鱗癬モデルにおける表現型とその特徴の解析、魚鱗癬に伴う皮膚炎の発症機構を中心に研究を行った。研究成果として、季節変動を示す水着魚鱗癬におけるTGM1変異p.[G144R]:[R307W]、表皮融解性魚鱗癬における新規変異p.L157Pを同定した。また、TGM1にR142C変異を持つ魚鱗癬モデルマウスにおける変異蛋白の不安定性とin vivoでの角層細胞間脂質分子配向障害を証明した。さらに、アトピー性皮膚炎様の症状を示すネザートン症候群の表皮でIL-33発現が増加していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Various phenotypes and pathophysiology were examined in causative mutations in congenital ichthyoses including rare cases with epidermolytic ichthyosis with hypercalcemia and bathing suit ichthyosis with summer exacerbation. A knock-in mouse line with a transglutaminase 1 mutation R142C was generated using Cre-lox system and mice were subjected for analysis of the phenotype. Homozygous mutant mice were lethal soon after birth and showed a low expression of the enzyme. Intercellular lipid organization in the stratum corneum was totally disoriented in living mutant mice. In cases with Netherton syndrome, which show atopic dermatitis-like phenotypes, the up-regulation of interleukin 33 was evident. IL-33 may be involved in the atopy-like cutaneous inflammation in Netherton syndrome, because a skin-specific expression of IL-33 in mice showed immunological features resembling atopic dermatitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：角化症 魚鱗癬 病態 モデル動物 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

魚鱗癬は先天性の皮膚の角層形成障害であり、現在までにさまざまな病型が明らかになっている。表皮融解性魚鱗癬(水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症)はケラチン K10 あるいは K1 の変異で発症する優性遺伝性の魚鱗癬である。劣性遺伝性魚鱗癬には、葉状魚鱗癬、魚鱗癬様紅皮症、およびその亜型が含まれ、原因遺伝子として、*TGM1*, *ABCA12*, *ALOXE3*, *ALOX12B*, *CYP4F22*, *NIPAL4*, *CERS3*, *PNPLA1* などが同定されている。さらにネザートン症候群など、魚鱗癬以外の障害を合併する魚鱗癬は魚鱗癬症候群として知られている。これらの魚鱗癬の原因遺伝子の同定や角層障害については詳細な解析が行われてきた。しかし、魚鱗癬にはしばしば合併する皮膚炎や紅皮症の機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究は、各魚鱗癬患者の責任遺伝子の解析、皮膚組織を用いた免疫学的解析に加え、*TGM1* に点突然変異を持つ魚鱗癬モデルマウス皮膚の免疫学的特性を解析することによって、角化異常と皮膚免疫の接点となる新たな分子機構を提唱することを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) 動物

遺伝子改変マウスを用いる実験は兵庫医科大学動物実験委員会・遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもとに実施した。

(2) 遺伝子診断解析

ヒト遺伝子解析研究およびヒトの組織、血液サンプルの採取、ゲノム DNA の解析については、兵庫医科大学倫理委員会で承認された説明文書に基づき説明を行い、提供者より書面による同意を得て実施した。提供者の個人情報については、連結可能匿名化して研究に使用した。

(3) 次世代シーケンシング (NGS)

サンプル DNA を制限酵素で断片化し、標的 DNA プロンプを用いてターゲット濃縮の後、キャプチャーされた DNA の配列情報をイルミナ社 MiSeq を使用して解析した。シーケンス解析のパイプラインには SureCall、Avadis などを用いた。

4. 研究成果

(1) 季節変動を示す常染色体劣性魚鱗癬の病態

臨床的に極めて特徴的な症状を示す夏季に増悪する常染色体劣性魚鱗癬の病態につ

いて研究を行った。対象とした症例は、コロンベビーとして出生し、その後魚鱗癬の症状を発症している。家系に同症はない。症状としては、頭部、頸部、体幹、四肢に限局性の比較的大型の鱗屑を認め、その部分にびまん性の紅斑を伴っていた。その他の部位では症状は軽く、掌蹠は薄い鱗屑が付着する程度の過角化であった。魚鱗癬症状の強い皮疹の分布に一致して紅斑を認め、サーモグラフィではその部位の体表温度が高温であった。魚鱗癬と紅斑は夏季に増悪し、10 の外気温の上昇とともに、拡大と悪化を示した。厚い角層と紅斑を伴う病変部の HE 染色像では角層の均一な肥厚、表皮肥厚と真皮の血管周囲に炎症細胞浸潤を認めるが、軽症の部位では炎症細胞浸潤、表皮肥厚はほとんどなく、角層肥厚は軽度であった。症状が著しい部位の電顕像では、角層の著明な肥厚、周辺帯の低形成、角層デスモソームの残存が観察された。倫理委員会承認の下に *TGM1* 遺伝子解析を実施した結果、父方由来の c.430G>A と母方由来の c.919C>T の塩基置換が検出され、トランスグルタミナーゼ 1 に p.G144R と p.R307W の変異が生じる可能性が示唆された。

(2) 表皮融解性魚鱗癬の病態と変異解析

角化型ケラチンによる魚鱗癬として、K10 の変異では水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、周期性魚鱗癬、K1 の変異ではそれ以外に Curth-Macklin 型豪猪皮様魚鱗癬、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の非典型例の報告がある。K1 は掌蹠に発現しているため、掌蹠角化症を伴うことが多く、症状が掌蹠角化症のみの場合もある。本年度の研究では、中等度の掌蹠角化を合併した水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の病態について検討を行った。この症例では予想に反し、遺伝子解析では *KRT10* 遺伝子に c.470T>C の変異が検出された。この塩基置換は K10 のコドン 157 の Leu が Pro に置換する点突然変異 p.L157P に相当する。このアミノ酸は最も変異の多いコドン 156 のアルギニンに隣接し、ケラチン 10 分子のヘリックス開始モチーフに存在する。通常、K10 の変異では掌蹠の過角化は伴わないが、本症例では掌蹠の過角化を伴っており、従来の概念とは異なる機序を想定することが必要と思われた。

(3) *TGM1* に R142C 変異をもつ魚鱗癬モデルマウスの表現型解析

トランスグルタミナーゼ 1 の R143C 変異に相当する R142C 変異を持つノックインマウスはこの酵素のノックアウトマウスと同様の症状を示すが、そのメカニズムは不明であった。今回の解析では、このマウスの皮膚では、変異トランスグルタミナーゼ 1 mRNA の発現は野生型と同じ程度であったが、タンパクについては非常に少ないことが皮膚抽出タンパクのウエスタンブロッティングにより証

明した。この変異マウスの培養角化細胞でもトランスグルタミナーゼ1の活性は低く、従って、トランスグルタミナーゼ1のR142C点突然変異により、生体レベルで酵素の不安定性が生じ、マウスではトランスグルタミナーゼ1欠損と同様の症状を示すに至ることが判明した。

(4) 魚鱗癬皮膚におけるサイトカイン・ケモカインの解析

TGM1 R142C 魚鱗癬モデルマウスの皮膚で発現するサイトカイン・ケモカインの発現パターンを網羅的に低密度アレイ、プロテインアレイなどにより解析した。低密度アレイでは複数のサイトカイン・ケモカインの発現が検出されたが、特定のヘルパーT細胞のサブセットの活性化を示唆する結果は得られず、別の角度からの検討が必要と思われた。

(5) ネザートン症候群における皮膚炎発症の病態

ネザートン症候群は魚鱗癬にアトピー性皮膚炎様の症状を伴う魚鱗癬症候群である。本症の稀な2症例を対象として皮膚炎に関する病態解析を行った。SPINK5 遺伝子の解析から p.Y126X、p.R790X の欠失変異以外に、新規変異 p.C367Lfs*3 を同定した。表皮のサイトカインの解析では、アトピー性皮膚炎では表皮に IL-33 の高発現がみられることに注目し、ネザートン症候群表皮における IL-33 の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、これら変異をもつネザートン症候群では、IL-33 が表皮で高発現することが示唆された。IL-33 を表皮特異的に発現する遺伝子改変マウスの表現型がアトピー性皮膚炎に酷似する免疫学的特性を示すことを考慮すると、ネザートン症候群における紅皮症の原因として、表皮から産生される IL-33 がその病態に関与する可能性が示唆された。

(6) 魚鱗癬遺伝子の包括的解析

魚鱗癬様紅皮症を含む魚鱗癬の診断には、従来 PCR 増幅産物のサンガー法によるダイレクトシーケンシングが用いられてきた。しかし、次世代シーケンシング (NGS) が実用化され、NGS を用いたターゲットリシーケンシングを応用すれば、短時間で多数の遺伝子を一度に解析することが可能である。そこで、魚鱗癬の責任遺伝子を含め皮膚の形成に関わる約 50 遺伝子のコード領域とスプライシング部位を標的配列として、包括的に変異同定が可能な解析システムを構築した。現在、このシステムを用いて、魚鱗癬の症状を示す患者の遺伝子変異解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Konishi T, Tsuda T, Sakaguchi Y, Imai Y, Ito T, Hirota S, Yamanishi K.

Upregulation of interleukin-33 in the epidermis of two Japanese patients with Netherton syndrome. *J Dermatol.* 41:258-261, 2014 (査読有)

Itoh M, Tatsukawa H, Eun-Seo L, Yamanishi K., Kojima S, Hitomi K. Variations in both TG1 and TG2 isozyme-specific in situ activities and protein expressions during mouse embryonic development. *J Histochem Cytochem.* 61:793-801, 2013 (査読有)

Takei-Taniguchi R, Imai Y, Ishikawa C, Sakaguchi Y, Nakagawa N, Tsuda T, Hollenberg MD, Yamanishi K. Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D3 and glucocorticoids in human keratinocytes. *J Dermatol.* 39:625-631, 2012 (査読有)

Yamamoto M, Tsuda T, Otaki Y, Nakanishi T, Yamanishi K. Case of epidermolytic ichthyosis (bullous congenital ichthyosiform erythroderma) with a novel L157P mutation in KRT10 complicated by hypercalcemia. *J Dermatol.* 39:716-718, 2012 (査読有)

Nakagawa N, Yamamoto M, Imai Y, Sakaguchi Y, Takizawa T, Noboru O, Yagi N, Hatta I, Hitomi K, Takizawa T, Tsuda T, Matsuki M, Takeda J, Yamanishi K. Knocking-in the R142C mutation in transglutaminase 1 disrupts the stratum corneum barrier and postnatal survival of mice. *J Dermatol Sci* 65:196-206, 2012 (査読有)

Yamamoto M, Sakaguchi Y, Itoh M, Nakagawa N, Fukunaga A, Hitomi K, Yamanishi K. Bathing suit ichthyosis with summer exacerbation: A temperature-sensitive case. *Br J Dermatol* 166:672-674, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

Yamanishi K., Nakagawa N, Haneda K, Sakaguchi Y, Imai Y. Upregulation of interleukin-33 in the epidermis of two Japanese patients with Netherton syndrome. Symposium of the International Society of Dermatopathology. 2014.9.26-28, Florence, Italy

山西清文. A variety of the phenotypes in transglutaminase-1 deficiency. 第86回日本生化学会 2013.9.11, 横浜

Yamanishi K. The phenotype of transglutaminase-1 deficiency. Transglutaminases in human disease processes. Gordon Research Conference, 2012. 7.18, Davidson, North Carolina, USA

山西清文. 角化症診療のカッティング・エッジ：非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症における表現型と責任遺伝子の多様性 第111回日本皮膚科学会総会 2012. 6.1, 京都

Yamamoto M, Nakagawa N, Sakaguchi Y, Mizuno Y, Suga Y, Yamanishi K. Disulfide cross-linking proceeds in the epidermis after the assembly of loricrin by transglutaminase 1. 2nd Continental Congress of Dermatology of the International Society of Dermatology. 2011.7.6-9, St. Petersburg, Russia

〔図書〕(計2件)

山西清文. 中山書店, シェーグレン・ラルソン症候群 症候群ハンドブック 2011, 54.

Yamanishi K. Lamellar ichthyosis; Non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma; Sjögren-Larsson syndrome. The Color Atlas of Disorders of Keratinization 2nd edition, Kyowa Kikaku, LTD. 2011, 77-78; 79-81; 90-91.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm/Ref1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 清文 (YAMANISHI, KIYOFUMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10182586

(2) 研究協力者

今井 康友 (IMAI, YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10529514

中川 登 (NAKAGAWA, NOBORU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：90412014

山本 雅章 (YAMAMOTO, MASAOKI)
兵庫医科大学・医学部・講師

坂口 祥子 (SAKAGUCHI, YOSHIKO)
兵庫医科大学・実験補助