

令和元年5月28日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10170

研究課題名(和文) 白皮症の治療 - ケミカルシャペロン効果の基礎研究

研究課題名(英文) Chemical chaperone therapy for oculocutaneous albinism

研究代表者

深井 和吉 (Fukai, Kazuyoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：20244642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】日本人眼皮膚白皮症1A型の、ケミカルシャペロン効果を利用した眼皮膚白皮症の治療法の開発を目的とする。【方法】ミスセンス変異体をHeLa細胞に導入し、その局在を調べた。デオキシアルブチンを投与し、チロシナーゼ活性の変化を測定した。【結果】チロシナーゼミスセンス変異体はER-retentionを起こしていた。P431L変異体にデオキシアルブチンを20 μ M投与した際、チロシナーゼ活性が有意に上昇した。【結論】デオキシアルブチンはケミカルシャペロン効果を示し、ケミカルシャペロン療法が眼皮膚白皮症1A型の治療法として有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、これまで治療方がなかった眼皮膚白皮症の治療法として、ケミカルシャペロン治療がすくなくともチロシナーゼ遺伝子の一部の変異による患者については有効であるということが理論的に証明された。今回の研究により、薬物の内服あるいは外用により、皮膚の色の回復、視力回復が期待できる可能性があることが示された。これは試験管内での成果であるので、動物実験で実際に有効であるのかどうか、検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Oculocutaneous albinism (OCA) is an autosomal recessive disease characterized by reduction or complete lack of melanin pigment in the skin, hair and eyes. In this study, we firstly investigated the intracellular localization of Japanese OCA1A missense mutants tyrosinase using immunohistochemical staining and western blotting. R77Q, R239W, D383N, P431L mutant tyrosinases retained within the ER, while H211Y mutant tyrosinases were partially transported to the Golgi apparatus. Secondly, we explored the possibility of chemical chaperone therapy for Japanese OCA1A missense mutants, and found that HeLa cells that express P431L tyrosinase mutant are able to retain the DOPA oxidase activity by the addition of a tyrosinase inhibitor in a dose-dependent manner. These results led to the conclusion that chemical chaperone therapy may be helpful for a fundamental treatment for OCA1 with P431L missense mutation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：眼皮膚白皮症 遺伝性皮膚疾患 ケミカルシャペロン 色素異常症 メラニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性白皮症についてはこれまで治療方法がなく、遺伝子診断を行いそれにともなった病態生理を解析する、というレベルにとどまっていた。今回私は、先天性白皮症の中でも最も重症なタイプ、つまり視力障害がより高度に認められるタイプであるチロシナーゼ遺伝子異常にともなったOCA1について、治療する新しい戦略を考えました。ケミカルシャペロン効果を利用して、OCA1患者の治療について追求していきたいと考えました。

2. 研究の目的

白皮症の治療戦略として、考えられる方策としては、以下の3つが考えられます。

(1) タンパク質補充療法

チロシナーゼ酵素をタンパクとして精製し、ファブリー病のようなタンパク質点滴治療。問題は、眼は血液脳関門により保護されているので、視力障害の改善は見込めないことです。

(2) ケミカルシャペロン法

ミスセンス変異の結果、チロシナーゼ蛋白がミスフォールディングをおこし酵素活性を失っているところへ、酵素と結合できる少量の単純な化合物投与により、正しいコンフォメーションに直すシャペロン効果(シャペロン = 介添え役)を生じさせ、失活した酵素活性を回復する方法です。

(3) ナンセンス変異に対するリードスルー効果を利用した治療法

アミノグリコシドなど、リードスルー効果をもった薬剤により、ナンセンス変異によるタンパク合成のストップを回避し、酵素活性を持った全長チロシナーゼ蛋白を合成させる。

日本人のチロシナーゼ遺伝子変異の種類と頻度については、日本皮膚科学会雑誌 109 巻 1974-76(1999)に富田先生が発表しています。一番高頻度な変異は、一塩基挿入の P310insC で 54%、次にミスセンス変異 R77Q で 20%、その次がナンセンス変異 R278X で 9%、さらにミスセンス変異 P431L 4%、R239W 2%、D383N 2%と続きます。チロシナーゼのミスセンス変異タンパク(mouse tyrosinase C85S, Human tyrosinase T373K)は、小胞体の中に異常蓄積していること(ER-retention)が示されています(Halaban R 2002 PNAS)。Gaucher 病では、このように異常蓄積した酵素をケミカルシャペロン効果により酵素活性を復活させ、驚くべきことに「ムコソルバン」という去痰剤により神経症状が改善していると聞いています。Gaucher 病はリソソーム酵素異常ですが、チロシナーゼは、メラノソーム(リソソーム関連細胞内小器官)に輸送されて酵素活性を発揮するという点で、同様の治療戦略が奏功する可能性があります。

今回の研究では、日本人OCA1のミスセンス変異について、ER-retentionが生じているのか、ケミカルシャペロン効果が期待されるのか、について in vitro の系で検討したいと考えています。

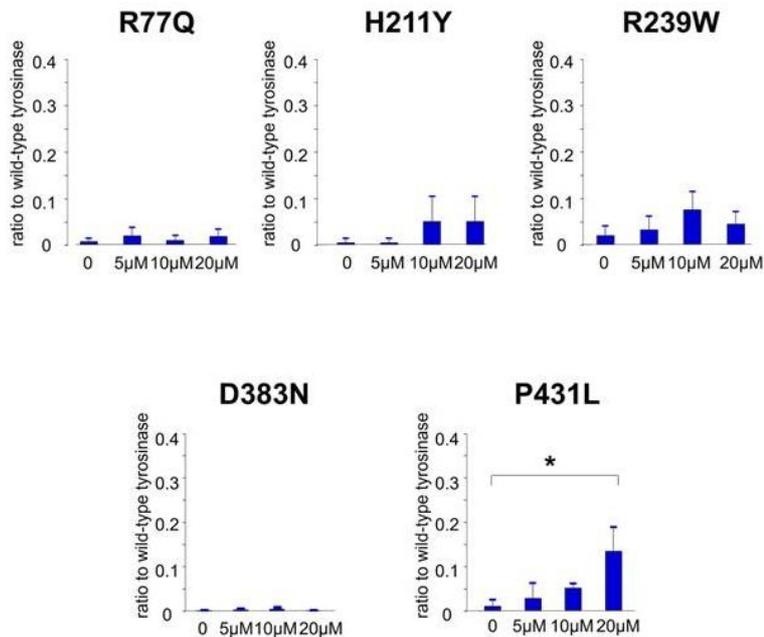
3. 研究の方法

- (1) In vitro mutagenesis によりチロシナーゼミスセンス変異 cDNA を作成する
- (2) HeLa 細胞にトランスフェクションを行い、チロシナーゼ活性アッセイシステムの構築
- (3) 変異チロシナーゼをレンチウイルスにより恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立 (Tyr^{mut}-HeLa) する。抗チロシナーゼ抗体により、チロシナーゼの細胞内分布を観察する。
- (4) ケミカルシャペロン効果が期待できる低分子化合物の候補物質を、Tyr^{mut}-HeLa 細胞に添加し、チロシナーゼ細胞内分布の変化が認められるか、チロシナーゼ活性に変化がみられるかを検討する。

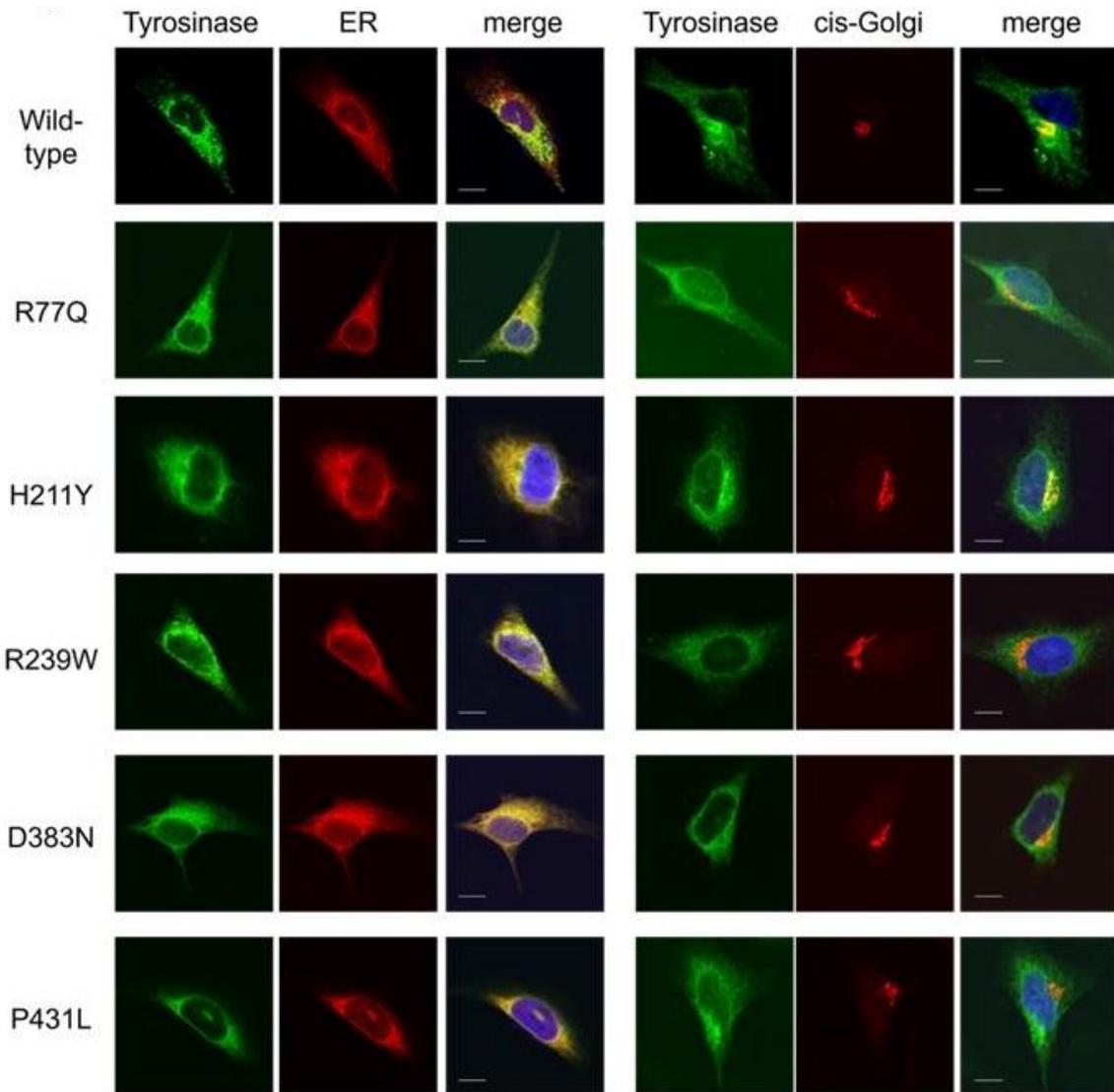
4. 研究成果

白皮症の治療戦略としてケミカルシャペロン療法の可能性について、科学研究費の補助のおかげにより3年前より研究を行うことができました。この研究成果は、*J Invest Dermatol* について最近アクセプト

されております。その内容は、チロシナーゼのミスセンス変異 P431L 変異を定常的に発現するように遺伝子導入した HeLa 細胞に、チロシナーゼの competitive inhibitor である、デオキシアルブチンを 20 μ M という低濃度の容量で、チロシナーゼ活性が回復する、というものです。



この P431L チロシナーゼ変異体は、三次構造の変化により、小胞体 (ER) にとどまっているところ (ER retention) で、これは R77Q, R239W, D383N でも同様の所見となりました。例外的に H211Y のみ cis-Golgi 装置にまで移動していることが観察されました。H211 のヒスチジンは、チロシナーゼタンパクが銅イオンと結合するのに必要な、塩基性アミノ酸で、このヒスチジンがチロシンに変化することにより銅イオンと H211Y ミスセンス変異チロシナーゼタンパクが結合できなくなると考えられ、このために、ER から cis-Golgi までの輸送は問題ないものの、cis-Golgi から trans-Golgi への輸送に障害が生じているものと推察されました。



(付図説明)

「チロシナーゼ H211Y のミスセンス変異タンパク(緑)は、ER のみならず cis-Golgi と merge していることがわかります。他のチロシナーゼミスセンス変異タンパク (R77Q, R239W, D383N, P431L) は ER と merge しているものの、cis-Golgi とは merge していません。一方 wild チロシナーゼタンパクは、ER や cis-Golgi のいづれにも merge せず、細胞質に顆粒状に分布しておりおそらくライソゾームに分布しているものと推察されます。」

以上のことから、デオキシアルブチン(チロシナーゼの選択的阻害薬で美白剤の一つ)は P431L ミスセンス変異をもった OCA1A の患者さんの皮膚に外用すると、メラニン合成が回復されることが期待されます。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 15 件)

1: Teramae A, Kobayashi Y, Kunimoto H, Nakajima K, Suzuki T, Tsuruta D, Fukai K. The Molecular Basis of Chemical Chaperone Therapy for Oculocutaneous Albinism Type 1A. *J Invest Dermatol*. 2019 May;139(5):1143-1149. doi:10.1016/j.jid.2018.10.033. (査読あり)

2: Shiratori T, Takeichi T, Kono M, Nishida M, Imanishi A, Maekawa N, Kawamura N, Fukai K. A case of pustular psoriasis possibly precipitated by estrogen/gestagen periodic therapy for Turner syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2019 Apr 8. doi: 10.1111/ced.13979. [Epub ahead of print] (査読あり)

3: Nishiyama C, Tateishi C, Hashimoto T, Nishida M, Imanishi A, Shiratori T,

- Maekawa N, Tsuruta D, Fukai K. Exacerbation of well-controlled bullous pemphigoid by the administration of a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. Clin Exp Dermatol. 2019 Mar 12. doi: 10.1111/ced.13962. [Epub ahead of print] (査読あり)
- 4: Hayashi E, Sowa-Osako J, Fukai K, Natsumi A, Yagami A, Sato N, Shimojo N, Nakamura M, Matsunaga K, Tsuruta D. Case of anaphylaxis caused by black ginger in a dietary supplement. J Dermatol. 2019 Feb;46(2):e56-e57. doi:10.1111/1346-8138.14592. (査読あり)
- 5: Ohyama A, Nakano H, Imanishi Y, Seto T, Tsuruta D, Fukai K. A novel missense mutation of the STS gene in two siblings with X-linked ichthyosis, complicated by short stature, bone density reduction, epilepsy, and cryptorchidism. Clin Exp Dermatol. 2019 Jan;44(1):78-79. doi: 10.1111/ced.13741. (査読あり)
- 6: Omura R, Kamo R, Kusutani N, Fukai K, Ozawa T, Awazawa R, Osawa M, Tsuruta D. Effectiveness of weekly paclitaxel for edema and pain in classic Kaposi sarcoma with widespread eruption in the lower legs. J Dermatol. 2018 Oct 31. doi:10.1111/1346-8138.14703. (査読あり)
- 7: Omura R, Sowa-Osako J, Fukai K, Kusutani N, Takeoka Y, Koh H, Ohsawa M, Iwatsuki K, Tsuruta D, Hamada T. Promising therapeutic option for cutaneous plasmacytosis: 308-nm excimer lamp. J Dermatol. 2018 Aug;45(8):e215-e216. doi:10.1111/1346-8138.14262. (査読あり)
- 8: Wataya-Kaneda M, Ohno Y, Fujita Y, Yokozeki H, Niizeki H, Ogai M, Fukai K, Nagai H, Yoshida Y, Hamada I, Hio T, Shimizu K, Murota H. Sirolimus Gel Treatment vs Placebo for Facial Angiofibromas in Patients With Tuberous Sclerosis Complex: A Randomized Clinical Trial. JAMA Dermatol. 2018 Jul 1;154(7):781-788. doi:10.1001/jamadermatol.2018.1408. (査読あり)
- 9: Yamauchi A, Kubo A, Ono N, Shiohama A, Tsuruta D, Fukai K. Three cases of Nagashima-type palmo-plantar keratosis associated with atopic dermatitis: A diagnostic pitfall. J Dermatol. 2018 May;45(5):e112-e113. doi:10.1111/1346-8138.14152. (査読あり)
- 10: Fukunaga Y, Kubo A, Sasaki T, Tsuruta D, Fukai K. Novel KRT9 missense mutation in a Japanese case of epidermolytic palmo-plantar keratoderma. J Dermatol. 2018 Apr;45(4):e72-e73. doi: 10.1111/1346-8138.14115. (査読あり)
- 11: Kasami S, Sowa-Osako J, Fukai K, Tokimasa S, Kaga SI, Saito R, Tanaka A, Hide M, Tsuruta D. Presymptomatic genetic diagnosis of two siblings with hereditary angioedema, presenting with unusual normal levels of serum C4. J Dermatol. 2018 Feb;45(2):e31-32. doi: 10.1111/1346-8138.14103. (査読あり)
- 12: Nishida M, Fukai K, Kamo R, Tsuruta D. Case of chronic venous insufficiency-associated Kaposi's sarcoma in a Japanese patient. J Dermatol. 2017 Dec;44(12):e344-e345. doi: 10.1111/1346-8138.13989. (査読あり)
- 13: Shiratori T, Sowa-Osako J, Fukai K, Tsuruta D. Severe stomatitis with a deep buccal ulcer associated with an allergic reaction to methyl methacrylate used for dental treatment. Contact Dermatitis. 2017 Dec;77(6):406-407. doi:10.1111/cod.12742. (査読あり)
- 14: Yanagishita-Nakatsuji S, Fukai K, Ohyama A, Umekoji A, Sowa-Osako J, Tsuruta D. Probable allergic contact dermatitis from hydroquinone presenting as leukomelanoderma: Report of two cases. J Dermatol. 2017 Dec;44(12):e330-e331. doi: 10.1111/1346-8138.14011. (査読あり)
- 15: Omura R, Fukai K, Sugawara K, Tsuruta D, Okamura K, Hozumi Y, Suzuki T. Ultrastructural study of dyschromatosis symmetrica hereditaria with widespread pigmentary eruption. J Dermatol. 2017 Jul;44(7):e150-e151. doi:10.1111/1346-8138.13849. (査読あり)
- [学会発表] (計 4 件)
- 1: 眼皮皕白皮症におけるケミカルシャペロン療法の可能性について 深井和吉、寺前彩子、鶴田大輔 117 回日本皮膚科学会総会(広島)2018 年6月6日
- 2: Molecular Basis Of Chemical Chaperone Therapy For Oculocutaneous Albinism Type 1 Ayako Teramae, Yui Kobayashi, Hiroyuki Kunimoto, Kouichi Nakajima, Tamio Suzuki, Daisuke Tsuruta, Kazuyoshi Fukai 23rd International Pigment Cell Conference 2017 年8月26日~8月30日(Denver, U.S.A)
- 3: A basic in-vitro study of novel therapy for oculocutaneous albinism type1 Ayako Teramae, Yui Kobayashi, Hiroyuki Kunimoto, Kouichi Nakajima, Tamio Suzuki, Daisuke Tsuruta, Kazuyoshi Fukai Society for Investigative Dermatology 76th Annual Meeting. 2017 年4月26日~29日(Portland, U.S.A)
- 4: A basic in vitro study of a novel therapy for oculocutaneous albinism type1 Kazuyoshi Fukai, Ayako Teramae, Yui Kobayashi, Hiroyuki Kunimoto, Kouichi Nakajima, Tamio Suzuki Daisuke Tsuruta 第24回分子皮膚科フォーラム2017年4月14日~15日(東京都)
- [図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/Derma/report/reports-03.shtml>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 國本浩之

ローマ字氏名: KUNIMOTO, hiroyuki

所属研究機関名: 大阪市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 80372853

(2)研究協力者

研究協力者氏名: なし

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。