

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 6月5日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791048

研究課題名（和文）パピヨン・ルフェーブル症候群表皮細胞におけるセリンプロテアーゼの活性化障害

研究課題名（英文）Serine proteinase dysfunction in keratinocyte of Papillon-Lefèvre syndrome.

研究代表者

滝吉 典子（TAKIYOSHI NORIKO）

弘前大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：30568895

研究成果の概要（和文）：パピヨン・ルフェーブル症候群は多種のセリンプロテアーゼを活性化させるカテプシン C (CTSC) の欠損により生じ、掌蹠角化、若年性歯周囲炎を特徴とする。本症に見られる掌蹠角化の発症機構を解明した報告はない。CTSC のリコンビナント蛋白を培養表皮角化細胞である HaCaT の培地中に加えたところ、HaCaT の細胞質内の KLK8 が活性化された。KLK8 はセリンプロテアーゼのひとつで、角層の脱落を担っているという報告がある。また、マウスの皮膚に TPA を塗布すると、CTSC ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比し著明な表皮の過角化亢進が組織学的に明らかとなった。以上の結果は、カテプシン C の欠損によるセリンプロテアーゼの活性化障害が引き起こされ、皮膚の角化が亢進するという我々の仮説を支持するデータと考える。

研究成果の概要（英文）：Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) is characterized by palmoplantar keratosis (PPK) and early-onset periodontitis, caused by deficiency of cathepsin C (CTSC) that activates many serine proteinases. The pathogenesis of PPK in PLS has not been determined. We confirmed that CTSC activates Kallikrein 8 (KLK8) in immortal human keratinocyte line; HaCaT cell, by stimulating with recombinant CTSC. KLK8 is one of serine proteinase, and has been reported that plays a role in shedding the corneocytes. Furthermore, histopathological finding showed that topical TPA application caused significant hyperkeratosis in the epidermis of CTSC knockout mice, compared to wild type. These findings suggest that an absence of CTSC causes a serine proteinase dysfunction, leads to hyperkeratosis in the epidermis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：過角化、遺伝子変異、癌、表皮細胞、メラノサイト

1. 研究開始当初の背景

パピヨン・ルフェーブル症候群は掌蹠角化、易感染性、歯周囲炎、を特徴とする比較的ま

れな常染色体性劣性遺伝病であり、その原因は多種のセリンプロテアーゼの活性化を担うカテプシン C の欠損である。申請者のグル

ープは本症を数例経験し、そのカテプシン C 遺伝子の変異を解析している。この酵素カテプシン C は、好中球やマクロファージに多く存在し、エステラーゼやグランザイムといったセリンプロテアーゼを活性化するので、本酵素が欠損するパピヨン・ルフェーブル症候群で、易感染性が生ずることは簡単に理解できる。しかし、本症に見られる掌蹠角化の発症機構を解明した内外の報告はない。

表皮細胞にも多くのセリンプロテアーゼが存在し、近年いろいろな生命現象に関与することが明らかにされてきた。特に重要な第 1 の現象は角質層での角化細胞の脱落であり、カリクレイセリンプロテアーゼ 5 や 8 (KLK 5, KLK 8) が、角化細胞の結合を担うデスモグレインやコルネオデスモシンを切断し角化細胞の脱落が完結する。申請者は、カテプシン C が KLK 5 や KLK 8 を活性化する働きがあり、パピヨン・ルフェーブル症候群ではそれらの活性化障害で角質細胞が脱落せずに手掌の角化が起こると推測している。

さらに我々はパピヨン・ルフェーブル症候群に悪性黒色腫が発症しやすいことを初めて報告している (Nakajima K, Takiyoshi N, et al, Dermatology 2008)。近年、癌とその微小環境の解析は非常にホットな分野で、癌の発症や進展に周囲に存在する細胞の分化異常が強く関与することが明らかになり、その分化異常でのキーとなるサイトカインが TGF- β であることが分かってきている。そこで、今回の研究では本症の表皮細胞に生じている分化異常が、TGF- β の発現やシグナルの異常を引き起こし、メラノサイトの癌化を促進しているのではないかとする大胆な仮説を提唱する。

2. 研究の目的

パピヨン・ルフェーブル症候群において認められる掌蹠角化やメラノサイトの癌化促進に注目し、さらに、角層の脱落の役割を担うとされるセリンプロテアーゼの活性化障害の観点から検討することにある。

カテプシン C 欠損と、TGF- β を介した発癌性の関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) パピヨン・ルフェーブル症候群の患者カテプシン C 遺伝子を増幅、遺伝子解析を行う。

(2) カテプシン C のリコンビナント蛋白を作成する。

(3) 培養表皮細胞を高カルシウム濃度の培地により分化を誘導、その後カテプシン C、KLK 5 や KLK 8 をくわえることにより、細胞の結合が変化するかを検討した。

(4) カテプシン C のノックアウトマウスを作成。さらに、メタロチオネインプロモータ下に癌遺伝子 RET つないだ遺伝子を持つトランスジェニックマウスの供与を受け、そのマウスとカテプシン C のノックアウトマウスを掛け合わせたマウスを作成。発癌性の検討を行う。

(5) カテプシン C ノックアウトマウスを用いて、表皮角化細胞における過角化誘導を検討。表皮の過角化を引き起こす TPA を塗布した際の組織学的変化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 新規の 3 家系のパピヨン・ルフェーブルの遺伝子解析を行い、各々の家系について遺伝子変異を同定した。さらに、各発端者の末梢白血球より蛋白を抽出。カテプシン C の酵素活性の測定をおこなったところ、発端者では酵素活性がほとんど検出されなかった (図 1)。

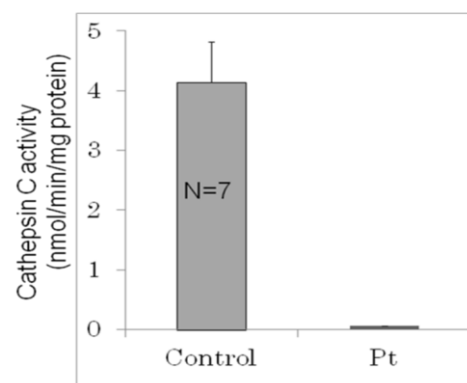


図 1

(2) 作成したカテプシン C のリコンビナント蛋白を培養表皮角化細胞である HaCaT の培地中に加えたところ、HaCaT の細胞質内のカリクレイン 8 (KLK8) が活性化されることがわかった。さらに、表皮細胞の分化を誘導する高カルシウム培地において、KLK8 の活性がより高値であることがわかった。

(3) メタロチオネインプロモータ下に癌遺伝子 RET のない遺伝子を持つトランスジェニックマウスとカテプシン C のノックアウトマウスを掛け合わせたマウスを作成。これらのマウスを用いた発癌実験においては、明らかな癌化の誘導に至らず、かつ野生型マウスとの差は現時点では得られなかった。

(4) 表皮の過角化を引き起こす TPA を剃毛したマウスの背部皮膚それぞれに塗布。野生型マウスに比し、カテプシン C のノックアウトマウスの表皮過角化の亢進が顕著であることが組織学的に明らかとなった (図 2)。

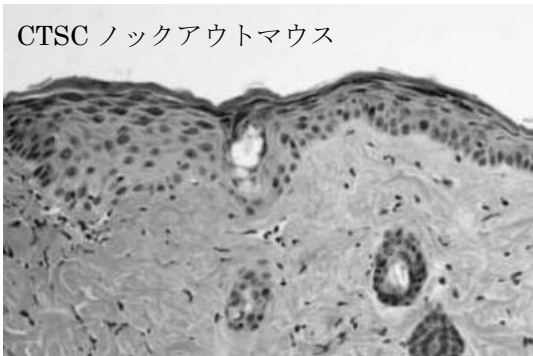
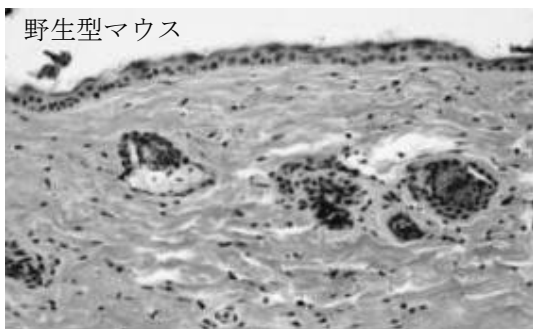


図 2

以上の結果は、カテプシン C 欠損によるセリンプロテアーゼの活性化障害が引き起こされ、皮膚の角化が亢進するという我々の仮説を支持するデータと考える。

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 3 件)

- ① Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D. Epidermolysis bullosa pruriginosa with marked phenotypic heterogeneity caused by a recurrent glycine substitution: incomplete penetrance or a latent case? J Dermatol, 2011; Epub 査読有
Doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01392.x.
- ② Akasaka E, Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Nishikawa Y, Korekawa A, Matsuzaki Y, Mitsuhashi Y, Sawamura D. Diffuse and focal palmoplantar keratoderma can be caused by a keratin 6c mutation. Br J Dermatol, 2011;165(6):1290-1292. 査読有
doi: 0.1111/j.1365-2133.2011.10552.x.
- ③ Korekawa A, Nakano H, Toyomaki Y, Takiyoshi N, Rokunohe D, Akasaka E, Nakajima K, Sawamura D. Buschke-Ollendorff syndrome associated with hypertrophic scar formation: a possible role for LEMD3 mutation. Br J Dermatol, 2012;166:900-903. 査読有
Doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10691.x.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 滝吉 典子. カテプシン C 遺伝子変異が同定された Papillon-Lefèvre 症候群の 2 家系. 第 26 回角化症研究会, 2011 年 7 月 30 日 東京商工会議所
- ② Takiyoshi Noriko. Mutational analyses in Papillon-Lefèvre syndrome. The 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR), 2011 年 9 月 9 日. バルセロナ (スペイン)
- ③ 滝吉 典子. Functional analyses in

Papillon-Lefèvre syndrome.

日本研究皮膚科学会第 36 回年次学術大会,
2011 年 12 月 10 日. 国立京都国際会館

- ④ 滝吉 典子. カテプシン C 遺伝子変異が
同定された Papillon-Lefèvre 症候群の 1
家系の報告及び、ケラチノサイト由来細
胞におけるカテプシン C 発現の検討.
第 17 回分子皮膚科学フォーラム, 2010 年
7 月 10 日. ホテルオークラ福岡(福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝吉 典子 (TAKIYOSHI NORIKO)
弘前大学・医学部附属病院・助手
研究者番号 : 30568895

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :