

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461657

研究課題名(和文)炎症性皮膚疾患ケラチノサイトにおけるエピゲノミクス異常の動的変化の解析

研究課題名(英文)Dynamic epigenetic change of keratinocytes in inflammatory skin diseases

研究代表者

小川 靖 (Yasushi, Ogawa)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10567754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、乾癬の皮膚病変を誘導可能なモデルマウスを用いて、炎症性皮膚疾患におけるケラチノサイトのエピジェネティクス変化の病変形成における意義を検討する事を目指した。Imiquimod塗布乾癬皮膚病変モデルマウスにおいてクロマチン修飾に影響を及ぼす様々な薬剤をモデルマウス系に投与し症状の変化を検討する、リバースケミカルゲノミクス的な方法論を取る事とした。病態の形成を促進するヒストン脱メチル化酵素阻害剤と抑制するリン酸化酵素阻害剤を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the roles of epigenetic changes of keratinocytes in the formation of inflammatory skin lesion of psoriasis. A reverse chemical genomics-approach was adopted. Topical imiquimod-induced skin inflammation was used as a mouse model of psoriasis, and various chemical inhibitors of chromatin modifying enzymes are applied to investigate their effect on the formation of the skin lesion. As a result we newly identified a histone demethylase inhibitor that promote the formation of the lesion, and a kinase inhibitor that suppress the skin lesion.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 ケラチノサイト エピジェネティクス 乾癬

1. 研究開始当初の背景

乾癬は外来診療で遭遇することの多い、臨床的に重要な皮膚疾患である。多くの場合慢性の経過を辿り、一度形成された病変は各種外用剤を用いた治療に抵抗し、完全に消失しない事がしばしばみられる。

近年、様々な疾患で、クロマチン修飾などのエピジェネティクスの異常が疾患形成に重要な役割を果たすことが判明している。乾癬についても、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤による治療効果が報告されており、病態の形成に関与していると考えられる。

乾癬ケラチノサイト (KC) の細胞内シグナルおよび遺伝子発現の変化については、これまでも研究がなされているが、その両者を結び、病態成立に重要な役割を果たすと考えられるエピジェネティクスの変化については、未だ殆ど解明されていない。

研究代表者は、これまでの研究を通じ、KC のエピジェネティクスの記憶が、炎症性サイトカインなどの転写活性化を持続させ、乾癬病変を係留させるといふ、治療抵抗性の発生メカニズムを想定するに至った。

乾癬表皮ケラチノサイトは炎症性サイトカインやケモカインを産生し、病変の形成に重要な役割を持つ。最近になり、乾癬患者の皮膚病変では、発現が亢進し遺伝子上流の CpG アイランドで、ゲノム DNA のメチル化の変化が起きている事が報告された。このような KC の炎症惹起性の転写環境変化の一因に、エピジェネティクス環境の変化があると研究代表者は考えている。

研究代表者らは先に、転写活性化因子 LEDGF が乾癬 KC において特異的に核内局在を示すこと、LEDGF 過剰発現 KC 株は実際の乾癬表皮と類似した表現型示すことを報告している。LEDGF はヒストン H3K36me3 の修飾モチーフを特異的に認識し、さらにクロマチン修飾複合体である MLL をリクルートすると考えられる。さらに、この MLL1 は他のヒストンアセチル化酵素やクロマチンリモデリング因子と結合して広範なエピジェネティクス変化をもたらすことが示唆されている。

2. 研究の目的

研究代表者らは実際に LEDGF を過剰発現する乾癬モデル KC において、IL6 プロモーターの H3K4me2 の修飾が亢進する事を示し、LEDGF により媒介されるエピジェネティクス異常が KC の乾癬様変化をもたらしている可能性を示した。

これまでの研究は、LEDGF を過剰発現した比較的人工的なモデルを対象に研究したが、本研究では、皮膚病変を誘導可能な、より一般化した疾患モデルマウスを用いて、炎症性皮膚疾患における KC のエピジェネティクス変化の病変形成における意義を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では最初に、乾癬モデルマウスとして、既に報告されている、imiquimod 塗布モデル、もしくは IL-23 注射モデルを作成し、実験系を確立することとした。また、アトピー性皮膚炎モデルマウスとして、NC/Nga マウス、flaky tail マウス、を導入することとした。

これらモデルマウスから適切な系を検討し、それぞれの病変部からの遺伝子発現変化、KC のエピジェネティクス変化の解析系としての有用性を確立する事を当初検討していたが、コスト面の制約等から方針を変更し、ヒストン修飾に影響を及ぼす様々な薬剤をモデルマウス系に投与し、症状の変化を検討するリバースケミカルゲノミクス的な方法論を取る事とした。この為、モデル生物の表現型に影響を及ぼす薬剤を同定することを優先し、その結果を得て遺伝子発現とエピジェネティクス的な変化を検証する方針とした。

4. 研究成果

乾癬モデルマウスとして、imiquimod (IMQ) モデルマウスを作成した。BALB/c CrSlc マウスを脱毛クリーム Epilat で脱毛し、市販のベセルナクリームを 50mg 連日塗布する系が再現性よく病変を形成した。また、IL-23 を局注するモデルと比較し、コストの面から IMQ 塗布モデルを採用する事とした。

また、アトピー性皮膚炎モデルとして、NC/Nga モデルにダニ抗原含有軟膏を塗布する事により病変を惹起するモデル系を作成した。コストと実験結果の安定性の面から、IMQ による乾癬モデルを優先して実験を進める方針とした。

ヒストンメチル化もしくは脱メチル化酵素、ヒストンアセチル化もしくは脱アセチル化 DNA 酵素、ヒストンリン酸化酵素の各種阻害剤である、トラニルシプロミン・ヘミサルフェート (TCP)、パルプロ酸、フェニルブチレート、C646、ガルシノール、HPA、HDAC 阻害剤 XIX、GSK-J4、BIX-01294、CTPB、EX-527、harmine hydrochloride について、腹腔内投与もしくは皮下注射を行い、IMQ モデル系に対する効果を検討した。

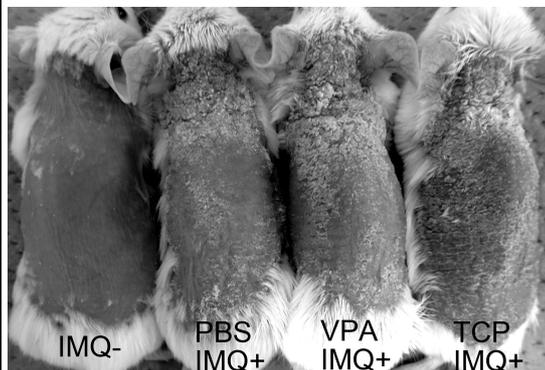


図 1

病変の評価には乾癬の評価スケールである PASI をマウス用に改変したスコアリング法と、組織病理の検討を行った。検討した薬剤の中で、ヒストン脱メチル化酵素 (LSD1) 阻害剤である TCP について、腹腔内投与時に 7 日目 (IMQ 塗布 6 日目) に乾癬病変の有意な増悪をみとめた。(図 1、2)

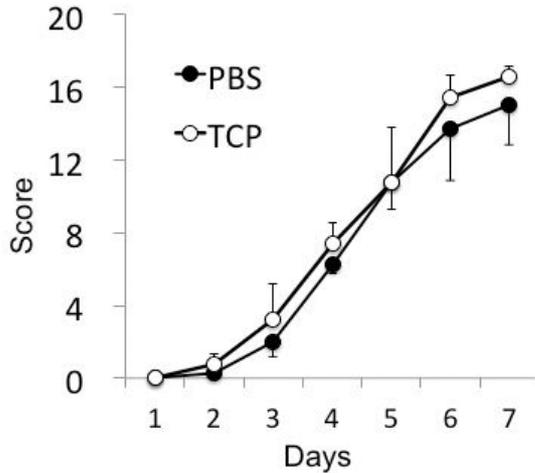


図 2

この結果は先に我々が見いだした、H3K36me3 のリーダー分子である LEDGF の活性の増加により乾癬病変するという知見に関連し、皮膚 KC での DNA メチル化が乾癬病変に関与する可能性が示唆された。

TCP の投与下では、乾癬モデル皮膚は臨床的に増悪した像を示すとともに、定量 PCR において、炎症性ケラチノサイトのマーカーである Krt16 の発言するとともに、CCL20 の発言が上昇する傾向が見られた。(図 3)

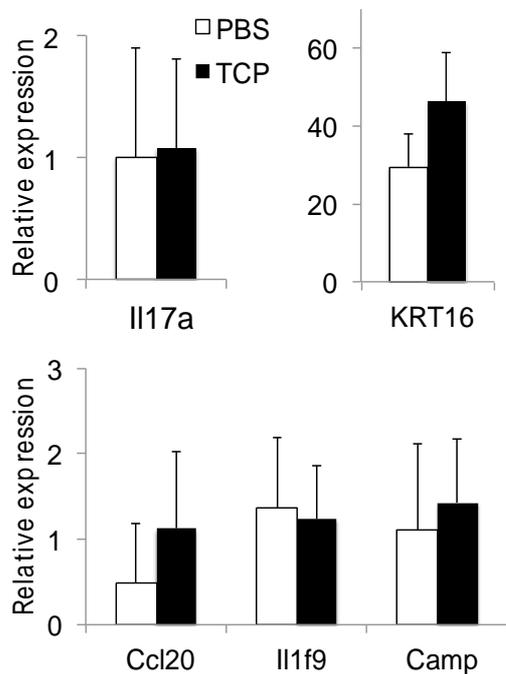
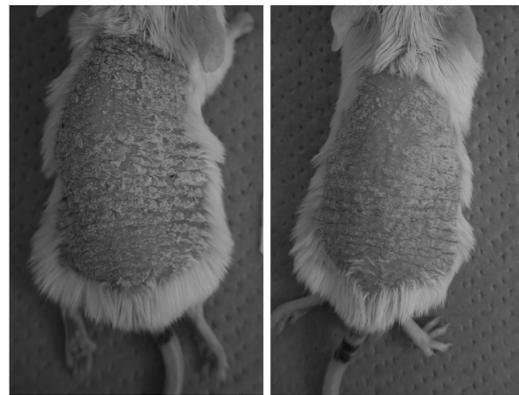


図 3

出来るだけ良い条件下でクロマチン免疫沈降を行う為、他の薬剤を含めて更なる条件検討を行ったが、結果に大きな変化を得られなかった。

これらの病変について、クロマチン免疫沈降を試みたが、技術的な理由により誤差が大きく、有意な結果を得ることは出来なかった。

上記の結果に加えて、ヒストンのリン酸化に影響し得る薬剤である harmine hydrochloride を IMQ 塗布乾癬モデルマウスに腹腔内投与した際に、僅かではあるが、用量依存性に皮膚病変の改善効果を得た。(図 4、5)



Vehicle alone (PBS) Beselna Cream 50 mg
Harmine HCl 2.5 mg Beselna Cream 50 mg

図 4

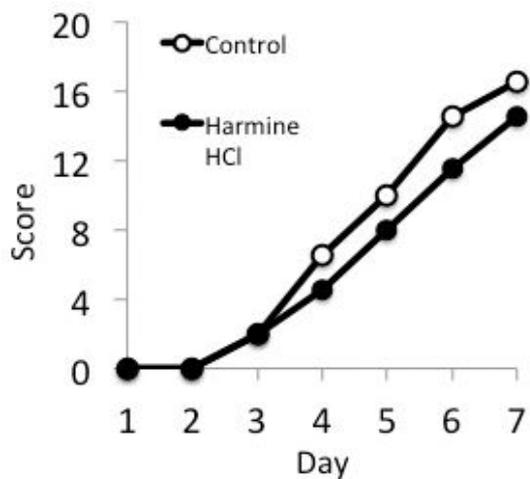
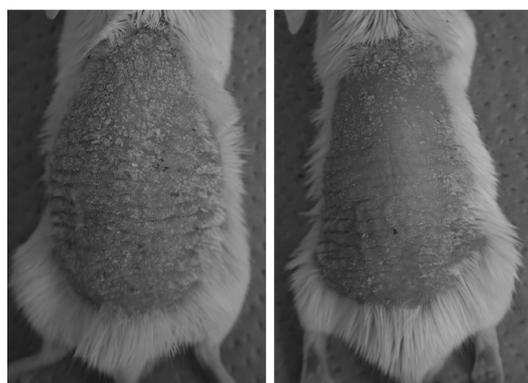


図 5

Harmine hydrochloride による病変の改善効果は微弱であった為、更なる効果を得る為に、より効果的な化合物の探索を行った。Harmine hydrochloride にはヒストンリン酸化酵素である Dyrk1a の阻害作用があることから、Dyrk1a に対してより強い阻害作用を持つ CX-4945 (IC50=6.8 nM) を候補化合物として選定し、同様の実験を行った。

その結果、実際に CX-4945 の投与化では、IMQ による皮膚病変はさらに強力に抑制される事が確認された。(図 6、7)



Vehicle alone (PBS) Beselna cream 50 mg CX-4945 0.5 mg Beselna cream 50 mg

図 6

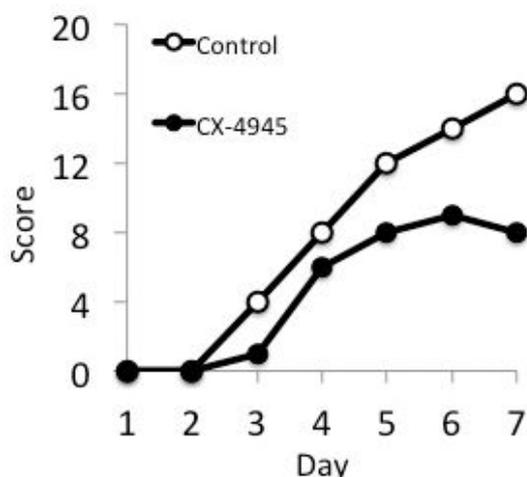


図 7

文献的検索により、Dyrk1a の阻害によりヒストンリン酸化の低下の他に、NFAT 経路の亢進により Treg の分化促進作用が生じる事が推測された。従って、CX-4945 の IMQ モデルマウス皮膚における効果は複合的な作用による事が想定された。それぞれの分子経路の実際の寄与程度については、今後の研究課題である。

本研究の成果として、乾癬モデルマウスにおいて、病変の増強作用、抑制作用をもたらすエピジェネティック作用化合物を同定することができた。とくに CX-4945 について、Dyrk1a が乾癬病変の治療標的となりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1 Ogawa Y, Kono M, Akiyama M. Pigmented macules in Waardenburg syndrome type 2 due to KITLG mutation.

Pigment Cell Melanoma Res. 30(5):501-504, 2017 査読 有

2 Takeichi T, Sugiura K, Nomura T, Sakamoto T, Ogawa Y, Oiso N, Futei Y, Fujisaki A, Koizumi A, Aoyama Y, Nakajima K, Hatano Y, Hayashi K, Ishida-Yamamoto A, Fujiwara S, Sano S, Iwatsuki K, Kawada A, Suga Y, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M. Pityriasis Rubra Pilaris Type V as an Autoinflammatory Disease by CARD14 Mutations.

JAMA Dermatol. 153(1):66-70, 2017 査読 有

3 Murase C, Ogawa Y, Yamamoto A, Iriyama C, Akiyama M.

Epstein-Barr Virus-associated Natural Killer/T-cell Lymphoma in a Patient Receiving Therapy with Anti-Tumour Necrosis Factor and Thiopurine.

Acta Derm Venereol. 97(2):273-274, 2017 査読 有

4 Takeichi T, Torrelo A, Lee JYW, Ohno Y, Lozano ML, Kihara A, Liu L, Yasuda Y, Ishikawa J, Murase T, Rodrigo AB, Fernández-Crehuet P, Toi Y, Mellerio J, Rivera J, Vicente V, Kelsell DP, Nishimura Y, Okuno Y, Kojima D, Ogawa Y, Sugiura K, Simpson MA, McLean WHI, Akiyama M, McGrath JA.

Biallelic Mutations in KDSR Disrupt Ceramide Synthesis and Result in a Spectrum of Keratinization Disorders Associated with Thrombocytopenia.

sJ Invest Dermatol. 137(11):2344-2353, 2017 査読 有

5 Fujita-Tanaka H, Ogawa Y, Muro Y, Ogawa-Momohara M, Asashima H, Tsuboi H, Sumida T, Akiyama M.

Pansclerotic morphea associated with hypohidrosis and anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies.

Br J Dermatol. 2017 Oct 4. [Epub ahead of print] 査読 有

6 Ogawa Y, Akiyama M.

Non-infectious Panniculitis during Hydroxyurea Therapy in a Patient with Myeloproliferative Disease.

Acta Derm Venereol. 96(4):566-7. 2016 査読 有

7 Ogawa Y, Kono M, Tsujikawa M, Tsujiuchi H, Akiyama M.

IgE-independent pathophysiology of severe atopic dermatitis demonstrated in an IgE-deficient patient.

J Dermatol Sci. May;82(2):139-41. 2016 査

読 有

8 Kono M, Yokoyama N, Ogawa Y, Takama H, Sugiura K, Akiyama M.
Unilateral generalized linear porokeratosis with nail dystrophy.
J Dermatol. 43(3):286-7. 2016 査読 有

9 Masaki S, Kii I, Sumida Y, Kato-Sumida T, Ogawa Y, Ito N, Nakamura M, Sonamoto R, Kataoka N, Hosoya T, Hagiwara M.
Design and synthesis of a potent inhibitor of class 1 DYRK kinases as a suppressor of adipogenesis.
Bioorg Med Chem. 2015 Aug 1;23(15):4434-41.
査読 有

10 Muro Y, Hosono Y, Sugiura K, Ogawa Y, Mimori T, Akiyama M.
Anti-PM/Scl antibodies are found in Japanese patients with various systemic autoimmune conditions besides myositis and scleroderma.
Arthritis Res Ther. 2015 Mar 11;17:57. 査読 有

〔学会発表〕(計4件)

1 Yasushi Ogawa, Michihiro Kono, Masashi Akiyama
Large hyperpigmented macules may be a genotype-specific manifestation of Waardenburg syndrome type 2 associated with KITLG mutation
日本研究皮膚科学会第42回年次学術大会・総会 2016年12月15日 高知

2 Yasushi Ogawa, Michihiro Kono, Mina Tsujikawa, Hiromi Tsujiuchi, Masashi Akiyama
IgE-independent pathophysiology of severe atopic dermatitis demonstrated in an IgE-deficient patient
日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会 2016年12月10日 仙台

3 Yoshitaka Shimizu, Yasushi Ogawa (presenter), Kazumitsu Sugiura, Jun-ichi Takeda, Kaori Sakai-Sawada, Teruki Yanagi, Atsushi Kon, Daisuke Sawamura, Hiroshi Shimizu, Masashi Akiyama
Identification of an Palindromic Motif in the Upstream Region of ABCA12 required for Promoter Activity in Cultured Human Keratinocytes
日本研究皮膚科学会第40回年次学術大会・総会 2015年12月11日 岡山

4 清水由隆、小川靖(発表者)、杉浦一充、武田淳一、澤田香織、柳輝希、今淳、澤村大

輔、清水宏、秋山真志
ヒト表皮ケラチノサイトにおける ABCA12 プロモーターの解析：プロモーター活性に必要なパリンドローム配列の同定
第30回角化症研究会 2015年8月1日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者
小川 靖 (OGAWA, Yasushi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10567754

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60222551