

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19707

研究課題名(和文)ヘイリーヘイリー病疾患モデルを用いた病態形成におけるストレス応答の関連性の検討

研究課題名(英文)The study of relationship between stress response and pathogenesis of Hailey Hailey disease using cell culture model

研究代表者

松田 光弘(MATSUDA, Mitsuhiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70569368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘイリーヘイリー病(HHD)は希少疾患であり動物モデルが存在しないことから、病態は未解明である。本研究では患者培養細胞およびRNAiで遺伝子をノックダウンしたケラチノサイトを用いて、HHDの三次元培養疾患モデルの作成を行った。さらに疾患モデルを用いた検討によって、HHDの病態形成に小胞体ストレス、ゴルジ体ストレスが関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The precise mechanism of development of skin lesions in Hailey-Hailey disease (HHD) remains unclear, mainly because of difficulty in obtaining skin samples due to the rarity of HHD and lack of an animal model. In this study, we generated 3D culture models using primary keratinocytes derived from an HHD patient and keratinocytes in which ATP2C1 mRNA was down-regulated with the RNAi method. Furthermore, we showed that endoplasmic reticulum and golgi stress may contribute to the pathogenesis of this disease.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ヘイリーヘイリー病 疾患モデル 三次元培養 RNAi 小胞体ストレス ゴルジ体ストレス

1. 研究開始当初の背景

ヘイリーヘイリー病 (HHD) は常染色体優性遺伝性角化症である。間擦部に皮疹を形成し著明な疼痛を示すため、患者の QOL を著しく低下させ、病理組織学的には表皮細胞の接着障害や異常角化細胞の出現を特徴とする。

病因は SPCA1 と呼ばれるゴルジ体に存在するカルシウムポンプ (Ca²⁺-ATPase) であることが明らかにされているが、カルシウムポンプの異常に引き続き、いかなる分子の変化が接着異常や角化異常を形成するのかは未解明である。

近年小胞体ストレス応答機構の破綻が糖尿病、パーキンソン病やアルツハイマー病など様々な疾患の要因になっていることが報告されている。HHD においても、ゴルジ体のカルシウムポンプの異常によるゴルジ体の機能障害が、タンパク分泌経路上に位置する細胞小器官のストレス応答の異常を引き起こし病態形成に関わる可能性がある。

しかし原因遺伝子 *ATP2C1* の hemi-knockout マウスでは皮膚症状は見られず、HHD 患者より樹立した培養表皮細胞でも形態の異常は示さないため、HHD の実験モデルは存在せず、病態の解析が困難な状況であった。

2. 研究の目的

近年、HHD と同様に培養表皮細胞では形態の異常を示さない遺伝性皮膚疾患において、三次元培養皮膚をモデルとして用いた研究の報告がみられる。平面培養では細胞の性質が生体と大きく異なるため病態を形成できないと考えられるが、三次元培養はより生体の細胞の状態に近く生体内環境を模した実験モデルの確立に適している。

本研究は未だ病態が明らかにされておらず、疾患モデルも存在しない HHD について、三次元培養疾患モデルの作成を行い、病態形成における小胞体ストレス、ゴルジ体ストレスの関与を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) HHD 患者より樹立した培養表皮細胞および RNAi を用いて原因遺伝子をノックダウンした安定細胞株を用いて三次元培養皮膚を作成する。

(2) これらの三次元培養皮膚を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行い、小胞体ストレス、ゴルジ体ストレス応答に関連する分子の変動を明らかにする。

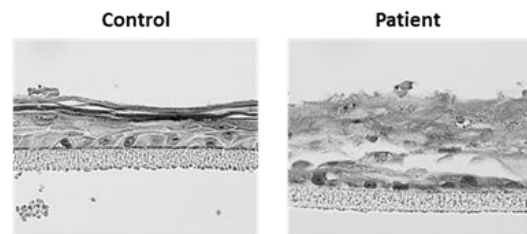
(3) ストレス抑制物質の投与下に改善がみられるかを調べる。

4. 研究成果

(1) まず HHD 患者より培養表皮細胞の樹立を行った。さらにレンチウイルスベクター (TRC2-pLKO-puro Sigma 社) に *ATP2C1* に対する shRNA を発現させ、polybrene を用いて表皮細胞へトランスダクションし、*ATP2C1* をノックダウンした安定細胞株を樹立した。その細胞を用いて患者表皮細胞と同様に三次元培養皮膚を構築した。

さらにポリカーボネート製の多孔性素材を用いたウェルインサートを使用し、それぞれの細胞から三次元培養皮膚を作成した。樹立された三次元培養皮膚は、表皮細胞接着障害や角化異常などの形態異常を示し (図 1)、ヘイリーヘイリー病の疾患モデルとして使用可能であると考えられた。

(図 1 HHD の 3 次元培養モデル)



(2) 作成した疾患モデルの遺伝子発現の解析を行い、CHOP、IRE1、Nrf2 等アポトーシスに関わるいくつかの分子の変動を確認することができた。またウエスタンブロット、免疫組織染色において、遺伝子発現の変化に伴うタンパク発現の変化が認められた。これらの結果から HHD の病態形成における細胞小器官ストレス応答の関与が示唆された。

(3) ストレス誘導性アポトーシスに対する抑制作用を持つと報告される薬剤エパルレスタット (50 μM)、還元型グルタチオン (1mM) 及びその前駆体 N-acetyl-L-cysteine (1mM) を投与下に三次元培養を行った。

薬剤の投与下で明らかな形態の変化は観察できなかったが、免疫染色で角化分子や細胞接着分子の発現変動を認めた。

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10件)

Shimada H, Takeo N, Saito-Shono T, Ishikawa K, Sakai T, Goto M, Hatano Y, Fujiwara S, Matsuda M, Hamada T, Nakama T, Hashimoto T, Kono M, Akiyama M, Kitajima Y. Superficial epidermolytic ichthyosis concomitant with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 28(1):94-96, 2018. (査読有)

Yasuda H, Kanazawa N, Matsuda M, Hamada T, Furumura M, Hashimoto T, Nakama T, Furukawa F. A Case of Hailey-Hailey Disease with a Novel Nonsense Mutation in the ATP2C1 Gene. *Ann Dermatol*. 29(5):642-644, 2017. (査読有)

Oyama N, Matsuda M, Hamada T, Numata S, Teye K, Hashimoto T, Hasegawa M. Two novel missense mutations of STS gene underlie X-linked recessive ichthyosis: understanding of the mutational and structural spectrum. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 30(9):1629-31, 2016. (査読有)

Numata S, Teye K, Karashima T, Matsuda M, Hamada T, Hashimoto T. Functional study of TGM1 missense mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis. *Exp Dermatol*. 25(8):657-9, 2016. (査読有)

Numata S, Teye K, Krol RP, Okamoto Y, Hashikawa K, Matsuda M, Fortugno P, Di Zeno G, Castiglia D, Zambruno G, Hamada T, Hashimoto T. A compound synonymous mutation c.474G>A with p.Arg578X mutation in SPINK5 causes splicing disorder and mild phenotype in Netherton syndrome. *Exp Dermatol*. 25(7): 568-70, 2016. (査読有)

Nishikawa R, Takahashi H, Matsuda M, Imaoka K, Ogawa M, Teye K, Tsuchisaka A, Koga H, Komorowski L, Probst C, Hachiya T, Fritzler MJ, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Krol RP, Muro Y, Morita E, Hashimoto T. Anti-early endosome antigen 1 autoantibodies were detected in a pemphigus-like patient but not in the majority of pemphigus diseases. *Exp Dermatol*. 25(5):368-74, 2016. (査読有)

Teye K, Suga Y, Numata S, Soejima M, Ishii N, Krol RP, Ohata C, Matsuda M, Honma M, Ishida-Yamamoto A, Hamada T, Koda Y, Hashimoto T. A founder deletion of corneodesmosin gene is prevalent in Japanese patients with peeling skin

disease: Identification of 2 new cases. *J Dermatol Sci*. 82(2):134-7, 2016. (査読有)

Matsuda M, Hamada T, Numata S, Teye K, Ishii N, Ohata C, Furumura M, Nakama T, Hashimoto T. A three-dimensional in vitro culture model of Hailey-Hailey disease. *Exp Dermatol*. 24(10):788-9, 2015. (査読有)

Ohata C, Matsuda M, Hamada T, Shintani T, Muto I, Nagata H, Furumura M, Nakama T. Loss of heterozygosity in a case of glomuvenous malformations. *J Dermatol*. 42(6):646-7, 2015. (査読有)

Numata S, Teye K, Krol RP, Karashima T, Fukuda S, Matsuda M, Ishii N, Furumura M, Ohata C, Saminathan SD, Ariffin R, Pramono ZA, Leong KF, Hamada T, Hashimoto T. Mutation study for 9 genes in 23 unrelated patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in Japan and Malaysia. *J Dermatol Sci*. 78(1):82-5, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 光弘 (MATSUDA, Mitsuhiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70569368

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()