

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08261

研究課題名(和文)皮膚におけるポルフィリン代謝の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of porphyrin synthesis in the skin

研究代表者

中野 創 (Nakano, Hajime)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90281922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの皮膚を構成する主要な3つの細胞である表皮角化細胞(KC)、真皮線維芽細胞(FB)、メラノサイト(MC)を対象として、ヘム生合成経路の9つの酵素の発現を調べた。各培養細胞から全RNAを抽出し、遺伝子発現をRT-PCRで調べたところ、ALAS2以外の8つの酵素をコードするすべての遺伝子の発現が確認された。次にKC、FB、およびMCから細胞質のタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を行ったところ、ALAS2以外の8つのヘム生合成関連酵素のタンパク発現が確認され、MCにおけるALAD、UROX、CPOX、PPOX、FECHのタンパク発現量が他の細胞と比較して有意に高いことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの皮膚構成細胞における、ヘム生合成経路で働く9つの酵素の遺伝子およびタンパク発現レベルを世界で最初に解析した。メラノサイトでの高い発現が証明され、この事実がメラノサイトのどのような生理的活動と関連するのかを明らかにするために、更なる研究が必要となり、学術的発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of nine enzymes involved in the heme biosynthesis pathway in epidermal keratinized cells (KC), dermal fibroblasts (FB), and melanocytes (MC), which are the three major cells that make up human skin. Total RNA was extracted from each cultured cell and the gene expression of heme biosynthesis-related enzymes was examined by RT-PCR. The expression of all genes encoding eight enzymes other than ALAS2 was confirmed. Cytoplasmic proteins were extracted from KC, FB, and MC and Western blotting was performed. Protein expression of eight heme biosynthesis-related enzymes other than ALAS2 was confirmed, and ALAD, UROX, CPOX, and PPOX in MC, FECH protein expression level was found to be significantly higher than in other cells.

研究分野：遺伝性皮膚疾患

キーワード：ポルフィリン症 遺伝性ポルフィリン症 ヘム生合成 ポルフィリン 表皮角化細胞 真皮線維芽細胞  
メラノサイト

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

ポルフィリン症は先天的あるいは後天的にポルフィリン代謝が障害され、生体組織にポルフィリン体が蓄積することによって、皮膚症状、神経精神症状、消化器症状を生じる複数の病型の総称である。皮膚症状が起きるメカニズムは皮膚にポルフィリン体が蓄積するためと、漠然と理解されていたが、表皮角化細胞その他、皮膚を構成する細胞におけるポルフィリン代謝の詳細は未だに明らかになっていない。光線過敏を主とする皮膚症状は生涯続くが、根治的治療はなく、皮膚でのポルフィリン合成系の詳細を調べることで新規治療法開発に必要である。また、劣性遺伝性の骨髄性プロトポルフィリン症では掌蹠角化症を生じることが知られているが、ポルフィリン体の増加と掌蹠の過角化との関係は全く不明である。ポルフィリン代謝異常と表皮の過角化との関係はこれまで研究されたことがなく、従来知られていない新知見が得られる可能性が極めて高い。

### 2. 研究の目的

皮膚を構成する主要な3つの細胞、表皮角化細胞、真皮線維芽細胞、およびメラノサイトにおけるヘム生合成関連酵素の発現状態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

1. ヒト初代培養表皮角化細胞、メラノサイト、皮膚線維芽細胞を用いて、それぞれの細胞におけるポルフィリン生成にかかわる9つの酵素の構成的発現を遺伝子レベル、タンパクレベルで調べる。遺伝子レベルの解析はRT-PCRを用いて行う。タンパクレベルの解析はウエスタンブロッティングにより検出したバンドをスキヤニングすることにより定量化する。
2. ヒト初代培養表皮角化細胞において分化誘導剤（カルシウム、活性型ビタミンD3）によって9つのポルフィリン生成関連酵素の発現がどのように変化するかを上記と同様の方法で検討する。
3. 上記3種の皮膚構成細胞においてどのような分子種のポルフィリン体あるいはその前駆体が、細胞内に生成あるいは培地中に分泌されているのかをHPLC法を用いて検討する。
4. 3種の皮膚構成細胞に $\delta$ -アミノレブリン酸を投与し、ポルフィリン関連酵素の発現や、ポル

フィリン体および前駆体の生成がどのような影響を受けるかを、デジタル RT-PCR、ウエスタンブロッティング、HPLC 法を用いて解析する。表皮角化細胞ではプロトポルフィリンの生成が増加することが予想されるが、その場合は分化で発現が増減するケラチン 1/10、ケラチン 5/14、VII型コラーゲン、フィラグリンなどの発現変化をデジタル RT-PCR、ウエスタンブロッティングで調べると同時に細胞の形態的变化も観察する。

5. ヒト表皮角化細胞由来不死化細胞 HaCaT 細胞を用いて、フェロケラターゼ遺伝子の誘導型遺伝子発現オフシステムを確立し、フェロケラターゼの酵素活性が致死的にならないレベルに低下させた状態で、ポルフィリン体の生成動態の変化を HPLC 法で調べる。患者由来の表皮角化細胞を使用することは倫理上困難であるため、人工的な疾患疑似細胞を作成する。この場合、プロトポルフィリン生成が増加すると予想されるので、前年度と同様に分化マーカーの変化を調べるとともに、可視光線照射による細胞障害の有無を細携帯観察、細胞数計数等で検討する

#### 4. 研究成果

ヒトの皮膚を構成する表皮角化細胞 (KC)、真皮線維芽細胞 (FB)、メラノサイト (MC) を対象として、ヘム生合成経路に関わる 9 つの酵素、ALAS2、ALAD、HMBS、UROS、UROD、CPOX、PPOX、FECH、CLPX (ヘム生合成関連酵素) の発現状態を解析した。KC、FB、および MC を初代培養し、各細胞から抽出した全 RNA を用いて、ヘム生合成関連酵素の遺伝子発現を RT-PCR で調べたところ、赤芽球系細胞で特異的に発現する ALAS2 以外の 8 つの酵素をコードするすべての遺伝子のメッセンジャー RNA 発現が確認された。次に、皮膚を構成する細胞におけるヘム生合成関連酵素のタンパク発現を調べるために、KC、FB、および MC から細胞質のタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を行ったところ、メッセンジャー RNA の発現と同様に ALAS2 以外の 8 つのヘム生合成関連酵素すべてのタンパク発現が確認された。さらに各細胞におけるヘム生合成関連酵素のタンパク発現量を比較したところ、MC における ALAD、UROS、CPOX、PPOX、FECH のタンパク発現量が他の細胞と比較して有意に高いことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito A, Okiyama N, Inoue S, Kubota N, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Watanabe R, Nakano H, Fujisawa Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Novel mutation of the ferrochelatase gene in a Japanese family with erythropoietic protoporphyria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e114-e116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15258.	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 -

1. 著者名 木岡茉奈, 兪 明寿, 谷崎英昭, 黒川晃夫, 森脇真一, 中野 創.	4. 巻 41
2. 論文標題 成人期に確定診断に至った骨髄性プロトポルフィリン症.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 皮膚病診療	6. 最初と最後の頁 657-660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 Matsui A, Akasaka E, Rokunohe D, Matsuzaki Y, Sawamura D, Nakano H.	4. 巻 93
2. 論文標題 The first Japanese case of familial porphyria cutanea tarda diagnosed by a UROD mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 65-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.11.004.	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 -

1. 著者名 丸田 志野, 宮下 梓, 中野 創, 尹 浩信.	4. 巻 41
2. 論文標題 骨髄性プロトポルフィリン症の家族例.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 皮膚病診療	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 浦野 聖子, 宇佐神 治子, 中野 創, 戸倉 新樹.	4. 巻 60
2. 論文標題 遺伝子解析により診断した多様性ポルフィリン症の1例.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 1345-1348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 中野 創	4. 巻 268
2. 論文標題 遺伝性皮膚疾患.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MB Derma	6. 最初と最後の頁 295-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 中野 創	4. 巻 107 s
2. 論文標題 ポルフィリン症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 診断と治療	6. 最初と最後の頁 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中野 創
2. 発表標題 わかりやすい遺伝性皮膚疾患
3. 学会等名 第34回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 創
2. 発表標題 遺伝性皮膚ポリフィリン症の診断スキル
3. 学会等名 第117回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 創
2. 発表標題 遺伝性皮膚ポリフィリン症の遺伝子診断
3. 学会等名 第40回日本光医学・光生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 創
2. 発表標題 皮膚ポリフィリン症
3. 学会等名 第69回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 創
2. 発表標題 ファブリー病の遺伝子解析
3. 学会等名 Fabry next generation meeting in Tohoku（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中野 創	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 310
3. 書名 皮膚疾患の最新の治療2019-2020.	

〔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
研究 分担者	澤村 大輔  (Sawamura Daisuke)  (60196334)	弘前大学・医学研究科・教授    (11101)	

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
---------	---------