

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19680

研究課題名(和文)新規fused-S100蛋白質Trichohyalin like 1の機能解析

研究課題名(英文)A functional analysis of trichohyalin-like 1 protein, a novel member of the fused-type S100 protein family.

研究代表者

三澤 恵 (Mizawa, Megumi)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：80401834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Trichohyalin-like protein 1(TCHHL1)はfused-S100蛋白質のひとつで、正常表皮基底層に発現する新規分子である。TCHHL1の機能を解析するため、siRNAを用いて培養表皮角化細胞(NHks)における発現を抑制したところ、増殖の有意な抑制と細胞死が観察された。その機序としてERK1/2、JNK、Aktのリン酸化が関与していた。次に皮膚有棘細胞癌(SCC)の増殖への関与も検討するため、SCC培養細胞株であるHSC1細胞のTCHHL1発現を抑制した。その結果NHksと同様に細胞増殖が有意に抑制され、TCHHL1がSCCの治療ターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Trichohyalin-like 1 (TCHHL1) protein is a novel member of the fused-type S100 protein family expressed in the basal layer of the epidermis. In the present study, we examined the function of TCHHL1 in human skin. Cell proliferation was significantly suppressed in TCHHL1-suppressed normal human keratinocytes (NHks) compared with control NHks. Furthermore, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)-positive cells were significantly increased by the suppression of TCHHL1 expression. In TCHHL1-suppressed NHks, the phosphorylation of ERK, JNK and AKT was inhibited. We next examined the association of TCHHL1 with the proliferation of squamous cell carcinoma (SCC). The knockdown of TCHHL1 expression in the human SCC line HSC-1 significantly suppressed the cell proliferation and induced cell death just as that in NHks. Accordingly, we hypothesized that TCHHL1 might be a novel therapeutic target in SCC.

研究分野：皮膚科

キーワード：TCHHL1 表皮角化細胞 細胞死 細胞増殖能

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに新規の fused-S100 蛋白質である Trichohyalin-like protein 1 (TCHHL1)を同定、単離した(Yamakoshi et al. Biochem Biophys Res Commun, 2013)。TCHHL1 遺伝子は他の S100 fused gene と同様に3つの exon からなり、全長 cDNA は 3604 bp で 904 アミノ酸残基をコードしている。推定されるアミノ酸配列では、N 末端に Ca²⁺結合ドメインである EF-hand ドメインがあり、66 アミノ酸から 88 アミノ酸に1つの膜貫通ドメイン、および 394 アミノ酸から 410 アミノ酸に核局在シグナルが見出された。一般に S100 fused protein family はよく保存された多くの反復配列を有することを特徴とするが、TCHHL1 では反復配列は明瞭でなく、これらと異なる特徴的な構造を有していた。

TCHHL1 蛋白質の C 末端を認識する抗体を作製し、その局在を調べたところ、TCHHL1 は正常表皮の基底層と毛包の外毛根鞘で強い発現を認めた。S100 fused protein family の多くは有棘層から顆粒層にかけて発現し、表皮角化細胞の終末分化である角化過程に関与すると考えられているが、TCHHL1 蛋白質はこれらとは全く異なる機能を有している可能性が示唆された。

さらに、各種皮膚疾患における TCHHL1 の発現：表皮角化細胞の増殖が亢進する疾患である乾癬や扁平苔癬、皮膚腫瘍の代表的な疾患である有棘細胞癌、基底細胞癌の組織では増殖が亢進している部位に一致して TCHHL1 蛋白質の強い発現が観察された。以上より TCHHL1 蛋白質は表皮角化細胞の増殖のメカニズムに関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまでの研究から TCHHL1 蛋白質は増殖能を有する表皮角化細胞で発現することが示唆されている。TCHHL1 が細胞の増殖・分化において重要な役割を担っていれば、本分子が皮膚疾患の病態形成に強く関与しうる可能性があり、本分子をターゲットとした分子治療の開発への発展も期待ができる。本研究では以下の3点に着目し正常表皮角化細胞の増殖・分化のメカニズムにおける TCHHL1 の役割と各種皮膚疾患の病態形成における関与を明かにすることを目的とする。

(1) siRNA による TCHHL1 蛋白質の抑制が表皮角化細胞に及ぼす影響の検討

(2) 皮膚組織構築における TCHHL1 蛋白質の役割の検討

(3) 皮膚有棘細胞癌の増殖における TCHHL1 蛋白質の関与の検討

3. 研究の方法

(1) siRNA による TCHHL1 蛋白質の抑制が表皮角化細胞に及ぼす影響の検討: TCHHL1 の siRNA を培養表皮角化細胞に導入し細胞の増殖能や遊走能、細胞死に及ぼす影響を検討す

る。さらにマイクロアレイを用いて増殖や分化、細胞死などに関与する各種遺伝子の発現パターンの変化を解析する。

(2) 皮膚組織構築における TCHHL1 蛋白質の役割の検討: siRNA により TCHHL1 を抑制した表皮角化細胞を3次元培養系に適用し皮膚の組織構築に及ぼす影響を検討し、生体内における本蛋白質の機能を検討する。

(3) 皮膚有棘細胞癌の増殖における TCHHL1 蛋白質の関与の検討: 皮膚有棘細胞癌における TCHHL1 の発現パターンを詳細に解析し、さらに培養皮膚有棘細胞癌株である HSC-1 細胞を用いて細胞の増殖における TCHHL1 の関与を検討する。

4. 研究成果

(1) siRNA による TCHHL1 蛋白質の抑制が表皮角化細胞に及ぼす影響の検討: siRNA により TCHHL1 の発現を抑制させた培養表皮角化細胞を用いて TCHHL1 蛋白質が細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。MTS assay では TCHHL1 抑制表皮角化細胞で有意な増殖の抑制が観察された。同細胞では Ki-67 の陽性率の有意な低下と TUNEL 陽性細胞の有意な増加が見られた。TCHHL1 抑制が細胞増殖に及ぼすメカニズムを検討するため MAPK などのシグナル伝達系の変化を検討したところ TCHHL1 抑制 NHK 細胞では ERK1/2、JNK、Akt のリン酸化が抑制されていた。さらに TCHHL1 蛋白質の発現抑制による遺伝子発現の変化を網羅的に解析するため TCHHL1 抑制表皮角化細胞を用いて microarray 解析を行ったところ、ERK1/2、JNK の発現の減少とその下流に存在する TP53、NFkB、HIF1A などの多くの分子の発現が低下していた。一方、Akt の発現量の変化はみられなかったため、real time PCR により Akt の下流に存在しアポトーシスを促進する FOXO1、BCL2、BCL2L11 の発現を検討したところ、いずれの発現も亢進していた。さらに NHK の増殖や分化において重要な転写因子である KLF4 との関連も検討したところ、TCHHL1 が KLF4 の標的分子である可能性が示唆された。

(2) 皮膚組織構築における TCHHL1 蛋白質の役割の検討: siRNA により TCHHL1 蛋白質の発現を抑制させた表皮角化細胞を3次元培養系に適用し皮膚の組織構築に及ぼす TCHHL1 蛋白質の影響を病理組織学的に検討した。TCHHL1 抑制 NHK 細胞ではコントロールと比較し細胞の重層化が乏しく角化も不十分であった。TCHHL1 抑制表皮角化細胞で作成した皮膚では基底層の Ki67 陽性細胞数が有意に少なく、これが組織構築に影響したと思われる。さらに免疫組織染色法によりケラチン 14、10 やフィラグリンなどの発現を検討したところ、いずれの皮膚でもこれらの蛋白の発現は見られたが、その発現量は TCHHL1 抑制表皮角

化細胞で作成した皮膚で少ない傾向にあった。

(3) 皮膚有棘細胞癌の増殖における TCHHL1 蛋白質の関与の検討: 皮膚有棘細胞癌における TCHHL1 蛋白質の発現を免疫組織染色により検討したところ、高分化型有棘細胞癌では腫瘍巣辺縁の増殖が亢進している部位に一致して、低分化型有棘細胞癌では腫瘍巣全体で TCHHL1 の発現が観察された。さらに有棘細胞癌の増殖における TCHHL1 の関与を皮膚有棘細胞癌の培養細胞株である HSC1 細胞を用いて検討した。その結果 HSC1 細胞でも TCHHL1 の発現抑制により増殖が抑制され、TUNEL 陽性細胞が増加した。さらに HSC1 細胞における抑制機序を検討したところ、ERK1/2 のリン酸化が抑制されていた。以上より TCHHL1 が SCC の治療ターゲットになる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Mizawa M, Makino T, Hayashi M, Furukawa F, Shimizu T. A case of lichen planus pemphigoides with palmoplantar keratoderma. *Eur J Dermatol.* 28: 100-1, 2018. doi: 10.1684/ejd.2017.3160. (査読あり)

Torai R, Makino T, Mizawa M, Shimomura Y, Shimizu T. A novel missense mutation in exon 3 of the TRPS1 gene in a patient with a mild phenotype of tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1. *Eur J Dermatol.* 28: 271-2, 2018. doi: 10.1684/ejd.2018.3233. (査読あり)

Torai R, Makino T, Mizawa M, Hayashi M, Furukawa F, Niimi H, Shimizu T. Recurrent deep vein thrombosis with a protein S Tokushima mutation. *Br J Dermatol.* 178: e7-e8, 2018. doi: 10.1111/bjd.15700. (査読あり)

Mizawa M, Makino T, Furukawa F, Torai R, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. The 6-year follow-up of a Japanese patient with silent erythropoietic protoporphyria. *JAAD Case Rep.* 3: 169-71, 2017. doi: 10.1016/j.jcdr.2017.01.025. (査読あり)

Furukawa F, Mizawa M, Makino T, Shimizu T. Efficacy of new low-dose oral anticoagulants in recalcitrant livedoid vasculopathy. *BMJ Case Rep.* 2017. doi: 10.1136/bcr-2017-219943. (査読あり)

Makino T, Hara H, Mizawa M, Shimizu A, Kaira K, Shimizu T. Detection of human

papillomavirus type 35 in recurrent Bowen's disease lesions of the fingers. *Eur J Dermatol.* 27: 198-200, 2017. doi: 10.1684/ejd.2016.2941. (査読あり)

Makino T, Yoshihisa Y, Mizawa M, Tsutsui K, Nishijima C, Inaoki M, Shimizu T. Increased Serum Levels of Th2-type Cytokines and Eotaxin in Fibrillar-type Dermatitis Herpetiformis. *Acta Derm Venereol.* 97: 642-3, 2017. doi: 10.2340/00015555-2604. (査読あり)

Makino T, Ishida W, Hamashima T, Mizawa M, Sasahara M, Shimizu T. An intermediate vascular tumour between kaposiform hemangioendothelioma and tufted angioma with regression of the skin lesion. *Eur J Dermatol.* 27: 175-6, 2017. doi: 10.1684/ejd.2016.2922. (査読あり)

Makino T, Mizawa M, Inoue S, Noguchi M, Shimizu T. The expression of profile of filaggrin-2 in the normal and pathologic human oral mucosa. *Arch Dermatol Res.* 308: 213-7, 2016. doi: 10.1007/s00403-016-1627-x. (査読あり)

Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. Decreased filaggrin-2 expression in the epidermis in a case of pityriasis rotunda. *Clin Exp Dermatol.* 41: 215-7, 2016. doi: 10.1111/ced.12716. (査読あり)

Mizawa M, Makino T, Inami C, Shimizu T. Jumihaidokuto (Shi-Wei-Ba-Du-Tang), a Kampo Formula, Decreases the Disease Activity of Palmoplantar Pustulosis. *Dermatol Res Pract.* 2016;2016:4060673. doi: 10.1155/2016/4060673. (査読あり)

Mizawa M, Makino T, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. Incomplete erythropoietic protoporphyria caused by a splice site modulator homozygous IVS3-48C polymorphism in the ferrochelatase gene. *Br J Dermatol.* 174:172-5, 2016. doi: 10.1111/bjd.14078. (査読あり)

Sugita Y, Makino T, Mizawa M, Shimizu T. Mugwort-Mustard Allergy Syndrome due to Broccoli Consumption. *Case Rep Dermatol Med.* 2016;2016:8413767. doi: 10.1155/2016/8413767. (査読あり)

Makino T, Hara H, Hamashima T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. Hodgkin's lymphoma presenting as subcutaneous masses in the left upper arm. *J Dermatol.*

43:1244-6, 2016. doi: 10.1111/1346-8138.13378. (査読あり)

Hara H, Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. Annular pustular psoriasis associated with colon cancer. *Eur J Dermatol.* 26: 104-5, 2016. doi: 10.1684/ejd.2015.2673. (査読あり)

Makino T, Shimizu K, Mizawa M, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. A novel deletion mutation of the ATP2C1 gene in a family with Hailey-Hailey disease. *Eur J Dermatol.* 26:414-6, 2016. doi: 10.1684/ejd.2015.2592. (査読あり)

Mizawa M, Makino T, Nakamura T, Yamaguchi S, Taki H, Shimizu T. Exacerbation of symptoms in Blau syndrome/early-onset sarcoidosis following delivery. *Eur J Dermatol.* 25: 620-2. doi: 10.1684/ejd.2015.2712. (査読あり)

Makino T, Hara H, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T. Detection of IgG antibodies to desmoglein 3 and desmocollins 2 and 3 in mucosal dominant-type pemphigus vulgaris with severe pharyngalgia and hyperemia of the bulbar conjunctiva. *Eur J Dermatol.* 25: 619-20, 2015. doi: 10.1684/ejd.2015.2646. (査読あり)

Matsui K, Makino T, Mizawa M, Hamashima T, Hanakawa H, Hata N, Sasahara M, Shimizu T. Extramammary Paget's disease occurring in the context of Cowden syndrome: true association or mere coincidence? *Eur J Dermatol.* 25: 89-91, 2015. doi: 10.1684/ejd.2014.2475. (査読あり)

Mori N, Makino T, Mizawa M, Kagoyama K, Kanegane H, Sakaguchi H, Miyazono T, Kojima S, Shimizu T. Late presentation of X-linked dyskeratosis congenita with a missense mutation in codon 350 of the dyskerin protein. *Eur J Dermatol.* 25: 75-6, 2015. doi: 10.1684/ejd.2014.2454. (査読あり)

[学会発表](計 15 件)

Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Shimizu T. The effect of ultraviolet B irradiation in the expression of trichohyalin-like 1 protein. The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology; 2017 Dec 15-17; Kochi.

三澤 恵, 牧野輝彦, 林 政雄, 古川史奈,

清水忠道. 掌蹠に著明な角化性病変を伴った Lichen planus pemphigoides. 第 69 回日本皮膚科学会西部支部学術大会; 2017 Oct 28-29; 熊本.

Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Shimizu T. The expression of trichohyalin-like 1 protein in human skin xenotransplants is enhanced by ultraviolet B irradiation. The 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research; 2017 Sep 27-30; Salzburg.

牧野輝彦, 三澤 恵, 吉久陽子, 清水忠道. Trichohyalin-like 1 protein は紫外線により発現が増強する. 第 39 回日本光医学・光生物学会; 2017 Jul 21-22; 名古屋.

三澤 恵, 牧野輝彦, 古川史奈, 虎井僚太郎, 中野 創, 澤村大輔, 清水忠道. 潜在的骨髄性プロトポルフィリン症の6年間の経過. 第 41 回日本小児皮膚科学会学術大会; 2017 Jul 8-9; 福井.

三澤 恵. 駆瘀血剤の使用法. 第 68 回日本東洋医学会学術総会(シンポジスト); 2017 Jun 2-4; 名古屋.

Mizawa M, Makino T, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. Six-year-follow-up of a Japanese patient with silent erythropoietic protoporphyria. The 4th Eastern Asia Dermatology Congress, 2016 Nov 16-18; Tokyo.

Mizawa M, Makino T, Inami C, Shimizu T. Jumihaidokuto (Shi-Wei-Ba-Du-Tang), a Kampo Formula, decreases the disease activity of palmoplantar pustulosis. The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 2016 Sep 7-10; Munich.

Makino T, Yoshihisa Y, Mizawa M, Tsutsui K, Nishijima C, Inaoki, M, Shimizu T. Increased serum levels of Th2-type cytokines and eotaxin in fibrillary-type dermatitis herpetiformis. The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 2016 Sep 7-10; Munich.

Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. Decreased filaggrin-2 expression in the epidermis in a case of pityriasis rotunda. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015 Dec 11-13; Okayama.

三澤 恵 . プラウ症候群と BCG . 第 66 回日本皮膚科学会中部支部 , 2015 Oct 31-Nov 1 ; 神戸 . (シンポジスト)

三澤 恵 , 牧野輝彦 , 中野創 , 澤村大輔 , 清水忠道 . FECH 遺伝子解析による診断 6 年後に発症した骨髄性プロトポルフィリン症 . 第 37 回日本光医学光生物学会 , 2015 Jul 17-18 ; 宮崎 .

Mizawa M, Makino T, Shibutani T, Shimizu K, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. Development of a mild phenotype of erythropoietic protoporphyria due to a splice site modulator IVS3-48C/C polymorphism in the ferrochelatase gene. 23rd World Congress of Dermatology; 2015 Jun 8-13; Vancouver .

三澤 恵 , 牧野輝彦 , 中村友子 , 山口智史 , 清水忠道 . BCG 接種が発症の契機であった Blau 症候群 / 若年発症サルコイドーシス . 第 114 回日本皮膚科総会 , 2015 May 29-31 ; 横浜 .

三澤 恵 . 桂枝茯苓丸のアトピー性皮膚炎に対する有効性 . 桂枝茯苓丸 (加薏苡仁) 国際シンポジウム , 2015 Feb 8 ; 東京 . (シンポジスト)

[図書] (計 3 件)

三澤 恵 , 清水忠道 . 専門医でも聞きたい皮膚科診療 100 の質問 . 宮地良樹編 . 東京 : メディカルレビュー社 ; 2017 . 赤ら顔に漢方 ? ; Page112-3 .

三澤 恵 . ここがすごい ! 富山大学附属病院の最新治療 . 富山大学附属病院編 . 東京 : バリユーメディカル社 ; 2017 . 皮膚レーザーによるアザ治療の進化 ; Page66-7 .

三澤 恵 , 清水忠道 . 皮膚科頻用薬のコツと落とし穴 . 宮地良樹編 . 東京 : 文光堂 ; 2016 . 皮膚疾患にエビデンスのある漢方薬は ? ; Page260-2 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 恵 (MIZAWA, Megumi)
富山大学・附属病院・講師
研究者番号 : 80401834

(2) 研究協力者

清水 忠道 (SHIMIZU, Tadamichi)
牧野 輝彦 (MAKINO, Teruhiko)