

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20918

研究課題名（和文）皮膚バリアを担う角質細胞脂質エンベロープの形成機序の解明と魚鱗癬治療への展望

研究課題名（英文）Elucidation of the formation mechanism of the corneocyte lipid envelope that plays a role in the skin barrier and prospects for the treatment of ichthyosis

研究代表者

伊藤 靖敏 (Ito, Yasutoshi)

名古屋大学・医学系研究科・客員研究者

研究者番号：00962797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：ABCA12変異を持つharlequin ichthyosis（以下 HI）患者、およびAbca12機能喪失変異によるHIモデルマウスにおけるCLEの形成状態を透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に評価することができた。

HIモデルマウスの表皮を用いた脂質解析を行なったが、エポキシケトンの発現は低下しており、CLE形成に酸化が必要であるという報告とは異なる結果であった。また、ABCA12変異を持つHI患者、および健常者の皮膚角層のテープストリッピングによる脂質解析を行ったが、健常者と比較して糖化したセラミドの上昇はなかった。形態学的にCLEは評価できたが、その分子メカニズムの解明には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIは現時点で根治的な治療法のない難病であり、新生児期の死亡例も稀ではない。ABCA12遺伝子の変異で発症するが、バリア機能障害の詳しい機序については分かっていなかった。今回、電子顕微鏡でCLEを形態学的に評価した。また、酸化されてCLEが形成されると考えられたが酸化物質は少なく異なる結果となった。また、糖化したセラミドが蓄積すると考えられたが、健常者との差は認めなかったことから、別経路で代謝されている可能性が考えられた。分子メカニズムの解明には至っていないが、機序を明らかにすることで、治療へと発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We were able to morphologically evaluate CLE formation in harlequin ichthyosis (HI) patients with ABCA12 mutations and in HI model mice with Abca12 loss-of-function mutations using transmission electron microscopy. Lipid analysis using epidermis from HI model mice revealed reduced expression of epoxyketones, which is contrary to reports that oxidation is required for CLE formation. We also performed lipid analysis by tape stripping of HI patients with ABCA12 mutations and healthy skin stratum corneum, and found no elevation of glycosylated ceramides compared to healthy subjects. Although CLE could be evaluated morphologically, the molecular mechanism has not been elucidated.

研究分野：遺伝性角化症

キーワード：脂質エンベロープ 魚鱗癬 皮膚バリア ABCA12 SDR9C7

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学技術の進歩により、難治性遺伝性皮膚疾患の病因の解明が急速になされつつある。魚鱗癬、魚鱗癬症候群についても多くの病因遺伝子・病因分子が明らかになり、中でも最も重篤な先天性魚鱗癬である harlequin ichthyosis (以下 HI) は、*ABCA12* 変異による常染色体劣性遺伝性疾患であることが明らかになっている。

しかしながら、HI は現時点で根治的な治療法のない難病であり、新生児期の死亡例も稀ではない。HI では皮膚の発達は胎生期に既に障害されており、出生時には、全身の皮膚表皮が非常に厚い板状の角質物質に覆われ、著名な眼瞼外反、口唇突出開口、耳介の変形をともなっている。

HI の原因遺伝子である *ABCA12* は *ABCA12* (ATP-binding cassette transporter A12) タンパクをコードしている。*ABCA12* タンパクは脂質輸送機能を持ち、表皮顆粒層の層板顆粒の膜に存在し、層板顆粒内へ脂質を運び、貯蔵する働きをしている。*ABCA12* タンパクの機能障害により層板顆粒による角層細胞間への脂質分泌が障害され、角層間で脂質層が十分に作られないことで魚鱗癬の発病へとつながっている。

角層細胞では本来細胞膜があった部位にアシルセラミドの層である corneocyte lipid envelope (以下 CLE) があり、角層細胞間脂質とタンパク質からなる cornified cell envelope (以下 CCE) を繋ぐ重要な役割を果たしている。CLE を形成するアシルセラミドは、表皮細胞内で合成され、細胞辺縁に運ばれ CLE を形成するが、この形成過程には、2つの仮説がある。一つは、層板顆粒の限界膜内のアシルセラミドが、層板顆粒が細胞膜と fuse することにより、CLE になるという説、もうひとつは、層板顆粒から角層細胞間に分泌されたアシルセラミドが、CLE を形成するという説である。後者であれば、*ABCA12* 機能喪失患者で CLE の形成が障害されるが、前者であれば、脂質輸送機能のみの障害では、CLE は形成されバリア機能はある程度保たれることになる。この CLE を形成するアシルセラミドの由来と *ABCA12* 機能喪失患者での CLE の形成障害の有無が本研究課題の核心をなす「問い」である。

2. 研究の目的

Abca12 機能喪失変異による HI モデルマウスにおける CLE の形態学的分析と機能解析を行い、CLE の形成が障害されているのか否かを解明する。さらに、*ABCA12* 変異をもつ HI 患者および健常者皮膚のテープストリッピングを用いた角層脂質の解析を行い、HI 患者では CLE と角層細胞間脂質形成が障害されるか否かを明らかにし、*ABCA12* の CLE 形成における役割を解明するのが目的である。

3. 研究の方法

【1. HI モデルマウスと HI 患者での CLE の形成状態を形態学的に解析する】

透過型電子顕微鏡を用いて CLE の形成を形態学的に評価する。組織検体にあらかじめ Pyridine 処理を行うことで、透過電顕の観察時に、CLE を可視化することができる。また、申請者のもつ他の魚鱗癬モデルマウス (*Abhd5* ノックアウトマウス、*Sdr9c7* ノックアウトマウス) を用いて比較を行う。

【2. モデルマウスでの表皮脂質を分析する】

上記【1】で採取した組織をもちいて、liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 分析を行い、角層の多様な機能脂質の発現量、組成の差を検討し、CLE の形成状況を解析する。

【3. ヒトでの表皮脂質を分析する】

ABCA12 機能喪失をもつ患者と健常者に皮表面のテープストリッピングを行い、角層を採取する。採取した角層をメタノールに浸して超音波処理を行い、遊離セラミドを除いて角質のみにする。その後アルカリ処理によりオメガ水酸化セラミドとして遊離させ検出する。検出した脂質発現の差を検討し、CLE の形成状況を解析する。

【4. HI モデルマウスでの遺伝子発現プロファイルを分析する】

Abca12 機能喪失モデルマウスと野生型マウスについて、胎生 18.5 日で帝王切開を行い胎児マウスの皮膚組織を採取する。採取した組織から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、脂質関連の遺伝子発現の差を検討する。

【5. 顆粒層から角質層へ角化する過程において CLE が形成されていく機序を考察する】

上記【1】、【2】、【3】の結果から、*ABCA12* 機能喪失によって、CLE の形成が障害されるか、否かを明らかにする。*ABCA12* 機能喪失によって、CLE の形成が障害されなければ、*ABCA12* 遺伝子変異による脂質輸送機能不全により、角層細胞間脂質層が十分形成されない状態でも、層板顆粒の限界膜内に存在するアシルセラミドから CLE が形成されることで、角層のバリア機能がある程度保たれていることを立証できる。

4. 研究成果

【1. HI モデルマウスと HI 患者での CLE の形成状態を形態学的に解析した】

透過型電子顕微鏡を用いて HI モデルマウスと HI 患者の表皮を観察し、形態学的に評価した。ともに CLE を観察することができ形態学的に評価できた。

【2. モデルマウスでの表皮脂質を分析した】

Vanderbilt University の Alan Brash 博士の協力を得て、マウスの表皮脂質の分析を行なった。HI モデルマウスではエポキシケトンが減少していた。CLE の形成には酸化が必要であるが矛盾する結果となった。採取した検体重量に差があることが考えられ、検体処理方法を見直し、今後再解析を行う予定である。

【3. ヒトでの表皮脂質を分析した】

北海道大学大学院薬学研究院生化学教室の大野祐介博士の協力を得て、ヒトの表皮脂質の分析を行なった。*Abca12* タンパク質の異常があれば、層板顆粒内に糖化したセラミドが輸送されなくなり、細胞内に蓄積され、糖化したセラミドは健常者と比較して上昇することを想定していた。しかし、結果は上昇していなかった。このことから、別の代替経路が存在し、輸送が行われている可能性が考えられた。また、サンプル数の不足の可能性も考えられた。再度、サンプル数を増やし、今後再解析を行う予定である。

【4. HI モデルマウスでの遺伝子発現プロファイルを分析した】

公益財団法人東京都医学総合研究所細胞膜研究室の平林哲也博士の協力を得て、マイクロアレイ解析を行なった。アシルセラミド生合成関連の遺伝子発現が少なく、炎症性サイトカインの発現が多くなっていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------