

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17770

研究課題名(和文)真菌の排除における表皮細胞の役割:表皮細胞の興奮と死、排除される真菌の生体内観察

研究課題名(英文) Intravital imaging of anti-fungal immunity focusing on the role of epithelial cells in the skin

研究代表者

村田 光麻 (Murata, Teruasa)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40838801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに感染する主要な真菌であるカンジダは、白血球によって排除されることが知られている。しかし、KID症候群では、白血球の機能に関わると考えにくいGJB2遺伝子に変異があるにも関わらず、慢性皮膚カンジダ症を合併し、その原因は不明である。本研究では、KID症候群患者の皮膚カンジダ症の治癒後に出現した体細胞変異という珍しい現象の解析と、KID症候群モデルマウスを用いた実験を行った。その結果、皮膚角化細胞におけるGJB2変異が、カンジダに感染しやすい原因であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダは高齢者や免疫力の低下した人に重篤な日和見感染を起こす真菌であり、皮膚は人体への侵入門戸の一つである。これまで白血球の機能に注目した研究が蓄積されてきたが、上皮細胞の関わりを直接示すヒトの疾患はなかった。本研究で解析した体細胞変異は、皮膚角化細胞がカンジダへの抵抗力に関わる可能性を強く示唆するものである。皮膚に限らず上皮細胞の働きに着目した、カンジダ感染症の予防・治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Candida, the major fungus infecting humans, is known to be eliminated by leukocytes. However, KID syndrome is complicated by chronic cutaneous candidiasis despite mutations in the GJB2 gene, which is unlikely to be involved in leukocyte function, and the cause of the disease is unknown. In this study, we analyzed the unusual phenomenon of somatic mutations appearing after the healing of cutaneous candidiasis in patients with KID syndrome and conducted experiments using a mouse model of KID syndrome. The results revealed that GJB2 mutations in skin keratinocytes are responsible for the susceptibility to Candida infection.

研究分野：皮膚科学

キーワード：カンジダ 皮膚角化細胞 細胞死 真菌感染 体細胞変異 遺伝性角化症 KID症候群 魚鱗癬症候群

1. 研究開始当初の背景

皮膚や粘膜の常在菌であるカンジダは、免疫力の低下した患者において重篤な感染症を引き起こす。抗真菌薬による治療効果は完全ではなく、カンジダの排除メカニズムのさらなる理解が求められている(Netea *et al.* Nat Rev Immunol. 2015)。これまで皮膚や粘膜からのカンジダの排除には、好中球、T細胞、樹状細胞が重要であることが明らかにされてきた。一方、ギャップジャンクション/ヘミチャネルの構成分子であるコネキシン 26 をコードする *GJB2* の変異が、KID 症候群を来すこと、また慢性カンジダ感染症を合併することが知られていた(Kaku *et al.* Br J Dermatol. 2012)。しかし、*GJB2* の発現は免疫細胞では低く、既存の知見では病態を説明できない。

研究代表者はこれまでの研究で、表皮細胞内の Ca^{2+} 濃度の動態を明らかにした。即ち、表皮細胞の特異的な細胞死である角化の 1 時間程度前から、個細胞単位で細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇することを見出した(Murata *et al.* Sci Rep. 2018)。続いて、KID 症候群ではヘミチャネルの活性が異常に高いため、表皮細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇しやすく、角化が早期に生じることを見出した(未発表)。さらに、KID 症候群患者のカンジダ感染巣の病理組織学的な検討により、カンジダ菌系に接する表皮細胞が早期の細胞死を起こすことと、表皮細胞の細胞に分布するカンジダのシグナルを見出した(未発表)。

また、上皮細胞の真菌排除における働きは、近年提唱されつつある。例えば、カンジダの放出するペプチドが上皮細胞の細胞質 Ca^{2+} を上昇させ、サイトカインの放出、好中球の浸潤が誘導されることが明らかとなった(Moyes *et al.* Nature. 2016)。

以上のことから、KID 症候群では、カンジダの浸潤により表皮細胞が表皮細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して早期の細胞死を起こし、表皮細胞が本来果たすべき機能が発揮されないことで、慢性カンジダ感染が引き起こされるのではないかと、この仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、KID 症候群における慢性カンジダ感染の病態の解明、および、それを通じたカンジダ排除における表皮細胞の役割の解明である。

3. 研究の方法

- (1) KID 症候群患者の体細胞変異の解析
- (2) KID 症候群におけるカンジダへの易感染性の原因となる細胞種の同定

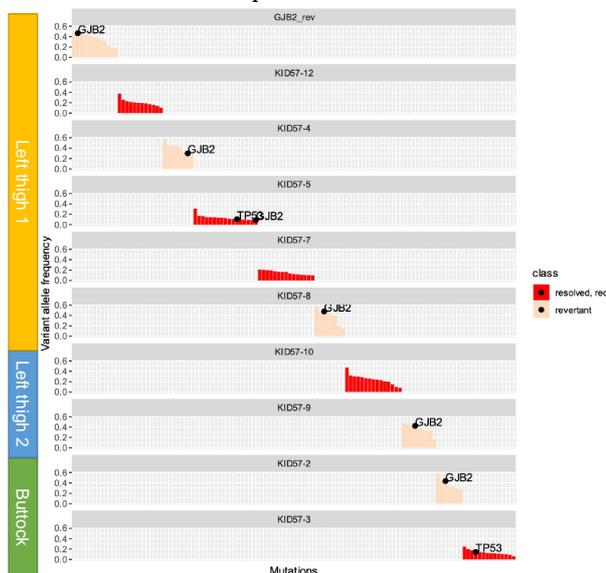
4. 研究成果

研究計画段階では、in vivo イメージングによる病態解析を計画していた。しかし、実験の前提となる KID 症候群モデルマウスの、カンジダ感染のない状態の in vivo イメージング解析に予想外の時間を要した。

そのため、3.(2)の結果を得たものの、in vivo イメージングに関しては実験系の構築にとどまった。一方、予想外の現象を見出したことから、3.(1)の研究をすすめることができた。

(1)KID 症候群の患者の慢性カンジダ感染が、抗真菌薬により治癒した部位に、健常者の皮膚のような斑が多数出現することを見出した。この所見から、体細胞変異をもつ皮膚上皮細胞クローンの拡大を疑った。そこで、正常化したような部位から 5 箇所(*1)、カンジダ感染があったものの以前と同様の KID 症候群の皮膚の部位から 5 箇所(*2)、カンジダ感染の既往のない部位から 2 箇所(*3)、皮膚生検を行い、表皮を分離した後に、whole-exome sequencing を行った。すると、*1 のすべてのサンプルで、*GJB2* に新たな、サンプルごとに異なる体細胞変異をもつ、皮膚上皮細胞のクローンの拡大が同定された。一方、*2 でも体細胞変異を有するクローンの拡大が同定されたものの、サンプル内でそのクローンの占める割合は*1 よりも低く、また *GJB2* には 1 つのサンプルを除いて体細胞変異を認めなかった(図 1)。さらに、*3 では体細胞変異を有するクローンの拡大は見いだされなかった。以上の結果から、KID 症候群患者における慢性皮膚力

図 1: Whole exome sequence の結果



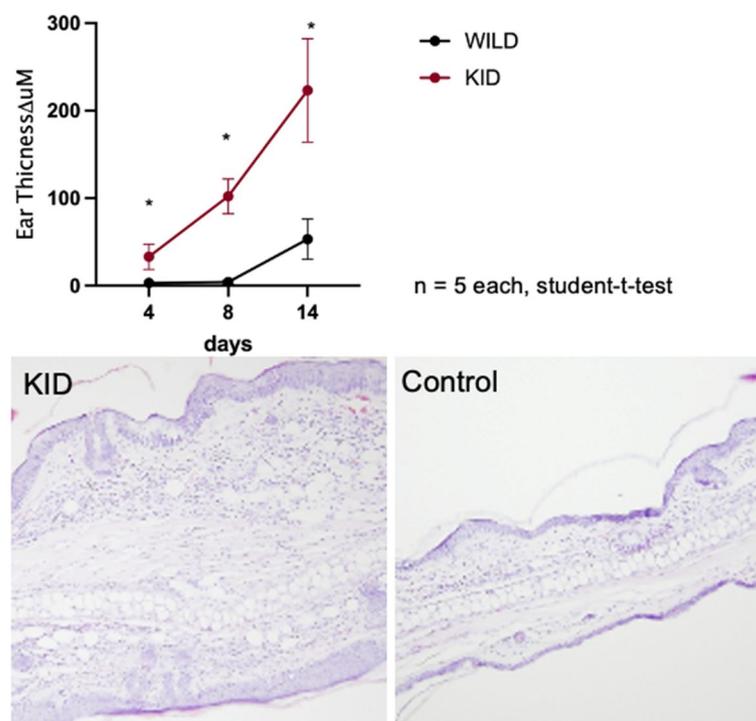
カンジダ症は、*GJB2* の体細胞変異を持つクローンの選択圧として働くことが強く示唆された。

上記の体細胞変異が、*GJB2* によってコードされるコネクシン 26 が形成するヘミチャネルの機能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために必要な、実験系の構築を行った。具体的には、福井大学の老木成稔教授との共同研究により、無細胞系におけるチャネル形成および電流測定系の立ち上げを行った。今後、実際に体細胞変異を持つ *GJB2* 遺伝子を導入することで、複数の体細胞変異に共通してみられるチャネル機能の有無を検討する予定である。

(2) KID 症候群モデルマウスを用いて、表皮角化細胞特異的に *GJB2* に変異を導入した場合に、カンジダへの易感染性が再現されるかどうかを検討した。代表的な菌株である sc5314 を耳介の皮膚に反復塗布すると、皮膚特異的 KID モデルマウスで、コントロールよりも有意に強い耳介の腫脹が起こった(図 2)。意外なことに、皮膚に浸潤する好中球や IL-17 産生細胞の数は、炎症のピークではコントロールとの間に有意な差はみられなかった。また耳介皮膚を擦過した綿球から得られるカンジダのコロニー数は KID 症候群モデルマウスで多い傾向があった。

これらの結果は、KID 症候群におけるカンジダへの易感染性は、表皮角化細胞における *GJB2* 変異によることが示された。さらに、カンジダの侵入による炎症反応が、少なくとも炎症の極期では保たれていることから、カンジダの皮膚への侵入から間もない段階で、表皮角化細胞が何らかの役割を果たしている可能性が示された。この可能性を検討するために、蛍光蛋白を導入したカンジダ株の樹立、観察を容易にするために全身の体毛を欠く KID モデルマウスの作成を行った。今後、*in vivo* イメージングによるカンジダ侵入直後の表皮角化細胞の反応や免疫細胞の動きを検討する予定である。

図 2: KID 症候群モデルマウスにおけるカンジダ塗布への反応



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Teruasa, Honda Tetsuya, Mostafa Alshimaa, Kabashima Kenji	4. 巻 28
2. 論文標題 Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 350 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmed.2022.02.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nita Akihiro, Matsumoto Akinobu, Tang Ronghao, Shiraishi Chisa, Ichihara Kazuya, Saito Daisuke, Suyama Mikita, Yasuda Tomoharu, Tsuji Gaku, Furue Masutaka, Katayama Bumpei, Ozawa Toshiyuki, Murata Teruasa, Dainichi Teruki, Kabashima Kenji, Hatano Atsushi, Matsumoto Masaki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 17
2. 論文標題 A ubiquitin-like protein encoded by the "noncoding" RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009686	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya Rintaro, Ishida Yoshihiro, Hanakawa Sho, Kataoka Tatsuki R., Takeuchi Yasuhide, Murata Teruasa, Akagi Arisa, Chow Zachary, Kogame Toshiaki, Nakamizo Satoshi, Nakajima Saeko, Egawa Gyohei, Nomura Takashi, Kambe Naotomo, Kitoh Akihiko, Kabashima Kenji	4. 巻 142
2. 論文標題 CCL2/CCR2 Signaling in the Skin Drives Surfactant-Induced Irritant Contact Dermatitis through IL-1 β -Mediated Neutrophil Accumulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 571 ~ 582.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.07.182	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueda, M. Saito, S. Murata, T. Hirano, T. Bise, R. Kabashima, K. Suzuki, S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47213-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 村田光麻、椛島健治
2. 発表標題 カルシウムイオンの流入は皮膚上皮細胞の正常な角化と異常な角化を誘導する
3. 学会等名 第42回炎症再生学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 村田光麻、椛島健治
2. 発表標題 カルシウムイオンを切り口とした皮膚上皮細胞の細胞死(角化)メカニズムの解析
3. 学会等名 生理学研究所研究会 「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 村田 光麻
2. 発表標題 カルシウムイオンに着目した皮膚上皮細胞の最終分化メカニズムの解析
3. 学会等名 第23回 トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 村田光麻、石田雄大、竹田真衣、乃村俊史
2. 発表標題 KID症候群の慢性カンジダ感染巣に限局して多発したGJB2の体細胞変異クローンの拡大
3. 学会等名 第36回 角化症研究会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Teruasa Murata, Tetsuya Honda, Hiromi Doi, Teruki Dainichi, Kenji Kabashima
2. 発表標題 Identification of aberrantly high cytoplasmic Ca ²⁺ in granular keratinocytes preceding hyperkeratosis in KID syndrome by intravital imaging
3. 学会等名 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 小松貴義・村田光麻
2. 発表標題 第34回角化症研究会、Revertant mosaicismを疑う所見を呈したKID症候群における難治性カンジダ 皮膚炎の1例
3. 学会等名 第34回角化症研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 村田光麻
2. 発表標題 角化細胞の細胞質カルシウムイオン濃度に着目したKID症候群の病態解析
3. 学会等名 第34回角化症研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 村田光麻
2. 発表標題 表皮角化細胞の細胞質カルシウムイオン濃度に着目した角化症の病態解析
3. 学会等名 第2回炎症性皮膚疾患集中セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 村田光麻
2. 発表標題 表皮角化細胞の細胞内カルシウムイオン濃度のダイナミクスと表皮の分化との関係
3. 学会等名 皮膚科学と数理科学の接点(招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Teruasa Murata
2. 発表標題 Distinct dynamics of cytoplasmic calcium ions of epidermal keratinocytes in connexin-related keratoderma
3. 学会等名 Gordon research seminar(Epithelial differentiation and keratinization)(国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Teruasa Murata
2. 発表標題 Distinct dynamics of cytoplasmic calcium ions of epidermal keratinocytes in connexin-related keratoderma
3. 学会等名 Gordon research conference(Epithelial differentiation and keratinization)(国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村田光麻	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 皮膚上皮細胞の分化と角化(別冊B10 Clinica 慢性炎症と疾患 皮膚疾患と慢性炎症)	

〔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
---------	---------