

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08646

研究課題名(和文) TGF-betaシグナルに着目した栄養障害型表皮水疱症の線維化メカニズム

研究課題名(英文) TGF-beta Signaling in fibrosis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa

研究代表者

赤坂 英二郎 (Akasaka, Eijiro)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：30436034

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)：栄養障害型表皮水疱症(RDEB)患者の皮膚線維芽細胞(RDEBF)ではTGF-βシグナルが活性化しており、線維化を生じやすい状態であった。RDEBFではNHFと比較して、TGF-βの活性化因子であるMMP、インテグリン、トロンボスポンディン1、ROS産生が亢進しており、とくにインテグリンとROSが主たる活性化因子であった。またRDEBでは線維芽細胞と角化細胞(RDEBK)との間にTGF-βシグナルを介した相互作用があり、線維化の負のループを形成していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRDEBにおける線維化の治療ターゲットとしてLatent TGF-βの活性化抑制に着目し、MMP、インテグリン、トロンボスポンディン、ROSがRDEBFにおけるTGF-βシグナルを活性化させること、これらの阻害によりTGF-βシグナルおよび線維化関連蛋白の発現を抑制できると考えられ、RDEB線維化の新規治療法の発展につながる。さらにRDEBFをとりまく細胞外マトリックスは、癌の上皮間葉転換や浸潤・転移とも密接に関連しているため、この新規治療法が確立されれば、線維化のみならず、RDEBの最も重篤な合併症であるcSCCの進展を抑制できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB), elevated TGF-beta signaling has been reported to drive devastating fibrosis. The exact knowledge of the individual contributions of keratinocytes and fibroblasts to dermal fibrotic response is crucial for development of improved disease-modulating therapies. We investigated the keratinocyte-fibroblast interaction on enhanced TGF-beta signaling in RDEB skin using fibroblasts and keratinocytes originating from RDEB donors. RDEB fibroblasts had an enhanced capacity to activate latent TGF-beta. Additionally, inhibition of thrombospondin-1 (TSP-1), matrix metalloproteinases (MMPs), and RGD-binding integrins, which are representative activators of latent TGF-beta, suppressed the TGF-beta signaling in RDEB fibroblasts. These results suggested the involvement of keratinocytes in initiating and progressing dermal fibrosis via TSP-1, MMPs, and RGD-binding integrins mediating keratinocytes-fibroblasts interaction.

研究分野：遺伝性水疱症

キーワード：表皮水疱症 栄養障害型表皮水疱症 VII型コラーゲン TGF-beta

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

栄養障害型表皮水疱症(RDEB)では、真皮と表皮の接着に必須な係留線維の主成分であるVII型コラーゲン(C7)の遺伝的異常により、真皮表皮の接着が脆弱となり、軽微な外力で全身の皮膚粘膜に水疱・びらんを形成する。また皮膚損傷と癒着のサイクルを繰り返すことで、指趾の棍棒状癒着、関節拘縮、食道狭窄など著明な線維化をきたすことが特徴である。この線維化は患者のQOLを低下するのみならず、皮膚有棘細胞癌の発生源となるため、重症RDEBの生命予後は極めて不良である。しかしながら、RDEBに対する有効な治療法は存在しない。

一般に、種々の臓器の線維化はTGF- β シグナルにより引き起こされる。TGF- β を標的とした治療はRDEBにおける皮膚線維化を抑制し、患者のQOLおよび生命予後を改善できると考える。そのためには、RDEBの疾患特異的なTGF- β シグナル活性化機構を解明しなければならない。

TGF- β は非活性型のLatent TGF- β として分泌され、Latent associated protein(以下LAP)からmature TGF- β が切り離されることで活性型となる。このLatent TGF- β

の活性化は様々な因子により生ずることが報告されているが、主要なものはトロンボスポンディン1(TSP-1)、インテグリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、活性酸素種(ROS)の4つである。しかしながら、これらがRDEBの線維化に、どのようなLatent TGF- β 活性化因子がどの程度関与しているか、あるいはRDEBKの線維化に及ぼす影響については、詳細な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RDEBにおける重篤な線維化の発症メカニズムを明らかにすることである。さらにRDEBFをとりまくECMのProfibroticな微小環境は、癌の上皮間葉転換や浸潤・転移とも密接に関連しているため、この新規治療法が確立されれば、線維化のみならず、RDEBの最も重篤な合併症であるcSCCの進展を抑制できると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いるRDEBFにおけるTGF- β シグナルの評価

RDEBFにおけるTGF- β シグナル: RDEBFのTGF- β シグナルをウエスタンブロット(以下WB)で評価する。

RDEBFにおけるLatent TGF- β の活性: NHFおよびRDEBFにActive TGF- β およびLatent TGF- β を投与してWB(pSMAD2/3)を行い、それぞれのEC50を計測して比較する。またGel contraction assayでもTGF- β シグナルを再評価する。

(2) 各種阻害剤を用いたLatent TGF- β 活性化メカニズムの解析

各種阻害剤を用いて以下の実験を行う。

RDEBFにおけるLatent TGF- β 活性化メカニズム: 培養RDEBFを各種阻害剤で処置したのちにLatent TGF- β を添加し、TGF- β シグナルおよび線維化関連タンパクの発現を、WB、免疫蛍光、RT-qPCRで評価する。線維化の程度はGel-contraction assayおよびPicrosirius-Red染色で評価する。

阻害剤の*in vivo*での効果: 上記で高いTGF- β 活性抑制効果がみられた阻害剤をRDEBモデルマウスに投与し、線維化抑制効果を検討する。

RDEB表皮角化細胞(RDEBK)の皮膚線維化に及ぼす影響: I型コラーゲンゲル内で培養したRDEBFの上層でRDEBKを三次元培養し3D培養皮膚モデルを作成する。各種阻害剤存在下で3週間培養したのち、TGF- β シグナルおよび線維化について検討する。

4. 研究成果

(1) Latent TGF- β を添加し, TGF- β シグナルおよび線維化関連タンパクの発現を評価した. 各種阻害剤はすべて培養 RDEBF の Latent TGF- β 活性化を抑制したが, とくに ROS 阻害剤は抑制効果が高かった. また siRNA を用いた検討では, インテグリン α 5 および MMP-2 を阻害した際に Latent TGF- β 活性化が強く抑制された. 以上より, RDEBF においては主としてインテグリン α 5, MMP-2, ROS が Latent TGF- β 活性化に関与していると考えられた.

(2) RDEB 角化細胞(RDEBK)の皮膚線維化に及ぼす影響を調べるため, RDEBF と RDEBK を三次元培養し 3D-RDEB 培養皮膚モデルを作成した. 各種阻害剤存在下で TGF- β シグナルおよび線維化を評価した. RDEBK と RDEBF を共培養した際には, RDEBK と正常線維芽細胞, 正常角化細胞と RDEBF という組み合わせと比較して, 有意に RDEBK および RDEBF における TGF- β 活性や線維化関連タンパクの発現が上昇していた. RDEB における線維化には RDEBK と RDEBF の相互作用が重要な役割を果たしており, いずれかを collection することで, 重篤な線維化を抑制できる可能性が示唆された.

(3) VII 型コラーゲンコーティング後に RDEBF を培養したところ, Latent TGF- β 活性化が抑制された. このころから VII 型コラーゲン自体が活性化因子の発現や機能を抑制することで, TGF- β シグナルを制御していると考えられた.

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akasaka Eijiro, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke	4. 巻 106
2. 論文標題 Two cases of the intermediate phenotype of recessive dystrophic epidermolysis bullosa harboring the novel COL7A1 mutation c.3570G>A	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 193 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.04.009	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 Akasaka E, Nakano H, Sawamura D	4. 巻 22
2. 論文標題 Availability of mRNA Obtained from Peripheral Blood Mononuclear Cells for Testing Mutation Consequences in Dystrophic Epidermolysis Bullosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 13369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413369.	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 Akasaka E, Kleiser S, Sengle G, Bruckner-Tuderman L, Nystrom A	4. 巻 141
2. 論文標題 Diversity of Mechanisms Underlying Latent TGF- β Activation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatolgy	6. 最初と最後の頁 1450-1460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.10.024	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 Akasaka E, Rokunohe D, Nakano H, Yamatani S, Sawamura D.	4. 巻 51
2. 論文標題 A case of adult-onset localized recessive dystrophic epidermolysis bullosa, harboring the novel COL7A1 mutation p.G2754E and the previously reported mutation p.R1763	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e74-e76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16993	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 赤坂 英二郎
2. 発表標題 栄養障害型表皮水疱症における TGF- β シグナル活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第10回皮膚の会.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eijiro Akasaka
2. 発表標題 Usefulness of mRNA Obtained from Peripheral Blood Mononuclear Cells to Analyze Consequences of Mutations in Epidermolysis Bullosa
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eijiro Akasaka
2. 発表標題 Availability of mRNA Obtained from Peripheral Blood Mononuclear Cells for Mutational Analysis in Dystrophic Epidermolysis Bullosa
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akasaka E, Bruckner-Tuderman L, Nystrom A, Nakano H, Sawamura D
2. 発表標題 Diversity of Mechanisms Underlying Dysregulating TGF- β Signaling in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akasaka E, Bruckner-Tuderman L, Nystrom A
2. 発表標題 Epidermal keratinocytes are involved in severe skin fibrosis of recessive dystrophic epidermolysis bullsoa
3. 学会等名 第34回 表皮細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤坂 英二郎, Alexander Nystrom, Leena Bruckner-Tuderman, 澤村 大輔
2. 発表標題 栄養障害型表皮水疱症における TGF- シグナリング活性化機構
3. 学会等名 第42回水疱症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤坂英二郎, 中野 創, 澤村大輔
2. 発表標題 口腔癌を合併したKindler症候群の1例
3. 学会等名 第43回水疱症研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤坂 英二郎
2. 発表標題 表皮水疱症治療の最新の動向
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤坂 英二郎
2. 発表標題 遺伝性水疱症の診断とその対応
3. 学会等名 第122回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 福井 次矢、高木 誠、小室 一成 総編集、赤坂 英二郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2224
3. 書名 今日の治療指針 2022年版	

1. 著者名 高橋健造、佐伯秀久 編集、赤坂英二郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 318
3. 書名 皮膚疾患最新の治療2023-2024	

〔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