

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16064

研究課題名(和文) 遺伝性皮膚疾患(GGCX症候群)における石灰化関連因子と石灰化抑制の研究

研究課題名(英文) Calcification related factors and inhibition of calcinosis in GGCX syndrome

研究代表者

大久保 佑美(OKUBO, Yumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：10770399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GGCX (-glutamyl carboxylase)症候群は -グルタミル基のカルボキシル化不全により皮膚石灰化症状を呈する。本研究ではGGCX症候群を中心とした皮膚石灰化疾患における、皮膚石灰化機序を解明する基礎研究として、抗石灰化分子fetuin-Aに着目し研究を行った。結果、GGCX患者の培養線維芽細胞上清においてfetuin-Aは検出されず、これは健常人でも同じ結果であった。血清のfetuin-A濃度は、皮膚石灰化類似疾患である弾性線維性仮性黄色腫において、健常人と同程度検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GGCX (-glutamyl carboxylase)症候群や弾性線維性仮性黄色腫(pseudoxanthoma elasticum: PXE)は皮膚石灰化をもたらす希少疾患であるが、その石灰化機序は判明しておらず、有効な治療法はない。本研究においては、循環における強力な抗石灰化因子であるfetuin-Aに着目して検討を行った。難治性皮膚石灰化疾患の理解・治療方法創出への足がかりとなることを期待する。

研究成果の概要(英文)：GGCX (-glutamyl carboxylase) syndrome is a rare disease, and it shows skin calcification symptoms due to insufficient carboxylation of -glutamyl group. In this study, we focused on the anti-calcification molecule fetuin-A to elucidate the skin calcification mechanism in patients with GGCX syndrome.

As a result, fetuin-A was not detected in the supernatant of culture fibroblast obtained from GGCX patients as well as from healthy subjects. Titer of serum fetuin-A in pseudoxanthoma elasticum patient, one of skin calcification diseases, was similar to that in healthy subjects.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚遺伝学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 石灰化を起こす遺伝性疾患において、鍵となる分子の特定と石灰化経路の抑制は、患者に大きな利益をもたらすと考えられる。弾性線維性仮性黄色腫 (pseudoxanthoma elasticum: PXE) は全身の弾性線維に異所性石灰化を来す希少な遺伝性結合組織疾患であるが (1人/30万人)、石灰化の機序は未だ不明のままである。GGCX (γ -glutamyl carboxylase) 症候群は、GGCX 遺伝子がコードする GGCC タンパク質の機能異常によって、皮膚弛緩症様症状や弾性線維の石灰化といった PXE 様の症状に加え、眼症状や凝固能異常など多彩な臨床像を呈する稀な疾患である。世界ではこれまでに 30 例ほどが報告されているが、患者数が少ないことからその病態解明には程遠い。これら 2 疾患は、最終的に異所性石灰化が致死的病態の中心となっていく。原因遺伝子の違いから石灰化経路の違いはあれ、最終的な結果が同じ点に至るという事実に関しては、それぞれの疾患に特異的に存在する機序が関与していると予想される。そして、それを解明することは、疾患治療法の開発につながっていくと考える。

(2) 抗石灰化作用が注目されている fetuin-A は、主に肝で合成される糖タンパク質である。各種石灰化疾患に関連していると想定されるが、GGCX 症候群においても石灰沈着に影響を与えている可能性がある (Vanakker OM et al, Lab Invest. 2010)。また PXE 患者血中で 30% まで減少しているという報告がある (Jiang Q et al, J Invest Dermatol. 2010)。

(3) 研究代表者は PXE と GGCC 症候群患者における皮膚症状の差は石灰化機序や程度の差によるものであり、両者間には石灰化関連因子の発現に差があるのではないかと考えた。そこで、GGCC 症候群患者の線維芽細胞を用いた石灰化関連因子の発現に関する研究発表を行ってきた。2017 年に、これまでに報告のない新たな GGCC 遺伝子変異を同定し、その患者線維芽細胞において、ウェスタンブロットや免疫細胞染色、ELISA にてタンパク質解析を行った。その結果、非カルボキシル化 MGP の貯留が明らかとなり、GGCC 機能不全に伴う低カルボキシル化状態であることが示唆された。また石灰化メディウムを用いた誘導試験では、患者線維芽細胞において骨分化条件のみならず通常培養条件下でも石灰化を認めた。また、アルカリフォスファターゼ、オステリックス、ペリオスチンといった骨・軟骨分化マーカーが高値を示し、GGCC 患者線維芽細胞が骨芽細胞へ分化しやすい性質を持つことを発表した (Okubo Y et. al. *PLoS One*. 2017)

2. 研究の目的

本研究では実際の PXE と GGCC 症候群患者の線維芽細胞と血清における fetuin-A の定量を行う。抗石灰化作用を有する Fetuin A が、これらの疾患生理に及ぼしている影響の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 通常の細胞培養

GGCC 患者 (n=1)、健常人 (n=2) の腹部皮膚を dish 上に静置し、10% fetal bovine serum (FBS; EQUITECH-BIO, Inc., Kerrville, TX) を添加した、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; NISSUI PHARMACEUTICAL Co. Ltd., Tokyo, Japan) を培地として、5% CO₂, 37°C のインキュベーターで線維芽細胞を培養し、P3 で回収した。

その後、それぞれ 4.0×10^5 の細胞を 6 well dish に蒔き、コンフルエントになった段階で PBS 洗浄し冷却した。RIPA Buffer (#9806S, Cell Signaling Technology) を添加、細胞を回収し、12,500 rpm で 10 min 遠心して上清を回収した。

(2) 石灰化メディウムにおける細胞培養

上記の細胞を、10% FBS 添加 DMEM に以下を添加した石灰化誘導メディウムにて、7 日間培養した; 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1 mM vitamin C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 10^{-8} M dexamethasone (Sigma-Aldrich), and 1% glutamine (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)。 (条件の詳細は Okubo Y et. al. *PLoS One*. 2017 に記載)

(3) ELISA 法

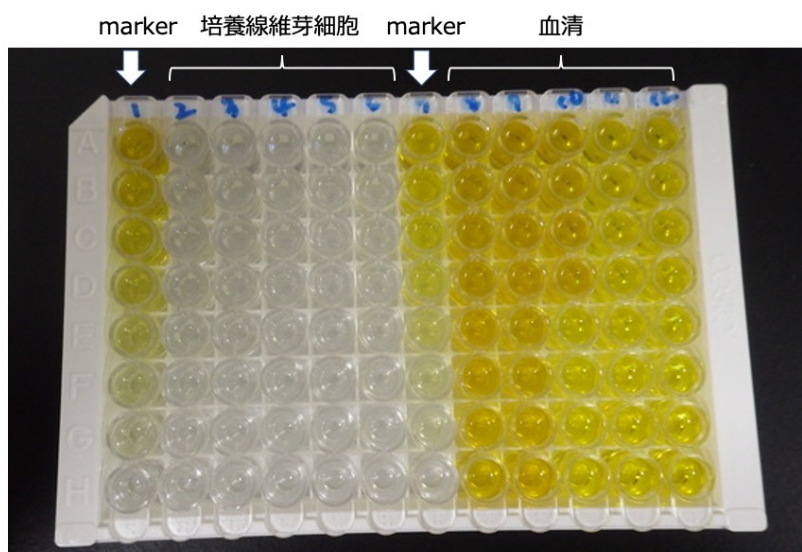
前述の通常培養線維芽細胞、石灰化メディウム培養線維芽細胞、血清 (PXE n=5, 健常人 n=5) について Quantikine ELISA, Human Fetuin A (R&D systems) を用いて、プロトコール通りに吸光度測定、standard から濃度算出した。

4. 研究成果

(1) まずは通常の細胞培養条件下にて、GGCC 患者線維芽細胞の fetuin A 産生能を検討した。結果、GGCC 患者線維芽細胞、コントロールとして用いた健常人の線維芽細胞いずれも、ELISA 法にて fetuin A 産生が見られなかった (図)。研究代表者の以前の検討より、特に GGCC 患者においては石灰化誘導メディウムによる培養条件下にて、強く線維芽細胞の石灰化が誘導された (Okubo

Y et. al. *PLoS One*. 2017)。同条件下にて、fetuin A 濃度を測定したが、通常の細胞培養条件下と同じく、産生は見られなかった。一方、PXE 患者血清、健常人血清について、fetuin A 濃度を ELISA 法にて測定したところ、PXE 患者 (1083 ± 117 ug/ml, n=5)、健常コントロール (1142 ± 218 ug/ml, n=5) と産生されていたが、有意差はなかった。GGCX 患者血清はサンプル回収不能であった。

(2) 本研究は強力な抗石灰化因子である fetuin A に着目して、GGCX 症候群、PXE といった皮膚石灰化疾患の病態解明を目指した。申請者は以前の研究により、石灰化条件にて GGCX 患者皮膚線維芽細胞の石灰化を確認していた。Fetuin A は主に肝で生成されるタンパク質ではあるが、皮膚という限局した部位においては線維芽細胞からも fetuin A が産生され、病態形成に寄与すると予想したが、結果として線維芽細胞から産生されることはなかった。また血液中を循環している Fetuin A 濃度に関して、PXE 患者の血清中では低下しているという報告があったが、申請者の検討では健常人と同程度の濃度であった。GGCX 症候群は、本邦において特に希少な疾患であり、血清入手できず検討できなかった。本研究の結果から、皮膚石灰化疾患における fetuin A のソースは線維芽細胞以外であると考えられる。産生源は、肝臓など皮膚以外の諸臓器であるが、どの臓器がどの程度 fetuin A を産生しているのか、そして皮膚石灰化の病態生理に寄与しているか否かは不明であり、今後の検討課題となる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa Kimie, Okubo Yumi, Masuyama Ritsuko	4. 巻 5
2. 論文標題 Vitamin Status and Mineralized Tissue Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 89 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-018-0174-2	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 Kuwatsuka Yutaka, Iwanaga Akira, Kuwatsuka Sayaka, Okubo Yumi, Murayama Naoya, Ishii Norito, Hashimoto Takashi, Utani Atsushi	4. 巻 45
2. 論文標題 Bullous pemphigoid induced by ipilimumab in a patient with metastatic malignant melanoma after unsuccessful treatment with nivolumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e21 ~ e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14043	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 小池雄太, 岩永聡, 大久保佑美, 宮副治子	4. 巻 80
2. 論文標題 Pseudo-pseudoxanthoma elasticum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 西日本皮膚科	6. 最初と最後の頁 179-180
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 江原大輔, 小池雄太, 大久保佑美, 松尾真稔, 石井文人, 橋本隆, 宇谷厚志	4. 巻 80
2. 論文標題 治療抵抗性腫瘍随伴性天疱瘡の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 西日本皮膚科	6. 最初と最後の頁 436-441
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 郡家佑美, 富村沙織, 西本勝太郎, 宇谷厚志	4. 巻 37
2. 論文標題 エタノール法を用い非観血的に虫体を除去し得たマダニ刺咬症の小児例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 92-97
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 岩永聡, 鎌塚大, 大久保佑美, 小池雄太, 宿輪哲生, 鳥山史, 赤星吉徳, 穠山雄一郎, 今福武, 宇谷厚志	4. 巻 60
2. 論文標題 Pseudoxanthoma Elasticum-like Papillary Dermal Elastolysis 8例の検討 Pseudoxanthoma Elasticumとの相違点を中心に	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 皮膚科の臨床	6. 最初と最後の頁 1408-1412
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小池雄太, 岩永 聡, 郡家(大久保)佑美, 宮副治子
2. 発表標題 弾性線維性仮性黄色腫類似の皮膚疾患
3. 学会等名 日本皮膚科学会第334回長崎地方会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩永 聡, 小池雄太, 郡家(大久保)佑美, 鎌塚 大, 宇谷厚志
2. 発表標題 【研究演題】PXE診療ガイドラインの公表
3. 学会等名 日本皮膚科学会第334回長崎地方会例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

小池雄太, 岩永聡 (研究協力者), 大久保佑美 (研究協力者): 本邦弾性線維性仮性黄色腫患者の重症度判定ならびにガイドライン作成. in 稀少難治性皮膚疾患に関する調査研究 (厚生労働科学研究費補助金難治性疾患政策研究事業) 平成29年度総括・分担研究報告書. (天谷雅行 (研究代表者) eds.) 東京; pp.31-32, 2018.

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