

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08657

研究課題名（和文）白斑発症における色素細胞の酸化ストレス感受性に関わる分子の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of molecules involved in the susceptibility of melanocytes to oxidative stress in vitiligo pathogenesis

研究代表者

井上 紳太郎（Inoue, Shintarou）

岐阜薬科大学・薬学部・特任教授

研究者番号：00793853

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：尋常性白斑(VL、Vitiligo)の発症と病態維持には、酸化ストレス(OS)などの環境要因が関与する。申請者は、VL病変部基底層ケラチノサイト(KC)において膜タンパク質GPNMBの発現が消失し、VLと関連する炎症性サイトカインであるIFN- γ がGPNMBの発現を下方制御することを報告している。本研究では、GPNMBのKCでの生理的役割、VL発症や病態維持への関与について検討し、GPNMBがKCにおいてOS抵抗性分子として寄与すること、さらに、分化・角層成熟化、細胞接着、および発癌関連遺伝子の発現制御に関わることを示し、メラノサイトの浮遊化や発癌リスクの低減に寄与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の色素細胞が消失し白斑形成が起きる後天性の自己免疫疾患、尋常性白斑の発症と病態維持には、酸化ストレスなどの環境要因も重要である。病変部の表皮細胞ではインターフェロン γ の関与により膜タンパク質GPNMBの発現が消失する。本研究では、GPNMBの生理的役割と白斑発症や病態維持への関与を検討し、GPNMBが表皮細胞の酸化ストレス抵抗性、分化・角層成熟、細胞接着、発癌関連遺伝子の発現制御等に関わることを示した。これらの結果から、GPNMBが白斑での色素細胞の浮遊化や発癌リスクの低減に関与することが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Environmental factors such as infections and oxidative stress (OS) are involved in the pathogenesis and maintenance of vitiligo (VL). We have reported that the membrane protein GPNMB (Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B) expression is lost in the basal layer keratinocytes (KC) of VL lesions and are downregulated by IFN- γ . In this study, we investigated the physiological role of GPNMB in KC and its involvement in VL pathogenesis and maintenance of the disease state. As a result, this study showed that GPNMB contributes as an OS resistance in KC and is involved in differentiation, stratum corneum maturation, cell adhesion, and regulation of carcinogenesis-related gene expression, suggesting that GPNMB contribute to melanocyte floating and carcinogenesis risk.

研究分野：皮膚科学

キーワード：白斑 ケラチノサイト GPNMB 酸化ストレス 分化 細胞接着 発がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尋常性白斑 (VL) は難治性の自己免疫疾患である。しかしながら、免疫的要因に加え、感染や酸化ストレス (OS) などの環境要因が発症や病態維持に関わっており、色素細胞 (MC) だけでなく表皮細胞 (KC) や線維芽細胞などの非免疫細胞の病態への寄与も報告されている。一方で、化学白斑であるロドデノール (RD) による色素脱失症には、発症に化合物由来代謝産物が引き起こす OS が寄与している。皮膚の MC の消失や減少をきたす原因として、細胞傷害性 T 細胞による MC の攻撃や、MC 自身の OS 感受性および E-カドヘリン消失による表皮基底膜からの脱離が有力視されている (*J Invest Dermatol* 135: 1810, 2015)。我々は化学白斑の発症メカニズムを解析するにあたり、MC の OS 抵抗性に NRF2 酸化ストレス抵抗系が寄与していることを報告した (*Pigment Cell Melanoma Res.* 29: 541-549, 2016)。加えて、KC と MC の接着に関わる候補分子として膜タンパク質 Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) に着目した。GPNMB は、内皮細胞では老化マーカーとして (*Sci Rep* 12: 6522, 2022)、メラノーマでは転移促進因子や癌マーカーとして (*J Invest Dermatol* 138: 2443, 2018)、また M2 マクロファージでは間葉系幹細胞の生存・増殖・移動に寄与する因子として (*J Invest Dermatol* 138: 219, 2018) 知られている多機能タンパク質だが、KC での機能は不明である。我々は GPNMB が結節性硬化症白斑部位では健常皮膚同様に発現しているが、VL の病変部表皮層で著しく発現低下していることを見出した (*Sci Rep* 10: 4930, 2020)。VL 発症に関連する炎症サイトカインである IFN- γ や IL-17A は、GPNMB の KC における発現を抑制した。これらの知見を踏まえ、化学白斑に加えて VL の発症予防や治療において、MC および KC の OS 感受性 (抵抗性) のメカニズムを解明することが重要であると考えた。近年では患者の VL 皮膚病変部において、角化亢進、基底部の空胞化、表皮厚の増加、および KC の E-カドヘリン発現の低下とアポトーシス細胞の増加が報告され、VL の発症と病態維持に MC だけでなく KC の異常が関わっていることが示唆されており (*Ultrastructural Pathol* 46: 217, 2022)、VL 発症機序の研究における KC の重要性が増してきている。

2. 研究の目的

VL 治療には、ステロイドやタクロリムスなどの免疫抑制剤や、UV 療法、皮膚移植などが用いられ、最近では IFN- γ および IL-15 をターゲットとした Janus kinase (JAK) 阻害薬の適応も検討されているが、概して難治であり、環境ストレスによりしばしば活動性 VL に復帰する。また、色素再生には日光の露光が推奨され、UV の反復照射治療もおこなわれているが、免疫抑制療法下における白斑部位での光発癌リスクが懸念され、免疫抑制やサイトカインシグナルではなく、MC や KC 特異的な VL ターゲット分子の探索と治療への応用が期待される。本研究は、下の 2 点を学術的問いとした。OS 感受性に関わる分子の同定と解析を通して白斑発症のメカニズムを明らかにするとともに、新たな治療ターゲットを提案する。

課題1) 化学白斑やVLでは、MCやKCのOSに対する感受性が発症や病態の維持に重要との知見があるが、OSに対する細胞の抵抗性は、どのような分子によって担われているのか？発症の引き金や病態維持がOS抵抗性の差によるとすれば、NRF2系やそれ以外の分子がどのように関わっているのか？

課題2) RDのような化学白斑リスク物質は、用いる細胞や培養条件により結果が異なり、発症リスクを安定的に事前に予知することは困難である。OS抵抗性に関わる分子を制御した改変細胞を用いることで汎用性の高いVL発症リスク物質の評価が可能になるか？

3. 研究の方法

課題1)

膜タンパク質GPNMBは、正常皮膚およびVLの非病変部の上皮細胞層では発現しているが、病変部では消失していること、VL発症に関連するサイトカインであるIFN- γ やIL-17AがGPNMB発現の総量を抑制したことから (*Sci Rep* 10: 4930, 2020)、VLの病因・病態維持に関わる重要な因子である可能性がある。ヒトKCにおけるGPNMBの役割、および白斑形成あるいは病態維持との関わりについて重点的に検討する。KCにおけるOS抵抗性へのGPNMBの関与やNRF2抗酸化システムとの関係性を検討するため、GPNMBタンパク質をノックダウン (KD) し、細胞のOS感受性の違いを検討する。加えて、*in vitro*で培養ヒト正常KCのGPNMBタンパク質をKDし、部分的に細胞障害性を示す濃度 (細胞生存率が約80%) の過酸化水素水処理あり・なしの条件下で変動する遺伝子について網羅的にRNA発現を解析し、発現変動している遺伝子群を特定する。KCにおけるGPNMB下流遺伝子の検索をおこない、VL発症におけるGPNMBの関与の作用機序を探る。

課題2)

ロドデノール (RD: rhododendrol) 色素脱失症の発症機序として、RDのMC特異的細胞障害性の可能性に着目し、ヒト皮膚正常MCを用いて検討したところ、RDはチロシナーゼ (TYR) 依存的にMC障害性を示すこと (*Pigment Cell Melanoma Res.* 27: 754, 2014)、グルタチオン (GSH) 合成阻害剤でのMCの前処理、およびNRF2遺伝子やGSH合成酵素遺伝子のKDにより、RDの細胞障害性は増強され、逆に、Nアセチルシステインにより細胞内GSHレベルを高めると障害性は防御されることを見出した (*Pigment Cell Melanoma Res.* 29: 541, 2016)。このような化学白斑リスク物質は、用いる細胞や培養条件により結果が異なり安定的に事前に予知することは困難であるが、OS抵抗性に関わる分子を制御した改変細胞を用いることで化学白斑リスク物質の安定的な検出系の確立を目指し、OS抵抗性に関与する代表的な遺伝子、NRF2遺伝子をノックアウト (KO) したメラノーマ細胞 (MM) クローンを作出して化学白斑リスク物質の安定的なスクリーニング系の作製を試みる。

4. 研究成果

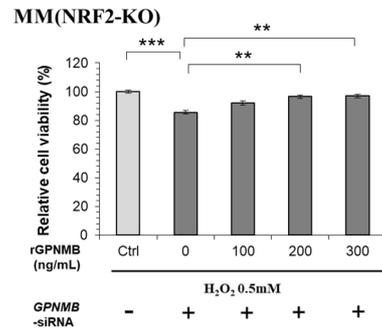
課題1)

我々は、表皮の基底部に発現が高いGPNMBがVL病変部のKCにおいて発現が消失していることを報告している (*Sci Rep* 10: 4930, 2020)。そこで、KCのGPNMB発現低下が白斑発症や病態維持にどう関わっているのか、あるいはGPNMBがKCでどのような生理的役割を担っているのかについて、遺伝子やタンパク質発現の動態の詳細な検討を行った。

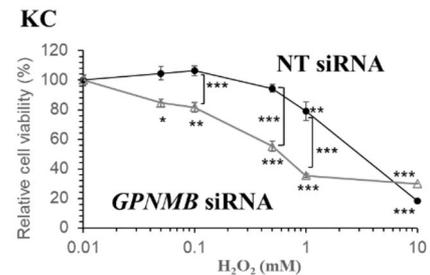
4-1. 膜タンパク質 GPNMB は KC の抗酸化ストレスタンパク質である

NRF2をKOしたMMを用いて過酸化水素 (H₂O₂) による細胞障害性を調べたところ、GPNMB siRNAによるGPNMBの発現低下は過酸化水素に対する感受性を増大した。加えて、実験系にrGPNMB (GPNMBの細胞外ドメイン) を添加したところ、rGPNMBはMMをNRF2活性化とは無関係にOSから保護した (図1)。この結果からMMではGPNMBがOSによる細胞障害を回避する抗OSタンパク質であることを示した。

次に、ヒト表皮KCのH₂O₂感受性に対するGPNMBの役割を調べた結果、不死化MCのNRF2のKDはH₂O₂感受性を増加させたのに対し、KCではH₂O₂感受性が全く変化しなかった。一方、GPNMBのKDにより、H₂O₂感受性が明らかに増大した (図2)。KCのH₂O₂刺激時のNRF2依存的な抗酸化経路 (HO-1, NQO1等) は活性化しなかった。培地に添加したrGPNMBは、KCをH₂O₂による酸化ストレスから保護した。これらのことは、ヒトKCの増殖期では一般的に抗酸化システムとして重要なNRF2ではなく、むしろGPNMBが抗酸化システムとして機能していることを示している。



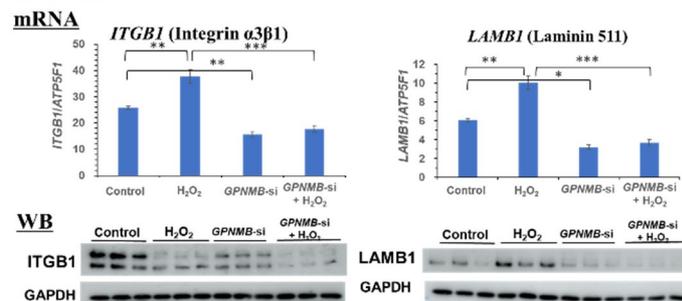
【図1】 rGPNMBはNRF2の活性化とは無関係に抗OS能を示した (**, p < 0.01, ***; p < 0.001 (Tukey's test))



【図2】 GPNMBのKDによりKCのH₂O₂感受性が増大した (*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001 (Tukey's test))

4-2. 基底層におけるGPNMBの発現低下はMCの浮遊化を誘導している可能性がある

VL病変部でMCが基底膜から離脱し浮き上がる (floating melanocytes) 要因と考えられる、接着因子に着目した。KCのGPNMBのKDにより、白斑メラノサイトでの発現低下が報告されているE-カドヘリンの発現量は変わらなかったが、インテグリン 1 (ITGB1) およびラミニン 1 (LAMB1) の mRNA

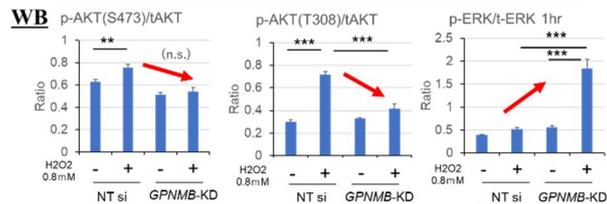
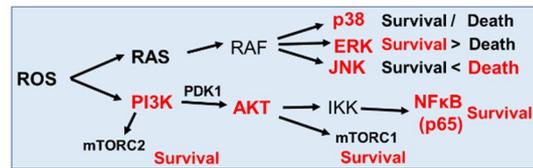


【図3】 GPNMBの発現低下に伴う接着因子の発現変化 (N=3, *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001 (Tukey's test))

発現が有意に低下し、GPNMB発現低下時にH₂O₂によるOSが加わるとさらに発現量が低下した。WB解析によるタンパク質発現量でも同様の結果が得られた。この結果は、KCのインテグリン 3 1および基底膜ラミン 511発現量の低下を示唆する。KCの 3 1はMCのGPNMBと結合し、MCは 6 1を介して基底膜ラミニン 511と結合すること、さらにKCのGPNMBはMCの 3 1と結合することから、VL病変部のKCでGPNMB発現低下時にOSに曝されると、KCとMCの結合、およびMCの基底膜との結合が低下し、floating MC形成を促す可能性が示された。これまでの結果と合わせて、IFN- や IL-17A によるKCのGPNMB発現減少時にOS刺激を受けると、KCのインテグリンやラミニン発現の低下を介してMCのOS感受性を高めVL病態で見られるMCの浮遊化を誘導すると考えられる。すなわち、VLでは、GPNMB発現が低下したKCのOS感受性亢進がMCの障害性を高める要因となっている可能性がある。

4.3 ヒトKCにおけるGPNMBの抗OS応答の作用機序の解析

ヒトKCのGPNMB発現低下がVL発症や病態維持にどう関わっているのか、あるいはGPNMBがKCでどのような生理的役割を担っているのかについて調べるため、抗OSシステムに関わる遺伝子やタンパク質発現の動態を詳細に調べた。KCのGPNMBをKDするとOS感受性が増大し、タンパク質合成・増殖・生存を含む基本的な細胞プロセスに関与するシグナル伝達経路、PI3K/AKTの活性化が抑制される。一方で、細胞の生死に関わるp38、ERKのリン酸化を促進した。また、AKT活性化抑制には、PI3K経路以外の複数の経路が関与しており、GPNMBはOS感受性亢進によりむしろ発癌リスクを低下させている可能性があった。今後、健常皮膚の基底層KCで発現しているGPNMBの生理的役割を明らかにするために、KCの分化に及ぼす影響や発がんリスクへの影響についても今後詳細に検討する。



【図4】 GPNMB-KDでAKTのリン酸化が抑制された
(N=3, *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001 (Tukey's test))

課題 2)

4-4 . 酸化ストレス抵抗性分子の遺伝子改変制御により VL 発症リスク物質を安定評価できる細胞株の作出と高汎用性細胞評価系の確立

我々はOS抵抗性分子の遺伝子改変制御によりVL発症リスク物質を安定評価できる細胞株を得るために、メラノーマ細胞 (MM) のNRF2をKOした細胞を作製した。意外なことに、正常細胞であるMC と異なりMMのNRF2をKOしてもRDやH₂O₂に対する細胞障害性には差がなく、NFR2とは独立したOSに対する細胞防御系の存在が疑われた。したがって、*NRF2*遺伝子をKOしたMMは化学白斑リスク物質のスクリーニングには不向きであることが判明した。

4-1の結果を受けて、このNRF2-KOヒトMM株においてsiRNAによるGPNMBのKDを行うとRDや過酸化水素の細胞障害性が増し、培地へのrGPNMBの添加により細胞障害性が軽減された。この結果はGPNMBが抗OSタンパクであるという先の結果を支持する。

MMを用いた評価系の確立は難しいことが判明したため、hTERT導入不死化MCを用いたVL発症リスク物質評価系について検討を行った。hTERT導入不死化MCについてRDの細胞傷害性を評価し、MCで見られたようなTYR依存性やNRF2活性化による細胞障害性の低下などを検討した。結果、RDおよび過酸化水素に対する感受性はNRF2、GPNMBのKDでは変化せず、また細胞障害性のTYR依存性も認められなかった。

このように、MMおよび不死化MCはOSに対して正常MCとは全く違う挙動を示したため、「白斑発症リスク物質を安定評価できる細胞株の作出と高汎用性細胞評価系の確立」に関しては断念した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 3件）

1. 著者名 井上紳太郎	4. 巻 14
2. 論文標題 尋常性白斑の病因論 - 最近の知見から - in 『白斑：病態の理解と最新治療』	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 美容皮膚医学BEAUTY	6. 最初と最後の頁 14-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 井上紳太郎	4. 巻 315
2. 論文標題 紫外線と色素異常	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MB Derma	6. 最初と最後の頁 10-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 佐野栄紀, 鈴木民夫, 井上紳太郎, 片山一朗.	4. 巻 131
2. 論文標題 白斑パラドックス：白斑にどうして紫外線発癌が少ないのか	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会誌	6. 最初と最後の頁 1859-1868
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Wang Q, Kuroda Y, Yang L, Lai S, Mizutani Y, Iddamalgotda A, Guo J, Yamamoto A, Murase D, Takahashi Y, Xiang L, Inoue S, Tsuruta D, Katayama I.	4. 巻 22
2. 論文標題 GPNMB extracellular fragment protects melanocytes from oxidative stress by inhibiting AKT phosphorylation independent of CD44.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 10843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910843	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 Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, Sumikawa Y, Yoshikawa M, Suzuki K, Yagami A, Masui Y, Ito A, Matsunaga K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Rhododendrol-induced leukoderma update II: Pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanism-based treatments in comparison with vitiligo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 969-978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15878.	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 Matsunaga K, Suzuki K, Ito A, Tanemura A, Abe Y, Suzuki T, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Yagami A, Masui Y, Inoue S, Ito S, Katayama I.	4. 巻 0
2. 論文標題 Rhododendrol induced leukoderma update I: Clinical findings and treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15835	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 Biswas KB, Takahashi A, Mizutani Y, Takayama S, Ishitsuka A, Yang L, Yang F, Iddamaligoda A, Katayama I, Inoue S.	4. 巻 10
2. 論文標題 GPNMB is expressed in human epidermal keratinocytes but disappears in the vitiligo lesional skin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61931-1.	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13件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 水谷有紀子
2. 発表標題 ヒト表皮ケラチノサイトにおけるGPNMB消失が白斑の発症と病態に及ぼす役割について
3. 学会等名 第5回日本白斑学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yang F, Yang L, Kuroda Y, Lai S, Takahashi Y, Sayo T, Namiki T, Nakajima K, Sano S, Inoue S, Tsuruta D, Katayama I.
2. 発表標題 Disorganization of basement membrane zone architecture for impaired melanocyte inhabitation in vitiligo.
3. 学会等名 The 1st International Societies for Investigative Dermatology Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 表皮細胞におけるGPNMBの役割 (3)
3. 学会等名 日本白斑学会口ドデノール誘発性 脱色素斑研究班第4回班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 白斑治療におけるJAK阻害剤適用の可能性.
3. 学会等名 第4回日本白斑学会学術大会共催 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 尋常性白斑の病態生理と発症メカニズムUpdate
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会教育講演8 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 表皮細胞におけるGPNMBの役割 (2)
3. 学会等名 日本白斑学会口ドデノール誘発性 脱色素斑研究班第3回班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 教育講演39 表皮細胞におけるGPNMBの役割
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 西田那月, 大津麻里子, 水谷有紀子, 井上紳太郎
2. 発表標題 GPNMBはNRF2非依存的にヒト表皮細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与している
3. 学会等名 第3回日本白斑学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 表皮細胞におけるGPNMBの役割
3. 学会等名 日本白斑学会口ドデノール誘発性脱色素斑研究班第2回班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田那月、井上紳太郎
2. 発表標題 白斑リスク物質による細胞障害性におけるGPNMBの役割について.
3. 学会等名 日本白斑学会口ドデノール誘発性脱色素斑研究班第1回班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上紳太郎
2. 発表標題 化学白斑の最新情報
3. 学会等名 第38回日本美容皮膚科学会総会教育講演（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inoue S.
2. 発表標題 Keratinocyte GPNMB is involved in the development of chemical vitiligo?
3. 学会等名 24th The International Pigment Cell Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishida N, Ishitsuka A, Nakayama H, Higashiyama S, Inoue S.
2. 発表標題 Compensatory action of anti-oxidative GPNMB in NRF2-deficient human melanoma clones to evaluate vitiligo-risk compounds.
3. 学会等名 24th The International Pigment Cell Conference（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	水谷 有紀子 (Mizutani Yukiko) (30396296)	岐阜薬科大学・薬学部・特任准教授 (23701)	

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