

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月4日現在

機関番号：37104
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791298
 研究課題名（和文）表皮細胞内カルシウム濃度の調節：3種のカルシウムポンプの機能協調と角化への関与
 研究課題名（英文）Regulation of intracellular Ca²⁺ concentration in epidermal keratinocytes: Study for coordination in three calcium pumps and their roles for epidermal differentiation
 研究代表者
 濱田 尚宏（HAMADA TAKAHIRO）
 久留米大学・医学部・講師
 研究者番号：40320204

研究成果の概要（和文）：

本研究は、細胞内カルシウムポンプ異常で生じる Hailey-Hailey 病（HHD）と Darier 病（DD）の培養表皮細胞を用いて、カルシウムポンプの表皮細胞内 Ca²⁺濃度の恒常性維持と角化などに関する役割を明らかにすることを目的とした。HHD では定常状態における細胞内 Ca²⁺濃度は正常と比べ変化はなかったが、ATP 刺激に対する反応性は低下していた。また、calmodulin-like 5 や loricrin などのカルシウム結合蛋白質や角化関連蛋白質の発現が上昇していた。

研究成果の概要（英文）：

Hailey-Hailey disease (HHD) and Darier disease (DD) are caused by mutations in the genes encoding the intracellular calcium pumps. In this study, we investigated the roles for intracellular Ca²⁺ homeostasis and epidermal differentiation in these calcium pumps, using cultured epidermal keratinocytes (KCs) derived from patients with HHD and DD. HHD KCs revealed the altered response of Ca²⁺ release from intracellular stores to ATP stimulation, but not by constitutive elevation of cytoplasmic Ca²⁺. The expressions of several calcium-binding proteins and epidermal differentiation-mediated proteins (e.g. calmodulin-like 5 and loricrin) were increased in HHD KCs compared to normal control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：①遺伝学 ②遺伝子 ③ゲノム ④単一遺伝子病 ⑤遺伝性皮膚疾患
 ⑥カルシウムポンプ ⑦皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

HHD と DD は常染色体優性遺伝性角化症である。表皮細胞の接着障害や異常角化細胞の出現を病理組織学的特徴とし、それぞれの病因は SPCA1 と SERCA2 と呼ばれるカルシウムポンプ (Ca^{2+} -ATPase) であることが明らかにされている。研究代表者は HHD の症例収集を積極的に行い、SPCA1 の遺伝的な異常について報告を行ってきた (Hamada et al. J Dermatol Sci 2008)。本疾患は非常に稀であるが、研究代表者が今日までに遺伝子変異を新規同定した症例は 20 以上となり、病変部・非病変部皮膚から抽出した RNA や凍結標本の保存、患者表皮細胞の培養などを行い、その病態解明に関する研究の準備を重ねていた。

正常な表皮細胞の角化には細胞内外の Ca^{2+} 濃度が重要である。角化の過程には細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であると考えられている。一方、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節にはカルシウムポンプの働きが大きく寄与し、小胞体 (SERCA)、形質膜 (PMCA)、ゴルジ装置 (SPCA, SERCA) に存在する 3 種のカルシウムポンプが明らかにされていた。これらは互いに協調しながら、細胞外の環境変化に対応しつつ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を保つと考えられる。また、ひとつのポンプの機能が低下すると他が代償的に働き、細胞内 Ca^{2+} 濃度を保とうとすることが推察される。HHD や DD は特定のカルシウムポンプの変異によって生じる単一遺伝子病であるが、発症時期が青壮年期以降であることや特異的な皮膚症状の分布が認められることなどには代償的なカルシウムポンプの機能の関与が考えられた。しかし、HHD や DD の患者から得られた培養表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の異常を示す報告は散見されるが、実験の条件設定やサンプルの採取部位などにより、結果は様々で未だ一定の見解には至っていなかった。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化と表皮の分化異常との関連についても明らかにされていなかった。

本研究計画では、3 種のカルシウムポンプが表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持にそれぞれの程度寄与しているのかを調べ、角化への関連性を明らかにするための基礎研究を行うこととした。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの成果をもと

に、本研究では 3 種のカルシウムポンプを様々な組み合わせで実験的にノックダウンし、それぞれのポンプが表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持にそれぞれの程度寄与しているのかを調べることにした。さらに角化との関連性を明らかにするための基礎研究を計画した。研究期間内には以下のことを明らかにすることを目的とした。

- [1] HHD と DD の培養表皮細胞における 3 種のカルシウムポンプ (SERCA、PMCA、SPCA) の発現を調べ、表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する。
- [2] HHD の培養表皮細胞では SERCA と PMCA をそれぞれ別にノックダウンし、[1]と同様に細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する。
- [3] DD においては SPCA と PMCA をそれぞれ別にノックダウンし、同様に細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定する。
- [4] [1]から[3]の全ての培養細胞をもとに三次元培養皮膚を作製する。それらの形態を観察し、角化や表皮細胞接着に関わる分子の発現を詳細に観察する。

このように本研究を通してカルシウムポンプの表皮における詳細な役割が判明すれば、アトピー性皮膚炎や乾癬などに代表されるありふれた皮膚疾患の病因の一部としてもカルシウムポンプが関与する可能性を考える必要が出てくる。また、本研究結果を基盤にこれらのカルシウムポンプの発現を調節する転写因子や薬剤を含む物質が将来的に同定されれば、様々な皮膚疾患の治療応用へ発展することが期待された。

3. 研究の方法

[1] HHD の遺伝子変異解析

HHD の追加症例に対し、以下の方法で遺伝子変異を同定した。まず、PCR 法を用いて *ATP2C1* 遺伝子を断片化して増幅する。*ATP2C1* は 28 のエクソンを有しており、このように比較的大きなエクソンをもつ遺伝子について変異を簡便かつ安価に検出する方法として DGGE 法による検索を用い、変異の存在が疑われた検体については、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定し、遺伝子変異を検出した。

[2] HHD の培養表皮細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度異常の解析

この解析では遺伝的に特定のカルシウムポンプの異常を有する患者の培養表皮細胞において、小胞体・形質膜・ゴルジ装置に存在する他のカルシウムポンプの代償作用により細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性が維持されてい

るのか、それとも破綻しているのかを調べた。HHD の表皮培養細胞において SERCA、PMCA、SPCA をコードするそれぞれの遺伝子の発現をリアルタイム PCR で定量し、ウエスタンブロットでタンパク質の発現の変化を調べた。さらに、細胞内 Ca^{2+} を検出できる Fluo-8 試薬 (Cosmo Bio, Japan) を培養細胞に投与し、蛍光プレートリーダーを用いてカルシウム投与後経時的に濃度測定を行った。

[3] カルシウムポンプによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節と角化などとの関わり の 解明

HHD では表皮細胞の接着障害や異常角化細胞の出現が認められる。そこで、角化やカルシウム結合タンパク質、表皮細胞接着に関わる遺伝子群の発現を調べるために、患者表皮角化細胞から RNA を抽出して、リアルタイム PCR を用いて定量を行った。

[4] 表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持における各種カルシウムポンプの重要性の 解明

正常な角化では細胞外 Ca^{2+} 濃度の変化に伴い、小胞体・形質膜・ゴルジ装置に存在する 3 種のカルシウムポンプが協調して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持がなされている。これについて、それぞれのカルシウムポンプが機能的にどの程度寄与しているのかを明らかにすることを計画した。その予備実験として、RNAi 法を用いて HaCaT 細胞の SPCA1 をノックダウンした。次にこれらの細胞について [2]、[3] と同じ手法で細胞内 Ca^{2+} 濃度を経時的に測定し、角化やカルシウム結合タンパク質、表皮細胞接着に関わる遺伝子群の発現を調べた。

[5] 三次元培養皮膚におけるカルシウムポンプによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節と角化との関わり の 解明

3 種のカルシウムポンプが様々なパターンで機能低下する培養表皮細胞を用いて三次元培養皮膚を樹立する予備実験として、CELLnTEC 社のキットを用いて正常培養表皮細胞から三次元培養皮膚を作製することとした。

4. 研究成果

[1] HHD の遺伝子変異解析

本研究の基盤となる HHD を 30 家系収集し、29 種の *ATP2C21* 遺伝子 (SPCA1) 変異を新たに同定した。

[2] HHD の培養表皮細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度異常の解析

HHD 培養表皮細胞における 3 種のカルシウムポンプの発現は様々なパターンを呈したが、重症例では全ての発現低下を認めた。また、同細胞の定常状態における細胞内カルシウム濃度はコントロールと比べ変化はなかつ

たが、ATP 刺激に対する反応性は低下しており、特に重症例では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はみられなかった。

[3] カルシウムポンプによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節と角化などとの関わり の 解明

HHD 培養表皮細胞では、カルシウム結合タンパク質や角化関連タンパク質の発現が上昇し (calmodulin-like 5 \uparrow 、loricrin \uparrow など)、病態との関連性が示唆された。

[4] 表皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持における各種カルシウムポンプの重要性の 解明

HHD のモデル細胞として、HaCaT 細胞の SPCA1 ノックダウンを用いた実験を行った。これらの細胞では、カルシウム結合タンパク質や角化関連タンパク質の発現変動 (S100A7 \uparrow 、AQP3 \downarrow 、TGM2 \uparrow など) が認められた。

本研究のもうひとつの基盤となる DD については、新規症例を収集し *ATP2A2* 遺伝子変異は検索できたが、培養表皮細胞を得ることができなかった。今後は、今回の研究で得られた知見をもとに HHD・DD の病態形成機序を詳細な生化学的・分子生物学的検討でさらに明らかにする予定である。この研究は新しいカルシウムポンプ遺伝子異常による疾患研究のプロトタイプとなると考えている。

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 9 件) (全て査読付き)

(1) Ueo D, Hamada T, Hashimoto T, Hatano Y, Okamoto O, Fujiwara S. A d Late-onset Darier's disease due to a novel missense mutation in the *ATP2A2* gene: ifferent missense mutation affecting the same codon has been previously reported in acrokeratosis verruciformis. *J Dermatol* 40:280-281, 2013 Apr 10. 1111/1346-8138. 12058.

(2) Numata S, Teye K, Tsuruta D, Sogame R, Ishii N, Koga H, Natsuaki Y, Tsuchisaka A, Hamada T, Karashima T, Nakama T, Furumura M, Ohata C, Kawakami T, Schepens I, Borradori L, Hashimoto T. Anti-alpha-2-macroglobulin-like-1 Autoantibodies are Detected Frequently and may be Pathogenic in Paraneoplastic Pemphigus. *J Invest Dermatol* 2013 Feb 13. 10.1038/jid.2013.65.

(3) Hamada T, Tsuruta D, Fukuda S, Ishii N, Teye K, Numata S, Dainichi T, Karashima T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. How do keratinizing disorders and blistering disorders overlap? *Exp Dermatol* 22:83-87, 2013 Feb10. 1111/exd.12021

(4) Ohyama B, Nishifuji K, Chan PT, Kawaguchi A, Yamashita T, Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Koga H, Tsuruta D, Amagai M, Hashimoto T. Epitope spreading is rarely found in pemphigus vulgaris by large-scale longitudinal study using desmoglein 2-based swapped molecules. *J Invest Dermatol* 2012 Apr 132:1158-1168, 10.1038/jid.2011.448.

(5) Karashima T, Tsuruta D, Hamada T, Ishii N, Ono F, Hashikawa K, Ohyama B, Natsuaki Y, Fukuda S, Koga H, Sogame R, Nakama T, Dainichi T, Hashimoto T. Interaction of plectin and intermediate filaments. *J Dermatol Sci* 66:44-50, 2012 Apr. 10.1016/j.jdermsci.2012.01.008

(6) Fukuda S, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Sakai K, Akiyama M, Shimizu H, Masuda K, Izu K, Teye K, Tsuruta D, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Hashimoto T. Novel adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette, subfamily A, member 12 (ABCA12) mutations associated with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* 166(1):218-221, 2012 Jan 10.1111/j.1365-2133.2011.10516.x

(7) Tsuruta D, Sowa J, Tateishi C, Obase Y, Tsubura A, Fukumoto T, Ishii M, Kobayashi H, Sakaguchi S, Hashimoto T, Hamada T. Atypical epidermolysis bullosa simplex with a missense keratin 14 mutation p.Arg125Cys. *J Dermatol* 38(12):1177-1179, 2011. Dec 10.1111/j.1346-8138.2011.01302.x.

(8) Koga H, Hamada T, Ishii N, Fukuda S, Sakaguchi S, Nakano H, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto T. Exon 87 skipping of the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol* 38(5):489-492, 2011. May 10.1111/j.1346-8138.2010.01008.x.

(9) Kaneko S, Hamada T, Kawano Y, Hashimoto T, Morita E. Missense mutation at the helix

termination region in the 2B domain of keratin 14 in a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex, generalized other. *Int J Dermatol* 50(4):436-438, 2011. Apr 10.1111/j.1365-4632.2010.04702.x.

[学会発表] (計3件)

(1) Matsuda M, Hamada T, Ishii N, Sakaguchi S, Murai Y, Ohata C, Furumura M, Tanaka E, Hashimoto T. Studies of cultured Hailey-Hailey disease keratinocytes revealed pathogenic role of the mutations and novel mechanism in Ca²⁺ homeostasis. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology December 7-9, 2012. Okinawa.

(2) 松田光弘、濱田尚宏、坂口幸子、石井文人、辛島正志、古村南夫、橋本 隆：Hailey-Hailey病30家系におけるATP2C1遺伝子変異と細胞内カルシウム動態や角化に関する遺伝子群の発現について。第19回分子皮膚科学フォーラム平成24年4月14日、青森市。

(3) Hamada T, Ogawa M, Ishii N, Ono F, Matsuda M, Sakaguchi S, Karashima T, Nakama T, Dainichi T, Tsuruta D, Yasumoto S, Hashimoto T. Impaired innate immunity to HSV in Hailey-Hailey disease is caused by TLR9 defect through abnormal cytoplasmic Ca²⁺ signalling. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 9-11, 2011. Kyoto.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田尚宏 (HAMADA TAKAHIRO)
久留米大学・医学部・講師

研究者番号：40320204

(2) 研究分担者

該当者なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当者なし

研究者番号：