

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15134

研究課題名（和文）ATP2A2遺伝子をターゲットにしたダリエ病表皮モデルの樹立と二次感染予防の研究

研究課題名（英文）Investigation on prevention of secondary infection using Darier's disease-like skin construct

研究代表者

佐藤 絵美（SATO, EMI）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10803893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：今回我々はATP2A2遺伝子をサイレンシングした角化細胞を用いることで、ダリエ病様の皮膚バリア機能障害のある三次元表皮モデルを樹立した。通常の三次元表皮では、角層上に単純ヘルペスウイルス（HSV）のKOS株を添加してもウイルスが表皮内へ侵入することは不可能だが、このバリア異常モデルではHSVが角層を超えて表皮内に侵入し表皮全層に感染を認めた。Poly(I:C)単独または抗菌ペプチドLL37を加えた前処理は、IFN- γ 産生を増強し、このバリア異常モデルでのウイルス複製を抑制した。さらにHSVの糖タンパクと強力に結合するヘパリンを含有した軟膏の角層への塗布は、HSVの侵入を強力に阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎またはダリエ病などによる表皮バリア機能障害は、しばしば皮膚に重度の二次感染症を引き起こす。表皮バリア障害のある患者は、単純ヘルペスウイルス（HSV）によって引き起こされるカポジ水痘様発疹を繰り返し発症することがよくあるが、そのメカニズムと予防法はまだ見つかっていない。今回私たちは三次元の表皮バリア異常モデルを樹立し、これを用いて自然免疫を強化したりウイルスの侵入阻害が二次感染予防に繋がる可能性を示した。私たちの表皮バリア機能異常モデルは、今後もカポジ水痘様発疹を含む皮膚二次感染症の発症のメカニズム、予防法および治療効果を判定するためのツールとして役立つと考える。

研究成果の概要（英文）：In this research, we established a three-dimensional skin barrier dysfunction model by silencing ATP2A2, which is mutated in some Darier's disease patients. We confirmed the loss of desmosomes and presence of histopathological clefts in the suprabasal layer. Herpes simplex virus 1 applied to the stratum corneum infected the deep epidermis. An innate immune reaction was assessed by evaluating the expression of IFN- γ and related genes. Pretreatment with Poly(I:C) alone or plus the antimicrobial peptide, LL37 enhanced IFN- γ production and suppressed viral replication. Furthermore, topical application of a white petrolatum ointment containing heparin, which binds viral glycoproteins related to virus entry, strongly inhibited viral replication, probably by inhibiting invasion.

研究分野：皮膚科学

キーワード：カポジ水痘様発疹症 単純ヘルペスウイルス 表皮バリア機能異常 ダリエ病 アトピー性皮膚炎 二次感染症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

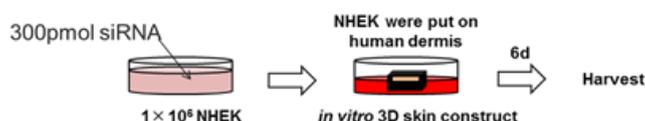
小胞体カルシウムポンプ関連遺伝子である *ATP2A2* は表皮の分化や接着に重要であり、この遺伝子変異によって引き起こされるダリエ病では間擦部や脂漏部の皮膚に難治な角化性丘疹が生じる。この皮疹部の病理像をみると表皮の分化異常や接着異常がみとめられ、そこにウイルスや細菌などの病原微生物がしばしば二次感染を起こす。表皮バリア機能異常を起こす代表的な皮膚疾患としてアトピー性皮膚炎がよく知られており、皮疹部にダリエ病と同様に単純ヘルペスウイルス (HSV) や A 群 β 溶血性連鎖球菌、黄色ブドウ球菌などによる二次感染が頻繁に生じる。しかしながら、なぜ表皮バリア機能に問題があるとこのような病原微生物が感染し重篤化するのか詳細なメカニズムはわかっておらず、根本的な治療法も開発されていない。

2. 研究の目的

表皮バリア機能異常に伴う二次感染症、特に HSV の二次感染によって引き起こされるカポジ水痘様発疹症 (KVE) の発生メカニズムを明らかにする。さらに KVE のような二次感染症の発生予防に有用な新規外用療法を開発する

3. 研究の方法

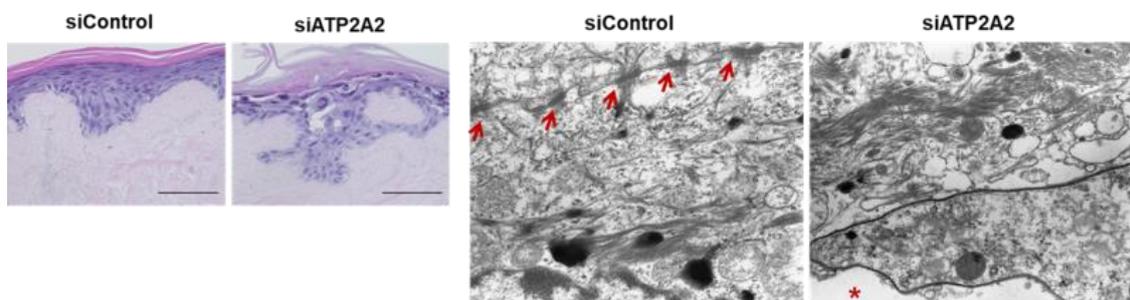
ダリエ病患者で変異がみられる *ATP2A2* 遺伝子に対する siRNA を正常ヒト角化細胞に導入し、導入細胞を用いて三次元表皮モデルを作成する。



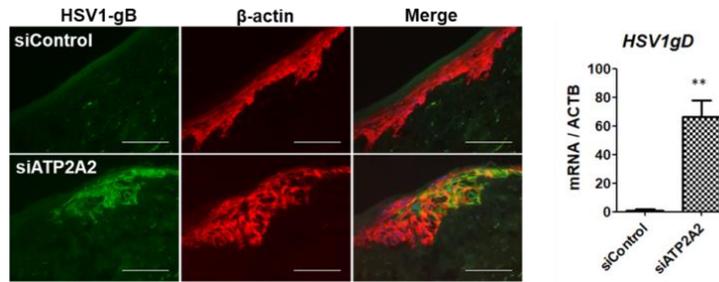
この三次元表皮をバリア機能異常 (ダリエ病) モデルとする。ダリエ病モデルの表皮構造をまず病理組織学的に観察し、次に電子顕微鏡で観察する。正常ヒト角化細胞で作成したコントロールの三次元表皮モデルと比較し、表皮細胞間の接着異常がどうして生じるのか原因を探索する。さらにこの表皮モデルの角層上から単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV1, KOS 株) を感染させ、表皮内への感染の状況を確認する。またウイルス感染時に産生される IFN- β などの産生を確認する。最後に、HSV の表皮内感染を予防する治療法として三次元表皮を Poly(I:C) や抗菌ペプチドの LL-37 を用いて IFN- β の産生を促す方法、また HSV の糖タンパクである gB および gC に強く結合するヘパラン硫酸およびヘパリン軟膏で角層上を覆うことで表皮内への HSV の侵入を阻害する。

4. 研究成果

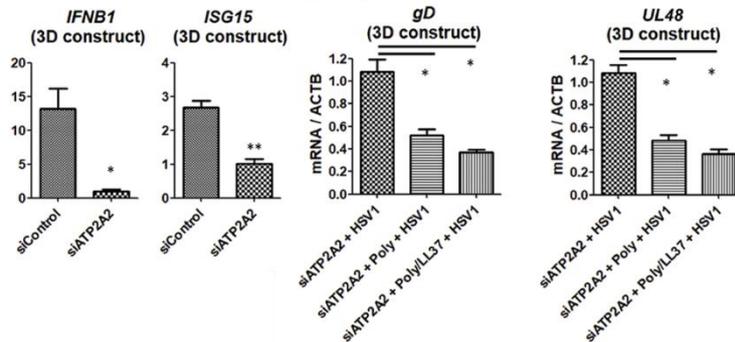
ATP2A2 の siRNA を導入したダリエ病表皮モデルでは過角化と基底細胞上での細胞接着不良を認めた (下図左)。電子顕微鏡で観察すると、ダリエ病表皮モデルでは細胞間に接着装置であるデスマゾームを認めなかった (下図右)。このデスマゾームの形成異常が細胞間接着不全を引き起こし、さらには表皮透過性を亢進させると考えられた。



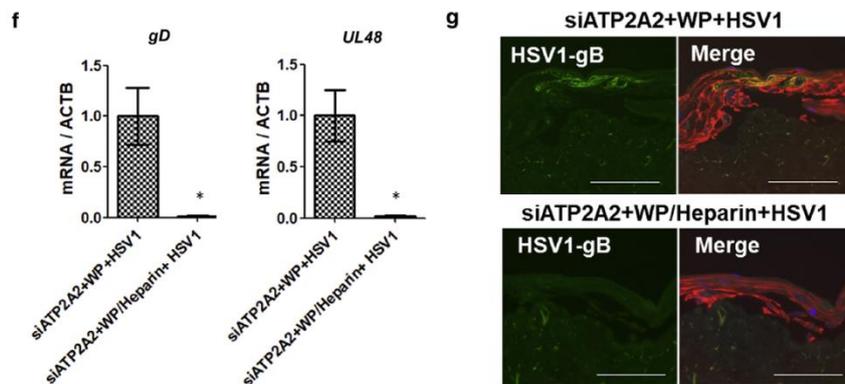
次に 5×10^5 PFU の HSV1 (KOS 株) をこれらの三次元表皮モデルの角層側に静置し 24 時間後に回収、HSV1-gB タンパクの蛍光免疫染色及び HSV1-gD の mRNA 発現解析を行った。ダリエ病表皮モデルでは表皮透過性の亢進によって HSV1 の角層を超えた感染を認めた (下図)。



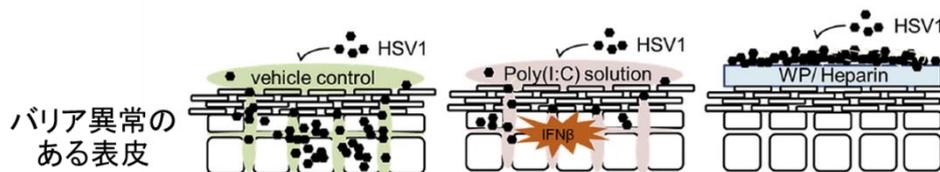
このバリア機能異常モデルで産生される IFN- β や interferon stimulated gene, 15kDa (ISG15) の発現を qRT-PCR で確認すると、予想外にダリエ病表皮モデルでは IFN- β や ISG15 の遺伝子発現が抑制された。そこでこのダリエ病表皮モデルに Poly(I:C) や抗菌ペプチドの LL37 による前処置を行った後に HSV1 を感染させると、HSV1 の主要な構成タンパクである gD や VP16 の遺伝子 (gD および UL48) の複製を抑制することができた。



しかし表皮自体の IFN- β 誘導によるウイルスの複製阻害はある程度の複製阻害はできるものの完全ではないこと、さらに炎症性皮膚疾患患者の表皮に 1 型インターフェロンを誘導すると、より強い炎症が起こり、原疾患が増悪するリスクが高いと考えた。そこで次に HSV-gB および gC タンパクに結合し HSV の細胞への侵入に重要な役割を持つヘパラン硫酸に注目した。HSV が角層から侵入する前に、角層上にヘパラン硫酸もしくはヘパリン軟膏を塗布することで HSV が軟膏に留められ角層を超えて表皮内に HSV1 が侵入することができないようにした (下図)。



今回の研究の結果を下のシェーマにまとめた。



私たちの三次元ヒト表皮モデルは、今後も siRNA やリコンビナントを用いることで今回のダリエ病モデルのようにより現実に近いヒトの疾患モデルを形成することが可能と思われる。今後もこれを用いて、まだよく理解されていない炎症性皮膚疾患の発症メカニズムの解明や治療開発などを行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sato E, Hiromatsu K, Murata K, Imafuku S. | 4. 巻 138 |
| 2. 論文標題 Loss of ATP2A2 Allows Herpes Simplex Virus 1 Infection of a Human Epidermis Model by Disrupting Innate Immunity and Barrier Function. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Investigative Dermatology | 6. 最初と最後の頁 2540-2549 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2018.05.019. | 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 - |
| 1. 著者名 Sato, E. Yano, N. Fujita, Y. Imafuku, S. | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Interleukin-17A suppresses granular layer formation in a 3-D human epidermis model through regulation of terminal differentiation genes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 390-396 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15250 | 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 - |
| 1. 著者名 Honami Nishio Tatemichi, Emi Sato, Yoshitsugu Shibayama, Kaori Koga, Shinichi Imafuku | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Sudden colour enhancement of congenital speckled lentiginous naevus after partial resection | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Australasian Journal of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 e355-e356 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ajd.13552 | 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 - |
| 1. 著者名 Akie Kajita, Emi Sato, Shinichi Imafuku | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Hypersensitivity due to unfractionated heparin treatment in a pregnant woman | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Dermatology | 6. 最初と最後の頁 e419-e421 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15551 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 絵美 |
| 2. 発表標題 Darier 病様の三次元表皮モデルを用いたカポジ水痘様発疹症の発症メカニズムの研究 |
| 3. 学会等名 第32回ヘルペスウイルス研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 絵美 |
| 2. 発表標題 Poly(I:C) and GAG inhibit exogenous HSV1 infection in the barrier dysfunctional 3D epidermal model |
| 3. 学会等名 2018 International Investigative Dermatology (IID) Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 絵美 |
| 2. 発表標題 IL-17A suppresses the formation of the granular layer in a human epidermis model via regulation of terminal differentiation genes |
| 3. 学会等名 2020 Society of Investigative Dermatology Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 絵美 |
| 2. 発表標題 Dysfunction of SERCA2 suppresses skin carcinogenesis |
| 3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回年次学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 絵美 |
| 2. 発表標題 IL-36 or IL-36 induces peeling skin syndrome-like symptom by suppressing TGM5 and CDSN in a three-dimensional human epidermis model |
| 3. 学会等名 2021 Society of Investigative Dermatology Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Imafuku S, Miyachi M, Ihara H, Yamaguchi K, Shibayama Y, Naito R, Ohga Y, Kunimi Y, Sato E, Aiko E, Aramaki C, Katayama S, Tanahashi A and Matsuda E |
| 2. 発表標題 Herpes simplex virus is rarely shedded in oral mucosa of immunocompetent oral herpes patients at symptomatic recurrence. |
| 3. 学会等名 24th World Congress of Dermatology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 佐藤 絵美、今福 信一 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 学研メディカル秀潤社 | 5. 総ページ数 2 |
| 3. 書名 Visual Dermatology 特集 光線療法使いこなしガイド 症例と最新情報, Case3 アトピー性皮膚炎のエキシマライト療法 | |

〔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 |
|-------|---------------------------------|-----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 今福 信一 (Imafuku Shinichi) | 福岡大学・医学部・皮膚科学・主任教授 (37111) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---------------------------------|--|----|
| 研究協力者 | 廣松 賢治 (Hiromatsu Kenji) | 福岡大学・医学部・微生物免疫学・主任教授 (37111) | |
| 研究協力者 | 木村 宏 (Kimura Hiroshi) | 名古屋大学・医学系研究科・ウイルス学・主任教授 (13901) | |
| 研究協力者 | 渡辺 大輔 (Watanabe Daisuke) | 愛知医科大学・医学部・皮膚科学・主任教授 (33920) | |

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 |
|---------|---------|
| | |