

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461668

研究課題名(和文)角化症における警告因子の誘導と病態

研究課題名(英文)The induction of alarmins in keratinization disorders

研究代表者

山西 清文(Yamanishi, Kiyofumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10182586

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)：皮膚に作用する内的要因、並びに外的侵襲によって表皮角化細胞が傷害されると、角化細胞からIL-33などの複数の警告因子が放出され、炎症・修復反応が誘導される。本研究では、角化症における遺伝子変異と表皮における警告因子の発現について探索を行った。これまで40症例の角化症の遺伝子変異の解析を行い、ネザートン症候群の表皮においてIL-33の発現亢進を見いだした。また、角化症の表現型が生じるメカニズムについて、TGM1欠損マウスと常染色体劣性魚鱗癬の皮膚を用いて検討した。その結果、角化症では皮膚のバリア機能を補強するために自然免疫系に関わる分子群の発現が自律的に誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When skin is injured by internal or external insults, alarmins, such as interleukin 33 (IL-33), is released from keratinocytes and inflammatory and repairing reactions are induced. In the present study, analysis of mutations in 40 cases with keratinization disorders and the expression of alarmins were examined in the skin. The up-regulation of IL-33 in the epidermis of Netherton syndrome was observed, and the induction of genes involved in innate immune responses, such as antimicrobial peptides, was found in the skin with transglutaminase 1 deficiency. From these results, we proposed the autonomous regulation of molecular signatures for innate immune responses in the pathogenesis of keratinization disorders.

研究分野：皮膚科学

キーワード：角化症 自然免疫 トランスグルタミナーゼ サイトカイン 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

皮膚は外界に接しており、常に物理的、化学的、生物学的侵襲に曝されている。表皮角化細胞が傷害された場合、細胞から複数の警告因子 (alarmin) が放出される。警告因子として、インターロイキン 1 (IL-1)、S100A8 (MRP8)/S100A9 (MRP14)、High-mobility group box 1 (HMGB1)、インターロイキン 33 (IL-33) などが知られている。実際に、研究代表者らは角化細胞における IL-33 の発現増加が 2 型自然リンパ球の増殖・活性化、Th 2 型サイトカイン産生誘導を生じ、アトピー性皮膚炎に酷似する炎症を引き起こすことを世界に先駆けて証明した(文献)。これらの警告因子は、内在性の要因を含め、侵襲や傷害の種類、程度に応じて産生され、生理的には傷害された細胞の排除や修復に関わる一方、発現が持続すると表皮・角層肥厚などの形態形成の異常や炎症を誘発し、皮膚疾患の病態に関わる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 次世代シーケンシング (NGS) 技術の発展により、角化症関連遺伝子のコード領域の解読や、全エクソーム解析 (WES) が実施できるようになった。そこで本研究では、角化症を対象に、NGS を用いてより効率的な包括的遺伝子診断解析のシステムの構築を目的とした。

(2) 上記の方法等で原因遺伝子が同定された角化症並びに角化症モデルマウスにおいて、皮膚の遺伝子発現を解析し、発現が増加する警告因子群を同定する。その発現パターンあるいは特性から角化症の病態形成に関与するシステムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 兵庫医科大学遺伝子組換え実験安全委員会 (課題番号 23012; 29007; 214012) および動物実験委員会の承認 (承認番号 B09-251; 13-001; 15-067) のもとに、Tgm1 遺伝子を欠損する Tgm1 欠損マウスを作成し、実験に用いた。

(2) 角化症における原因遺伝子の解析は、兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認 (倫ヒ第 32 号) のもとに、対象者の文書同意を得て実施した。また、皮膚組織の免疫組織化学は、倫理審査委員会承認 (第 212 号) のもとに、対象者の文書同意を得て実施した。

(3) NGS 解析は角化症の原因遺伝子を含む 54 遺伝子 (v.2)、122 遺伝子 (v.3) あるいは全エクソームを対象とし、アジレント社 Hal

oPlexあるいはSureSelectによりゲノムライブラリーを作成し、イルミナ社 MiSeq あるいは HiSeq (外注) により fastq ファイルを得た。データは SureCall あるいは StrandNGS によりヒト参照配列にアラインメントし、変異候補の選択を行った。

(4) マイクロアレイ (Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8x60Kv.1) は Takara Bio Inc. に外注した。データは GeneSpring (Agilent 社) を使用して解析した。定量的リアルタイム PCR は TaqMan gene expression assay (ABI 社) を用いた。サイトカイン・ケモカイン量の測定には Bio-Plex Pro mouse cytokine multiplex assay kit (Bio-Rad 社) を用いた。免疫組織化学は MAC 387 抗体 (Dako 社) と Vectastain Universal kit (Vector Laboratories 社) を使用した。マウス表皮抽出液の抗菌活性の測定は、Sorensen et al. ら (文献) の方法に従った。

4. 研究成果

(1) NGS を用いて 40 症例の角化症を解析した。そのなかで、変異が同定された症例の一部を表に示す (表 1)。常染色体劣性魚鱗癬の葉状魚鱗癬において、TGM1 では世界初の deep intronic mutation による pseudoexon activation によって生じた挿入変異を同定した。また、東アジアでは最初の報告となる NIPAL4 遺伝子変異を同定した。

表 1 NGS を用いた角化症変異解析

角化症	変異遺伝子
コロジオンペビー (乳児)	TGM1
葉状魚鱗癬 (小児)	TGM1
道化師様魚鱗癬 (乳児)	ABCA12
魚鱗癬様紅皮症	NIPAL4
Netherton 症候群	SPINK5
Netherton 症候群 (乳児)	SPINK5
掌蹠角化症	KRT6C
掌蹠角化症	AQP5
長島型掌蹠角化症 (乳児)	SERPINB7
長島型掌蹠角化症 (小児)	SERPINB7
長島型掌蹠角化症 (小児)	SERPINB7
膿疱性乾癬	IL36RN

(2) 角化症における警告因子の発現解析については、Netherton 症候群の表皮において IL-33 の発現増強を明らかにした。

つぎに、角化症の代表的な原因遺伝子であるトランスグルタミナーゼ 1 (TGM1) の欠損マウスにおける遺伝子発現を解析した。TGM1 欠

損マウス表皮のマイクロアレイでは、警告因子を含め、自然免疫に関わる遺伝子群の発現誘導が示唆された(図1)。

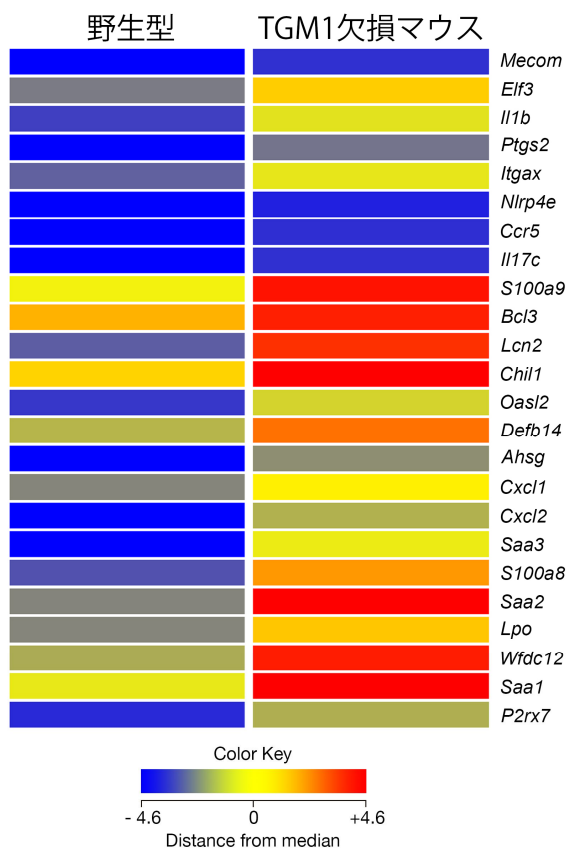


図1 表皮における遺伝子発現の比較(雑誌論文より引用)

続いて、IL-1、抗菌ペプチド S100A8、S100A9、デフェンシン 14、カテリシジン、SLPI、リポカリン 2、CCL20、WFDC12 について、定量的リアルタイム PCR で遺伝子発現を検討した。その結果、TGM1 欠損マウス表皮における発現増加が明らかになった。また、野生型マウスと比較して、IL-1、G-CSF、GM-CSF、CXCL1、CXCL2、CXCL9、CCL2 の濃度が TGM1 欠損マウスの皮膚で増加することが判明した。TGM1 欠損マウスの表皮では、EGF 受容体リガンドヘパリン結合性 EGF 様成長因子、アンフィレギュリン、エピレギュリンの遺伝子発現の増加も観察された。さらに TGM1 欠損マウス表皮抽出タンパクは大腸菌、黄色ブドウ球菌の増殖を有意に抑制することを見いだした。さらに、TGM1 変異を持つ常染色体劣性魚鱗癬の表皮でも S100A8/S100A9 が強く染色され、病変部皮膚では警告因子、抗菌ペプチド、サイトカイン等、自然免疫系の遺伝子群の発現増強が観察された。以上より、角化症では原因遺伝子の変異によって角層のバリア機能が障害され、その構造や質的变化によって自律的に警告因子が発現誘導される。その結果、創傷治癒と同様のシステムが働き、表皮肥厚、角層増生が持続的に生

じる角化症の表現型に至ると推測される。

<引用文献>

Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Haneda T, Mizutani H, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Imai Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(34):13921-6.

Sørensen OE, Thapa DR, Roupé KM, Valore EV, Sjöbring U, Roberts AA, Schmidtchen A, Ganz T. Injury-induced innate immune response in human skin mediated by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1878-85.

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6件)

Kusakabe M, Nagai M, Nakano E, Jitsukawa O, Nishigori C, Yamanishi K. A Japanese case of ichthyosiform erythroderma with a novel mutation in NIPAL4/Ichthyin. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(3):397-398. doi: 10.2340/00015555-2062. (査読有)

Haneda T, Imai Y, Uchiyama R, Jitsukawa O, Yamanishi K. Activation of Molecular Signatures for Antimicrobial and Innate Defense Responses in Skin with Transglutaminase 1 Deficiency. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159673. doi: 10.1371/journal.pone.0159673. (査読有)

Suga Y, Tsuda T, Nagai M, Sakaguchi Y, Jitsukawa O, Yamamoto M, Hitomi K, Yamanishi K. Lamellar ichthyosis with pseudoexon activation in the transglutaminase 1 gene. *J Dermatol.* 2015;42(6):642-5. doi: 10.1111/1346-8138.12846. (査読有)

Inoue Y, Yamamoto M, Sakaguchi Y, Jitsukawa O, Hayano K, Yamane M, Sakamoto M, Yamanishi K. ABCA12-deficient congenital ichthyosiform erythroderma in a boy with an intellectual developmental delay. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(6):747-9. doi: 10.2340/00015555-2062. (査読有)

Itoh K, Kako T, Suzuki N, Sakurai N, Sugiyama K, Yamanishi K. Severe lethal phenotype of a Japanese case of Nethert

on syndrome with homozygous founder mutations of SPINK5 c.375_376delAT. J Dermatol. 2015;42(12):1212-4. doi: 10.1111/1346-8138.13090. (査読有)

Konishi T, Tsuda T, Sakaguchi Y, Imai Y, Ito T, Hirota S, Yamanishi K. Upregulation of interleukin-33 in the epidermis of two Japanese patients with Netherton syndrome. J Dermatol. 2014;41(3):258-61. doi: 10.1111/1346-8138.12410. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

Imai Y, Haneda T, Uchiyama R, Jitsukawa O, Yamanishi K. Molecular signatures for antimicrobial and innate defense responses activated in skin with transglutaminase 1 deficiency. 日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会・総会 2016.12.10 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Kusakabe M, Nagai M, Nakano E, Jitsukawa O, Nishigori C, Yamanishi K. Congenital ichthyosiform erythroderma with a novel NIPAL4/ichthyin mutation identified by whole exome sequencing. The 4th Eastern Asia Dermatology Congress 2016.11.17 東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート(千葉県浦安市)

山西 清文. これならわかる、角化症. 第66回日本皮膚科学会中部支部総会学術大会 2015.10.31 神戸国際会議場(神戸市)

鷺見 真由子, 仲田 かおり, 鷺尾 健, 福永 淳, 錦織 千佳子, 山名 啓司, 香田 翼, 森岡 一郎, 山西 清文. 早期のエトレチナート導入により救命し得た道化師様魚鱗癬の1例. 第114回日本皮膚科学会総会学術大会 2015.5.29 パシフィコ横浜(横浜市)

山西 清文. 角化症の診断とゲノムベース解析の活用. 第114回日本皮膚科学会総会学術大会 2015.5.29 パシフィコ横浜(横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/drm/department/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 清文 (YAMANISHI, KIYOFUMI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10182586

(2) 研究協力者

今井 康友 (IMAI, YASUTOMO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10529514

山本 雅章 (YAMAMOTO, MASAOKI)
兵庫医科大学・医学部・助手
研究者番号: 60624640

羽田 孝司 (HANEDA, TAKASHI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90580035

永井 諒 (NAGAI, MAKOTO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30791545

坂口 祥子 (SAKAGUCHI, YOSHIKO)
兵庫医科大学・医学部・実験補助

實川 織江 (JITSUKAWA, ORIE)
兵庫医科大学・医学部・実験補助