

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16334

研究課題名(和文) 硬化性萎縮性苔癬の細胞外基質を標的とする免疫異常の病態解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Impaired function of extracellular matrix 1 alters the fibrogenic and carcinogenic properties: implications of underlying mechanisms for the pathogenesis of lichen sclerosus

研究代表者

宇都宮 夏子 (Utsunomiya, Natsuko)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・医員

研究者番号：50792090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：硬化性萎縮性苔癬は後天性に生じる炎症性皮膚疾患であり、ECM1が病態形成において重要である。培養ヒト線維芽細胞においてECM1の発現を低下させるとコントロール群に比較して、線維化や発癌に重要な間葉-上皮転換に関わる遺伝子群の発現異常が生じ、細胞の遊走能が有意に低下した。今回の検討により、硬化性苔癬の分子特異的な病態のさらなる真相解明に直結し、本症の早期診断や患者の生命予後を改善させる知見へと繋がる可能性が高く重要な成果であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗体を指標とした硬化性苔癬の血清診断ならびに病勢把握ツールの開発に向けた臨床応用の可能性を追求しながら、患者血清中に存在する抗ECM1抗体の病的意義の解明を目指した。ヒト線維芽細胞を用いてECM1を特異的に発現を低下させると連動する線維化と癌化に関与する遺伝子を同定した。これらの成果は、硬化性苔癬の分子特異的な病態のさらなる真相解明に直結し、本症の早期診断や患者の生命予後を改善させる知見へと繋がる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lichen sclerosus (LS) is an acquired inflammatory dermatosis that mainly affects anogenital area. Serum autoantibodies to extracellular matrix protein 1 (ECM1) in patients may hold clues in the underlying pathogenesis of LS. cDNA microarray comparing between ECM1-knockdown and control fibroblasts identified 3,035 differentially expressed genes, which related exclusively to protein binding for cell adhesion and proliferation, apoptosis, intracellular signaling, and extracellular matrix organization. Of these, laminin-332 and collagen-IV displayed unique immunolabeling of the basement membrane zone and dermal vessels in the LS skin by ECM1 knockdown. ECM1-knockdown fibroblasts exhibited a marked delay in cell migration and gel contraction. ECM1 gene silencing may prime selective dysregulation and disassembly of structural and extracellular matrix molecules in fibroblasts, reflecting the microstructural disorganization in LS pathology.

研究分野：皮膚疾患

キーワード：硬化性苔癬 ECM1 自己抗体 基底膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硬化性萎縮性苔癬(lichen sclerosus et atrophicus; LSA、以下、硬化性苔癬)は後天性に生じる炎症性皮膚疾患であり、診断や治療に難渋することが多い上に、局所の発癌が疾患予後を左右する。その病態には細胞外基質extracellular matrix protein 1(ECM1)に対する自己免疫異常の関与が指摘されているが、この病態特性を活かした分子レベルの診断・治療法の開発は、他の自己免疫性疾患に比べて大きく立ち遅れている。また、近年、遺伝子異常や疾患標識自己抗体の同定に関わる検査法は飛躍的に進歩し、前者では胎児診断や遺伝カウンセリング、後者では抗原や免疫グロブリン種に特異的なELISA法が確立されつつある。その一方、これらの疾患特性を活かした分子レベルでの治療法の開発は殆ど実用的なレベルに達していない。

近年、常染色体劣性遺伝形質を示す皮膚粘膜ヒアリノーシス(lipoid proteinosis; LiP)が、皮膚はもとより諸臓器へ広範囲に発現分布する細胞外基質ECM1の単一遺伝子変異で生じることが報告された(Hamada et al, Hum Mol Genet 2002)。一方、LiPと主要な病理組織像(表皮萎縮、真皮上層のヒアリン化や毛細血管拡張)が酷似していることを基盤に、硬化性萎縮性苔癬の患者血清中に高頻度でECM1を特異的に認識するIgG抗体の存在が示され(Oyama et al, Lancet 2003)、ECM1を標的とする遺伝病LiPと自己免疫異常LSAの病態メカニズムが明らかにされた。硬化性苔癬は、罹患率が高いこと(0.07-1.7%; Am J Clin Dermatol 2013)、ステロイド外用剤や保湿剤による対症療法や病勢コントロールが主体で根本的な治療法が無いこと、経過中に局所の悪性腫瘍(有棘細胞癌、黒色腫など)を高頻度で合併する(約7%; JAMA Dermatol 2015/Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2016)ことが診療上の大きな課題となっている。

申請者は、同一の分子を標的としながらも臨床像や病態が異なる皮膚疾患群に興味をもち、本学の遺伝性皮膚疾患専門外来や自己免疫性水疱症の臨床・研究に携わってきた。LSAは外陰部に好発するため、他科との境界領域の疾患としての位置付けも大きい上に、難治例や長期化した病変では局所の発癌が問題になる。このECM1分子に特異的な新規治療の開発や、LSAの早期血清診断の実用化を模索し続けてきた。その結果、高感度レーザー共焦点顕微鏡を用いた蛍光抗体間接法にて、LSA患者血清中の抗ECM1抗体をより簡便に同定できることに初めて成功した。さらに申請者グループは、長年ECM1ノックアウトマウスの作製に取り組んできたが、胎生初期に全て致死となり、ヒトLiPの表現型を反映する動物モデルは未だ存在しない。そのため、ヒトLiPへの遺伝子治療への応用や、in vivoにおけるECM1の生物学的重要性の追及が滞っている。一方、ECM1抗体の経皮投与によるLSAモデルマウス作製の試みは、疾患に特徴的な臨床像や病理組織像を再現できず、LSAの病態における本抗体の意義は未だ不明である(Oyama et al, J Clin Invest 2003/Int Trend Immunol 2015)。LSAの診断治療においては、他の自己免疫性疾患と同様に、客観的な早期診断と病勢や重症度の把握に有用なバイオマーカーの確立が望まれていた。血清中のECM1抗体の測定が、病初期の血清診断～病勢を反映するマーカーとしての有益性を検証した上で、診断ツールへとつなげていける可能性を含んでおり、その際の日常診療に与える影響は計り知れないと考えられる。

2. 研究の目的

上記を踏まえた更なる病態解明と未だ試みられていないECM1を標的とした分子標的治療法を確立すべく、本研究では、抗体を指標とした硬化性苔癬の血清診断ならびに病勢把握ツールの開発に向けた臨床応用の可能性を追求しながら、患者血清中に存在する抗ECM1抗体の病的意義を解明する。さらに病勢の異なる患者病変部皮膚の遺伝子発現の違いを網羅的に解析し、生体内におけるECM1機能障害に連動した線維化と癌化の感受性遺伝子を同定する。これらの成果は、硬化性苔癬の分子特異的な病態のさらなる真相解明に直結し、本症の早期診断や患者の生命予後を改善させる知見へと繋がる可能性が高い。さらに、この結果は、既存の治療に難渋する両疾患に分子特異的な治療法を提供するだけでなく、未だ両疾患で明らかにされていないECM1に関する深層の病態解明へつなげる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

既存のECM1ノックアウトマウスが全て致死に至る経験を踏まえ(Sercu et al, FEBS J 2005; Oyama et al, Acta Physiol 2005; Li et al, Nat Immunol 2011)患者血清中に存在する抗ECM1抗体の病的意義を解明するため、siRNAを用いてECM1をノックダウンした培養ヒト線維芽細胞における遺伝子発現に関してマイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。ECM1はin vitroで他の細胞外基質(ヒアルロン酸、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸など)や接着分子(ラミニン332、型コラーゲン、フィブリン)と結合し、皮膚の構造維持における「生物学的な糊」として機能している(Sercu et al, J Invest Dermatol 2009)。ECM1欠損細胞での種々の細胞外基質の発現、分布の変化をmRNA/タンパクレベルで解析し、ECM1が引き起こす細胞レベルでの遺伝子発現の変化を評価する。また、線維化や発癌に重要な間葉-上皮転換に関わる遺伝子群の発現異常が生じているか確認した。ECM1ノックダウン培養ヒト線維芽細胞を用いて、ECM1ノックダウ

ン培養ヒト線維芽細胞を用いて migration assay を行い細胞遊走能に与える変化を検討した。

硬化性苔癬症例の laminin-332 や COL-4 の発現を共焦点レーザー顕微鏡下での免疫染色により確認した。患者病変部皮膚における特定のヘミデスモソーム抗原が発現を検討した。

臨床に直結する研究の一環として、抗体価が低いため一般的な蛍光抗体間接法では同定が困難な血清中抗 ECM1 抗体をより簡便に同定する手法、ECM1 の主たる抗原エピトープを担う COOH 側のリコンビナント蛋白を分割作製し、患者血清との反応性を検討した。

4. 研究成果

ECM1 は in vitro で他の細胞外基質(ヒアルロン酸、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸など)や接着分子(ラミニン 332, 型コラーゲン, フィブリン)と結合し、皮膚の構造維持における「生物学的な糊」として機能している(Sercu et al, J Invest Dermatol 2009)。このことを考慮し、培養ヒト線維芽細胞は定常状態での ECM1 の発現を mRNA とタンパク質レベルで確認し、細胞の数によって発現量は比例して増加が見られた。これにより皮膚において ECM1 は線維芽細胞により産生されることが示唆された。ヒト培養線維芽細胞に対して siRNA により ECM1 の発現を低下させ、他の遺伝子の発現の変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した。線維化や発癌に重要な間葉-上皮転換に関わる遺伝子群の発現異常が生じているか確認した。その結果、KIT, CTGF, PDGF, SMAD7, TGFBR3, MDMD2, FBN1, collagens (COL4A1, 4A5, 4A6, and 5A1), and laminins (LAMA2, 3, and 4)の発現が大きく変動していた。この変化はリアルタイム PCR 法でも確認された。発現の変動した遺伝子に関して GO 解析を行うと“cell assembly or disassembly,” “structural molecules,” and “ECM constituent,” が有意に変動していた。ELISA による解析では mRNA における変化と同様に COL-4 1 と LAMA3 の発現の変動が確認された。

培養ヒト線維芽細胞において ECM1 の発現を低下させた際の遊走能を migration assay により評価した。コントロール群に比較して細胞の遊走能が有意に低下した。ゲルの収縮の検討でも ECM1 をノックダウンした群はコントロール群に比較してゲルの収縮が抑制された(図 1)。

硬化性苔癬症例の皮膚において laminin-332 や COL-4 の発現を共焦点レーザー顕微鏡下での免疫染色により確認したところ患者病変部皮膚において上記のヘミデスモソーム抗原が発現様式が健常皮膚と比較して不整になっていた(図 2)。ECM1 の主たる抗原エピトープを担う COOH 側のリコンビナント蛋白を分割作製し、患者血清との反応性を確認した。

本研究課題の推進により、ECM1 の発現低下や機能障害により線維化や発癌に重要な間葉-上皮転換に関わる遺伝子群の発現異常が生じていることを突き止め、診断と病態解明を実現する段階まで研究を進めた。

図 1.

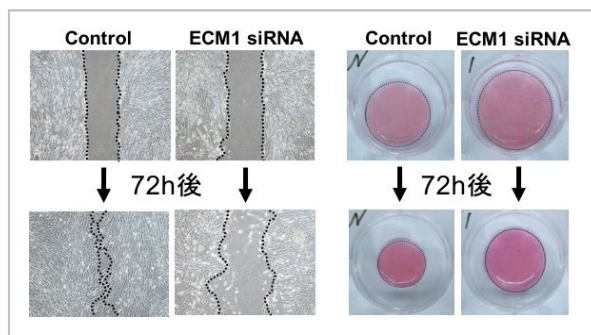
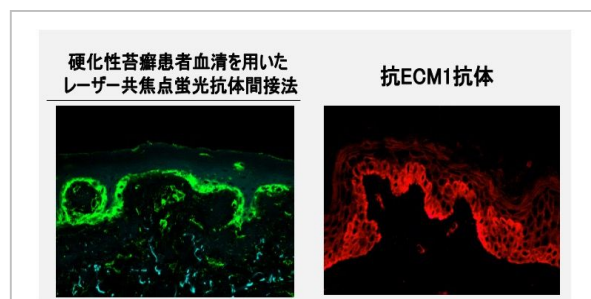


図 2.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Natsuko Utsunomiya
2. 発表標題 Detection of serum autoantibodies to extracellular matrix protein 1 (ECM1) and relevant abnormal expression of hemidesmosomal antigens in lichen sclerosus
3. 学会等名 International Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Natsuko Utsunomiya
2. 発表標題 Circulating IgG autoantibodies to ECM1 contribute to the altered expression of hemidesmosomal and vascular antigens in lichen sclerosus skin
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuko Utsunomiya
2. 発表標題 Serodiagnostic utility and in vivo expression profile of hemidesmosomal antigens in lichen sclerosus: a confocal laser scanning immunofluorescence microscopic study
3. 学会等名 2017 Annual Meeting-Society For Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuko Utsunomiya
2. 発表標題 Impaired function of ECM1 underlies the pathogenic disorganization of vascular and basement membrane molecules in lichen sclerosus
3. 学会等名 49th Annual ESDR Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----