

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670518

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質PI(3,5)P2産生経路の破綻による壊疽性膿皮症の発症機序

研究課題名(英文) Pathogenetic mechanism for pyoderma gangrenosum by disruption of the production pathway of phosphatidylinositol (3,5) biphosphate

研究代表者

蓮沼 直子 (Hasunuma, Naoko)

秋田大学・医学部・その他

研究者番号：10282170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の慢性炎症性皮膚疾患である壊疽性膿皮症の発症機序を解明するために、イノシトールリン脂質代謝酵素PipkIIIを表皮特異的に欠損させたマウスを作製した。しかし、このマウスは生後数時間で死亡することが判明した。そこで、生後の表皮でのPipkIIIの機能解析を可能とするために、タモキシフェンを用いた誘導型PipkIII欠失マウスを作製した。その結果、タモキシフェンを塗布した部位に一致して、表皮、毛包上皮に著しい空胞形成がみられた。しかし、壊疽性膿皮症でみられる好中球を中心とした稠密な炎症細胞浸潤は見られなかった。今後は、このマウスを利用して表皮における細胞内小胞輸送の役割を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：Pyoderma gangrenosum is a chronic inflammatory skin disease of unknown etiology. To investigate the pathogenic mechanism for pyoderma gangrenosum, we generated mutant mice harboring epidermal specific deletion of type III phosphatidylinositol phosphate kinase (PipkIII). However, the mutant mice died several hours after birth. To overcome this neonatal death and to examine functional roles of PipkIII in the epidermis, we then generated tamoxifen-inducible PipkIII-deficient mice. After tamoxifen application, we found that intensive vacuolization occurred in the epidermis and follicular epithelium. However, we failed to detect dense neutrophilic infiltration in the dermis, which is a characteristic histopathological feature of pyoderma gangrenosum, in the mutant mice. We will examine the role of PipkIII in intracellular transport in the epidermis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：壊疽性膿皮症 イノシトールリン脂質 ノックアウトマウス 炎症性皮膚疾患 細胞内小胞輸送系

1. 研究開始当初の背景

ホスファチジルイノシトールは、細胞膜に普遍的に存在し、そのイノシトール環水酸基がリン酸化、あるいは脱リン酸化を受けることで、イノシトールリン脂質(ホスホイノシチド:PIs)と総称される7種類の代謝産物が派生する。PIsは数々の機能蛋白質の集積、離散、活性を制御しており、PIs代謝酵素の活性が遺伝子変異などにより変調すると、様々な病態が形成されることが報告されている。

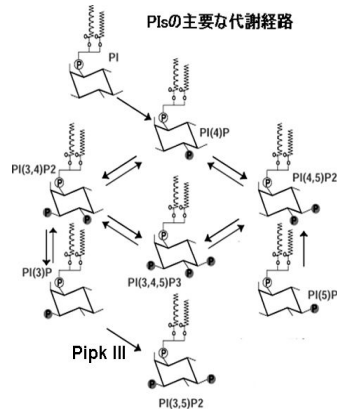


図1 PIsの主な代謝経路

興味深いことに、PI(3)Pの5位水酸基をリン酸化しPI(3,5)P₂を生成するPipkIII(図1)の腸上皮細胞特異的欠失マウスは、クローン病に類似した病理組織像を示すことが報告された。

壊疽性膿皮症は、小膿疱、丘疹として始まった皮疹が急速に拡大し、辺縁が隆起した有痛性の潰瘍を形成する慢性、再発性の疾患である。潰瘍底には黄褐色の壊死物質がみられ、病変部には稠密な好中球の浸潤がみられる。発症機序として血管炎説、感染アレルギー説、自己免疫説などが提唱されているが、いまだ原因不明で治療に難渋する疾患である。壊疽性膿皮症は、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患にしばしば合併するばかりでなく、ステロイドや抗TNF抗体に対する反応性も類似しており、これらの疾患は共通の病態基盤を有しているものと推察されている。

Pipk IIIは、また、オートファゴソーム、初期エンドソーム、後期エンドソームを含む細胞内小胞輸送系を制御することが知られている。オートファジーの主要な役割の一つは、病原性細菌を含む有害物質を除去することであるが、最近、この機能の低下が生活習慣病を含む数多くの疾患の発症に関与していることがわかってきた。しかし、オートファジーの異常と炎症性皮膚疾患との関連はいまだ不明である。

2. 研究の目的

(1) 壊疽性膿皮症は原因不明の炎症性疾患であり、治療に難渋する皮膚疾患の一つである。本研究は、イノシトールリン脂質代謝酵

素Pipk IIIの腸上皮細胞特異的欠失マウスが、本症と共通の病態基盤を持つと推測されているクローン病に類似した病理組織像を示したことに基づき、Pipk IIIの表皮特異的欠失マウスを作成する。このマウスを用いて、壊疽性膿皮症の皮膚病変との類似性を形態学的に観察するとともに、マイクロアレイ法を利用することにより、炎症反応や薬剤感受性に関わる遺伝子発現を網羅的に解析する。

(2) 本研究により、これまで想定されていなかった壊疽性膿皮症の病態を解明し、かつ新規治療戦略を創成する。

3. 研究の方法

(1) 目的の遺伝子をloxP配列ではさみこんだ遺伝子(flox allele)は、組換え酵素Creの存在下で除去することができる。このCre-loxPシステムを利用して、ケラチンK5プロモーター下にCreを発現させたK5-Creトランスジェニックマウスと佐々木雄彦先生(秋田大学)より供与されたPipk III遺伝子にloxP配列を導入したPipk III flox/floxマウスを交配し、角化細胞特異的Pipk IIIホモ欠失マウスを作成する。

(2) 腸上皮細胞特異的にPipk IIIを欠失したマウスは、生後3週で成長障害を伴い水溶性下痢を生じ、生後14週までに80%が死亡する。また、小腸から大腸にかけて、粘膜固有層から粘膜下層の炎症細胞浸潤と顕著な線維化、杯細胞の減少などの組織所見を示す。そこで、角化細胞特異的にPipk IIIを欠失したマウスにおいて、類似した病変が同様の時系列で再現されるかを検討するため、炎症反応の発生を経時的に観察する。

(3) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)が壊疽性膿皮症を誘発することが知られている。そこで、角化細胞特異的にPipk IIIを欠失したマウスにおいて、GM-CSFが病変を誘発するかを検討するため、マウス皮膚にGM-CSFを皮内注射し、炎症反応の発生を経時的に観察する。

(4) 上記の炎症反応に関して、HE染色による形態学的観察を行うとともに、各種細胞マーカーを用いた免疫染色により炎症の質的解析を行う。さらにオートファジー・マーカーや細胞内小胞輸送・細胞極性に関与する蛋白質に対する抗体で免疫蛍光染色を行い、炎症性腸疾患に類似した異常の有無について解析する。

(5) 近年、クローン病に対して抗TNF α 療法が実施され、その際に合併していた壊疽性膿皮症が軽快したことから、randomized controlled trialが実施され、抗TNF α 抗体が有効であることが示された。そこで、角化細胞特異的にPipk IIIを欠失したマウスにおいて、

抗 TNF α 抗体が炎症反応を抑制するかを検討するため、抗 TNF α 抗体を継続的に全身投与し、炎症反応の発生を肉眼的・組織学的に観察する。

4. 研究成果

(1) 当初の研究計画通り Keratin 5 (K5)-Cre マウスを用いて表皮特異的な *Pipk111* マウスの作製を試みたが、この変異マウスは生後数時間で死亡することが判明し、その後の解析が困難になった。HE 染色で変異マウスの表皮を解析したところ、表皮、および毛包上皮に著しい空胞変性がみられ、これが死亡の原因と考えられた。

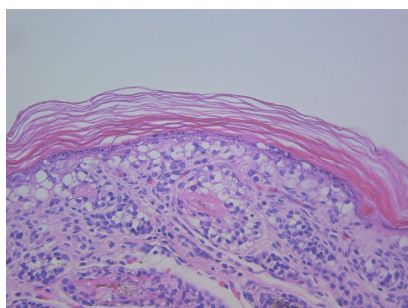


図2 表皮特異的 *Pipk111* 欠損マウスの表皮の病理組織像 x40 倍

(2) 生後の表皮で *Pipk111* の機能解析を可能とするために、計画を変更しタモキシフェン (TAM) を用いた誘導型 *Pipk111* 欠失マウスを作製した。その結果、TAM を塗布した部位に一致して表皮、および毛包上皮に著しい空胞変性がみられ、K5-Cre マウスをいた表皮特異的 *Pipk111* 欠失マウスと同様の表現型を再現できた。

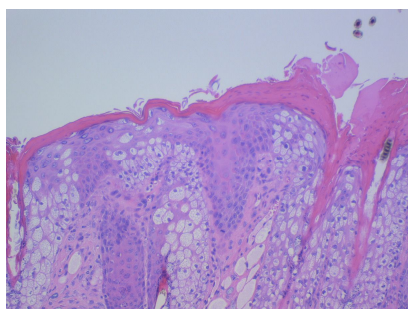


図3 Tamoxifen 誘導型 *Pipk111* 欠損マウスの表皮の病理組織像 x40 倍

(3) 一方で *Pipk111* が欠失したマウスの表皮を観察してみると、壊疽性膿皮症で見られるような好中球の浸潤を特徴とする病理所見は見られなかった。このため本研究計画で予定していた顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 投与による炎症反応の誘発実験や抗 TNF 抗体処理による炎症反応の阻害効果の検討はできなかった。

(4) 研究当初の予想と異なり、*Pipk111* を表皮特異的に欠損させたマウスは壊疽性膿皮症

の病理組織像を呈さなかった。このことは、*Pipk111* の炎症における役割は、組織により異なることを意味している。しかし、表皮、および毛包上皮に空胞形成がみられる表現型は劇的であり、今後このマウスを利用して、表皮における細胞内小胞輸送系における役割を明らかにしていく予定である。

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 8 件)

蓮沼 直子：新たな女性医師支援のあり方
- 女性医師のキャリア支援、働き方を考える
- 整形・災害外科 59(3), 277-281, 2016. 査読無

Kitadate A, Ikeda S, Teshima K, Ito M, Toyota I, Hasunuma N, Takahashi N, Miyagaki T, Sugaya M and TagawaHMicroRNA-16 mediates the regulation of a senescence-apoptosis switch in cutaneous T-cell and other non-Hodgkin lymphomas. Oncogene 2015 Dec 7. doi: 10.1038/onc.2015.435. 査読有

堀江 早喜、竹内 真純、山岡 和枝、野原 理子、蓮沼 直子、沖永 寛子、野村 恭子：「女性医師が働きやすい病院」チェックリストの開発、日衛誌 (Jpn. J. Hyg.), 70, 264-270, 2015. <http://dx.doi.org/10.1265/jjh.70.264> 査読有

高山 かおる、青山 裕美、多田 弥生、蓮沼 直子、加藤 則人、宇原 久、永井 弥生、河原 由恵、東 裕子、中島 喜美子、松村 由美、伊藤 明子、菊地 克子、秀道 広：しなやかリーダーシップワークショップ 2014 ~ Find Yourself in Dermatology ~ キャリア支援委員会企画 平成 26 年度皮膚科リーダー養成ワークショップ、日皮会誌 125, 1205-1214, 2015. 査読無

蓮沼 直子：21 世紀のキャリア教育の実践 秋田大学での低学年からの必修講義キャリア教育プログラムの構築、医学教育 46(3):225-233, 2015. 査読無

蓮沼 直子：自分のキャリアをデザインしよう！、Visual Dermatology 14(4) p.472, 2015. 査読無

東 裕子、伊藤 明子、岡崎 愛子、常深 祐一郎、菊池 克子、蓮沼 直子、檜垣 祐子、高山 かおる、本田 ひろみ、加藤 則人、鶴田 京子、中島 喜美子、青山 裕美、塩原 哲夫、松永 佳世子：「一歩」踏み出そう 自分の可能性を信じてチャレンジ・成長していこう 皮膚科の女性医師を考える

会、日皮会誌 124 (14) 3143-3148 , 2014 . 査読無

Hasunuma N , Umebayashi Y , Manabe M (2014) True leukonychia in Crohn disease induced by selenium deficiency . *JAMA Dermatol* 150 , 779-780. doi:10.1001/jamadermatol.2013.6701. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

蓮沼 直子、榑木 晶子、片岡 仁美、佐々木 ひと美、矢上 晶子：21世紀におけるキャリア教育とは～卒前から卒後までのシームレスなサポートを目指して。(シンポジウム) 第8回日本性差医学・医療学会学術集会、2015年1月、ホテルクレメント徳島(徳島県・徳島市)

蓮沼 直子：巻き爪矯正後の維持療法～アクリル充填法と巻き爪用クリップの比較. 第33回日本臨床皮膚外科学会学術集会、2015年3月、シェラトングランデ東京ベイ(千葉県・浦安市)

蓮沼 直子：21世紀の医師キャリア教育の実践とは～秋田大学での必修講義としてのキャリア教育プログラム。(特別企画) 第115回日本外科学会定期学術集会、2015年4月、名古屋国際会議場、(愛知県・名古屋市)

蓮沼 直子：医療メディエーション：認知フレームの違いを理解し対話を促進する。(教育講演) 第114回日本皮膚科学会総会、2015年5月、パシフィコ横浜、(神奈川県・横浜市)

蓮沼 直子、梅林 芳弘、真鍋 求、石河 軌久：両方の側爪郭に肉芽を生じた陥入爪にコットン充填固着法変法が奏効した3例、第31回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会、2015年6月、オホーツク・文化交流センター/網走セントラルホテル、(北海道・網走市)

蓮沼 直子：21世紀の医師キャリア教育の実践に向けたアウトカムを考える。(パネルディスカッション)、第46回日本医学教育学会大会、2014年7月、和歌山県立医科大学 紀三井寺キャンパス/高度医療人育成センター・講堂、(和歌山県・和歌山市)

蓮沼 直子、長谷川 仁志、南園 佐知子、間宮 敬子、山本 明美、蒔田 芳男、河野誠司、在間 梓：秋田大-旭川医大-神戸大の担当者が連携した男女共同参画・医師キャリア形成必修講義の試み、第46回日本医学教育学会大会、2014年7月、和歌山県立医科大学 紀三井寺キャンパス/高度医療人育成センター・講堂、(和歌山県・和歌山市)

蓮沼 直子：離職を経験した女性医師が医

局長になったら(JAWS共催企画)。第76回日本臨床外科学会総会、2014年11月、郡山市民文化センター/ビッグパレットふくしま/ホテルハマツ/郡山ビューホテルアネックス(福島県・郡山市)

堀江 早喜、竹内 真純、山岡 和枝、野原 理子、蓮沼 直子、沖永 寛子、野村 恭子：「女性医師が働きやすい病院」職場環境尺度の開発、第73回日本公衆衛生学会総会、2014年11月、栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ/ニューみくら、(栃木県・宇都宮市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮沼 直子 (Hasunuma, Naoko)
秋田大学・医学部・准教授
研究者番号：10282170

(2) 連携研究者

真鍋 求 (Manabe, Motomu)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30138309

堀江 泰夫 (Horie, Yasuo)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30282164

(3) 研究協力者

鈴木倫子 (SUZUKI, Tomoko)
加賀谷昌美 (KAGAYA, Masami)