

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09782

研究課題名(和文) CHILD症候群の皮疹形成メカニズムに基づいたケブネル現象の解析と他疾患への応用

研究課題名(英文) Mechanism of Koebner phenomenon in CHILD syndrome

研究代表者

梅垣 知子(Umegaki, Noriko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80397629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CHILD症候群は、末梢コレステロール生合成経路のNSDHL変異により乾癬様の皮疹を呈するが、内因性のコレステロール中間代謝物と皮膚炎発症のメカニズムについての詳細な検討は未だ行われていない。

培養HaCaT細胞にNSDHL阻害剤を添加し、48時間後に回収した。ガス・クロマトグラフィー(GC-MS)を用いてコレステロール代謝物を測定したところ、数種類の異常な中間代謝物を検出した。これらのコレステロール中間代謝物は、CHILD症候群患者病変部皮膚から抽出したGC-MS結果と一致していた。コレステロール生合成経路に関わる阻害剤を培地に添加したところ、用量依存性に異常な中間代謝物の蓄積を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性コレステロール生合成経路の異常症であるCHILD症候群患者の皮膚におけるコレステロール代謝産物について詳細に解析し、異常な蓄積中間代謝物が表皮角化細胞の分化・増殖や免疫系に与える影響を検討した。異常な脂質代謝物が皮膚炎を惹起するメカニズムを明らかにすることで、将来的に皮膚の脂質異常による皮膚炎の治療の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：CHILD syndrome is a genetic disorder associated with a mutation of the NSDHL gene. The patients with CHILD syndrome present scaly erythema with Koebner phenomenon, however the mechanism of the skin eruption has been unclear. In this study, we performed Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) to analyze of the detailed cholesterol metabolites in CHILD syndrome and detected several unusual cholesterol metabolites in the affected skin. We also performed GC-MS using HaCaT cells treated by NSDHL inhibitor and detected identical unusual cholesterol metabolites, suggesting that our culture system could mimic the affected skin in CHILD syndrome in vitro.

研究分野：乾癬、遺伝性疾患

キーワード：ケブネル現象 CHILD症候群 コレステロール合成

1. 研究開始当初の背景

遺伝性コレステロール合成経路の異常症である CHILD 症候群は、NSDHL 酵素活性の低下によって片側性に紅斑、角化、落屑を伴う魚鱗癬様もしくは乾癬様の皮疹を生じる。CHILD 症候群の皮膚では間擦部や掻破部においてケブネル現象が見られるが、そのメカニズムは不明である。代表研究者らは慶應義塾大学病院を受診した計 5 名の CHILD 症候群患者のすべてについて遺伝子解析を行い診断確定を得ている。また皮疹部および無疹部の皮膚生検を施行し、皮膚で発現している NSDHL の mRNA をシークエンスしたところ、皮疹部とそれと同側の無疹部いずれも変異したアレルの発現が確認された。また、コレステロール代謝酵素の一つである CYP51 の免疫染色を行ったところ、無疹部と比較して皮疹部表皮有棘層上層において発現の上昇が確認され、CHILD 症候群の皮疹の病態には遺伝子変異以外の要因によってコレステロール代謝異常を惹起している可能性が示唆された。これらの結果から、申請者らは倫理委員会承認のもと CHILD 症候群患者の皮疹部に 1%アトルバスタチンローション・2%コレステロール液と CYP51 阻害薬である抗真菌剤オキシコナゾールの外用を行い、8 か月後には皮疹の著明な改善効果を確認している。

2. 研究の目的

本研究において CHILD 症候群患者の皮膚におけるコレステロール代謝産物について詳細に解析し、異常な蓄積中間代謝物が表皮角化細胞の分化・増殖や免疫系に与える影響を検討する。さらに CHILD 症候群患者皮膚でケブネル現象を起こすメカニズムについて *in vitro* の系で病態モデルを作成して検討し、乾癬などケブネル現象を認める他疾患について、ケブネル現象という共通性を通じて解析結果を応用することでこれらの疾患の病態を検討し、新しい治療法の開発へと発展させていくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常表皮角化細胞もしくは HaCaT 細胞の培地内にコレステロール代謝物/コレステロール代謝酵素阻害剤を添加し、表皮細胞の分化、増殖、細胞周期に与える影響について解析を行い、培養上清中の炎症性サイトカインについて検討し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) にてコレステロール代謝物の解析を行う。(2) 三次元培養皮膚に薬理的にコレステロール代謝異常を誘導し、*in vitro* 系で CHILD 症候群患者皮膚モデルを作成し(1)と同様に解析を行う。(3) CHILD 症候群患者の皮膚抽出物の GC-MS を行い、コレステロール代謝物の詳細な解析を行う。

4. 研究成果

In vitro の系で CHILD 症候群病変部の表皮を疑似的に作成するため、HaCaT 細胞を

10%FCS/DMEM 培地で培養後、70%コンフルエントの状態にてコレステロール除去培地に変更し、NSDHL 阻害剤である 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) を 30 μ M 培地に添加し、48 時間後に回収した。GC-MS を用いてコレステロール代謝物を測定したところ、17-OHP 無添加群と比較して、数種類の異常な中間代謝物を検出した。これらのコレステロール中間代謝物は、CHILD 症候群患者病変部皮膚から抽出した GC-MS 結果と一致しており、*in vitro* の系で CHILD 症候群の病変部表皮を疑似していることが確認できた。現在、構造決定の解析を行っている。さらに、コレステロール合成経路に関わる CYP51 阻害剤や HMG-CoA 阻害剤を培地に添加して異常な中間代謝物を GC-MS にて測定したところ、用量依存性に異常な中間代謝物の蓄積を抑制した。さらにヒト正常表皮角化細胞を用いた三次元培養皮膚を作成し、17-OHP を 30 μ M 培地に添加し、48 時間後に回収した。GC-MS を用いてコレステロール代謝物を測定したところ、17-OHP 無添加群と比較して、CHILD 症候群患者病変部皮膚と同様の異常な中間代謝物を検出した。

さらに、CHILD 症候群の皮膚における遺伝子発現プロファイルを検討するため、患者の病変部 (表皮) および健常部皮膚 (表皮) から total RNA を抽出し、RNAseq を行った。Gene ontology 解析では、skin development、epidermis development、keratinocyte differentiation などの遺伝子群に有意な上昇があり、一方で adaptive immune response の低下を認めた。これらの解析結果から、CHILD 症候群の皮膚に蓄積した異常な中間コレステロール代謝物によって、表皮の分化異常や免疫異常が起こり、皮膚炎が惹起されている可能性が示唆された。

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 11 件)

- 1) Horikawa H, Kurihara Y, Funakoshi T, Umegaki-Arao N, Takahashi H, Kubo A, Tanikawa A, Kodani N, Minami Y, Meguro S, Itoh H, Izumi K, Nishie W, Shimizu H, Amagai M, Yamagami J. Unique clinical and serological features of bullous pemphigoid associated with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Br J Dermatol*. 2018 Feb 25. doi: 10.1111/bjd.16479.
- 2) Horikawa H, Umegaki-Arao N, Funakoshi T, Amagai M, Tanaka M. Dermoscopy of pigmented invasive ductal carcinoma mimicking basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol*. 2017 Nov;58(4):326-327. doi: 10.1111/ajd.12671.

- 3) Baba Y, Umegaki-Arao N, Kimura Y: Successful treatment of intractable vulvitis circumscripta plasmacellularis via combination therapy with topical tacrolimus and tetracycline. *J Dermatol*. 2017 Oct;44(10):1183-1185. doi: 10.1111/1346-8138.13672.
 - 4) Honda A, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanikawa A, Amagai M, Kubo A: Somatic HRAS p.G12S mosaic mutation causes unilaterally distributed epidermal nevi, woolly hair and palmoplantar keratosis. *J Dermatol*. 2017 Jun;44(6):e109-e110. doi: 10.1111/1346-8138.13801.
 - 5) Umegaki-Arao N, Sasaki T, Fujita H, Aoki S, Kameyama K, Amagai M, Seishima M, Kubo A: Inflammatory Linear Verrucous Epidermal Nevus with a Postzygotic GJA1 Mutation Is a Mosaic Erythrokeratoderma Variabilis et Progressiva. *J Invest Dermatol*. 2017 Apr;137(4):967-970. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.016.
 - 6) Kinoshita-Ise M, Kubo A, Sasaki T, Umegaki-Arao N, Amagai M, Ohyama M: Identification of factors contributing to phenotypic divergence via quantitative image analyses of autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis with homozygous c.736T>A LIPH mutation. *Br J Dermatol*. 2017 Jan;176(1):138-144. doi: 10.1111/bjd.14836. Epub 2016 Dec 19.
 - 7) Sakiyama T, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Kosaki K, Amagai M, Kubo A: Case of dominant dystrophic epidermolysis bullosa with amniotic band syndrome. *J Dermatol*. 2017 Jan;44(1):102-103. doi: 10.1111/1346-8138.13449. Epub 2016 Apr 30.
 - 8) Kumagai Y, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Nakamura Y, Takahashi H, Ashida A, Tsunemi Y, Kawashima M, Shimizu A, Ishiko A, Nakamura K, Tsuchihashi H, Amagai M, Kubo A: Distinct phenotype of epidermolysis bullosa simplex with infantile migratory circinate erythema due to frameshift mutations in the V2 domain of KRT5. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Oct 12. doi: 10.1111/jdv.14005.
 - 9) Mukai M, Tanese K, Umegaki-Arao N, Kubo A, Takahashi H, Amagai M: Case of lymphoplasmacytic plaque in children: Analysis of the distribution of infiltrating immune cells. *J Dermatol*. 2016 Nov;43(11):1368-1370. doi: 10.1111/1346-8138.13413. Epub 2016 Apr 14.
 - 10) Gledhil KGledhill K, Guo Z, Umegaki-Arao N, Higgins CA, Itoh M, Christiano AM. Melanin Transfer in Human 3D Skin Equivalents Generated Exclusively from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One*. 2015 Aug 26;10(8):e0136713. doi:10.1371/journal.pone.0136713. eCollection 2015.
 - 11) Geyer MB, Radhakrishnan K, Giller R, Umegaki N, Harel S, Kiuru M, Morel KD, LeBoeuf N, Kandel J, Bruckner A, Fabricatore S, Chen M, Woodley D, McGrath J, Baxter-Lowe L, Uitto J, Christiano AM, Cairo MS. Reduced Toxicity Conditioning and Allogeneic Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Pediatr*. 2015 Jul 3. pii: S0022-3476(15)00559-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.05.051.
- 〔学会発表〕(計5件)
- 1) Mukai M, Fujita H, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Yasuda-Sekiguchi F, Isojima T, Kitanaka S, Amagai M, Kubo A. A familial case of nail patella syndrome with a heterozygous indel mutation of LMX1B detected by sequencing and luciferase reporter assay. 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017
 - 2) Nomura H, Kurihara Y, Saito M, Yamagami J, Funakoshi T, Amagai M, Umegaki-Arao N, Kubo A. Azathioprine-induced anagen effluvium and leukopenia associated with NUDT15 polymorphisms. 10th World Congress for Hair Research, 2017
 - 3) Toshima S, Kurihara Y, Nomura H, Yuichiro Hayashi Y, Christiano AM, Amagai M, Umegaki-Arao N. A case of alopecia areata multiplex after injecting an autologous dermal micro-graft for treatment of androgenetic alopecia. 10th World Congress for Hair Research, 2017
 - 4) Umegaki-Arao N, Sasaki T, Fujita H, Aoki S, Amagai M, Seishima M, Kubo A. The identification of a postzygotic GJA1 mutation in a patient with an inflammatory linear verrucous epidermal nevus suggests that the disease is a mosaic of erythrokeratoderma variabilis et progressiva. 47th Annual Meeting of the European Society of Dermatological Research, Salzburg, Austria, 2017
 - 5) Hiroto Horikawa, Yuichi Kurihara, Jun Yamagami, Takeru Funakoshi, Noriko Umegaki-Arao, Hayato Takahashi, Akiharu Kubo, Kentaro Izumi, Wataru Nishie, Masayuki Amagai :Clinical features of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4) inhibitors associated bullous pemphigoid (BP) experienced in Keio University. 12th German-Japanese Society of Dermatology, 2016
- 〔図書〕(計1件)

堀川弘登、梅垣知子、船越建、田中勝、
Visual Dermatology Vol.14 2015 乳輪部の
黒褐色局面を呈した乳がん p.1386-1387

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梅垣 知子 (UMEGAKI, Noriko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 80397629

(2)研究分担者

久保 亜紀子 (KUBO, Akiko)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任講
師
研究者番号 : 50455573

久保 亮治 (KUBO, Akiharu)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授
研究者番号 : 70335256