

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591462

研究課題名（和文） 遺伝性・炎症性角化症に対するカンナビノイド作動薬による治療の確立

研究課題名（英文） The efficacy of cannabinoids to the various keratoderma.

研究代表者

高橋 健造（TAKAHASHI KENZO）

琉球大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80291425

研究成果の概要（和文）：

カンナビノイド、バニロイド作動薬による表皮角化細胞における SERCA2 発現亢進の効果はそれぞれ CB2、TRPV3・4 受容体を介した直接の作用であることを明らかにした。遺伝性および炎症性角化症の代表としてのダリエー病、尋常性乾癬のモデルマウスを用いた外用効果の確認においても、カンナビノイドは特に顆粒層の形成も回復せしめる病理学的な効果をもたらした。その効果はバニロイドによる効果とは病理学的に異なる効果であった。カンナビノイド作動薬は外用薬として、新規の角化症治療薬となりうることを示せたと考えた。

研究成果の概要（英文）：

We showed that the strong induction of SERCA2 expression in the epidermal keratinocytes after the treatments with cannabinoid and vanilloid agonists are direct effects through CB2 and TRPV3/4 receptor, respectively. Also the external application on the Darier's and psoriatic model mouse as a representative of hereditary and inflammatory keratosis, we found that especially the cannabinoids brought about the significant pathological effects which include the a recovery of a stratum granulosum, while vanilloid did not bring such strong impact. I believe that the cannabinoids agonist can be a good candidate of the future therapeutic drug against the hyperkeratotic skin diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ダリエー病、ヘイリー・ヘイリー病、ハプロインサフィシエンシー、カンナビノイド、バニロイド、SERCA2、転写、創薬

1. 研究開始当初の背景

ダリエー病とヘイリー・ヘイリー病はともに、単一遺伝子の変異による優性遺伝性の難治性角化症で、思春期以降に胸や顔面など脂漏部位（ダリエー病）や、腋窩・股部・乳房下などの間擦部位（ヘイリー・ヘイリー病）など、それぞれ特有の皮膚の部分に、角化性の丘疹やびらん・潰瘍などの醜形や悪臭として発症する。現時点では、根治的はおろか、対処的な治療法も存在せず、合併しがちな皮膚感染症への対処療法のみが行われている。近年の分子遺伝学の成果により、この2つの疾患の原因遺伝子（ATP2A2、ATP2C1）が同定され、表皮角化細胞の小胞体あるいはゴルジ体に機能するカルシウムポンプである SERCA2b、SPCA1 蛋白の正常な蛋白量が、健康人に比べ半分近くに低下していることが、発症の原因であることが理解された。この発症機序は haplo- insufficiency と呼ばれ、健康人の半分のみカルシウムポンプ蛋白の発現量では、正常な角化プロセスの制御ができずに角化が個別に亢進し、角化細胞の異常角化やデスモソームでの脆弱な細胞間接着を引き起こし、特有の皮膚症を発病すると考えられる。ダリエー病とヘイリー・ヘイリー病においては、その原因である変異遺伝子の発現や変異蛋白の存在自身は、病態の形成に関与しないという発症機序の理解が、今回の薬剤スクリーニングの鍵となった。即ち、各々の疾患の原因遺伝子（ATP2A2、ATP2C1）の表皮角化細胞での発現をより亢進し、患者皮膚の SERCA2b・SPCA1 蛋白の発現を変異体、正常蛋白ともに2倍近くに増加し、その結果、正常に機能する野生型カルシウムポンプの蛋白量を健康人の量に近づけることにより、皮膚症状を改善しようと考えた。研究代表者の高橋健造は、平成 17-18 年度の萌芽研究お

よび平成 19-20 年度の基盤研究における研究補助をもとに、in vitro での広範な薬剤ライブラリーの網羅的スクリーニングの探索結果、ダリエー病の病態を改善しうる可能性のある薬剤として、カンナビノイド作動薬とバニロイド作動薬の2群を発見した。

2. 研究の目的

今回の研究期間においては、上記の探索研究の段階で発見しえたバニロイドとカンナビノイド作動薬を、より実用に即した薬剤・医薬品として確立するために、これら薬剤の作用機序をより詳細に解明する。次に、これまでの in vitro での培養表皮角化細胞を用いたアッセイの段階から、より患者皮膚の状態に近いダリエー病モデル皮膚を構築した上で、薬剤の選定並びにその臨床効果の判定と作用機序の解析を進める。既報の SERCA2 ノックアウトマウスにおいて、ホモ体は胎生期に致死であり、ヘテロ体は病理学的な皮膚の異常は呈さないため、これをモデル動物として使用することが出来ない。そこでダリエー病モデルとして、ダリエー病患者の皮膚を直接ヌードマスなどの免疫不全マウスに移植し、生着後にその病変皮膚部へ、候補薬剤を塗布し、その効果を病理学的に判定する。ダリエー病は表皮角化細胞の角化過程が障害されることで一義的に発症する角化症であり、この発症機序には免疫システムの関与はないと考えられる。そのため免疫不全マウスを用いる上記のモデルマウスにおいても、その薬理学的効果の判定が妨げられることはないと考えられる。さらに別のダリエー病モデルとして、ダリエー病患者より樹立した培養表皮角化細胞、3次元培養に供し、その重層化・3次元化過程において、探索した薬剤を添加することでその効果を確認しうる。さら

に、今回のバニロイド・カンナビノイド作動薬には、角化細胞の SERCA2 カルシウムポンプの発現量を上昇させることで、細胞内カルシウム濃度の安定化（低下）を導く効果があると考えられる。その結果、カルシウム濃度により制御される表皮角化細胞の角化プロセスの進行を遅延させ、異常角化・個別角化さらには錯角化などの病的な角化を抑制し、健全な角化プロセスを回復させる作用があると考えられる。またカンナビノイド作動薬は、この優れた角化プロセスの健全化作用のみでなく、培養表皮角化細胞上では細胞増殖の抑制をもたらす事実を発見した。一見、角化の抑制と細胞増殖の抑制は背反する現象に思えるが、表皮角化細胞内の小胞体カルシウムポンプの発現亢進をきっかけとして、これらカンナビノイド作動薬が、当初の目的であるダリエー病とヘイリー・ヘイリー病などの遺伝性角化症のみならず、より幅広く、異常に亢進した角化（錯角化）と細胞増殖の更新（表皮肥厚）を特徴とする、尋常性乾癬などの炎症性角化症にも効果的な薬剤であると考えられるに至った。今回の研究においては、これら炎症性角化症に対する効果を探査することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題の最終的な目標は、優性遺伝性の皮膚疾患であるダリエー病とヘイリー・ヘイリー病の治療に有効な外用薬剤の開発である。そのための薬剤の選定段階では、これら疾患の原因蛋白である SERCA2・SPCA1 蛋白の発現を亢進しうる薬剤をスクリーニングし、ライブラリーより外用薬として使用可能な脂溶性生理活性物質と低分子水溶性薬剤を中心に選択した。具体的には、米国 BioMol 社より市販されている脂溶性薬剤ライブラリーと、分子量 200 - 500 程度の低分子水溶

性薬剤を中心にスクリーニングに供した。アッセイ法としては、蛋白発現の変動よりも、変動幅が大きな mRNA の発現の変動を薬剤負荷後の、4・8・12 時間の各 RNA サンプルをノーザンブロット法で解析した。In vitro でのこれら作動薬の効果を、実際の患者の皮膚により近い状態で確認するために、京大病院に通院中のダリエー病患者の皮膚疾患に対する切除治療の際、切除部位の皮膚をヌードマウスに移植し、生着後に上記のカンナビノイド・バニロイド作動薬を塗布し解析に供した。なおこれら解析は、京大病院内の倫理委員会の承認のもとに実行した。さらに薬剤の効果の再現性のある確認のためのダリエー病皮膚モデルの構築と、さらにはダリエー病院外の炎症性角化症に対するカンナビノイドの in vitro での効果の確認を行った。京大病院へ通院中のダリエー病患者数名より由来する培養表皮角化細胞を用い、In vitro の培養条件で、血清負荷・空気暴露により表皮角化細胞の重層化を行い、重層過程において薬剤を添加しモデル皮膚とする手法。およびダリエー病患者の皮膚を直接ヌードマウスに移植し、モデル皮膚とする手法を準備した。このモデル皮膚へ選定された各薬剤を塗布・添加することで、その有効性を in vivo, ex vivo の状態で経時的に病理学的に確認する。また実際にマウスの皮膚に外用した際の組織学的な変化や生化学的な蛋白誘導を解析した。これらの検討を通して、SERCA2・SPCA1 蛋白の発現制御の傾向・シグナル伝達を考察し、より有効性で安全性の高い薬剤の傾向・方向性を模索する。さらにカンナビノイド作動薬は小胞体の SERCA2 カルシウムポンプの発現を亢進することで、角化細胞の細胞質内カルシウム濃度を低下・安定化させ、その角化プロセスをゆっくりと遅延させる効果があり、同時に基底

細胞増殖を抑制する効果がある点を発見した。この効果はカンナビノイド作動薬がダリエー病のみならず、尋常性乾癬などの炎症性角化症への治療効果を予期させた。そこで炎症性角化症の代表である尋常性乾癬への治療効果を確認した。尋常性乾癬は、表皮細胞の角化と共に免疫アレルギーの機序による角化症である。そのモデル動物の1型として、高知大学皮膚科の樽谷博士の開発した、K14-Raf/Tam マウスを供与して頂き、実験に使用した。このマウスの皮膚にタモキシフェンを外用し、ケラチン14遺伝子のプロモーターにより発現誘導されるRaf遺伝子により表皮は過増殖・肥厚しつつ尋常性乾癬に似た形態をとる。このマウスに薬剤を添加後に、表皮角化細胞の角化マーカーであるK1/K10、フィラグリンなどの発現の遅延などを観察する。表皮角化細胞の増殖に対する影響はMTTアッセイ、BrdU取り込み、PCNA発現などで確認した。

4. 研究成果

これまでの網羅的スクリーニングにより、カンナビノイド作動薬およびバニロイド作動薬が、小胞体のカルシウムポンプであるSERCA2蛋白の発現を亢進することを発見した。表皮角化細胞にはカンナビノイド受容体のCB1とCB2の両者が、さらにバニロイド受容体のTRPV受容体のなかで、1, 2, 3, 4, 6のアイソフォームが発現していた。そこで、この刺激が具体的にどのような経路で伝達するのかを決定するために、健康人や患者皮膚由来の培養細胞に対しsiRNA法により各受容体の発現を抑制した状態での薬剤の効果や、選択的な阻害薬を使用することで、2つの作動薬は表皮角化細胞に発現する各々CB2, TRPV3/4受容体を介して独立した機序でSERCA2の亢進をもたらすこ

とを明らかにし、より選択的な薬剤の選択を可能とした。ダリエー病とヘイリー・ヘイリー病は、夏の暑さで著明に悪化し冬季に軽快するという疾患でもあり、温熱感受性受容体の作動薬が、ATP2A2遺伝子の発現を著明に亢進するという実験結果は、これら疾患の病態形成をより細かに理解する上でも非常に興味深い事実である。さらにダリエー病患者の皮膚の小断片をヌードマウスへ移植し、その移植皮膚へカンナビノイドとバニロイド作動薬を外用することで、その病理学的な効果を確認することが出来た。特にカンナビノイドはダリエー病モデルの移植皮膚に対して顆粒層の回復までももたらす治療効果があることをより詳細な移植モデル、3次元モデル構築等を用いて病理学的に明らかにした。興味深いことに、カンナビノイド・バニロイド共に、移植片での個別角化・異常角化・棘融解などのダリエー病の病理像を著明に改善したが、その改善した病理像には若干の差異が認められた。即ち、バニロイド作動薬の塗布では顆粒層の回復は認められなかったが、カンナビノイド作動薬で、顆粒層も回復し、健全な角化プロセスに相応した表皮構築の回復が確認された。これはあとに述べるようにカンナビノイドが異常角化を広く抑制する効果が強いことを示唆すると考えられる。さらにカンナビノイド作動薬においては、SERCA2の発現亢進により細胞内カルシウム濃度を安定化し、角化の亢進を平穩化する効果のみならず、角化細胞の細胞増殖の抑制効果も有することを新たに確認した。そこで異常角化の亢進と基底細胞の増殖亢進を病態とする尋常性乾癬に対する効果を期待すべく、そのモデル動物として入手が可能であるスタンフォード大学で作製されたK14-Raf/Tamマウスを、その作成者である高知大学皮膚科の樽谷准博士より供与頂きその効果を確認し

た。カンナビノイド作動薬を1-2週の間、連日外用することで、コントロールである溶媒のDMSOに比較して、著明に過角化や炎症細胞浸潤の抑制効果があることを病理学的に確認できた。具体的には、タモキシフェン外用3日後には顕著となる表皮肥厚と不全角化が、カンナビノイドを塗布することでコントロールのDMSO塗布と比較して、大きく抑制された。その抑制は、基底層での分裂の抑制、顆粒層の形成の回復、不全角化の抑制という、尋常性乾癬の表皮角化細胞側に確認される病態を回復させると考えられた。しかし乾癬における免疫異常の主体をなす、リンパ球浸潤、好中球浸潤に関してはその効果は今回の外用実験では効果は確認できなかった。ダリエー病のみでは新薬の開発としては患者数が余りに限定されることが問題であり、カンナビノイド作動薬がSERCA2の発現亢進により細胞内カルシウム濃度を安定化し、過角化を抑制する効果のみならず、角化細胞の細胞増殖の抑制効果も確認した。今後は乾癬における免疫細胞の動向に与えるカンナビノイド作動薬の効果を確かめることで、実用化に必要な情報を得られると考える。

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 24 件)

①Nosocomial outbreak of multidrug-resistant USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing severe furuncles and carbuncles in Japan. Mine Y, Higuchi W, Taira K, Nakasone I, Tateyama M, Yamamoto T, Uezato H, Takahashi K. *J Dermatol*. 2011 Dec 38(12):1167-71. (査読有)

②Seborrheic keratosis in a young patient with non-bullous congenital ichthyosiform

erythroderma. Nakamizo S, Takahashi K, Miyachi Y, Kabashima K. *Eur J Dermatol*. 2011 Sep-Oct;21(5):793-4. (査読有)

③Circumscribed palmar hypokeratosis on both hands: distinct keratin expression in multiple depressed lesions. Masahito YASUDA, Masatoshi ABE, Mariko SUTO, Etsuko OKADA, Yayoi NAGAI, Atsushi TAMURA, Osamu ISHIKAWA and Kenzo TAKAHASHI*. *Br J Dermatol*. 2011 Jan;164(1):211-3. (査読有)

④A novel potent tumour promoter aberrantly overexpressed in most human cancers. Atsushi Takahashi, Hisashi Tokita, Kenzo Takahashi, Tomoharu Takeoka, Kosho Murayama, Daihachiro Tomotsune, Miki Ohira, Akihiro Iwamatsu, Kazuaki Ohara, Kazufumi Yazaki, Tadayuki Koda, Akira Nakagawara & Kenzaburo Tani *Scientific Reports* 2011, 1, 1-12 (査読有)

⑤Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders - Distribution and clinical significance (review). Ichiro Kurokawa, Kenzo Takahashi, Ingrid Moll, Roland Moll *Experimental Dermatology* 2011, 20, 217-228 (査読有)

⑥Asian Skin and Skin Diseases: Special book of the 22nd World Congress of Dermatology Editors: Hee Chul Eun, Soo-Chan Kim, Won-Soo Lee.

15. Keratoderma in Asia. Kenzo Takahashi Pp97-102 2011 Medrang Inc. (査読有)

⑦Tinea corporis caused by *Microsporum gallinae*: first clinical case in Japan. Review. Miyasato H, Yamaguchi S, Taira K, Hosokawa A, Kayo S, Sano A, Uezato H, Takahashi K. *J Dermatol*. 2011 May;38(5):473-8. Epub 2010 Dec 13. (査読有)

⑧A familial case of Nagashima-type palmoplantar keratosis. Nakamizo S, Takahashi K, Miyachi Y, Kabashima K. Eur J Dermatol. 2010 Jul-Aug;20(4):507-8. (査読有)

⑨Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. Kioka N, Ito T, Yamashita H, Uekawa N, Umemoto T, Motoyoshi S, Imai H, Takahashi K, Watanabe H, Yamada M, Ueda K. Exp Cell Res. 2010 Jun10;316(10):1728-1738. Epub 2010 Mar 31. (査読有)

⑩The expression of differentiation markers in aquaporin-3 deficient epidermis. Hara-Chikuma M, Takahashi K, Chikuma S, Verkman AS, Miyachi Y. Arch Dermatol Res. 2009 Mar;301(3):245-52. Epub 2009 Jan 31. (査読有)

⑪Tanioka M, Takahashi K, Miyachi Y. Narrowband ultraviolet B phototherapy for inflammatory vitiligo with raised borders associated with Sjögren's syndrome. Clin Exp Dermatol. 2009 Apr;34(3):418-20. Epub 2008 Dec 22. (査読有)

⑫Circumscribed palmo-plantar hypokeratosis: a disease with two subtypes. Tanioka M, Miyagawa-Hayashino A, Manabe T, Toichi E, Miyachi Y, Takahashi K. J Invest Dermatol. 2009 Apr;129(4):1045-7. Epub 2008 Sep 25. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

①高橋 健造 ダリエー病の治療薬の開発に向けての工夫 その過程で感じたこと、教わったことなど. 第26回角化症研究会 2011年7月30日 東京 東京商工会議所

[図書] (計 2 件)

①高橋 健造 ダリエー病の治療薬の開発に向けての工夫、その過程で感じたこと、教わ

ったことなど 第26回角化症研究会 記録集 pp128-133 協和企画 2012年3月発行

②高橋 健造 治療 ダリエー病の治療薬の探索と病態の理解、皮膚病診療 2012 Vol. 34 No. 3 p305-310

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特願 2009-503902

2009年9月7日 米国、英国、ドイツ出願

◎「角化の亢進に起因する皮膚疾患の予防及び治療のための医薬」

発明者：京都大学大学院医学研究科 皮膚生命科学講座 講師 高橋健造

出願者：京都大学

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 健造 (TAKAHASHI KENZO)

琉球大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80291425

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし