

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09740

研究課題名(和文) プロフィラグリンN末領域による細胞死の分子機構の解明と皮膚癌治療への展開

研究課題名(英文) Pathomechanism of cell death induced by N-terminal fragment of profilaggrin

研究代表者

牧野 輝彦 (Makino, Teruhiko)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：90359711

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)：ProfilaggrinのN末領域(proFLG-N)は核内に移行しDNAを分解、細胞死を誘導する。この機序としてカルパインIを介するシグナルが関与し、さらにapoptosis-inducing factorの関与も示唆された。proFLG-Nと結合する分子をプロテオミクス解析にて検索したところ、pininが同定され、その両者が核内で直接結合すること、pinin自体が細胞死と直接関与することも見出した。さらにproFLG-Nの最もN末端に存在する19アミノ酸を皮膚有棘細胞癌の株細胞であるHSC-1細胞に導入したところほぼ全てが細胞死に至り、有棘細胞癌の新規治療になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Profilaggrin plays a critical role in keratinocyte terminal differentiation. During this process, a 55-kDa N-terminal fragment of profilaggrin (FLG-N) is translocated into the nucleus; thereafter, the cells became TUNEL-positive. We examined the molecular mechanism underlying the DNA degradation process induced by FLG-N in keratinocytes. Our findings suggest that calpain I and apoptosis-inducing factor may be associated with the FLG-N inducing-DNA degradation. We also found that FLG-N directly interacted with pinin, a transcriptional activator binding to the E-box 1 core sequence of the E-cadherin promoter gene, within the nucleus. Surprisingly, the suppression of pinin expression can induce cell death in keratinocytes even without interaction with FLG-N. In addition, 19 amino acids present in the N-terminal profilaggrin can induce cell death for squamous cell carcinoma (SCC) cell line HSC-1. We therefore hypothesized that FLG-N may be a novel therapeutic target in SCC.

研究分野：Keratinocyte biology

キーワード：profilaggrin 表皮 角化 細胞死 カルパイン

1. 研究開始当初の背景

皮膚の終末分化である「角化」は皮膚のバリア形成過程であると同時に生物学的に細胞死のひとつであり、皮膚組織構築のなかで極めて重要な位置を占める。この過程には loricrin や profilaggrin、transglutaminase 1 など多くの分子が協調的に関与している。しかし、これらの角化関連分子の制御機構や細胞死の誘導メカニズムに関しては未だ十分に解明されていない。Profilaggrin はこの角化において中心的な役割を担う分子であり、N 末端に Ca²⁺-binding domain である EF hand domain を有しそれに多くの反復配列が続く、いわゆる fused-type の S100 タンパク質である。Profilaggrin は角化の過程で切断され filaggrin となり、ケラチンを重合し皮膚のバリア形成に寄与する。Filaggrin 遺伝子の変異が尋常性魚鱗癬の原因であり (Smith FJ et al, Nat Genet 2006)、アトピー性皮膚炎の発症にも関与していることが報告されている (Palmer CNA et al, Nat Genet 2006)。一方、profilaggrin が切断される際、EF hand domain を含む N 末領域 (proFLG-N) は核内に移行することが知られている。 (Ishida-Yamamoto A et al, Laboratory Invest 1998; Pearton DJ et al, J Invest Dermatol 2001)。

我々はこの proFLG-N に着目しその機能解析を以前より行っている。これまでに proFLG-N が核内に移行し DNA を分解し細胞死を誘導すること、その機能に proFLG-N の A domain が関与していることを見出した。同時に、mesotrypsin により profilaggrin から proFLG-N が切断されること、さらに DNA の分解には caspase14 により inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) から遊離した Caspase-activated DNase (CAD) も関与していることを明らかにした (Yamamoto-Tanaka M, Makino T et al, Cell Death Dis 2014)。

一方、皮膚有棘細胞癌は早期に完全に切除されれば治癒に至るが、時に進行例も存在する。進行し他臓器へ転移した有棘細胞癌に対しては放射線療法やシスプラチンとアドレミアミシンの併用化学療法などが行われるが、その奏功率は決して十分ではない。近年、様々な癌に対して分子標的薬や癌ペプチド免疫療法など新規治療が開発され、各種癌患者の予後の改善に大きく寄与している。しかし、皮膚有棘細胞癌に対する分子標的薬など新しい治療法は未だになく有効な治療法が開発が望まれる。我々は proFLG-N の細胞死誘導作用を皮膚有棘細胞癌の治療に発展させるにあたり、その操作性の向上を目的にこの領域を 19-20 アミノ酸からなるペプチドに分解し細胞死に関与するコア領域の同定を試みた。ペプチドを核内に誘導するため N 末に HIV の TAT 配列を結合させたペプチドを合成し、これらを培養表皮角化細胞や HaCaT 細胞に導入したところ、最も N 末端に存在するペプチド (1-19 アミノ酸; 1-19proFLG-N) で細胞死が誘導された。これらのペプチドで

処理した細胞を annexin V/PI 用いて FACS 解析を行ったところ処理後 30 分でほとんどの細胞が後期アポトーシス/ネクロシスの分画に存在していた。

2. 研究の目的

(1) proFLG-N による細胞死の分子メカニズムの解明

本研究では proFLG-N が核内に移行した後、どのようなメカニズムで細胞死に至るのかを解明する。小胞体ストレスなど既知のアポトーシス誘導シグナル経路との関連や近年報告された細胞死のひとつであるネクロトーシスとの関連を検討する。さらに核内に存在し proFLG-N と結合しうる蛋白質として同定された pinin との相互作用について検討する。

(2) proFLG-N を用いた皮膚有棘細胞癌に対する新規遺伝子治療の開発

培養表皮角化細胞や HaCaT 細胞株において細胞死を顕著に誘導する proFLG-N の N 末端 19 アミノ酸 (1-19proFLG-N) が癌細胞株においても細胞死を誘導しうるか検討する。

3. 研究の方法

(1) proFLG-N による細胞死の分子メカニズムの解明

proFLG-N とアポトーシス誘導シグナル経路の関連の検討

本研究では全 caspase の経路を阻害する Z-VAD-fmk、カテプシン B を介する経路を阻害する CA074-ME、カルパインを介する経路を阻害する ALLN や PD155606 で処理した培養表皮角化細胞に proFLG-ABT construct を導入し、TUNEL 陽性細胞数の変化を指標に細胞死に及ぼす影響を検討する。また caspase 非依存性に DNA 分解を誘導する AIF や ENDO-G の関与について proFLG-N 導入による AIF、ENDO-G の細胞内局在の変化により検討する。

proFLG-N による細胞死におけるネクロトーシスの関与の検討

これまでの TAT-1-19proFLG-N を導入 30 分後の細胞の FACS 解析において、ほとんどの細胞が後期アポトーシス/ネクロシスの分画に存在することが観察されている。以上の結果より、この細胞死がネクロトーシスの経路を介するのかを検討する。この経路の key mediator である receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) や RIPK3 の阻害薬である necrostatin-1 で処理した培養表皮角化細胞に proFLG-ABT construct を導入して細胞死への関連を検討する。

皮膚組織構築における proFLG-N と各種アポトーシス誘導シグナルの関与の検討

各種アポトーシス阻害薬による proFLG-N の細胞死の抑制が皮膚組織構築においても影響しうるのかを皮膚 3 次元培養系を用いて検証する。

proFLG-N と結合する蛋白質 pinin の表皮に

おける発現・機能解析

pinin はプロテオミクス解析により核内に存在し proFLG-N と結合する蛋白質として同定され。しかし、皮膚や表皮における pinin の発現や機能に関しては未だ報告がない。そのため、まず正常および疾患皮膚、培養表皮角化細胞における pinin の発現の検討する。さらに、リコンビナント pinin 蛋白質を作製し、免疫沈降法による pinin 蛋白質と proFLG 蛋白質の結合の確認する。また、Proximity Ligation Assay による表皮における pinin と profilaggrin の局在の近接性も検討する。

proFLG-N による細胞死と pinin との関連の検討

siRNA で pinin を抑制した細胞に proFLG-ABT construct や TAT-1-19proFLG-N を導入し、pinin が細胞死のどのように関与しているか検討する。

(2) proFLG-N を用いた皮膚有棘細胞癌に対する新規遺伝子治療の開発

TAT-1-19proFLG-N の癌細胞株に対する細胞死誘導効果の検証

profilaggrin の最も N 末端の 19 アミノ酸を有する合成ペプチド TAT-1-19proFLG-N が皮膚有棘細胞癌の株細胞である A431、HSC-1 に対しても細胞死を誘導するかどうか検討する。

担癌動物を用いた TAT-1-19proFLG-N の抗腫瘍効果の検討

免疫不全マウスの皮下に有棘細胞癌を摂取した担癌動物モデルを作製し、TAT-1-19proFLG-N を腫瘍内に投与することにより癌のサイズの縮小や転移の抑制がみられるかを肉眼的所見と組織学的所見により検討する。同時に TUNEL 染色も行い腫瘍細胞死の客観的評価を試みる。

4. 研究成果

(1) proFLG-N による細胞死の分子メカニズムの解明

proFLG-N とアポトーシス誘導シグナル経路の関連の検討

Z-VAD-fmk、CA074-ME、ALLN、PD155606 で処理した培養表皮角化細胞に proFLG-ABT construct を導入し TUNEL 陽性細胞数の変化を検討したところ PD155606 で処理した細胞で、有意に TUNEL 陽性細胞が減少していた。この結果よりカルパイン I を介する経路の関与が示唆されたため siRNA でカルパイン I を抑制し proFLG-ABT construct を導入したところ同様に TUNEL 陽性細胞数が減少した。また proFLG-N 導入より TUNEL 陽性になった細胞では核内に AIF が局在しており、proFLG-N による細胞死にカルパイン I-AIF シグナルが関与している可能性が示唆された。

proFLG-N による細胞死におけるネクロプトーシスの関与の検討

necrostatin-1 で処理した培養表皮角化細胞に proFLG-ABT construct を導入して TUNEL 陽性細胞数の変化を検討したが対象と比較し有意な減少は認めなかった。

皮膚組織構築における proFLG-N と各種アポトーシス誘導シグナルの関与の検討

カルパイン I が proFLG-N による細胞死に関与していることが示唆されたため、siRNA でカルパイン I を抑制した表皮角化細胞を用いて 3 次元培養系で皮膚組織構築を試みた。その結果、皮膚の重層化は対照群と有意な差はみられなかったが、カルパイン I の抑制により角層内に多くの核の残存が確認された。以上より in vivo においてもカルパイン I の経路が細胞死 (DNA の分解) に関与している可能性が示唆された。

proFLG-N と結合する蛋白質 pinin の表皮における発現・機能解析

核内に局在する pinin を認識する抗体を用いて正常皮膚や疾患皮膚、培養表皮角化細胞の染色を行ったところ、表皮全層の細胞の核で発現が確認された。同様に培養表皮角化細胞においても分化度に関わらず核内で陽性所見が確認された。

proFLG-N による細胞死と pinin との関連 proFLG-N と結合する分子をプロテオミクス解析にて検索したところ、その候補として pinin が同定された。また、pinin と proFLG のリコンビナント蛋白質を用いた免疫沈降法では両者の結合が確認された。また、Proximity Ligation Assay では表皮顆粒層において pinin と profilaggrin が非常に近接して局在していることが示された。さらに siRNA により pinin を抑制したところ培養表皮核細胞 TUNEL 陽性数が有意に増加し pinin 自体が細胞死と直接関与することを見出した。

(2) proFLG-N を用いた皮膚有棘細胞癌に対する新規遺伝子治療の開発

TAT-1-19proFLG-N の癌細胞株に対する細胞死誘導効果の検証

proFLG-N の最も N 末端に存在するペプチド (1-19 アミノ酸; 1-19proFLG-N) を皮膚有棘細胞癌の株細胞である A431、HSC-1 処理した細胞に導入し、30 分後に annexin V/PI 用いて FACS 解析を行ったところほとんどの細胞が後期アポトーシス/ネクロトーシスの分画に存在していた。

担癌動物を用いた TAT-1-19proFLG-N の抗腫瘍効果の検討

現在担癌動物モデルにおける TAT-1-19proFLG-N の腫瘍増殖抑制効果を検討中である。

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 25 件)

1. Inflammatory cytokine-mediated induction of serine racemase in atopic dermatitis. Yoshihisa Y, Nakagawa M, Rehman MR, Matsukuma S, Makino T, Mori H, Shimizu T. J Cell Mol Med 2018 in press
2. Nerve alterations showing autophagy in two patients with lichen aureus. Yanagihara M,

- Makino T, Shimizu T, Mochizuki T. *J Cutan Pathol.* 2018; 45: 423-7.
3. Monitoring of IgA antibodies to epidermal and tissue transglutaminases over an 18-month period in a Japanese patient with dermatitis herpetiformis. Kurosaki Y, Suga Y, Negi O, Takamori K, Ishii N, Makino T, Shimizu T, Hashimoto T. *J Dermatol.* 2018 in press
 4. A novel missense mutation in exon3 of the TRPS1 gene in a patient with a mild phenotype of tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1. Torai R, Makino T, Mizawa M, Shimomura Y, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2018; 28: 271-2.
 5. A case of lichen planus pemphigoides with palmoplantar hyperkeratosis. Mizawa M, Makino T, Hayashi M, Furukawa F, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2018; 28: 100-17.
 6. Recurrent deep vein thrombosis with a protein S Tokushima mutation. Torai R, Makino T, Mizawa M, Hayashi M, Furukawa F, Niimi H, Shimizu T. *Br J Dermatol.* 2018; 178: e7-e8.
 7. Efficacy of new low-dose oral anticoagulants in recalcitrant livedoid vasculopathy. Furukawa F, Mizawa M, Makino T, Torai R, Shimizu T. *BMJ Case Rep* 2017; 2017. pii: bcr-2017-219943.
 8. The six-year follow-up of a Japanese patient with silent erythropoietic protoporphyria. Mizawa M, Makino T, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. *JAAD Case Rep* 2017; 3: 169-71.
 9. Detection of human papillomavirus type 35 in recurrent Bowen's disease lesions of the fingers. Makino T, Hara H, Mizawa M, Shimizu A, Kaira K, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2017; 27: 198-200
 10. Increased Serum Levels of Th2-type Cytokines and Eotaxin in Fibrillar-type Dermatitis Herpetiformis. Makino T, Yoshihisa Y, Mizawa M, Tsutsui K, Nishijima C, Inaoki M, Shimizu T. *Acta Derm Venereol.* 2017; 97: 642-3
 11. An intermediate vascular tumour between kaposiform hemangioendothelioma and tufted angioma with regression of the skin lesion. Makino T, Ishida W, Hamashima T, Mizawa M, Sasahara M, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2017; 27: 175-176
 12. Mugwort-Mustard Allergy Syndrome due to Broccoli Consumption. Sugita Y, Makino T, Mizawa M, Shimizu T. *Case Rep Dermatol Med.* 2016; 2016: 8413767.
 13. RAC1 activation drives pathologic interactions between the epidermis and immune cells. Winge MC, Ohyama B, Dey CN, Boxer LM, Li W, Ehsani-Chimeh N, Truong AK, Wu D, Armstrong AW, Makino T, Davidson M, Starcevic D, Kislat A, Nguyen NT, Hashimoto T, Homey B, Khavari PA, Bradley M, Waterman EA, Marinkovich MP. *J Clin Invest.* 2016; 126: 2661-77.
 14. Jumihaidokuto (Shi-Wei-Ba-Du-Tang), a Kampo Formula, Decreases the Disease Activity of Palmoplantar Pustulosis. Mizawa M, Makino T, Inami C, Shimizu T. *Dermatol Res Pract.* 2016; 2016: 4060673.
 15. Hodgkin's lymphoma presenting as subcutaneous masses in the left upper arm. Makino T, Hara H, Hamashima T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. *J Dermatol.* 2016; 43: 1244-6.
 16. The expression profile of filaggrin-2 in the normal and pathologic human oral mucosa. Makino T, Mizawa M, Inoue S, Noguchi M, Shimizu T. *Arch Dermatol Res.* 2016; 308: 213-7.
 17. Annular pustular psoriasis associated with colon cancer. Hara H, Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2016; 26: 104-5.
 18. Incomplete erythropoietic protoporphyria caused by a splice site modulator homozygous IVS3-48C polymorphism in the ferrochelatase gene. Mizawa M, Makino T, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. *Br J Dermatol.* 2016; 174: 172-5.
 19. A novel deletion mutation of the ATP2C1 gene in a family with Hailey-Hailey disease. Makino T, Shimizu K, Mizawa M, Nakano H, Sawamura D, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2016 Aug 1;26(4):414-6.
 20. Decreased filaggrin-2 expression in the epidermis in a case of pityriasis rotunda. Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. *Clin Exp Dermatol.* 2016 Mar;41(2):215-7.
 21. Exacerbation of symptoms in Blau syndrome/early-onset sarcoidosis following delivery. Mizawa M, Makino T, Nakamura T, Yamaguchi S, Taki H, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2015; 25: 620-2.
 22. Detection of cytomegalovirus in the gastric ulcer of a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome. Kagoyama K, Makino T, Ueda C, Takegami Y, Shimizu T. *JAAD Case Rep.* 2015; 1: 215-8.
 23. Detection of IgG antibodies to desmoglein 3 and desmocollins 2 and 3 in mucosal dominant-type pemphigus vulgaris with severe pharyngalgia and hyperemia of the bulbar conjunctiva. Makino T, Hara H, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Ishii N, Hashimoto T, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2015; 25: 619-20.
 24. Extramammary Paget's disease occurring in the context of Cowden syndrome: true association or mere coincidence? Matsui K, Makino T, Mizawa M, Hamashima T, Hanakawa H, Hatta N, Sasahara M, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2015; 25: 89-91.
 25. Late presentation of X-linked dyskeratosis congenita with a missense mutation in codon 350 of the dyskerin protein. Mori N, Makino T, Mizawa M, Kagoyama K, Kanegane H, Sakaguchi H, Miyazono T, Kojima S, Shimizu T. *Eur J Dermatol.* 2015; 25: 75-6.

〔学会発表〕(計12件)

1. Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Shimizu T. The effect of ultraviolet B irradiation in the expression of trichohyalin-like 1 protein. The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology; 2017 Dec 15-17; Kochi.
2. Makino T, Mizawa M, Yoshihisa Y, Shimizu T. The expression of trichohyalin-like 1 protein in human skin xenotransplants is enhanced by ultraviolet B irradiation. The 47th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research; 2017 Sep 27-30; Salzburg, Austria
3. 牧野輝彦. ターゲット型エキシマランプ VTRACTM が拓げる皮膚疾患の治療(ランチョンセミナー). 第81回日本皮膚科学会東京支部学術大会; 2017 Nov 18-19; 東京
4. 牧野輝彦、三澤 恵、吉久陽子、清水忠道. Trichohyalin-like 1 protein は紫外線により発現が増強する. 第39回日本光医学・光生物学会; 2017 July 21-22; 名古屋
5. 牧野輝彦、原 寛、三澤 恵、清水 晶、解良恭一、清水忠道. HPV35型が検出された手指のBowen病. 第279回日本皮膚科学会東海地方会; ; 2017 Mar 11; 津.
6. 牧野輝彦. 表皮角化関連分子から見たアトピー性皮膚炎(特別講演). 第22回スキンケア研究会; 2017 Feb 2; 静岡.
7. 牧野輝彦、宮園卓宣、中島隆彦、三澤恵、清水忠道. 色素性蕁麻疹患者に生じた原発性皮膚 MALT リンパ腫の1例. 第80回日本皮膚科学会東部支部学術大会; 2016 Oct 29-30 浜松
8. Makino T, Yoshihisa Y, Mizawa M, Tsutsui K, Nishijima C, Inaoki, M, Shimizu T. Increased serum levels of Th2-type cytokines and eotaxin in fibrillary-type dermatitis herpetiformis. The 46th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research; 2016 Sep 6-10 Munich, Germany
9. Makino T, Mizawa M, Seki Y, Hayashi M, Shimizu T. Decreased filaggrin-2 expression in the epidermis in a case of pityriasis rotunda. The 40th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015 Dec 11-13, Okayama
10. 牧野輝彦. 桂枝茯苓丸の慢性炎症性皮膚疾患における治療効果とその作用機序. 第66回日本東洋医学会学術総会; 2015 Jun 12-14 富山市
11. 牧野輝彦. 物理性蕁麻疹. 第114回日本皮膚科学会総会; 2015 May 29-31; 横浜市
12. 牧野輝彦、清水教子、三澤 恵、中野 創、澤村大輔、清水忠道. 新規 deletion mutation を検出した Hailey-Hailey 病の1家系. 第377回日本皮膚科学会新潟地方会; 2015 Apr 17; 新潟市

〔図書〕(計2件)

- 牧野輝彦, 清水忠道. 多形滲出性紅斑. 「皮膚科研修医ノート」. 診断と治療社, p286-287, 2016
- 牧野輝彦. 魚鱗癬. 「今日の治療指針2016」, 医学書院, p1252, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野 輝彦 (MAKINO, Teruhiko)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
准教授
研究者番号: 90359711

(2)研究分担者

清水 忠道 (SHIMIZU, Tadamichi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授
研究者番号: 70260396