

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591621

研究課題名(和文)パピヨン・ルフェーブル症候群のセリンプロテアーゼ活性化障害及び角化亢進要因の検討

研究課題名(英文) Factors inhibit serine protease activity and enhance epidermal differentiation in Papillon-Lefevre syndrome

研究代表者

滝吉 典子 (Takiyoshi, Noriko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30568895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作成したカテプシンCノックアウトマウスでは、パピヨン・ルフェーブル症候群(PLS)でみられるような掌蹠の角化が確認されなかった。

そこで、PLSにおける過角化が、掌蹠のほか、肘頭、膝蓋などの被刺激部に局限していることに着目し、過角化の発症には何らかの物理的刺激が誘因になっていると考えた。ノックアウト、野生型マウスを用い、各々にTPA塗布群と非刺激群に分け(計4群)、表皮角化の差を検討。ノックアウトマウスのTPA塗布群では、野生型のTPA塗布群に比し、著明な過角化及び表皮肥厚が組織学的に確認された。これらより、PLSにおける過角化は、外的刺激などが誘引となり生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Total loss of Cathepsin C (CTSC) activity cause Papillon-Lefevre syndrome (PLS), which characterized by palmoplantar keratoderma (PPK). CTSC knock out mice naturally lack PPK, so we examined whether inflammation trigger a change of epidermal differentiation in CTSC knock out mice. We made four groups, knock out mice and wild type mice with or without application of TPA. We confirmed that knock out mice with application of TPA had feature of palmpanterkeratosis, remarkable hyperkeratosis and acanthosis histologically.

This research sugesut that skin manifestation of Pappilion Lefevre syndrome caused by irritation,so skin change localize palmpanter,knee,elbow in PLS.

研究分野：医師薬学

キーワード：cathepsin C inflammation hyperkeratosis acanthosis

1. 研究開始当初の背景

パピヨン・ルフェーブル症候群 (PLS) は掌蹠角化、易感染性、歯周囲炎を特徴とする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 (CTSC) 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 CTSC 遺伝子の変異を解析、報告している (Nakano et al, JID 2001, Nakajima, Takiyoshi, et al, Dermatology 2008, Ochiai et al, J Derm Sci 2009)。さらに当施設では、患者末梢白血球より抽出した蛋白をもとに、CTSC の酵素活性測定も行っており、診断の一助としている。



PLS 患者の足底：著明な過角化を呈する

この酵素 CTSC 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 PLS で易感染性が生ずることは簡単に理解できる。しかしながら、PLS でみ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。我々は、CTSC がヒトの表皮細胞にも局在していることを、免疫組織化学的検索及びイムノプロットにより確認しており、表皮細胞の分化に、何らかの役割を担っていると考えている。加えて、PLS にみられる過角化が、掌蹠や肘頭、膝蓋などの被刺激部であること、PLS の中でも、ごく軽微な皮膚症状しか呈さない症例も報告されていることより、CTSC の欠損単独で皮膚の変化が生じるのではなく、そこに外的刺激が加わることで過角化の亢進が引き起こされると考えた。

また、CTSC により活性化するとされるセリンプロテアーゼは、表皮細胞にも多く存在する。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、セリンプロテアーゼであるカリクレイン 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、CTSC が KLK 5 や KLK 8 を活性化する働きがあり、PLS 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。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PLS における掌蹠の過角化のメカニズムが、CTSC とどのように関連しているかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

PLS 患者の末梢血から DNA を抽出し、CTSC 遺伝子領域を PCR 法により増幅。オートシーケンサーで遺伝子解析を行った。さらに、PLS 患者の末梢血から蛋白を抽出し、合成ペプチドを基質として加水分解して生じる NHMec の量を蛍光プレートリーダーで経時的に測定し、CTSC 酵素活性を測定した。

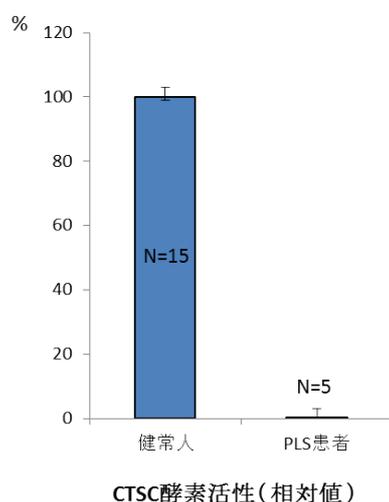
さらに、CTSC ノックアウトマウスを作成し、PLS でみられるような過角化や表皮の肥厚が出現するか、臨床及び病理組織学的に検討。

さらに、外的刺激を加える手段として、マウスの除毛した背部や耳、後肢に角化を亢進させるフォロボールエステルの TPA を塗布。実験対象に CTSC ノックアウトマウス、野生型マウスを用い、各々に TPA 塗布群、塗布しない群を設けた (計 4 群)。各群において過角化や表皮肥厚が誘発されるか、各群で皮膚の変化に差が生じるかを組織学的に

検討した。

4. 研究成果

我々は PLS の新規の 3 家系について遺伝子変異解析を行い、CTSC 遺伝子変異を同定した。同定した変異の中には、新規の変異も含まれている。さらに、患者の末梢血から蛋白を抽出し、CTSC 酵素活性を調べたところ、いずれの患者においても CTSC 酵素活性が完全に失われていることがわかった。



PLS 患者の CTSC 酵素活性は消失

我々は、ヒトと同様にマウスの表皮にも CTSC が発現していることを、CTSC 抗体を用いた免疫組織化学検査で確認した。CTSC のノックアウトマウスを作成し、表皮に CTSC が発現していないことを免疫組織化学検査で確認し、さらに表皮細胞を採取して CTSC 酵素活性の測定を行い、酵素活性が失われていることを確認した。作成したノックアウトマウスの臨床症状を観察をしたところ、臨床的には後肢の角化症状はみられなかった。また、後肢や背中 of 皮膚を採取し、病理組織学的に野生型と比較を行ったが、ノックアウトマウスの明らかな皮膚の角化傾向はみられなかった。TPA を塗布による刺激を加えた実験では、野生型マウスにおいても、TPA 塗布により軽度の角化亢進がみられた。

ノックアウトマウスの TPA 塗布群では、野生型の TPA 塗布群に比し、著明な過角化が引き起こされることが、組織学的にも証明され、我々が予想 CTSC の欠損単独で皮膚の変化が生じるのではなく、そこに外的刺激が加わることで過角化の亢進が引き起こされると考えた。

今後の課題として、野生型マウスの皮膚に外的刺激(TPA 塗布)を加えた際に、CTSC の酵素活性が変化するか マウスの表皮角化細胞におけるセリンプロテアーゼの酵素活性を、野生型及び CTSC ノックアウトマウスで比較検討をする 表皮角化細胞において CTSC がセリンプロテアーゼを活性化するかを in vivo および in vitro で検証することがあげられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

赤坂英二郎、中野 創、滝吉典子、澤村大輔：点状掌蹠角化症の 2 家系例．第 28 回角化症研究会記録集、78-81 頁、2014 年 査読なし

Takiyoshi N, Nakano H, Sawamura D : Papillon-Lefèvre syndrome: Impact of cathepsin C activation on the phenotypic expression. *Hirosaki Med J*, 2013; 64: 65-70. 査読有

中野 創：遺伝性角化症のスキルアップ 「分類と診断のポイント，最近の話題」．皮膚診療スキルアップ 30 ポイント．*MB Derma*, 2013 ; 203 : 73-78 .

〔学会発表〕(計 2 件)

Takiyoshi N, Toyomaki Y, Nakano H, Sawamura D Impact of cathepsin C activity on keratinization . 第 22 回表皮細胞研究会、2014.12.6.城山観光ホテル (鹿児島)

赤坂英二郎、中野 創、澤村大輔：点状掌
蹠角化症の2家系例. 第28回角化症研究会、
2013.7.27 東京商工会議所（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝吉典子 (Takiyoshi, Norioko)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30568895

(2) 研究分担者

中野 創 (Nakano, Hajime)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90281922