

平成23年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791053

研究課題名（和文）ABCA12 再構成リポソームを用いた道化師様魚鱗癬モデルマウスの治療法開発

研究課題名（英文）Development of treatment of harlequin ichthyosis model mouse using ABCA12-reconstruction liposome

研究代表者

山根 尚子（YAMANE NAOKO）

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：20399942

**研究成果の概要（和文）：**近年、表皮のバリアに重要な角層細胞間脂質を輸送する蛋白質である ABCA12 の機能欠損が道化師様魚鱗癬の病因であることが解明された。これまでに遺伝性角化症の治療は、対症治療が中心であり、ABCA12 の機能をさらに詳しく解析することにより、病態の本質に沿った治療法の開発が期待される。本研究では、ヒトリコンビナント ABCA12 を得るために、リポソームを用いて哺乳類細胞へトランスフェクションして発現誘導を試みた。また、ABCA12 の発現が抑制されている細胞株を樹立し、ABCA12 補充による脂質輸送の改善についての検討を行う。ABCA12 含有リポソームの調製と効果の検証を行うことは極めて重要であり、病態の本質に沿った治療法の開発のために有効となる。

**研究成果の概要（英文）：**Recently, it was reported that ABCA12 works as an epidermal keratinocyte lipid transporter and that defective ABCA12 results in a loss of the skin lipid barrier, leading to Harlequin Ichthyosis. Until now, the mainstream of the treatments of hereditary keratosis were supportive measures. The development of the treatment method along the pathophysiology of HI is hoped by analyzing the function of ABCA12 more in detail. In this study, to prepare recombinant ABCA12, its expression vector was transfected to mammalian cells using liposomes. Moreover, we aimed to establish the stable cell line of which the expression of ABCA12 is suppressed, and the improvement of the lipid transport by the ABCA12 replacement is examined. It would be interesting to further examine improvement of lipid transport by supplementation of ABCA12 using liposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：①ABCA12, ②遺伝性角化症, ③脂質輸送

## 1. 研究開始当初の背景

ABCA12は12種のトランスポーターと1つの偽遺伝子からなるABCトランスポーターのサブファミリーAに属するトランスポーターである。ABCA12は2595個のアミノ酸残基により構成され、12個の膜貫通領域、2つのATP結合領域を持つ膜蛋白質である(Annino T, et al., *Cytogenet Res*, 2002)。ABCA12は表皮顆粒層に局在し、超微細形態学的にはケラチノサイトの細胞質内の層板顆粒に局在する(Akiyama M, et al., *J Clin Invest*, 2005)。道化師様魚鱗癬(Harlequin ichthyosis:HI)患者表皮の電子顕微鏡による超微細形態学的観察では有棘層上層から顆粒層の細胞に異常な層板顆粒が認められ、角化した細胞内には異常な脂肪滴が多量に蓄積している。これらの所見より、ABCA12遺伝子変異を有するHI患者の表皮では、顆粒層細胞での層板顆粒の形成と層板顆粒を有した脂質輸送の障害があると考えられている。ABCA12によって輸送された脂質は層板顆粒の中に蓄積され、最終的にはケラチノサイトの終末分化である角化の際に細胞外に放出されて、角層間脂質を形成すると考えられている。このABCA12に機能欠損、機能低下があると、表皮ケラチノサイト内で脂質は層板顆粒に正常に蓄積されず、角化において角層細胞間脂質の低形成もしくは形成異常が起り、皮膚表面の著明なバリア機能障害を引き起こす。その結果、全身皮膚の著明な代償性の過角化、すなわち魚鱗癬となる。秋山らは、HI患者由来の培養表皮細胞に正常なABCA12遺伝子を導入することにより、グルコシルセラミドの輸送障害を改善することに成功している。グルコシルセラミドは、皮膚の角化の過程において角化細胞間に分泌されてセラミドとなり皮膚角層のバリア機能の重要な要素となる。一方、遺伝子治療の臨床応用試験は、1990年代以降米国を中心に精力的に行われてきた。遺伝子を細胞内に導入するベクターとしてはレトロウイルスなどのウイルスベクターと、リポソームなどの非ウイルスベクターに大別されるが、遺伝子導入率、発現効率ではウイルスベクターが有利であるが、安全性を考えると非ウイルスベクターを用いるのが望ましいとされて

いる。

## 2. 研究の目的

近年、表皮のバリアに重要な角層細胞間脂質を輸送する蛋白質であるABCA12の機能欠損が最重症の遺伝性皮膚疾患・道化師様魚鱗癬の病因であることが解明された。本研究ではABCA12リコンビナント蛋白質を調製し、ABCA12蛋白質をリポソームを用いて再構成し、ABCA12ノックダウン細胞へ導入することでグルコシルセラミドの輸送障害が改善するかどうか調べるのが第一の目的である。さらに、ABCA12遺伝子変異を持つHI患者由来培養表皮を免疫不全マウスの背部に移植したHIの病変を再構築したモデルに、リポソームに封入した正常なABCA12蛋白質を導入し、表皮のグルコシルセラミドの分布が改善するかどうかを調べることを目指して検討を行う。まず、ABCA12を輸送する為のリポソームの調整を行い、細胞レベル、組織レベルでの補充について、上記の検討を行うところまでを本研究では行う予定である。その後の展望としては、疾患モデルマウスを作成し、全身性投与(経口、経静脈的)、経皮的投与にて治療応用を試みることを最終的な目標としている。これにより病態の本質に沿ったHI患者の新規治療法の開発へと結び付けたい。

## 3. 研究の方法

ヒトABCA12のcDNA配列を発現ベクターに組み込み、哺乳類細胞(293細胞)に形質転換した後、ABCA12安定発現株を樹立する。発現したヒトABCA12蛋白質をアフィニティークロマトグラフィーにて精製を行い、高純度ABCA12精製蛋白質を得る。ABCA12は膜蛋白質のため、不溶化や凝集が精製過程での可溶化などの検討が必要となる。具体的には、尿素やグアニジン塩酸塩、界面活性剤などを用いて検討を行う。リポソームに用いる脂質やコレステロールなどの混合したリピッドフィルムを調製し、リポナイザーを用いてショ糖溶液に懸濁する。超音波処理後、フィルターにて粒子径を整えたリポソームを調製する。この際、リポソームの粒子径や

Z 電子についての評価を行って最適化する。ABCA12 の siRNA を設計し、ABCA12 ノックダウン細胞株を樹立する。調製した数種類のヒト ABCA12 蛋白質リポソームについて ABCA12 ノックダウンした細胞へ導入する。高カルシウム条件で培養を行い、細胞内のグルコシルセラミドの輸送の改善をグルコシドセラミドに対する抗体を用いて免疫組織化学的手法により検討する。ABCA12 遺伝子変異を持つ HI 患者由来培養表皮を免疫不全マウスの背部に移植した HI の病変を再構築したモデルに、リポソームに封入した正常な ABCA12 蛋白質を導入し、表皮のグリコシルセラミドの分布が改善するかを免疫組織学的検索、電子顕微鏡を用いて超微細構造学的に解析する。

#### 4. 研究成果

細胞への ABCA12 の補充を試み、脂質輸送が改善するか検討するため、次の実験を行った。ABCA12 リコンビナント蛋白質を調製するために、ヒト ABCA12 のコンストラクトを哺乳類細胞 (293 細胞) へカチオニックリポソームを用いてトランスフェクションし、発現の誘導を試みた。ABCA12 の強制発現について、抗 ABCA12 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析を行うことで、現在、ABCA12 の安定発現株の樹立を目指して、より効率よく発現する条件を検討したが、十分な ABCA12 を発現するクローンは今のところ得られておらず、さらなる検討を試みている。また、siRNA を設計 (Table.1)、合成し、安定的に ABCA12 をノックダウンする発現株を調製した。ABCA12 蛋白質導入に用いるリポソームを調製し、粒子径 (Fig.1) および Z 電位 (Fig.2) の測定を行って最適化した。今後、ABCA12 を効率良く発現している安定発現株を得ることによって、ABCA12 を導入タンパク質として調製するための原料を得ることができ、また、ABCA12 が安定的に発現抑制されている細胞株の樹立によって、ABCA12 の補充による脂質輸送の改善についての検討を行うことが出来ると考えられる。以上の実験結果を踏まえて、今後、ABCA12 含有リポソームの調製と効果の検証を行う系を構築することは極めて重要であり、病態の本質に沿った治療法の開発が期待できる。

Table.1 siRNA sequences for human ABCA12

| Target sequences |                      |
|------------------|----------------------|
| 1                | GAAAGAAGAUUUAAGGAGA  |
| 2                | GCUAAAAGGCUCUACAAAA  |
| 3                | GUGACAUGCUCACUGGGUAA |
| 4                | CAACAUCAGCAUUGGGUAUA |
| 5                | CAGAAGAAGUACAGAACAA  |

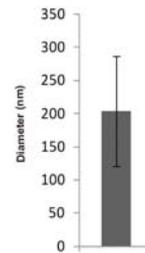


Fig.1 Diameter of liposome

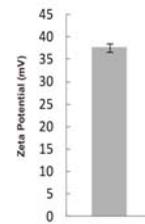


Fig.2 Zeta potential of liposome

#### 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6件)

1. Lin HY, Yanagi T, Akiyama M, Iitani MM, Moriuchi R, Natsuga K, Shinkuma S, Yamane N, Inokuma D, Arita K, Shimizu H. Childhood subepidermal blistering disease with autoantibodies against type VII collagen and laminin-332. *Br J Dermatol*. 査読有, 164(2):2011:452-4
2. Saito N, Yanagi T, Akiyama M, Lin HY, Kasai S, Fujita Y, Yamane N, Inokuma D, Kase S, Ono K, Minakawa H, Shimizu H. Pyoderma Gangrenosum of the Eyelid: Report of Two Cases and Review of the Literature. *Dermatology*. 査読有, 221(3):2010:211-5
3. Saito N, Yamane N, Matsumura W, Fujita Y, Inokuma D, Kuroshima S, Hamasaka K, Shimizu H. Generalized exacerbation of systemic allergic dermatitis due to zinc patch test and dental treatments. *Contact Dermatitis*,

査読有, 62: 2010,:372-3

4. 山根尚子, 加藤直子, 西村真智子, 伊藤幹, 高橋祥公. lichen<臨床例> 慢性 C 型肝炎に伴った粘液水腫性苔癬. 皮膚病診療, 査読有, 32(5):2010,:531-534
5. Yamane N, Kato N, Nishimura M, Ito M, Yanagi T, Osawa R. A case of primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma with generalized skin and one peripheral lymph node region involvement, successfully treated with low dose oral etoposide. Clin Exp Dermatol, 査読有, 34:2009:e56-9
6. 山根尚子, 加藤直子, 柳輝希, 大澤倫子, 西村真智子, 伊藤幹, 齋藤奈央. 低用量エトポシド内服療法が有効であった Anaplastic large cell lymphoma の 1 例, Skin Cancer, 査読有, 24(1):2009, 21-24

[学会発表] (計 2 件)

1. 山根尚子, 青柳哲, 馬場慶子, 西村真智子, 齋藤奈央, 飯谷麻里, 本間英里奈, 田巻知宏, 伊藤裕子, 清水宏. 急速な転帰をとった外陰部表皮嚢腫から生じた有棘細胞癌の 1 例. 第 109 回日本皮膚科学会総会, 2010.04.16, 大阪市
2. 山根尚子, 青柳哲, 馬場慶子, 秦洋郎, 清水宏. 表在播種型汗孔角化症に有棘細胞癌と Bowen 病を生じた 1 例. 第 25 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会. 2009.05.22, 岡山市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山根 尚子 (YAMANE NAOKO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師  
研究者番号：20399942

(2)研究分担者

なし