

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19715

研究課題名(和文) 表皮角化細胞の分化およびバリア機能因子としてのsuprabasin

研究課題名(英文) Suprabasin associated with epidermal keratinocyte differentiation and barrier function

研究代表者

青島 正浩 (Aoshima, Masahiro)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40464127

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)：血清中のスブラバシン(SBSN)濃度はAD患者において健常人より有意に低く、アトピー性皮膚炎(AD)におけるSBSNの産生の減少を支持した。また、SBSN発現を抑制した三次元培養皮膚は、ケラトヒアリン顆粒の顕著な減少を示した。さらに、このモデルはフィラグリン、ロリクリン、デスモグレイン-1、デスマコリン-1、コルネオデスモシンおよびブレオマイシン加水分解酵素を含む分化関連分子をmRNAレベルで有意に抑制したが、インボルクリン、クローディン-1、カルパイン-1は影響を受けなかった。この事実はSBSN発現の低下が異常な表皮分化を誘導し、ADにおける表皮バリア機能障害に寄与し得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We found that the serum levels of SBSN were significantly lower in AD patients than in normal subjects, supporting the decreased production of SBSN in AD. To investigate the function of SBSN for epidermal differentiation, we knocked down SBSN in a 3D epidermal model transduced with lentivirus-mediated small-hairpin SBSN (shSBSN). Although the 3D model treated with shSBSN exhibited no remarkable morphological change in stratum corneum, it showed a marked reduction in keratohyalin granules. In addition, shSBSN significantly down-modulated the mRNA expression levels of differentiation-associated molecules, including filaggrin, filaggrin-2, loricrin, desmoglein-1, desmocollin-1, corneodesmosin and bleomycin hydrolase, while involucrin, claudin-1, or calpain-1 was not affected. Our findings suggest that the decreased SBSN expression induces abnormal epidermal differentiation and may contribute to the epidermal barrier dysfunction in AD.

研究分野：皮膚科

キーワード：スブラバシン アトピー性皮膚炎 三次元培養皮膚

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎 (AD) 患者における皮膚角層は、バリア構成タンパク質、プロテアーゼとそのインヒビターなどの異常があり、バリア機能が破綻していることが明らかとなった。角層には膨大な種類の蛋白質が存在し、それらが関連し合って機能を発揮している。約 80% の AD はフィラグリン低下をはじめとする何らかの異常により、バリア機能低下を示す (Tokura Y. J Dermatol Sci 58: 1-7, 2010) が、その全貌は未だ明らかではない。

我々の講座では、角層をテープストリッピングにより採取し、蛋白質を抽出後、プロテオーム解析を行い、角層に含まれる 440 種類の蛋白質を同定、定量する手法を確立した (Sakabe J, et al. J Allergy Clin Immunol 134: 957-960, 2014)。そして、健常人と比較し AD 患者にて発現の有意に低下する複数の蛋白質を同定した。その一つに suprabasin (SBSN) がある。

SBSN は、2002 年に初めて報告されたケラチノサイトに発現する蛋白質であり、マウスでは表皮ケラチノサイトの他、舌、消化管の様々な上皮組織の基底層より表層に発現する。また、トランスグルタミナーゼ (TGase) 2、3 の基質となることも報告されている (Park GT et al. J Biol Chem 277: 45195-202, 2002)。SBSN は表皮細胞の分化において重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細は不明である。我々が行った免疫染色でも、健常人に比し、AD 患者にて角層中の suprabasin 発現が減少していることが判明している。この結果からは、SBSN が、involucrin (IVL) 等と同様に TGase によって架橋される cornified envelope 前駆体蛋白質であり、AD では何らかの理由で架橋されず分解されてしまうという可能性もある。

2. 研究の目的

SBSN 発現の低下が AD における表皮バリア機能不全を誘導する可能性があり、SBSN が表皮ケラチノサイトの分化、表皮バリア機能に与える影響を明らかにすることが目的である。本研究では、皮膚における SBSN の機能を明らかにするため、1) ヒト皮膚組織での検討、2) 三次元培養皮膚を用いた検討を行う。SBSN という、ほぼ未知の蛋白質を対象とし、その機能、AD 病態との関わり、測定方法を解明・開発することが本研究の大きな特色である。

3. 研究の方法

AD 患者と健常人の血清 SBSN 濃度を、ELISA を用いて測定する。これを外因性 AD と内因性 AD で比較検討する。

前段階研究において、単層培養表皮角化細胞を対象に SBSN の発現を調べたところ、培養時間、培養細胞密度、培養液中の Ca 濃度の変化によって発現に大きな差が生じた。これは、SBSN が分化関連蛋白質であり、こうした培養条件の違いによって角化に伴いその発現が顕著に影響されることを示している。従って単層培養角化細胞は対象として不適切と考えた。そこで、三次元培養した角化細胞を用いて検討を行い、有棘層から角層での発現をより生体に近い条件下で観察する方針とした。三次元培養皮膚にて SBSN が正常皮膚に近い発現様式を示すことを免疫染色で確認している。さらに、SBSN を shRNA を用いてノックダウンした三次元培養皮膚を作成し、形態学的変化 (光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察) やルシファーイエローを用いた角層透過性実験を行う。また、角化細胞の分化についてコントロールとの比較検討を行う。具体的には SBSN, suprabasin; IVL,

involucrin; FLG, filaggrin; FLG2, filaggrin-2; HRNR, hornerin; LOR, loricrin; DSG1, desmoglein-1; DSC1, desmocollin-1; CNDS, corneodesmosin; CLDN, claudin 1; BLMH, bleomycin hydrolase; CAPN1, calpain-1 の発現を調べる。以上の検討は免疫染色、RT-PCR、ウェスタンブロット法を用い、定量的にも解析する。

4 . 研究成果

血清中の SBSN は AD 患者において健常人より有意に低く、特に内因性 AD 患者において有意差をもって低値になることが明らかとなった。これは AD における SBSN の産生の減少を支持する所見と考えた。

三次元培養皮膚の実験については、まず、最も適した三次元培養皮膚が形成される培養条件を明らかにするために実験を行った。結果、使用するレンチウイルスの種類や培養条件(ウイルス数 MOI=1, 細胞数 1×10^5 cells/well) が明らかとなった。この条件下で三次元培養皮膚を作成したところ、shSBSN では角層、表皮の菲薄化がみられ、免疫染色でも SBSN の発現低下が観察された。電子顕微鏡による観察ではケラトヒアリン顆粒の顕著な減少を示した。ルシファアーイエローによる実験では SBSN の発現を抑制しても角層バリア障害は認めなかった。

次に RT-PCR による解析を行った。相対的 mRNA 発現量は、機能のないレンチウイルスを感染させた control の 1 に対し、SBSN は 0.14 であった。involucrin (IVL) は 0.97 であったのに対し、FLG は 0.21 と大きく低下した。この傾向は単層培養条件下(三次元化する前)のケラチノサイトでもみられ、SBSN が 0.25、IVL が 0.90、FLG が 0.51 であった。

さらに、shSBSN はフィラグリン、フィラグリン-2、ロリクリン、デスモグレイン-1、デスモコリン-1、コルネオデスモシンおよびブレオマイシン加水分解酵素を含む分化関連分子を mRNA レベルで有意に抑制したが、インボルクリン、クローディン-1、カルパイン-1 は影響を受けなかった。この事実は、SBSN 発現の低下が異常な表皮分化を誘導し、AD における表皮バリア機能障害に潜在的に寄与し得ることを示唆した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Masahiro Aoshima, Shinsuke Nakazawa, Takatsune Umayahara, Jun-Ichi Sakabe, Tsuyoshi Yatagai, Shigeki Ikeya, Takatoshi Shimauchi, Yoshiki Tokura: Knockdown of Suprabasin in a three-dimensional Epidermal Model Inhibits Differentiation of Keratinocyte. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kochi, 2017.12.15

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

青島 正浩 (AOSHIMA, Masahiro)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：4 0 4 6 4 1 2 7

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()