

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790778
 研究課題名 (和文) 新規角化関連分子 Hornerin の機能解析とヒト疾患における意義の検討
 研究課題名 (英文) Functional analysis of human hornerin and its contribution to human skin disorders
 研究代表者 牧野輝彦 (MAKINO TERUHIKO)
 富山大学・大学病院・講師
 研究者番号：90359711

研究成果の概要：

培養正常ヒト表皮角化細胞 (NHK) をもちいて hornerin の発現条件を検討した。Ca²⁺添加による分化誘導では Profilaggrin の発現はみられるものの、hornerin の発現がみられず、細胞を full-confluent の状態に維持することにより hornerin の発現が確認された。さらに RNAi により profilaggrin 発現の抑制した条件下でも full-confluent を維持することにより hornerin の発現が誘導された。この結果より hornerin と profilaggrin は異なる発現調節を受けることが示唆された。

また、各種角化異常を伴う皮膚疾患をもつ患者より得られた皮膚を用いて Hornerin の発現を検討した。水疱型先天性魚鱗癬紅皮症や扁平苔癬、掌蹠角化症、慢性期アトピー性皮膚炎の一部などで発現が確認され、さらに hornerin が発現している皮膚ではサイトケラチン 6 の発現がみられた。これより hornerin は過増殖状態にある表皮角化細胞で発現すると推測された。サイトケラチン 6 は TNF- α や IL-1 など炎症性サイトカインの刺激で発現することが知られており、hornerin の発現にも炎症性サイトカインが関与しているか現在器官培養系を用いて検討中である。

以上の結果より hornerin は表皮において profilaggrin と異なる機能を持つことが示唆され、さらに hornerin の発現は炎症性角化症などのヒト疾患の病態形成に関与していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：皮膚、角化、ケラチノサイト、フィラグリン、組織構築

1. 研究開始当初の背景

我々は皮膚組織構築の分子機構を明らかに

し、その知見を様々な皮膚疾患の原因の解明や治療に役立てるため、胎生期のマウス皮膚

に RNA differential display を適用し、表皮角化細胞の増殖や分化に関与する遺伝子を系統的に単離・解析することを試みた。その過程でマウス胎児皮膚より単離された新規遺伝子のひとつである Hornerin は、N 末に EF hand ドメインを有し、それに多くの反復配列が続く、いわゆる fused-type の S100 タンパク質とよばれる構造を示し、また表皮顆粒層のケラトヒアリン顆粒に一致して発現していた。これらの特徴は、表皮の角化において重要な役割を担っている Profilaggrin と非常に類似しており、角化に関連する新しい遺伝子であると考えられた (J Biol Chem, 276(50): 47445-47452, 2001、J Histochem Cytochem, 51(4): 485-492, 2003)。さらにゲノムデータベースを利用し Hornerin のヒトホモログを同定した。その構造と発現について検討したところ、構造はマウス Hornerin や Profilaggrin と同様に fused-type の S100 タンパク質の特徴を示していたが、発現はマウスと異なり正常体幹皮膚 (成人・胎児) では認められず、外陰部皮膚、尋常性乾癬、創傷治癒過程の皮膚など特別な部位・状況下にある皮膚でのみ発現していた (J. Biol. Chem., 280(6): 4696-4703, 2005)。表皮角化細胞の増殖や分化に関与する遺伝子を系統的に単離・解析することを試み、ヒト Hornerin を同定した。ヒト hornerin は profilaggrin と類似した構造であったが、尋常性乾癬や創傷治癒過程の皮膚など特別な部位・状況下でのみ発現する分子であった。

2. 研究の目的

ヒト hornerin の機能の解析をさらに進め、本分子の生物学的な意味を解明するとともに hornerin の皮膚における役割、特に profilaggrin との機能の相違点の解明と各種皮膚疾患の病態形成への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮角化細胞を用いた in vitro での解析

これまでの実験結果よりヒト Hornerin は正常のヒト皮膚で発現が認められず、特殊な条件下で発現するものと推測される。従って正常ヒト表皮角化細胞 (NHK) や HacaT 細胞株に培地中のカルシウム濃度の増加、空気曝露、各種サイトカインの添加、紫外線照射などで細胞の分化を誘導し、どのような条件下で Hornerin が発現するかを検討する。同時に Hornerin 分子を正常ヒト表皮角化細胞 (NHK) や HacaT 細胞株過剰発現させた場合の、細胞の増殖・分化に及ぼす影響も検討する。

(2) 各種ヒト皮膚疾患における Hornerin の関与の検討

前述の通りヒト Hornerin は正常ヒト皮膚では発現がないが、尋常性乾癬や創傷治癒過程の皮膚では発現が確認されている。これまでに作成したヒト Hornerin を特異的に認識するペプチド抗体を使用し、尋常性魚鱗癬をはじめとする遺伝性角化症やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患、さらに悪性腫瘍における Hornerin の発現を解析し、ヒト疾患との関連性を検討する。特に尋常性魚鱗癬やアトピー性皮膚炎では Profilaggrin の変異が同定され、それによる機能の欠失が報告されている。これらの疾患に関しては、Profilaggrin の発現と比較しながら解析し、これらの分子の機能的差異についても検討する。

(3) Transgenic Human skin の作製

ヒト Hornerin は正常皮膚では発現がみられないが、マウス Hornerin は正常皮膚において発現がみられ、皮膚におけるその発現量は Profilaggrin を上回っている。このように動物種により発現パターンが大きく異なるため、Transgenic mouse の作製はヒト Hornerin の in vivo 機能の解析には適さないと考えられる。従ってヒト Hornerin を定常的に発現する表皮角化細胞を作製し、この細胞を用いて nu/nu マウスあるいは scid マウスの背部に皮膚を再構築、いわゆる Transgenic Human skin を作製し、ヒト Hornerin の組織構築に及ぼす作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 培養表皮角化細胞を用いた in vitro での解析

培養正常ヒト表皮角化細胞 (NHK) をもちいて hornerin の発現条件を検討した。Ca²⁺添加による分化誘導では Profilaggrin の発現はみられるものの、hornerin の発現がみられず、細胞を full-confluent の状態に維持することにより hornerin の発現が確認された。また発現した hornerin は培養細胞内で filaggrin と共発現していた (図 1)。培養表皮角化細胞はいわゆる過増殖状態にあることが知られており、Ca²⁺による表皮角化細胞の分化誘導ではなく過増殖の維持が hornerin の発現において重要な因子であることが示唆された。さらに RNAi により profilaggrin 発現の抑制した条件下でも full-confluent を維持することにより hornerin の発現が誘導され、これより hornerin と profilaggrin は異なる発現調節

を受けることが示唆された。

前述した通り培養表皮角化細胞はすでに過増殖状態にあることから各種サイトカインが hornerin の発現に及ぼす効果の評価は困難であった。そのため皮膚生検などの際の余剰皮膚を用いた器官培養により各種サイトカインが hornerin 発現に及ぼす影響を評価した。KBM 培地のみで培養した皮膚は2日後、4日後とも過増殖ケラチノサイトのマーカーであるケラチン6の発現は見られず、hornerin も発現しなかった。一方 EGF、IFN- γ 、TNF- α を KBM 培地に添加した皮膚では、2日後にケラチン6が、4日後には hornerin の発現がみられた。以上より炎症性サイトカインの影響により発現が誘導される可能性が示唆され、これは乾癬皮膚や創傷治癒過程の皮膚で発現することを支持するものと考えられた。

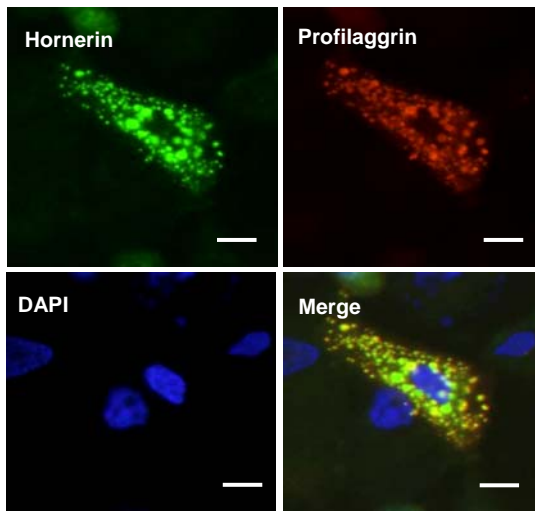


図1. 培養表皮角化細胞 confluent 7日後

(2) 各種ヒト皮膚疾患における関与の検討

a. 尋常性魚鱗癬における発現

尋常性魚鱗癬は filaggrin の遺伝子異常により生じる疾患であり、本疾患皮膚では filaggrin の発現が減少していることが知られている。本疾患患者3名の皮膚を用いて hornerin 発現を検討したところ、RT-PCR法、免疫染色法において hornerin の発現はみられなかった。尚 filaggrin に関しては正常皮膚より発現量は減少しているが両方法で発現がみられた。これより hornerin が filaggrin の発現を代償する可能性は極めて低いと思われた。

b. アトピー性皮膚炎における発現

アトピー性皮膚炎は尋常性魚鱗癬と同様に filaggrin の遺伝子異常がその原因のひとつ

であることが知られている。アトピー性皮膚炎患者7名より採取した皮膚を用いて hornerin の発現を検討した。

アトピー性皮膚炎の急性期の発疹である紅斑から採取した皮膚では hornerin の発現は見られなかったが、苔癬化病変や痒疹など慢性期の病変で hornerin の発現がみられた(図2左)。hornerin の発現している表皮ではケラチン6の発現もみられた(図2右)。また、hornerin が発現している皮膚におけるサイトカインの発現を検討したところ RT-PCR法で TNF- α や IFN- γ の発現がみられ(図3)、これらのサイトカインが hornerin の発現に関与している可能性が示唆された。

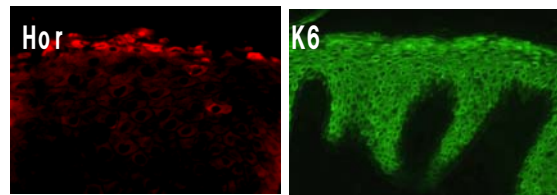


図2 アトピー性皮膚炎における発現

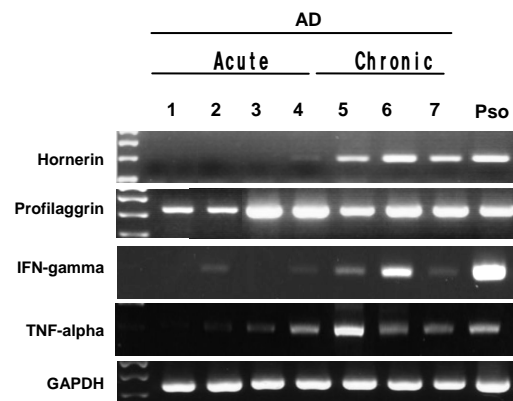


図3. アトピー性皮膚炎における hornerin と炎症性サイトカインの発現

c. その他の皮膚疾患における発現

遺伝性および後天性の角化を伴う皮膚疾患における発現を検討した。遺伝性角化症では水疱型先天性魚鱗癬紅皮症において Hornerin の強発現をみとめた。その発現の一部は filaggrin の発現と類似し顆粒層のケラトヒアリン顆粒に一致して発現していたが、filaggrin の発現と全く異なるパターンで発現している細胞もみられた(図4)。また、炎症性角化症である扁平苔癬や尋常性乾癬、前がん病変である日光角化症や Bowen 病でも発現がみられた。とくに日光角化症での発現は紫外線が hornerin 発現に関与する可能性を示唆しており興味深い。

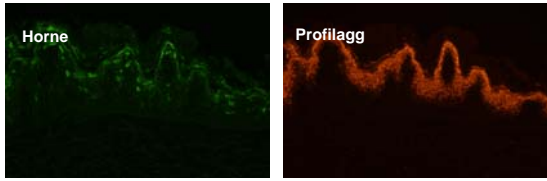


図4. 水疱型魚鱗癬様紅皮症における発現

d. 口腔軟膜、口腔疾患における発現

Hornerinおよびfilaggrinの口腔粘膜における発現を検討した。正常粘膜では舌、口腔粘膜、口蓋のいずれにおいても hornerin は発現していなかった。しかし、扁平苔癬や強い角化を伴う白板症では hornerin の発現がみられた。

以上の結果より hornerin は表皮において profilaggrin と異なる機能を持つことが示唆され、さらに hornerin の発現は炎症性角化症などのヒト疾患の病態形成に関与していると考えられた。

(3) Transgenic Human skin の作製

マウス背部にシリコンチャンバーを挿入し、その中に表皮角化細胞と線維芽細胞を加え皮膚の3次元構造を作製する。hornerin 全長の導入は困難であるため EF hand 領域や反復配列を3つ含むような mini gene を作製しレトロウイルスベクターである LZRS に導入した。現在この遺伝子を培養正常表皮角化細胞や HaCaT 細胞に導入し、その発現を検討している (図5)。

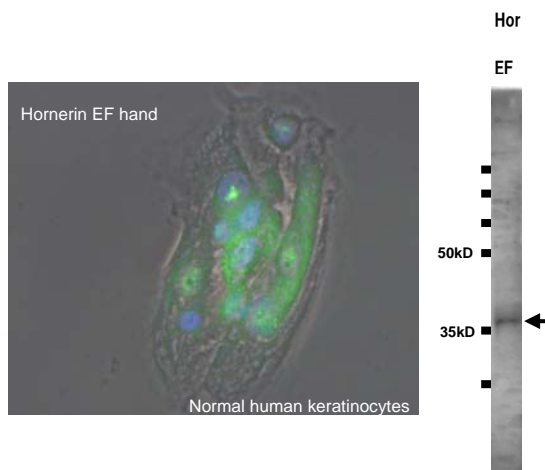


図5. 表皮角化細胞における hornerin コンストラクトの発現

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)

[学会発表] (計 3件)

T Makino, T Yamakoshi, S Inoue, M Noguchi, N huh and T Shimizu: Expression of profile of a profilaggrin-like protein, hornerin, in oral mucosa. 69th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2009 May6-9 Montreal, Canada

T Makino, M Takaishi, N Huh and T Shimizu: Expression of profile of a profilaggrin-like protein, hornerin, in human skin disorders and in differentiating normal human keratinocytes. International Investigative Dermatology 2008, May 14-17 Kyoto, Japan

E Hoste, G Denecker, P Van Damme, J Hachem, B Gilbert, P Ovaere, RB Presland, T Makino, N Huh, PM elias, J Vandekerckhove, K Gevaert, P Vandenabeele and W Declercq: Caspase-14 is a crucial protease in proper stratum corneum formation. International Investigative Dermatology 2008, May 14-17 Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野輝彦 (MAKINO TERUHIKO)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：90359711