

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08310

研究課題名(和文) CD1aを介した脂質抗原提示と皮膚炎惹起メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of lipid antigen presentation via CD1a and induction of skin inflammation

研究代表者

荒尾 知子 (Arao, Noriko)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80397629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスES細胞にNSDHLターゲティングベクターをエレクトロポレーションにて導入した。ES細胞のスクリーニング後、胚盤胞(BALB/c)への注入を行い、NSDHLキメラマウスを作成した。ES細胞(毛が黒色)と宿主胚(BALB/c)(アルビノ)とのキメラF1マウス( )と、B6(黒色)マウスと交配し、黒色のF2マウス5匹について、ジェノタイピングを行った。キメラマウスの尾からDNAを抽出しジェノタイプを確認した。さらにNSDHLキメラマウスとK5-Creを掛け合わせてNSDHL変異を持つK5-Cre-NSDHLfloxedを作成し、表皮特異的にNSDHLをノックアウトした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウス(K5-Cre-NSDHLfloxed)の作成することに成功した。表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウスの皮膚にモザイク状に脱毛を伴うphenotypeが見られ、3匹のマウスについてその部位の皮膚を生検して、皮膚のHE染色を行った。脱毛部では表皮の菲薄化と毛包構造の消失があり、一方で有毛部では、皮膚炎を想起させる角質層の錯角化を認めた。今後、CHILD症候群における皮膚炎発症のメカニズム解明に有益な成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We successfully created skin epidermis-specific NSDHL conditional knockout mice (K5-Cre-NSDHLfloxed). NSDHL targeting vector was introduced into mouse ES cells via electroporation, followed by colony picking. After screening of ES cells, injection into blastocysts (BALB/c) was performed to generate NSDHL chimeric mice. Chimeric F1 mice ( ) with ES cells (black hair) and host embryos (BALB/c, albino) were crossed with B6 mice (black) and genotyped for 5 female F2 mice with black coat color. DNA was extracted from the tails of chimeric mice and genotyping was confirmed. Furthermore, NSDHL mutant mice carrying K5-Cre were generated by crossing NSDHL chimeric mice with K5-Cre, resulting in skin epidermis-specific NSDHL knockout.

研究分野：genetic skin diseases

キーワード：CHILD症候群 皮膚炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚の表皮は、肝臓と並ぶ脂質産生器官であるという特異性を持つ。皮膚では、表皮角化細胞からセラミドやコレステロール、ビタミン D など皮膚のバリア機能や全身の恒常性を維持するために不可欠な脂質が産生される。CHILD 症候群 (Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects) は X 連鎖優性疾患で、コレステロール生合成酵素の欠損症である<sup>2)</sup>。生後数週より、一部の皮膚に紅斑、角化、落屑を伴う魚鱗癬様もしくは乾癬様の皮疹が見られ、次第に拡大した後に縮小し、最終的に片側性に固定する。患側の上下肢の短縮や欠損、側彎症などの骨格異常、中枢神経系、心血管系の異常や、軽度の精神遅滞がみられる例もある<sup>3)</sup>。また、CHILD 症候群患者皮膚においては擦過などの外的刺激によりケブネル現象を見ることが特徴である。コレステロール代謝酵素である *NSDHL* 変異により酵素活性が低下し、上流の中間代謝物の蓄積と最終生産物であるコレステロールの生合成低下が皮膚症状発現に寄与していると考えられるが<sup>4)</sup>、皮疹部における内在性のコレステロール中間代謝物と皮膚炎発症のメカニズムについての詳細な検討は未だ行われていない。また過去に報告のある *NSDHL* 変異を有するマウスの表現型解析では、野生型 (WT) に比べて体格が小さく、背部と尾にごく軽度の皮膚炎を生じており、組織学的にも軽度の表皮肥厚を認めているが<sup>5)</sup>、CHILD 症候群患者の様に激しい炎症を伴う特徴的な皮疹は生じておらず、ヒトの病態を再現しているとは言い難い。一方で、ウルシオールなどの外因性の脂質は皮膚に対して何らかの毒性を持ち皮膚炎を生じることが知られていたが、これまで外因性脂質による皮膚炎惹起のメカニズムは不明であった。しかし近年、表皮における CD1a による脂質の抗原提示により T 細胞が活性化し、皮膚炎が惹起されるメカニズムが、ヒト CD1a トランスジェニックマウスを用いたウルシオールによる皮膚炎モデルにて明らかにした<sup>1)</sup>。CD1a はヒトのランゲルハンス細胞 (LC) に特徴的に発現する蛋白で、マウスには元々は存在しないため、マウスモデルにおいてその意義や機能が明らかではなかった<sup>1)</sup>。CD1a には内在性のリガンドも存在すると考えられ、CHILD 症候群において、異常蓄積が確認されている内在性のステロール代謝中間体が CD1a の内在性リガンドである可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究において、脂質のうち特にコレステロール代謝物が皮膚炎を惹起するメカニズムを明らかにするため、ヒトの CD1a を併せ持った CHILD 症候群モデルマウスを新たに作成する。表皮特異的に *NSDHL* 変異をもつコンディショナルノックアウトマウスを作成し、さらにヒト CD1a トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、ヒト CD1a を介したコレステロール中間代謝物の抗原提示と皮膚炎発症について解析を行うことを目的とする。本研究は、これまでほとんど解明されていなかった内在性脂質と皮膚炎惹起のメカニズムについて、遺伝性コレステロール生合成酵素の異常症である CHILD 症候群患者のモデルマウスを通して解析する点が独創的である。その研究成果は、CHILD 症候群のみならず、アトピー性皮膚炎などを含めた脂質合成・代謝障害を伴う幅広い炎症性皮膚疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指す点が社会的に非常に意義深いと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### CRISPR/Cas9 システムを用いた *NSDHL* ターゲティングベクターの作成

X 染色体上 *NSDHL* の exon3 の前後 2 箇所、CRISPR/Cas9 システムを用いて LoxP を挿入してタ

ーゲッティングベクターを作成する。CRISPR/Cas9用のガイドRNA選別のためにルシフェラーゼアッセイを行い、ルシフェラーゼ活性の高いガイドRNAを用いる。

#### Tam誘導性-表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウス(K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>)の作成

マウスES細胞にて作成したNSDHLターゲッティングベクターをエレクトロポレーションにて導入し、コロニーのピックアップを行う。ES細胞のスクリーニング後、胚盤胞への注入を行い、NSDHLキメラマウスを作成する。NSDHLキメラマウスとK5-CreERTを掛け合わせて雄のX染色体にNSDHL変異を持つK5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>(A)を作成する。

#### CHILD症候群モデルマウス(CD1a-tg-K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>)の作成

表皮LCに発現したヒトCD1aによる抗原提示によって皮膚炎が惹起されるかどうかを検討するため<sup>1)</sup>、K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>(A)とヒトCD1aトランスジェニックマウス(CD1a-tg)と交配させ、CD1a-tg-K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>(C)を作成。これによってLCにヒトCD1aを発現し、かつTam誘導性に表皮特異的にNSDHLを欠損させたCHILD症候群モデルマウス(D)を作成する(図3)。これらのマウスのgenotypeはPCRを用いて確認する。

#### CHILD症候群モデルマウスの表現型解析

作成したすべての遺伝子改変マウスの表皮細胞および血液を採取し、GC-MSにて脂質解析を行う。K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>(A)およびCD1a-tg-K5-CreERT-NSDHL<sup>flox</sup>(C)にTamを投与して、Tam誘導性に表皮細胞特異的にNSDHLを欠損させた際に(B,D)、CHILD症候群患者と同様のコレステロール中間代謝物が表皮中に蓄積するかどうかを他のマウスと比較して統計学的に解析し、さらにCHILD症候群被験者のGC-MSの結果と比較検討する。

皮膚の炎症所見について評価するため各マウス(A-D)の皮膚を採取しHE染色を行い、表皮の肥厚の程度を計測、浸潤している炎症細胞の種類を特定するため免疫染色を行い、組織学的に検討する。また皮膚組織から浸潤している炎症細胞、末梢血の単核球、リンパ節のFACS解析を行う。特に表皮細胞特異的にNSDHLを欠損させたマウスのうち、ヒトCD1aの存在の有無による炎症のパターンについて(B,D)、詳細な解析を行う。

コレステロール中間代謝物の蓄積による表皮の変化を検討するため、各マウス(A-D)の表皮細胞からtotal RNAを抽出したのち、RNAseqを行い、遺伝子発現プロファイルの変化について統計学的に解析する。特に表皮細胞特異的にNSDHLを欠損させたマウスのうち、ヒトCD1aの存在下で表皮細胞の遺伝子発現プロファイルの変化が起こっているかどうかについて、解析を行う。

CHILD症候群患者では、擦過部位に一致して皮疹が出現するケブネル現象がみられるが、表皮細胞特異的にNSDHLを欠損させたマウス皮膚(B,D)にテープストリップ刺激を連日加えることで皮膚炎が誘発されるかどうか、上記と同様に検討を行う。

## 4. 研究成果

#### CHILD症候群モデルマウス(K5-Cre-NSDHL+/-CD1a-tg)の作成

表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウス(K5-Cre-NSDHL<sup>flox</sup>)の作成  
マウスES細胞にNSDHLターゲッティングベクターをエレクトロポレーションにて導入し、コロニーのピックアップを行った。ES細胞のスクリーニング後、胚盤胞(BALB/c)への注入を行い、NSDHLキメラマウスを作成した。ES細胞(毛が黒色)とホスト胚(BALB/c)(アルピノ)とのキメラF1マウス( )と、B6(黒色)マウスと交配し、黒色のF2マウス5匹について、ジェノタイプングを行った。キメラマウスの尾からCica GeneusトータルDNAプレップキットを用いてDNA

を抽出した。ターゲットベクターを挟むように数カ所primerを設定してPCRを行い、ジェノタイプを確認した。さらにNSDHLキメラマウスとK5-Creを掛け合わせてNSDHL変異を持つK5-Cre-NSDHL<sup>flx</sup>を作成し、表皮特異的にNSDHLをノックアウトした。表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウスの皮膚にモザイク状に脱毛を伴うphenotypeが見られ、3匹のマウスについてその部位の皮膚を生検して、皮膚のHE染色を行った。脱毛部では表皮の菲薄化と毛包構造の消失があり、一方で有毛部では、皮膚炎を想起させる角質層の錯角化を認めた。

ヒトCD1aトランスジェニックマウス(CD1a-tg)(Kim JH, et al. Nat Immunol, 2016)について検証を行った。論文内で示された方法に準じて、耳介に2%ウルシオールを塗布し、皮膚炎誘発の再現性について確認を行ったところ、野生型のマウスと比較して耳介の厚さ(腫脹)については有意差を認めなかった。したがって、当初実験計画で予定していた表皮特異的NSDHLコンディショナルノックアウトマウスとヒトCD1aトランスジェニックマウスを交配させる実験は行わないこととした。

**文献** 1) Kim JH, et al. Nat Immunol, 2016, 2) Happle R, et al. Eur J Pediatr, 1980 3) 知念安紹, 他: 日本臨牀別冊, 先天異常症候群下巻, p96, 2001, 4) Paller AS, et al. J Invest Dermatol, 2011, 5) Liu XY et al. Nat Genet, 1999, 6) Hirabayashi, et al. Nat Commun, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito Sonoko, Tanaka Ryo, Ono Noriko, Umegaki Arao Noriko, Sasaki Takashi, Aoki Satomi, Amagai Masayuki, Kubo Akiharu	4. 巻 49
2. 論文標題 Palmar whitish change after water exposure in a familial mild case of loricrin keratoderma (loricrin ichthyosis)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e405-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iriki Hisato, Umegaki-Arao Noriko, Kakuta Risa, Fujita Harumi, Aoki Satomi, Amagai Masayuki, Sasaki Takashi, Hamamoto Yasuo, Nakayama Robert, Kubo Akiharu	4. 巻 25
2. 論文標題 Superimposition of checkerboard distribution of ephelides and neurofibromas in a patient with segmental neurofibromatosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAAD Case Reports	6. 最初と最後の頁 89 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdcr.2022.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu H, Umegaki-Arao N, Futei Y, Iwabuchi E, Ishizaki S, Tanaka M.	4. 巻 48(10)
2. 論文標題 Two cases of acquired lymphangioma: Dermoscopic-histopathologic correlation between irregular vessels on lacunae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 E506-E507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Furuichi Y, Ito Y, Tanese K, Mukai M, Uwamino Y, Hasegawa N, Amagai M, Umegaki-Arao N.	4. 巻 48(2)
2. 論文標題 Two case reports of Mycobacterium marinum infection with psoriatic arthritis treated by tumor necrosis factor- inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e106-e107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Umegaki Arao Noriko, Tanemoto Sae, Tanese Keiji, Kubo Akiharu, Takahashi Hayato, Kurihara Yuichi, Yanagisawa Erika, Kameyama Kaori, Amagai Masayuki, Saito Masataka	4. 巻 47
2. 論文標題 Eosinophilic pustular folliculitis with palmoplantar lesions and nail deformity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e357-e359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furuichi Yuki, Ito Yoshihiro, Tanese Keiji, Mukai Miho, Uwamino Yoshifumi, Hasegawa Naoki, Amagai Masayuki, Umegaki Arao Noriko	4. 巻 48
2. 論文標題 Two case reports of Mycobacterium marinum infection with psoriatic arthritis treated by tumor necrosis factor inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e106-e107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Umegaki Arao N, Ono N, Tanaka R, Sasaki T, Fujita H, Shiohama A, Aoki S, Amagai M, Kubo A	4. 巻 182
2. 論文標題 A nonepidermolytic keratinocytic epidermal naevus associated with a postzygotic mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1303 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.18729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kubo Akiharu, Sasaki Takashi, Suzuki Hisato, Shiohama Aiko, Aoki Satomi, Sato Showbu, Fujita Harumi, Ono Noriko, Umegaki-Arao Noriko, Kawai Tomoko, Nakabayashi Kazuhiko, Hata Kenichiro, Yamada Daisuke, Matsubara Yoichi, Kosaki Kenjiro, Amagai Masayuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Clonal Expansion of Second-Hit Cells with Somatic Recombinations or C>T Transitions Form Porokeratosis in MVD or MVK Mutant Heterozygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2458 ~ 2466.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.05.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toshima S., Kurihara Y., Wang E.H.C., Nomura H., Hayashi Y., Christiano A.M., Amagai M., Umegaki A. N.	4. 巻 33
2. 論文標題 Alopecia areata multiplex following autologous dermal micrograft injection for treatment of androgenetic alopecia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.15701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Horikawa Hiroto, Hirai Ikuko, Umegaki A. Noriko, Amagai Masayuki, Saito Masataka	4. 巻 60
2. 論文標題 Alopecia in Cronkhite? Canada syndrome: Is it truly telogen effluvium?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Australasian Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajd.13073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Umegaki A. N., Ono N., Tanaka R., Sasaki T., Fujita H, Shiohama A., Aoki S., Amagai M., Kubo A.	4. 巻 0
2. 論文標題 A nonepidermolytic keratinocytic epidermal naevus associated with a postzygotic mutation in the gene encoding epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.18729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mukai Miho, Kurihara Yuichi, Ito Yoshihiro, Shintani Yuka, Takahashi Hayato, Kubo Akiharu, Amagai Masayuki, Umegaki A. Noriko	4. 巻 47
2. 論文標題 Successful treatment with secukinumab of three psoriatic patients undergoing dialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	久保 亜紀子  (Kubo Akiiko)  (50455573)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	
研究 分 担 者	久保 亮治  (Kubo Akiharu)  (70335256)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授   (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------