

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17786

研究課題名（和文）皮膚疾患におけるオートファジーの役割の解明

研究課題名（英文）Elucidating the role of autophagy in skin diseases

研究代表者

吉原 渚（Yoshihara, Nagisa）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30772785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：脱毛症モデルマウスであるCCHCR1ノックアウトマウスの皮膚に対してオートファジー関連マーカーに対する免疫染色及びWestern Blot法を施行したところ、SQSTM1(p62)の発現の上昇がみられた。さらにCCHCR1KOマウスの脱毛部位では非病変部と比較し、LC3B-II/LC3B-I 比およびSQSTM1(p62)の有意な上昇がみられた。Beclin1の発現に関しては両者間に差異はみられなかった。以上の結果から、円形脱毛症においてはオートファジー活性が増加しているものの、異常蛋白の蓄積を起こしていた。オートファジー経路の後期段階に障害がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

円形脱毛症は、見た目に影響を与え、患者の生活の質を大きく落とす疾患である。近年、経口JAK阻害薬の登場により、新たな治療戦略を立てられるようになったが、今だ明確な病態解明はされておらず、既存の治療方法による疾患治癒率は低く、しばしば再発する。今回、オートファジーと円形脱毛症との関連を示唆する結果を得たことは、円形脱毛症の病態解析・新たな治療法確立に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Immunohistochemical staining of the skin of CCHCR1 knockout mice, a model mouse for alopecia, for autophagy-related markers revealed increased expression of SQSTM1(p62). Furthermore, the LC3II/LC3I ratio and SQSTM1(p62) were compared between the bald and non-lesioned areas of CCHCR1KO mice, and a significant increase in the LC3B-II/LC3B-I ratio and SQSTM1(p62) was observed in the hair loss areas. No difference was observed between the two in terms of Beclin1 expression. These results suggest that although autophagy activity is increased in alopecia areata, abnormal proteins accumulate. The normal level of Beclin1 was not impaired at the initiation stage of autophagy, and the accumulation of both LC3B-II and p62 suggested that there may be a defect in the later stages of the autophagy pathway, such as the fusion of autophagosomes with lysosomes and the degradation of autophagy cargo in lysosomes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：オートファジー 角化異常 円形脱毛症 ATG7 CCHCR1 LC3 p62

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、哺乳類の全ての細胞に存在する細胞内小器官等の蛋白処理機能であることが解剖学的・分子生物学的に解明されており、細胞内で取り込んだ空間をまるごと消化するため、バルク分解系と呼ばれている。オートファジーは自己消化にあたり消化物を隔離する隔離膜(オートファゴソーム)の形成が不可欠であるが、オートファゴソームの形成に必要な幾つかのグループの一つにユビキチン様因子 Atg8 の結合反応系がある。病態とオートファジーの関わりとしては、心筋症や悪性腫瘍、神経変性疾患など多岐に渡り報告がなされている。皮膚科領域でも、有棘細胞癌や悪性黒色腫 (Lazova R, et al J Cutan Pathol. 2010) など悪性腫瘍との関与が報告されている。当教室では、表皮での LC3 の発現検討を行っており (Haruna K, et al. J Dermatol Sci. 2008) LC3 の発現が顆粒層から有棘層にみられ、乾癬皮膚ではその発現が減弱していることからオートファジーが最終角化において何らかの役割を担っている可能性を報告している。しかしながら通常の Atg7 欠損マウスは生後数時間で死亡するため、成熟した皮膚での長期観察が困難であった。その後我々は、新生児 Atg7 欠損マウス皮膚を成熟マウスへ皮膚移植し、成熟皮膚でのオートファジーの役割を解析する実験系を確立し、成熟過程においてフィラグリンやロリクリン発現の減少を示し、代償性に他の機構が働き角化異常を抑制する可能性を見出している (Yoshihara N, et al. Arch Dermatol Res. 2015)。このことは、Heidemarie Rossiter らの報告 (2013, JDS) にある表皮細胞の分化の際にオートファジーは活性化されているが、角化関連遺伝子の発現変化は乏しい原因の解明にもつながる結果であった。今回我々は、さらなる皮膚疾患とオートファジーの関連を解明し、オートファジーをターゲットとした治療法の模索を検討した。

2. 研究の目的

皮膚におけるオートファジーの役割や各種皮膚科疾患の病態に与える影響を探索することにより、疾患に対する新しい知見を与え、新しい治療への礎の構築を目指す。

3. 研究の方法

臨床で得た皮膚科疾患検体に対して、オートファジー関連マーカーである LC3・p62・カテプシン D・L のの染色を行い、オートファジーの関連している疾患を網羅的に検索する。Atg7 ノックアウトマウスの皮膚を重症免疫不全マウスに移植し、その移植片の観察を行う。脱毛症とオートファジーの関連探索に関しては、脱毛症モデルマウス CCHCR1 ノックアウトマウスに対して、オートファジー関連マーカーの検索を行う。

4. 研究成果

当初検索する対象疾患を、尋常性乾癬、扁平苔癬、アトピー性皮膚炎、有棘細胞癌、日光角化症、基底細胞癌、ボーエン病、ボーエン癌として検討を行った。このうち、特に尋常性乾癬および悪性腫瘍において、オートファジー機能の関与が強く、さらにカテプシン D・L の染色性の増強が確認された。さらに、有棘細胞癌、ボーエン病、ボーエン癌において、腫瘍径と悪性度が増強するにつれ LC3 およびカテプシンの発現の増強が見られる傾向が観察された。以上の結果より顆粒層に異常を来たす病態を持つ皮膚疾患や皮膚腫瘍病変においてオートファジーが関与していることが示唆された。

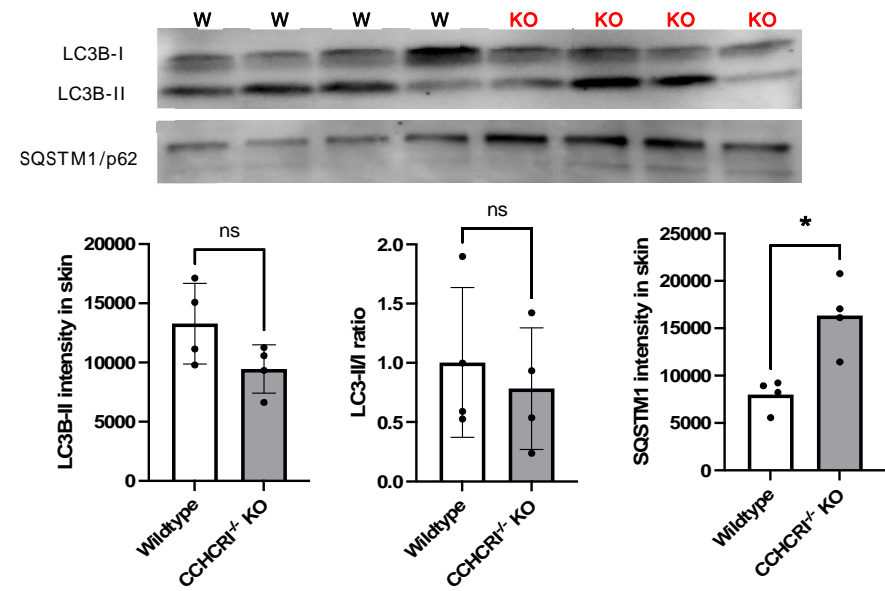
Atg7KO マウスの移植片の皮膚の観察をする過程において、オートファジーが機能しない移植片では、角化関連蛋白質の発現低下と毛髪形態の異常が出現することが観察されたが、同様の結果が当施設で研究している、円形脱毛症モデルマウスである CCHCR1 遺伝子 KO マウスにおいても同様の結果が見いだされた。具体的には、CCHCR1 遺伝子 KO マウスにおいて角化関連タンパク質の発現および毛髪形態の観察を施行した。その結果、免疫染色、Western Blot 法・qPCR 法のいずれにおいてもロリクリン、フィラグリン、インボルクリンといった角化関連タンパク質の発現低下がみられた。さらに、CCHCR1 遺伝子 KO マウスの毛髪に対する電子顕微鏡検査を施行したところ、コントロール群と比較し有意差を持って、毛の小型化および毛幹構造異常が確認された。以上の結果は、これまで Atg7KO マウスの皮膚移植片でみられていた皮膚変化と同様の結果であった

そこで、円形脱毛症とオートファジーの関連が強く疑われたため、オートファジー関連マーカーの発現を免疫染色および Western Blot 法にて検討したところ、CCHCR1 遺伝子 KO マウスは WILD タイプマウスと比較し、LC3 発現の低い傾向があり、SQSTM1(p62)の発現が優位に上昇していた (図1)。

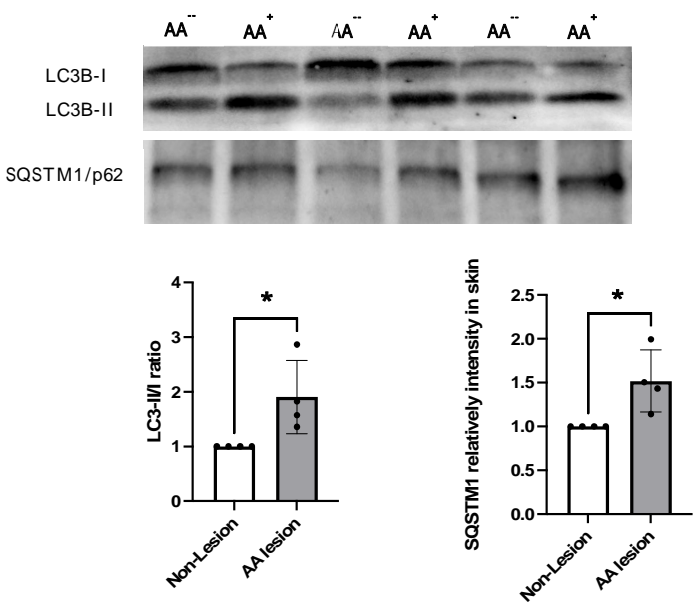
さらに CCHCR1KO マウスの脱毛部位と非脱毛部位の LC3 /LC3 比および SQSTM1(p62)を比較したところ、脱毛部位において LC3B- /LC3B- 比および

SQSTM1(p62)の有意な上昇がみられた(図2)。さらに、オートファジーを誘導する Beclin1の発現に関しては両者間に差異はみられなかった。以上の結果から、円形脱毛症においてはオートファジー活性が増加しており、一方で異常蛋白の蓄積も起こしていることが示唆された。Beclin 1の正常レベルは、オートファジーの開始段階では機能が損なわれておらず、LC3B- および SQSTM1(p62)両方の蓄積がみられたことから、オートファゴソームとリソソームの融合やリソソーム内のオートファジーカーゴの分解など、オートファジー経路の後期段階に障害がある可能性が示唆された。

【図1】



【図2】



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Nagisa Yoshihara
2 . 発表標題 The relationship between CCHCR1 variant and alopecia areata
3 . 学会等名 FIRST INTERNATIONAL SOCIETIES FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY MEETING (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Cuong Nguyen Phu, Nagisa Yoshihara, Ikeda Shigaku, Rei Watanabe
2 . 発表標題 The effects of the CCHCR1 variant on pathogenesis of alopecia areata
3 . 学会等名 日本研究皮膚科学会 第49回年次学術大会・総会
4 . 発表年 2024年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------