

平成21年 5月 25日現在

究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591302

研究課題名（和文）

温熱感受性受容体の作動薬を基にしたダリエー病の治療薬の開発

研究課題名（英文） The therapeutic effects of TRPV receptor agonists for Darier disease.

研究代表者

高橋 健造（TAKAHASHI KENZO）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80291425

研究成果の概要：

ダリエー病の治療薬の探索を行った。薬剤ライブラリーのスクリーニングの結果、カンナビノイドおよびバニロイド作動薬に属する2群の薬剤が、それぞれ表皮角化細胞に発現するCB受容体とTRPV3・TRPV4受容体を介し、独立した機序でATP2A2遺伝子の発現を亢進することを発見した。3次元培養ダリエー病モデルなどで、これら作動薬が異常角化、棘融解、円形体などの病理像を著明に改善し、健常な角化プロセスを回復し、角化異常に対する強い抑制効果があることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：遺伝性角化症、ダリエー病、優性遺伝性疾患、カンナビノイド、バニロイド

1. 研究開始当初の背景

これまでに代表研究者である高橋健造は、ヒト皮膚の角化細胞の細胞骨格であるケラチン蛋白とケラチン結合蛋白の同定と機能解析、ケラチン骨格の破綻によって生じる優性遺伝性の各種ケラチン病の病態の解明、その疾患モデルマウスの作成と、さらにこのマウスを用いた遺伝子治療の手法の模索を進めてきた。

この研究過程において、優性ネガティブ変異 (Dominant Negative Mutant) と呼ばれる発症メカニズムによるこれらケラチン病の皮膚症状の発病過程を、外来性に自在にコントロールすることの可能な遺伝子導入マウスモデルを作製した。さらにそのマウスを詳細に観察することで、どのように変異ケラチン蛋白の蓄積が皮膚の水疱や魚鱗癬の発症に至るのかを微細に解明しえた。

一方、今回の研究課題であるダリエー病は、上記のケラチン病のような優性ネガティブ変異による優性遺伝性疾患や劣性遺伝による皮膚疾患とは大きく異なり、その発症機序は haplo-insufficiency と呼ばれ、細胞内カルシウムポンプの1種である SERCA2 蛋白の正常な蛋白量が、健常人に比べ半分近くに低下していることが、発症の原因であることが理解された。

この発症機序の特徴を生かし、haplo-insufficiency で生じる疾患には、より直接的で単純化した治療法の探求が可能であろうと考えた。

本研究は、近年の分子生物学とヒトゲノム計画の進展により理解されるに至った、ヒトの優性遺伝性疾患の発症メカニズムの理解に直接基づいた治療法の開発であり、まさにポストゲノム時代の創薬といえる研究課題である。

皮膚科領域を含め、これまでヒトの遺伝性疾患に対する治療法の研究開発は、主に栄養障害型単純性表皮水疱症などの劣性遺伝性の疾患に対する遺伝子治療や蛋白補充による治療法が広く検討され、本研究対象のような優性遺伝性の疾患に関しては、治療法の確立に向けての具体的なアイデアがほとんど呈示されてこなかった。その意味でも本研究課題は、遺伝性皮膚疾患の治療法の模索に対して新たな道筋を付けるテーマであり、広く皮膚角化症以外の同様のメカニズムによる優性遺伝性疾患の治療法探索

に先鞭となす、探求すべき価値ある命題であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題の対象とするダリエー病およびその類縁疾患であるヘイリー・ヘイリー病は、比較的発症頻度の高い優性遺伝性の角化症で、生命予後は悪くはないが難治性である。特にダリエー病は、思春期に突然、顔面に醜形や異臭を伴う皮疹が出現するためか、自殺率の高い皮膚疾患に挙げられる。

現時点ではレチノイン酸や活性型ビタミンD3製剤がその治療に用いられるが、満足のいく治療効果は期待できない。

そこで本研究課題の目標は、難治性角化症であるダリエー病の治療薬となりうる、より選択性の高い副作用の少ない薬剤を探索・開発することである。

本研究で得られる研究成果は、まず直接、この2つの難治性皮膚疾患の治療薬として近い将来に結実する結果をもたらし、両疾患の罹患者・家族にとっての福音となりうる臨床医学的に意義のあるテーマである。

3. 研究の方法

本研究テーマは、優性遺伝性の皮膚疾患であるダリエー病とヘイリー・ヘイリー病の外用治療薬となりうる薬剤の探索・開発を目標とし、スクリーニングに供する薬剤・試薬の選択、アッセイに用いる細胞の種類と、数百の薬剤を効率的に再現性よくスクリーニングするための実際的なシステムの確立が重要な鍵である。

1次スクリーニングに使用する薬剤・試薬は、外用可能な脂溶性生理活性物質と低分子水溶性薬剤を中心に選択した。具体的には、米国 BioMol 社より市販されている数百種の脂溶性薬剤ライブラリーと低分子水溶性薬剤ライブラリーを中心にスクリーニングに使用した。

今回の2年間の基盤研究においては、これまでに完了したダリエー病に対する1次・2次スクリーニングの結果より選択したバリノイド系化合物による ATP2A2 遺伝子の発現亢進に関しての *in vitro* の解析を行い、マウス生体へ応用しうると考えるに至った薬剤をマウス皮膚や

免疫不全マウスへ移植した患者皮膚を用いた in vivo での薬剤の効果を病理組織学的に検討した。

(1) ヒトの正常表皮角化細胞 (NHEK) を用いて、コルチゾールを除いたステロイドフリーの KGM 培地の培養液中に、 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ モル程度高い濃度のスクリーニング薬剤を順次添加し、3時間、6時間、9時間後に RNA を、24時間後に全細胞蛋白を逐次抽出する。生理活性濃度よりも高い濃度の薬剤を1次スクリーニングで使用することで、内因性の受容体を介した直接的な刺激のみならず、交差反応による薬物活性も幅広く検出しようと考えた。

(2) この総蛋白と RNA を用い、ダリエー病の原因である SERCA2 蛋白をウエスタンブロット法で、原因遺伝子である ATP2A2 遺伝子をノーザンブロット法で検量することで、ヘイリー・ヘイリー病患者の臨床像を改善する可能性のある薬剤を探索しその傾向を決定した。この際、発現量の変動のない核膜ラミンの蛋白量と RNA 量を定量化のコントロールとして用いた。

この1次スクリーニングを効率的に遂行するために、これまでにシグナルノイズ比の高い ATP2A2 遺伝子断片をノーザンブロット用のプローベとして準備した。

(3) 上記の生化学的な解析結果を得て、マウス生体での病理学的・生化学的な解析を継続した。選択された薬剤が、目的である ATP2A2 遺伝子の発現亢進以外にどのような変化を表皮にもたらすかを病理学的に検討した。

また候補薬剤を実際にマウスやラットなど実験小動物に塗布した後の、経時的な皮膚の組織学的変化や生化学的な蛋白発現の変化を追跡した。

よりヒトの生体や患者皮膚に近い状態での生化学的解析や病理組織学的な効果確認を行う。この際、実際に健常人や患者皮膚に外用のために、擬似的なヒトの皮膚を免疫不全マウスの皮膚に再構築し、そこでの薬剤の効果を確認した。

この擬似ヒト皮膚の作製には、2種類の手法を準備した。1つは健常人や患者皮膚の小切片を直接ヌードマウスや免疫不全マウスに移植縫合し、生着を待って薬剤を負荷する方法がある。

さらに健常人あるいは患者より得た小切片を、まずは初代培養に供し増殖・継代しえた後に、ヒトの線維芽細胞と共にこの培養角化細胞の塊をヌードマウスの皮膚に埋め込み、その後、重層化した擬似ヒト皮膚モデルを構築させ、その重層化した皮膚へ薬剤を添加する手法を用いた。

薬剤の探索・選定の後の患者皮膚を用いた Ex Vivo での移植実験・短期培養実験については、その妥当性と安全性などを、京都大学医学部附属病院内の倫理委員会において審査を受け、その遂行に関し許可を得ている。(課題番号：平成17年度 E-88 番)。この倫理委員会での議論・許可を得た条件をもとに、その決定事項を遵守した上で、ダリエー病、ヘイリー・ヘイリー病患者に十分な説明のものを、生検組織の一部を移植実験等に使用することへの協力を得て、移植実験を遂行した。

またヌードマウスの皮膚に移植した患者組織片を用いた動物実験は、京都大学医学部附属動物実験施設の承認を受けた。

4. 研究成果

上記の手法により、培養表皮角化細胞株に対する網羅的な数百の薬剤ライブラリーの1次スクリーニングを遂行した。

その結果、カンナビノイドおよびバニロイド作動薬に属する2群の薬剤が、ATP2A2 遺伝子さらには SERCA 蛋白の発現を数倍に亢進することを発見し特許申請に至った。

それらは各々表皮角化細胞膜に発現する G 蛋白共役型のカンナビノイド受容体 (CB-1, 2)、あるいはカルシウムチャンネル型の温感受性受容体 (TRPV) を介してダリエー病の原因遺伝子である ATP2A2 遺伝子の発現を強く誘導することを発見した。この2つの作動薬はそれぞれ表皮角化細胞に発現する CB2 受容体と TRPV3・TRPV4 受容体を介し、各々独立した機序で働くことを見いだした。

さらに、現在6種類の存在が知られるヒトの温感受性受容体 (TRPV) の中で、人の皮膚組織は I・III・IV・V・VI 型の5種類の受容体アイソフォームを発現することをノーザン法で確認した。

温熱感受性受容体の6種の受容体同位体の中で、これらの受容体間では、20度—35度付近、あるいは43度付近の温熱帯、さらに50度近い高温帯とそれぞれ感応する温度帯に違いがあり、また温度刺激のみならず浸透圧刺激や物理的なストレッチ刺激を感受するなど、その反応様式に違いが知られている。

この温熱感受性受容体群の作動薬が、ATP2A2遺伝子の発現を著明に亢進するという実験結果は、これら疾患の病態形成をより細かに理解する上でも非常に興味深い事実である。ダリエー病は、上記のごとく単一遺伝子を原因とする優性遺伝性疾患ながら思春期以降に発症し、夏の暑さで著明に悪化し冬季に軽快するという事実がある。

ある特定温度領域に反応する受容体への刺激により、ダリエー病の遺伝子発現が著しく亢進するという事実は、治療薬としての興味のみならず、これら疾患の特徴的な病態の謎を解明する貴重な情報となることが期待される。

さらにより患者皮膚に近い状態で効果を検定するために、ダリエー病患者皮膚より樹立した3次元培養ダリエー病モデルや、ヌードマウスへの患者移植片に対し使用し、これら作動薬が異常角化、棘融解、円形体などの病理像を著明に改善し、健全な角化プロセスを回復し、角化異常に対する強い抑制効果があることを確認しえた。

ダリエー病患者の病態に極めて近い状態で薬剤の効果を確認しえる患者自身の培養角化細胞を用いた3次元モデル皮膚の構築は、他では非常に困難あるいは不可能な疾患モデルである。このモデル皮膚の利用により、治験段階にある数種のカンナビノイド薬剤より、迅速で効果的に外用剤化に最適な薬剤の選定を行うことが可能となる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8件)

(1) Ai Akagi, Miki Tanioka, Kenzo Takahashi, Yoshiki Miyachi and Atsushi Utani, FamilialFocal Acral Hyperkeratosis associated with hyperthyroidism.

Chonnam Medical Journal. 44, 3, 177-179, 2008

(2) Miki Tanioka, Aya Miyagawa-Hayashino, Toshiaki Manabe, Eiko Toichi, Yoshiki Miyachi and Kenzo Takahashi
Circumscribed Palmo-Plantar Hypokeratosis: A Disease With Two Subtype. Journal of Investigative Dermatology 2008 (9)

(3) S Matsui, A Utani, K Takahashi, YMukoyama, Y Miyachi, N Matsuyoshi
Knock down of Fat2 by siRNA inhibits the migration of human squamous carcinoma cells. J Dermatol Sci. 2008 3: 207-210.

(4) 日本医事新報 臨床医学の展望 2008
皮膚科学—乾癬 高橋健造 p33-34 No. 4371
2008年2月2日号

(5) 皮膚疾患の病態：
線維芽細胞の機能は皮膚の部位により異なる—
創傷治癒の観点より。
高橋健造、安田正人、石川 治、宮地良樹
臨床皮膚科 62巻5号 p51-56 2008年4月

(6) Matsui S, Utani A, Takahashi K, Mukoyama Y, Miyachi Y, Matsuyoshi N.
Human Fat2 is localized at immature adherens junctions in epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci. 2007 Dec;48(3):233-6.

(7) ケラチン 高橋健造 皮膚科セミナー
エ 日本皮膚科学会雑誌 117(2)、129-136、
2007

(8) 時空をマーチする血管炎 その他の血管炎・vasculopathy 蕁麻疹様血管炎
高橋健造 Visual Dermatology 6巻5号
p517-519(2007.04)

〔学会発表〕(計 2件)

(1) Vanilloid agonists as a novel therapeutics for Darer disease; the transcriptional stimulation of SERCA2 via TRPV thermo-sensitive receptors. K Takahashi, M Yonezawa and Y Miyachi

Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology, 2007 April 19 Yokohama

(2) Cannabinoid and vanilloid agonists as novel therapeutics for Darier's disease. K. Takahashi, M Yonezawa, Y Shirakata and Y Miyachi, 4th International Investigative Dermatology, Kyoto May 17 2008

[図書] (計 9件)

(1) いま“旬”の研究トピックスは？
a 細胞生物学 (1) 表皮角化細胞
高橋健造 新皮膚科レジデント戦略ガイド pp161-165 宮地良樹編集 2009年 診断と治療社

(2) 悪性萎縮性丘疹症 (デゴス病)
pp371-372
クモ状血管種 pp372-373
遺伝性脈管性疾患 pp373-377
高橋健造 皮膚科疾患診療実践ガイド 第2版
宮地良樹、古川福実編集
2009年 文光堂

(3) D3製剤の選択基準：剤型や濃度はどの様に選べばいいのでしょうか。
高橋健造 薬局で役立つ皮膚科治療薬 Q and A 皮膚疾患の基礎知識 ビタミン
2009年 中外医薬社

(4) 子供の皮膚は大人とどこが違う？
高橋健造 小児の皮膚トラブル FAQ
末廣 豊、宮地良樹編 pp2-3, 2008年

(5) 角化症に効く外用薬は？
高橋健造 現場の疑問に答える 皮膚病治療 Q and A pp157-159 2008年 中外医薬社

(6) 第1章スキンケアを理解するための基礎知識 2表皮細胞を知る。皮膚科診療最前線シリーズ
高橋健造 スキンケア最前線 p22-25 メディカルレビュー社 宮地良樹編 2008年

(7) 第1章フットケアの基礎、1フットケアを理解するためにはこれだけは知る必要がある。1足の皮膚 皮膚科診療最前線シリーズ

ズ 高橋健造 フットケア 最前線
p22-25 メディカルレビュー社 河野茂夫、宮地良樹編 2008年

(8) 塩化アルミニウムは多汗症になぜ効く？ 高橋健造 What's New in 皮膚科学
2008-2009
p194-195 メディカルレビュー社 河野茂夫、宮地良樹編 2007年

(9) 外界刺激の角化への影響
高橋健造 皮膚科プラクティス No.20
戸倉新樹 編 in Environment Dermatology
pp14-20 2007年

[産業財産権]
○出願状況 (計 2件)

「角化の亢進に起因する皮膚疾患の予防及び治療のための医薬」
特願 2007-059519

「角化の亢進に起因する皮膚疾患の予防及び治療のための医薬」
2008年3月7日に JST より PCT 出願
PCT/JP2008/000479]

6. 研究組織

(1)研究代表者
高橋 健造 (TAKAHASHI KENZO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80291425