

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670502

研究課題名(和文)皮膚角化異常症の治療標的としての脂質代謝-皮膚角化制御カップリング機構の解明

研究課題名(英文) The disturbed feed forward transcriptional regulation mechanism coupled with disturbed intracellular lipid metabolism in keratinocytes of congenital ichthyosis model mice

研究代表者

小川 靖(Ogawa, Yasushi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10567754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性角化異常症である道化師様魚鱗癬とNLSDIのモデルマウスについて研究を行った。初代培養ケラチノサイト(KC)に対してPPAR α アゴニストを投与する事により、一部の表皮分化マーカーの発現が回復した。一方で、全般的な症状改善にはいたらなかった。マウス胎仔にin uteroで薬剤を投与する実験をおこなったが、子宮内治療は成功しなかった。皮膚KCに存在する未知TGリパーゼの検索を、PNPLAファミリーを対象として行ったが、同定はできなかった。これら以外に未知リパーゼが存在すると思われた。今回作成した実験系は、今後更なる研究を行う上での有用なツールであり、今後更なる研究が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to verify the hypothesized feed forward mechanism of lipid metabolism-transcriptional regulation in differentiating keratinocytes, and find possible application of this putative mechanism in the treatment of congenital skin diseases. For this purpose we utilized Abca12-deficient as a mouse model of harlequin ichthyosis and CGI-58-deficient mouse as a model of neutral lipid storage disease with ichthyosis. Primary keratinocytes taken from the skin of model mice were treated with agonists of PPAR family nuclear receptors. A PPAR α agonist restored the decreased expression of a keratinocyte differentiation marker. It could not, however, provide an overall reversal of the disease phenotype. An attempt to inject of PPAR agonist in utero failed to rescue the early death of newborn mice. Search for skin-specific triglyceride lipase was performed using siRNA targeted at PNPLA family members suggested the putative lipase exists otherwise.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 先天性角化異常症 道化師様魚鱗癬 NLSDI ケラチノサイト 脂質代謝 転写調節

1. 研究開始当初の背景

皮膚表皮は再生と分化を繰り返し、角層という特殊なバリア機構を絶え間なく生成し続ける。しかし、皮膚ケラチノサイトにおける分化と角化の分子的な制御機構には未知の領域が多い。

先天性角化異常症の一種である、魚鱗癬症候群は、皮膚の高度の乾燥と角化、鱗屑を特徴とする難治性の疾患である。いくつかの病型があり、原因遺伝子も多数同定されているが、未だに原因となる遺伝子異常が同定されていない例も存在する。興味深いことに、魚鱗癬を起こす複数の遺伝子異常は、表皮角化細胞内のトリグリセリド代謝経路を障害することで、疾患を起こしていることが明らかになってきている。この障害は角質の生成異常のみでなく、表皮細胞の分化障害も伴っているため、脂質代謝は表皮角化細胞の分化制御とカップリングしていることが、強く示唆される。また、脂質をリガンドとする PPAR ファミリー等の核内受容体は、表皮の分化制御に関わる事が知られている。

このため、我々は、角化細胞の各分化に段階に即した特定の転写環境が、脂質代謝環境の変化を導き、そこから生じた新たな脂質代謝産物が更なる転写環境の変化をもたらすという、脂質代謝-転写環境の変化がカップリングして協調的に進行する、フィードフォワード機構の存在を想定するに至った。

我々の研究室では、トリグリセリドの輸送に関わる ABCA12 と分解に関わる CGI-58 に着目している。皮膚特異的な細胞内脂質輸送タンパク質である ABCA12 は、遺伝性角化異常疾患である道化師様魚鱗癬の原因遺伝子である。道化師様魚鱗癬では、角化細胞の分化不全がおきるが、その原因は不明である。また、別の遺伝性角化異常症であり、魚鱗癬を伴う疾患、Neutral lipid storage disease with ichthyosis (NLSDI) の原因遺伝子である CGI-58 は、細胞内のトリグリセリド (TG) 分解に必須の遺伝子である。

ABCA12 の欠損は細胞内脂質輸送の障害により、脂質を貯蔵、分泌する細胞内器官の形成不全と、細胞内脂質の構成異常を来す。近年の研究により、CGI-58 は、皮膚以外の臓器では細胞内小器官である脂質滴の表面で TG リパーゼである ATGL を活性化させ、TG の分解を制御している事が知られている。皮膚では ATGL が発現していないが、NLSDI 患者皮膚では TG が細胞中に蓄積するため、未知のリパーゼの活性を同様に制御していると考えられているが、その本体は不明である。本研究に先だて、我々はこれらの遺伝子のノックアウトモデルマウスをそれぞれ作成している。

2. 研究の目的

本研究は、表皮角化細胞の分化の過程で、脂質代謝-転写調節が協調的に制御されるカップリング機構が存在することを証明し、その

分子的な基盤を解明することを目的とした。それにより、皮膚角化異常症の新規治療戦略の開発を目指した。

(1) 未知リパーゼ代謝産物が PPAR 等の脂質をリガンドをとして持つ核内受容体を介して転写調節を行うと仮定し、この仮説検証を行うとともに、遺伝性角化症病態形成に重要な核内受容体を同定する。

(2) 上記の作業仮説に基づいて、先天性角化異常症のうち、道化師様魚鱗癬、NLSDI のモデルマウス皮膚を利用する事で、PPAR 受容体リガンドを用いた新規治療法の開発可能性を検討する。

(3) Neutral lipid storage disease with ichthyosis (NLSDI) の原因遺伝子である CGI-58 と協調的に働く皮膚特異的未知リパーゼを同定する。

3. 研究の方法

(1) ABCA12、および CGI-58 のそれぞれのノックアウトマウスを、表皮脂質代謝異常による先天性角化異常疾患のモデル実験系としての有用性をまず確認した。

それぞれのモデル系における、表皮の組織学的変化を確認し、表皮と角層内における中性脂肪の沈着を検討した。また、表皮分化マーカーおよび PPAR ファミリー分子の発現変化を検討した。

(2) 疾患モデル皮膚ケラチノサイトにおける核内受容体リガンドの効果を検討した。

上述の ABCA12、および CGI-58 のそれぞれのノックアウトマウス病変皮膚ケラチノサイトに対して PPAR ファミリー核内受容体のアゴニストを作用させ、その反応を検討することで、これら核内受容体とそのリガンドの病理的な意義を検討するとともに、先天性角化異常症の新規治療法となりうる可能性について検討した。

実際の方法としては、疾患モデルマウスの初代培養ケラチノサイトに対する各種リガンドを投与し、表皮分化マーカーの発現変化を計測した。また、疾患モデルマウスの胎仔に in utero でリガンドを投与する実験系を作成し、胎児皮膚における表皮分化マーカーの変化を検討した。

(3) Neutral lipid storage disease with ichthyosis (NLSDI) の原因遺伝子である CGI-58 と協調的に働く皮膚特異的未知リパーゼの同定を試みた。

ATGL の近縁遺伝子である patatin-like phospholipase domain containing (PNPLA)-family 分子のなかに、目的の遺伝子が含まれていると仮定し、これらを標的とする siRNA ライブラリを皮膚角化細胞に導入し、トリグリセリドの蓄積についてスクリーニングした。

4. 研究成果

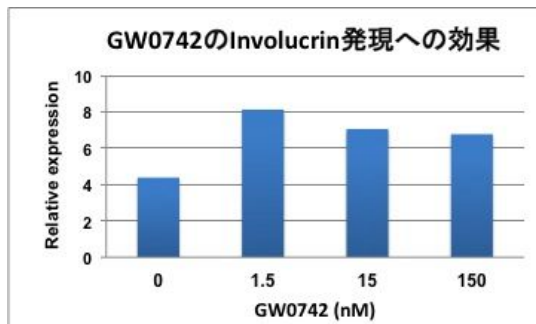
(1) ABCA12、および CGI-58 のそれぞれのノックアウトマウスでは、ホモ接合性に遺伝子がノックアウトされたマウスにおいて、膜様の緊張した皮膚を持つ表現型をとり、出生後すぐに死亡した。これらのマウスでは皮膚の表皮バリア機能異常と表皮、角層への脂肪滴の蓄積が認められた。

胎仔皮膚表皮から行った定量 PCR 法により、PPAR ファミリー核内受容体の発現を検討し、ABCA12 ノックアウトマウスでは PPAR の発現が亢進する傾向が認められる一方で、CGI-58 ノックアウトマウスでは PPAR の発現が低下するという傾向が見られ、2つのモデルの間でも異なる病理機序が働いている可能性が見いだされた。

表皮の分化異常を定量的解析する目的で、filaggrin、involucrin、loricrin、kallikrein 5、ABCA12、CGI-58、transglutaminase 1 等の発現を同様の方法で検討した。2つのマウスモデルともに、全般的にマーカー分子の発現が著名に低下している事が確認され、これらの角化異常症の出生児の病態形成に表皮分化異常がある事が確認された。これにより、これらモデル系が脂質代謝-表皮分化制御のカップリング異常の解析に適した実験系である事が示された。

(2) ABCA12 ノックアウトマウスの胎仔皮膚から初代ケラチノサイトを培養し、PPAR ファミリーのアゴニスト化合物を添加して、その効果を確認した。初代培養細胞を高カルシウム条件にする事で分化誘導を行い、同時に各種アゴニストを投与した。PPAR のアゴニストとして、WY-14643 を 0.1-10 μ M、PPAR のアゴニストとして GW0742 を 1.5-150 nM、PPAR のアゴニストとして rosiglitazone を 0.1-10 μ M の範囲で使用した。RNA を抽出し、各種分化マーカーの発現の変化を検討した。GW0742 の投与下で involucrin と loricrin の発現上昇が認められた。(図1)

(図1)



一方で他のマーカーである kallikrein 5、filaggrin、transglutaminase 1 については明らかな傾向を認めず、WY-14643、rosiglitazone についても再現性のある効果

は得られなかった。(図2)

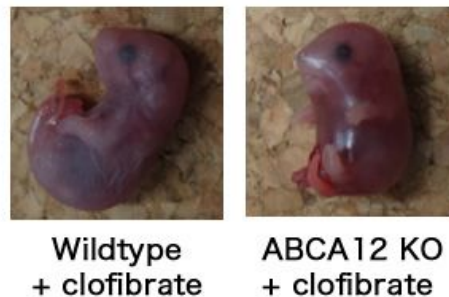
(図2)



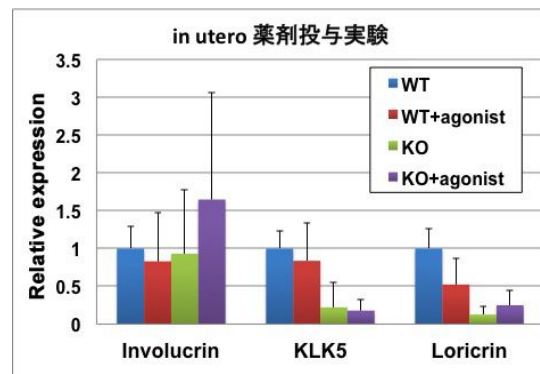
ABCA12 及び CGI-58 のノックアウトマウスの胎仔について、E15.5 の時点で子宮内に薬剤を注射する事により、直接 in utero で皮膚にアゴニストを作用する実験系を作成した。この方法で、clofibrate を投与した際に、PPAR で転写制御される遺伝子のコントロールとして Acox1 等の発現亢進は確認できたものの、表皮分化をレスキューすることはできなかった。(図3、図4)

(図3)

in utero 薬剤投与実験



(図4)



(3) 表皮ケラチノサイト特異的に CGI-58 制御下でトリグリセリドを分解する、未知リパーゼとして、PNPLA ファミリー酵素を想定し、PNPLA1 から PNPLA8 までを標的とした siRNA のライブラリーを作成した。ヒト初代培養ケラチノサイトにトランスフェクシ

オンする事でノックダウンを行い、高カルシウム条件下で2日間培養した後に、トリグリセライドの蓄積を測定した。この実験では有為な変化を認めることができず、候補となるリパーゼを特定する事はできなかった。

本研究の結果として、ABCA12とCGI-58のそれぞれのノックアウトマウス表皮について、統計学的に有為ではないものの、PPARとPPARの発現量が変化する傾向が見られたが、興味深い事に2つの疾患モデルでその変化は一致しなかった。また、ケラチノサイトの分化マーカーはそれぞれのモデルで全体に低下しており、表皮分化異常がこれらの疾患にともなう事が確認された。疾患モデルマウスの初代培養ケラチノサイトに対して、各種のPPARファミリーのリガンドを投与したが、PPARのアゴニストである、GW0742について一部の表皮分化マーカーの発現がレスキューされたものの、全般的な改善にはいたらなかった。モデルマウスの胎仔にin uteroで薬剤を投与する実験系を開発したが、疾患の子宮内治療は成功しなかった。この結果は上記の初代培養系による知見と一致している。皮膚ケラチノサイトにおいて、CGI-58と協調的に働く未知のTGリパーゼの探索を、PNPLAファミリーを対象として行ったが、今回の実験では同定することができなかった。ノックダウン効率などの実験系の問題の可能性も完全に否定はできないものの、今回の結果からはこれら以外に未知のリパーゼが機能している可能性が考えられた。今回作成した実験系は、今後、異なる核内受容体とそこに作用する薬剤について探索を行う上で非常に有用なツールとなり、今後も研究を続けていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

1 Shimizu Y*, Ogawa Y*, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M.

A Palindromic Motif in the -2084 to -2078 Upstream Region is Essential for ABCA12 Promoter Function in Cultured Human Keratinocytes.

Scientific Reports (2014) 4:6737. 査読あり

*These authors contributed equally.

2 Yasuda K, Sugiura K, Takeichi T, Ogawa Y, Muro Y and Akiyama M.

Nuclear envelope localization of Ran-binding protein 2 and Ran-GTPase-activating protein 1 in psoriatic epidermal keratinocytes.

Exp Dermatol (2014) 23(2): 119-24. 査読あり

3 Shibata A, Ogawa Y, Sugiura K, Muro Y, Abe R, Suzuki T and Akiyama M.

High survival rate of harlequin ichthyosis in Japan.

J Am Acad Dermatol (2014) 70(2): 387-8. 査読あり

4 Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K and Akiyama M.

Revertant mutation releases confined lethal mutation, opening Pandora's box: a novel genetic pathogenesis.

PLoS Genet (2014) 10(5): e1004276. 査読あり

5 Hane H, Muro Y, Watanabe K, Ogawa Y, Sugiura K and Akiyama M.

Establishment of an ELISA to detect anti-glycyl-tRNA synthetase antibody (anti-EJ), a serological marker of dermatomyositis/polymyositis and interstitial lung disease.

Clin Chim Acta (2014) 4319-14. 査読あり

6 Takama H, Sugiura K, Ogawa Y, Muro Y and Akiyama M.

Possible roles of barrier to autointegration factor 1 in regulation of keratinocyte differentiation and proliferation.

J Dermatol Sci (2013) 71(2): 100-6. 査読あり

7 Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T, Tsuda K, Nishida E, Togawa Y, Nakajima K, Sakakibara A, Kawachi S, Shimizu M, Ito Y, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Muro Y, Ishida-Yamamoto A, Sano S, Matsue H, Morita A, Mizutani H, Iizuka H, Muto M and Akiyama M.

The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist.

J Invest Dermatol (2013) 133(11): 2514-21. 査読あり

8 Shimizu Y, Sugiura K, Aoyama Y, Ogawa Y, Hitomi K, Iwatsuki K and Akiyama M.

Novel ABCA12 missense mutation p.Phe2144Ser underlies congenital ichthyosiform erythroderma.

J Dermatol (2013) 40(7): 581-2. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1 Yasushi Ogawa, Takuya Takeichi, Michihiro Kono, Nobuyuki Hamajima, Toshimichi Yamamoto, Kazumitsu Sugiura and Masashi Akiyama

Revertant mutation released a lethal mutation concealed in a healthy parent: a previously unreported pathogenesis of hereditary disorders.

日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術大会・総会

ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市
2014 年 12 月 13 日

2 清水由隆、小川靖、杉浦一充、武田淳一、
澤田香織、柳輝希、今淳、澤村大輔、清水宏、
秋山真志

ヒト表皮ケラチノサイトにおける ABCA12
プロモーターの解析：プロモーター活性に
必要な -2084 から -2078 の領域に存在する
パリンドローム配列の同定

第 4 回生理学研究所・名古屋大学医学系研究
科合同シンポジウム 2014 年 11 月 22 日 名
古屋大学 愛知県名古屋市 2014/11/22

3 Yasushi Ogawa, Takuya Takeichi,
Michihiro Kono, Nobuyuki Hamajima,
Toshimichi Yamamoto, Kazumitsu Sugiura
and Masashi Akiyama

Reversion-triggered release of confined
lethal mutations: an unreported genetic
pathogenesis

44th meeting of the European Society for
Dermatological Research

44th meeting of the European Society for
Dermatological Research, 2014/9/11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 靖 (OGAWA, Yasushi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10567754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

杉浦 一充 (SUGIURA, Kazumitsu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70335032

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60222551