

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07044

研究課題名（和文）カルパインの酵素活性異常を介した難治性皮膚炎発症の分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the development of intractable dermatitis caused by abnormal enzymatic activity of calpain

研究代表者

秦 勝志（HATA, Shoji）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：10392375

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）：表皮は、大部分を表皮細胞が占める皮膚の最外層組織であり、体内の水分調節機能やバリア機能を担う。表皮肥厚性の皮膚炎である乾癬は代表的な難治性疾患であり発症機序は不明な点が多い。本研究では、乾癬の病態形成に細胞内カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパイン12(CAPN12)が関与することを見出した。さらに、CAPN12は表皮細胞において分化制御に機能し、CAPN12活性亢進が病態形成に繋がる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾癬は難治性の皮膚炎で、発症のメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、乾癬の発症に、細胞内カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパイン12(CAPN12)が関与することを見出し、マウスでCAPN12の働きを抑えると症状を抑制できることを示した。CAPN12がどのように乾癬発症に作用するのかを今後明確にすることで、CAPN12を標的とした新規治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The epidermis, located at the outermost layer of the skin, is largely composed of keratinocytes, and serves as a biological barrier. Psoriasis is a intractable inflammatory disease characterized by hyperproliferation of keratinocytes. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. This research revealed the involvement of CAPN12, a member of intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) family, in the development of psoriasis. Further analysis suggested that CAPN12 regulates the differentiation of keratinolytes, and that upregulation of CAPN12 contributes to the development of psoriasis.

研究分野：細胞内タンパク質分解

キーワード：カルパイン 乾癬

1. 研究開始当初の背景

カルパイン(CAPN)は、Ca²⁺によって活性化し、基質を限定切断して機能調節する細胞内プロテアーゼである。哺乳類には発現組織や構造に特徴を有する 15 種の分子種が存在する。これらはしばしば疾患の関連因子として同定され、治療の標的として注目されることから、分子種固有の機能を解明することの重要性が認識されている。

研究代表者は、消化管特異的分子種 CAPN8 について、機能不全モデルとして遺伝子欠損(KO)マウスと全身過剰発現(Tg)マウスを用いて機能の同定を進めていた。その結果、*Capn8*KO マウスが胃粘膜防御の脆弱化を示す一方、Tg マウスが出生数日で皮膚表皮の肥厚と角質脱落を伴う皮膚炎を呈することを明らかにした。Tg マウス皮膚では表皮関連遺伝子や特定の炎症性サイトカイン遺伝子が著しく発現上昇しており、乾癬に極めて近い症状であることが示された。

乾癬は、表皮の大部分を占める角化細胞の過増殖と分化不全を特徴とし、根治法がなく罹患率が高い免疫疾患である。近年、Th17 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞の過剰な免疫応答に伴う炎症性サイトカイン(IL-17 や IL-22)産生の増加が発症に関わることが明らかになり、効果的な抗サイトカイン製剤も登場した。しかし、発症には様々な遺伝・環境要因が関与しており、これらがどのように過剰な免疫応答に繋がるのか不明な点が多く、治療の副作用も問題となっている。

2. 研究の目的

*Capn8*Tg マウスでは異所的に CAPN8 の活性亢進が生じ、乾癬発症という表現型が引き起こされると考えられる。乾癬は表皮細胞の増殖・分化異常、リンパ球の浸潤などを所見とする疾患である。発症機序は未だ不明な点が多いが、遺伝子や環境因子の複合要因のもと、表皮細胞と免疫細胞との相互作用が病態の中心であると考えられている。免疫細胞側では Th17 細胞の過剰な活性化が発症に深く関与することが明らかになっているが、表皮細胞側で関与するシグナル経路には不明な点が多い。本研究は、*Capn8*Tg マウスの表現型発見を契機に、乾癬発症におけるカルパインの役割を解明し、新規治療法開発に繋がる分子基盤の確立を目指した。

3. 研究の方法

野生型マウスおよび *Capn8*Tg マウス皮膚における遺伝子の発現量を比較するため、それぞれの皮膚から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行った。プライマリー表皮細胞は、出生 0 日目のマウス皮膚から単離した。単離した細胞は未分化培地で増殖させ、Ca²⁺を添加することで分化誘導した。未分化細胞と分化細胞から total RNA を抽出した後 qRT-PCR を行い、分化マーカー遺伝子の発現量を解析した。乾癬発症モデルマウスは、免疫賦活化剤イミキモドを 1 日 1 回、数日間耳介に連続塗布することで、耳介に乾癬を誘導させることで作製した。乾癬を誘導後、耳介厚の測定または耳介 total RNA を抽出して qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

Capn8Tg マウスでは、表皮細胞の機能異常が起こる

乾癬は、表皮細胞の増殖・分化異常と Th17 を中心とした免疫応答の活性化との相互作用によって引き起こされる。CAPN8 が表皮細胞と免疫細胞どちらで作用するのか調べるため、乾癬の症状が見られる前である生後 0 日の Tg マウスの皮膚のマイクロアレイ解析を行ったところ、多くの表皮細胞関連因子の遺伝子発現上昇が見られた一方、免疫細胞の活性化を示すサイトカイン

ンの発現上昇は見られなかった。このことから、CAPN8 による表皮細胞の機能異常が発症に先行して起こることが示唆された。

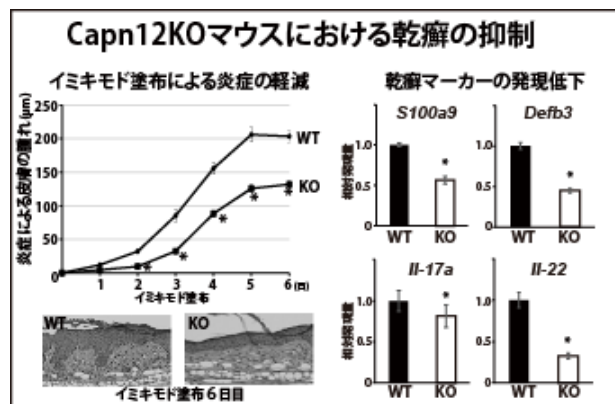
Capn8Tg マウスの表皮細胞は細胞分化が亢進する

表皮細胞で起こる異常について、細胞レベルでさらに解析した。表皮細胞は、表皮基底部の未分化細胞とこれが分化した細胞が層構造を形成する。野生型および Capn8-Tg マウス皮膚からプライマリー表皮細胞を単離し、この未分化状態及び分化状態の細胞を用いて各種遺伝子の発現解析を行った。その結果、分化状態において Capn8-Tg マウス由来の細胞ではあらゆる分化マーカーの発現が野生型由来の細胞よりも亢進しており、Capn8-Tg マウスの表皮細胞では細胞分化が亢進することが示された。

乾癬病態形成には CAPN12 が関与する

以上の結果は、乾癬の病態形成への CAPN8 の関与を強く示唆するが、これをさらに裏付けるために Capn8KO マウスに対してイミキモドによる乾癬誘発を行い、炎症による耳介肥厚を測定した。しかし、KO マウスでは症状が抑制されるとの予想に反し、症状の緩和は全く見られなかった。この結果から、乾癬の発症に本質的にはカルパインが関与するものの、それは CAPN8 以外のカルパインである可能性が示された。

次に、乾癬発症に関与するカルパインの特定を行った。野生型マウス耳介にイミキモドを塗布して乾癬を誘発させ、カルパインの発現量を qRT-PCR 解析した。その結果、Capn8 の発現上昇は見られなかった一方、Capn12 と Capn15 の有意な発現上昇が見られたことから、これらが候補と考えられた。次に、Capn12KO マウスと Capn15KO マウスそれぞれに対してイミキモドで乾癬誘発実験を行ったところ、Capn12KO マウスでは野生型に比べて炎症が軽減し、さらに乾癬の



マーカー遺伝子発現が一部抑制されていることを見出し、乾癬の病態形成への CAPN12 の関与が明らかになった(上図)。免疫染色の結果、CAPN12 は皮膚において表皮と毛包に発現することを見出し、表皮に発現する CAPN12 の機能亢進が乾癬の病態形成に関与することが示唆された。

今後の展望

乾癬発症における CAPN12 の関与が示されたので、今後は CAPN12 の作用機序解明に向け、マウス皮膚やプライマリー表皮細胞を用いて、質量分析やマイクロアレイ解析を取り入れつつ、細胞・分子レベルの解析を進めたい。CAPN12 の作用を解明し、CAPN12 特異的阻害薬の創出へと展開できれば、副作用を抑えた有効な治療手段の実現が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shinkai-Ouchi Fumiko, Shindo Mayumi, Doi Naoko, Hata Shoji, Ono Yasuko	4. 巻 40
2. 論文標題 Calpain-2 participates in the process of calpain-1 inactivation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 BSR20200552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20200552	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 Ojima Koichi, Hata Shoji, Shinkai-Ouchi Fumiko, Oe Mika, Muroya Susumu, Sorimachi Hiroyuki, Ono Yasuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Developing fluorescence sensor probe to capture activated muscle-specific calpain-3 (CAPN3) in living muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio048975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.048975	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 Hata Shoji, Doi Naoko, Shinkai-Ouchi Fumiko, Ono Yasuko	4. 巻 1868
2. 論文標題 A muscle-specific calpain, CAPN3, forms a homotrimer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140411 ~ 140411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2020.140411	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 Ojima Koichi, Hata Shoji, Shinkai-Ouchi Fumiko, Ono Yasuko, Muroya Susumu	4. 巻 174
2. 論文標題 Calpain-3 not only proteolyzes calpain-1 and -2 but also is a substrate for calpain-1 and -2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 421 ~ 431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad057	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾嶋孝一、秦勝志、室谷進、小野弥子
2. 発表標題 組織普遍的に発現するCAPN1はCAPN3を部分切断する
3. 学会等名 日本畜産学会 第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秦勝志、野口あや、土屋光、設楽浩志、田中啓二、佐伯泰、小野弥子
2. 発表標題 CAPN15はコピキチン化タンパク質を標的とするカルパインであり細胞接着を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大内史子、土井奈穂子、三上恭平、井口義信、秦勝志、小野弥子
2. 発表標題 肢帯型筋ジストロフィーR 1型モデルマウスの肝臓における脂質蓄積抑制
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秦 勝志
2. 発表標題 骨格筋特異的カルパインCAPN3はホモ三量体である
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾嶋孝一、秦勝志、大内史子、室谷進、小野弥子
2. 発表標題 骨格筋特異的に発現するカルパイン3は組織普遍的なカルパイン1および2を基質とする
3. 学会等名 日本畜産学会 第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野口あや、秦勝志、土屋光、設樂浩志、田中啓二、佐伯泰、小野弥子
2. 発表標題 ユビキチン-カルパイン系による新規E-カドヘリン代謝経路
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichi Ojima, Shoji Hata, Shinkai-Ouchi, Yasuko Ono, Susumu Muroya
2. 発表標題 Reciprocal proteolysis among calpain-1, -2, and -3
3. 学会等名 米国細胞生物学会 CellBio2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ono Y, Shinkai-Ouchi F, Noguchi A, Hata S.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 4822
3. 書名 Encyclopedia of Biological Chemistry, 3rd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所カルパインプロジェクトホームページ
<https://www.igakuken.or.jp/calpain/>

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

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