

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791066

研究課題名（和文） 表皮角化関連分子の系統的解析とヒト疾患への応用

研究課題名（英文） Systematic analysis of cornification related molecules and development of new treatments for skin disorders.

研究代表者 牧野 輝彦 (MAKINO TERUHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：90359711

研究成果の概要（和文）：

(1) 角化における細胞死の機序の解析： Profilaggrin の N 末領域 (proFLG-N) を正常表皮角化細胞に導入したところ細胞は TUNEL 染色で陽性となり、DNA 分解への関与が示唆された。さらに proFLG-N 内における機能ドメインを検索したところ Ca 結合ドメインをもつ A ドメインの関与が示された。

(2) 新規角化関連分子の機能の解析： Trichohyalin-like protein 1(TCHHL1)、Filaggrin family member 2 (FLG2) の構造および発現解析を行った。FLG2 の構造と皮膚における発現は profilaggrin と類似していた。TCHHL1 は膜貫通ドメインを有するなど他の S100 fused protein と異なる構造で、表皮基底層に発現していた。

研究成果の概要（英文）：

The Profilaggrin N-terminal (proFLG-N) consists of two distinct domains, an S100-like A-domain and B domain. After proFLG-N transfection at a growing phase of NHK, only proFLG-N expressing cells exhibited DNA degradation. Therefore, A-domain in proFLG-N is responsible for DNA degradation. These results indicate that proFLG-N play an important role in the keratinocyte terminal differentiation, especially in the denucleation process. On the other hand, we identified novel S100 fused-type proteins, filaggrin-2 (FLG2) and trichohyalin-like protein 1(TCHHL1). The structural features and expression profile of FLG2 were similar to those of profilaggrin. The deduced amino acid sequence of TCHHL1 contains one trans-membrane domain. The TCHHL1 protein was expressed in the basal layer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

皮膚組織構築の分子機構の解明は、悪性腫瘍、表皮分化異常症、脱毛症などの皮膚疾患を分子レベルで理解し、その治療法を開発するために必要不可欠なものである。皮膚の終末分化である角化は生物学的に細胞死のひとつであり、皮膚組織構築のなかで重要な位置を占める。この過程には *loricrin* や *Profilaggrin*、*Transglutaminase 1* など多くの分子が協動的に関与していることが知られている。角化の機序の解明は「如何にして細胞死が誘導されるのか」という非常に興味深い現象の解明にほかならず、これまで多くの研究成果が報告されている。一方、臨床医学的な側面では角化関連遺伝子の変異が遺伝性疾患の原因として次々に同定されている。最近では *Profilaggrin* の変異が尋常性魚鱗癬の原因 (Smith FJ et al, *Nat Genet*, 2006) であることが解明され、さらにこの変異がアトピー性皮膚炎患者でもみられ現在注目されている (palmer CN et al, *Nat Genet*, 2006)。このように近年角化に関する多くの興味深い知見が得られ、長足の進歩を遂げている。しかしその一方で、これらの角化関連分子の制御機構、特に最終段階である細胞死の誘導に関しては未だ不明のままである。また原因遺伝子が同定された遺伝性疾患においても、病態形成のプロセスに関しては十分に解明されているとはいえない。

2. 研究の目的

以上のような問題点解決するためには、角化に関する系統的な解析が必要である。我々は、

(1) 角化における細胞死の機序の解析と (2) 新規角化関連分子の機能の解析の 2 つのアプローチにより、角化のメカニズムを解明し、各種疾患の病態の解明・治療法を開発を試みる。

3. 研究の方法

前述した (1) のターゲットとして *profilaggrin* に着目した。*Profilaggrin* は角化の過程で反復配列の 1 単位である *filaggrin* に切断される際、EF hand domain を含む N 末領域が核内に移行することが報告されている (Ishida-Yamamoto A et al, *Laboratory Invest*, 1998, Pearton DJ et al, *J Invest Dermatol*, 2001)。しかし核内に移行した N 末領域の機能は未だ不明である。*Profilaggrin* の N 末領域も核内に移行した後、細胞死に関与するような重要な役割を有している可能性が示唆される。ここに焦点をあて解析を行う。

また、これまでにわれわれは独自に単離した新規分子である *Hornerin* の機能の解析を行ってきた。この *Hornerin* の研究の過程で染色体 1q21 上に未だ機能が解析されていない新規

の *fused-S100 gene* を 2 つ同定した。前述 (2) のターゲットとして *Hornerin* と新たに存在が同定された 2 つの分子 *Trichohyalin-like protein 1(TCHHL1)*、*Filaggrin family member 2 (FLG2)* の機能の解析を行う。

(1). 角化における細胞死の機序の解析：
Profilaggrin など *Fused S100* タンパク質の N 末領域を培養細胞に導入し細胞の増殖能などに及ぼす影響を検討する。細胞の増殖抑制や細胞死を誘導するタンパク質はマイクロアレイを用いてタンパク質導入後の遺伝子の発現パターンの変化を解析し、そのメカニズムを検討する。さらにこれらのタンパク質ががん細胞の増殖に及ぼす影響も検討する。

(2). 新規 *Fused S100* タンパク質の機能の解析：我々がこれまで解析してきた *Hornerin* に加え、*TCHHL1*、*FLG2* の 2 つの新規分子の構造と正常皮膚や疾患皮膚での発現を解析し、これらの分子の角化過程と皮膚疾患の病態形成への関与を検討する。さらに各分子を過剰発現する細胞を用いて 3 次元皮膚を作成し組織構築における影響も検討する。

4. 研究成果

(1). 角化における細胞死の機序の解析：
各種 *S100 fused protein* のアミノ酸配列を検索したところ、*Profilaggrin* の N 末領域 (*proFLG-N*) に核局在シグナル (NLS) が同定されたが、他の分子では NLS は見いだせなかった。まず、*proFLG-N* を培養正常表皮角化細胞 (NHK) に導入したところ発現した蛋白質は核に移行し、その細胞は TUNEL 染色で陽性となった。これは *proFLG-N* が細胞死、特に DNA の分解に直接関与していることを示唆した。次に *proFLG-N* の NLS に変異を入れ核移行を阻害したコンストラクトで同様の実験を行ったところ、誘導蛋白質は細胞質内のみ局在し、これらの細胞では細胞死は観察されなかった。細胞死に関与する領域を同定するため *proFLG-N* を Ca 結合ドメインをもつ A ドメインと NLS が存在する B ドメインにわけ同様の実験を行った。A ドメインには核移行を可能にするため NLS を C 末に付加した。その結果、A ドメインが DNA の分解に関与していた。また、この細胞死の誘導は NHK のみでなく HaCaT 細胞でも観察された。以上より皮膚の角化、特に核に消失において *proFLG-N* が強く関与していることが示唆され、この *proFLG-N* は乾癬やアトピー性皮膚炎など錯角化をきたす疾患における治療のターゲットにもなりうると考えられた。また細胞死を誘導する点から癌の治療の開発にも展開されることが期待される。現在核内移行後細胞死に至る過程を解析中である。

また同時に A ドメインをペプチド化し治療法の開発に向け検討中である。

(2)新規角化関連分子の機能の解析
ヒト染色体 1q21 上に新たに同定された Trichohyalin-like protein 1(TCHHL1)、Filaggrin family member 2 (FLG2)の構造および発現を中心に機能解析を行った。FLG2 は多くの反復配列構造を有しており profilaggrin や hornerin と非常に類似した構造であった。FLG2 に対するポリクローナル抗体を作製し、正常皮膚、病的皮膚における発現を検討したところ、表皮顆粒層に局在し profilaggrin と非常に類似していた。また NHK では分化誘導に伴い発現し、この点でも profilaggrin と非常に類似していた。しかしアトピー性皮膚炎患者皮膚での profilaggrin と FLG2 の発現を定量的 PCR で調べたところ個々の患者で発現パターンに差があり機能的な差を有している可能性も示唆された。TCHHL1 も反復配列構造を有するものの、それぞれの相同性は低く、むしろ膜貫通ドメインや NLS を有するという他の S100 fused protein と全く異なる構造を示していた。TCHHL1 に対するポリクローナル抗体を作製しその発現を検討したところ、表皮基底層に強く発現していた。また NHK での局在の検討では核周囲に発現しており、ヌクレオポリンと共発現していたことから核膜に局在する可能性が示唆された。両分子とも現在機能の解析を継続している。

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)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Furuichi M, Makino T, Yamakoshi T, Matsui K, Shimizu T. Blaschkoid distribution of cylindromas in a germline CYLD mutation carrier. Br J Dermatol. 査読有, 2012 in press
- ② Makino T, Furuichi M, Asano Y, Shimizu T. Novel mutation of the KRT 10 gene in a Japanese patient with epidermolytic hyperkeratosis. J Dermatol. 査読有, 39:87-9. 2012
- ③ Asano Y, Makino T, Ishida W., Furuichi M., and Shimizu T.: Detection of epidermal transglutaminase but not tissue transglutaminase in Japanese patients with dermatitis herpetiformis. Br. J. Dermatol., 査読有 164:883-884, 2011.
- ④ Yoshihisa Y., Makino T., Matsunaga K., Honda A., Norisugi O., Abe R., Shimizu H., and Shimizu T. : Macrophage migration inhibitory factor is essential for eosinophil recruitment in allergen-induced skin inflammation. J. Invest. Dermatol., 査読有,131:925-931, 2011.
- ⑤ Norisugi O., Makino T., Hara H., Matsui K., and Shimizu T.: An evaluation of the skin atrophy associated with linear atrophoderma of Moulin by ultrasound imaging. J. Am. Acad. Dermatol., 査読有, 65:232-233, 2011.
- ⑥ Ueda C., Makino T., Asano Y., Watanabe H., Hanakawa H., and Shimizu T.: An ultrastructural examination in a blistering lesion of mycosis fungoides bullosa. Br. J. Dermatol., 査読有,165: 213-214, 2011.
- ⑦ Hara H., Makino T., Norisugi O., Asano Y., Furuichi M., and Shimizu T. : Detection of human papillomavirus type 33 and 56 in extragenital Bowen's disease involving the sole. Eur. J. Dermatol., 査読有,20:663-664, 2010.
- ⑧ Makino T., Hongo K., Ichida F., and Shimizu T. : Livedo racemosa presenting with congenital fibromuscular dysplasia. Br. J. Dermatol., 査読有,163:1362-1364, 2010.
- ⑨ Kanegane H., Nomura K., Abe A., Makino T., Ishizawa S., Shimizu T., Naoe T., and Miyawaki T. : Spontaneous regression of aleukemic leukemia cutis harboring a NPM/RARA fusion gene in an infant with cutaneous mastocytosis. Int. J. Hematol., 査読有,89: 86-90, 2009.
- ⑩ Yamaguchi M., Tahara Y., Makino T., Shimizu T., and Date A. : Comparison of cathepsin L activity in cheek and forearm stratum corneum in young female adults. Skin Res. Technol., 査読有,15: 370-375, 2009.
- ⑪ Yamakoshi T., Makino T., Watanabe H., Furuichi M., Matsui K., and Shimizu T.: A case of giant vascular eccrine spiradenoma with unusual clinical features. Clin. Exp. Dermatol., 査読有,34: 250-251, 2009.
- ⑫ Matsui K., Makino T., Nakano H., Furuichi M., Sawamura D., and Shimizu T.: Squamous cell carcinoma arising from Darier's disease. Clin. Exp. Dermatol., 査読有,34:1015-1016, 2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Yamamoto M., Makino T., Motoyama A., Tsuboi R. and Hibino T.: Involvement of multiple pathways in keratinocyte DNA degradation. 71th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2011, 5, 4-7, Phoenix.
- ② Furuichi M., Makino T., Matsunaga K. and Shimizu T. : The usefulness of sebum check film for measuring the secretion of sebum. 22nd World Congress of Dermatology, 2011,5,24-5,29, Seoul.
- ③ Makino T., Ishida W., Furuichi M., and Shimizu T.: Detection of antibodies against epidermal transglutaminase but not tissue transglutaminase in Japanese patients with dermatitis herpetiformis. The 41st Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 2011, 9, 7-10, Barcelona.
- ④ 牧野輝彦, 古市 恵, 石田和加, 清水忠道. 日本人疱疹状皮膚炎における抗 transglutaminase (TG) 抗体の検討. 第 429 回日本皮膚科学会北陸地方会, 2011, 2, 21, 金沢.
- ⑤ 牧野輝彦: 第 32 回日本光医学・光生物学会学術奨励賞受賞「角化関連分子 Hornerin の紫外線による発現の誘導」2011, 7, 23. 大阪.
- ⑥ Makino T., Yamakoshi T., Furuichi M., Fuh NH., and Shimizu T.: Ultraviolet B irradiation induces the expression of hornein, a member of the S100 fused-type protein family in human skin. 70th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2010, 5, 5-8, Atlanta.
- ⑦ Furuichi M., Makino T., Nakano H., Sawamura D., and Shimizu T.: Genetic analysis of the ferrochelatase gene in a Japanese patient with erythropoietic protoporphyria. The First Eastern Asia Dermatology Congress, 2010, 9, 30-10, 3, Fukuoka.
- ⑧ Makino T., Furuichi M., Yamakoshi T., Yoshihisa Y., and Shimizu T.: The expression of terminal differentiation proteins and cytokeratins in epidermolitic

ichtyosis. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010, 12, 4-5, Wakayama.

- ⑨ Makino T., Yamakoshi T., Inoue S., Noguchi M., Huh NH., and Shimizu T.: Expression profile of a profilaggrin-like protein, hornerin, in oral mucosa. The Society for Investigative Dermatology 69th Annual Meeting, 2009, 6-9, Montreal, Canada.
- ⑩ Makino T., Hongo K., Ichida F., and Shimizu T. : A case of fibromuscular dysplasia with livedo racemosa. The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists. 2009, 7, 10-12, Sapporo.
- ⑪ Makino T., Yamakoshi T., Inoue S., Noguchi M., and Shimizu T. : Expression analysis of hornerin, a member of the S100 fused-type protein family in oral mucosa with the disorders. The 39th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, 2009, 9, 9-12, Budapest.
- ⑫ Makino T., Yamakoshi T., and Shimizu T. : Comparative analysis of the expression of the S100 fused-type proteins in human skin disorders. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2009, 12, 4-5, Fukuoka.

[図書] (計 5 件)

- ① 牧野輝彦: アトピー性皮膚炎をどのように診るか. Clinical Dermatology, 13 (2) : 7-8, 2011.
- ② 牧野輝彦: 鶏眼・胼胝 corn and callosity. 「今日の治療指針 2011—私はこう治療している—」 1062, 医学書院, 2011.
- ③ 牧野輝彦, 清水忠道: 脂漏性角化症. 「皮膚科診療カラーアトラス大系『腫瘍』メラノサイト系・ケラチノサイト系・非上皮性」 36-37, 講談社, 2010.
- ④ 牧野輝彦, 清水忠道: 天疱瘡に対する IVIG 療法. 「WHAT'S NEW in 臨床皮膚科学・治療」 202-203, メディカルレビュー社, 東京, 2010.
- ⑤ 牧野輝彦, 清水忠道: 水疱性類天疱瘡. 「Challenge QUIZ 貴方も名医」 Clinic Magazine 482, 35 : 72-73, 2009.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 輝彦 (MAKINO TERUHIKO)
富山大学・大学院医学薬学研究部
(医学)・准教授
研究者番号:90359711

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: