

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461653

研究課題名(和文)メレダ病における過角化機序の解明と新規蛋白補充療法の開発

研究課題名(英文)The elucidation of mechanism of hyperkeratosis and development of protein replacement therapy in patients with Mal de Meleda.

研究代表者

中島 康爾(Nakajima, Koji)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：70374832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メレダ病は常染色体性劣性の掌蹠角化症である。本症における掌蹠の角化は高度で、手背足背にも及ぶ。近年、本症の原因遺伝子がSLURP1遺伝子であることが明らかにされた。本研究では、掌蹠角化症患者でのSLURP1遺伝子の解析を行い、変異を同定をこころみた。また、メレダ病患者の表皮細胞と線維芽細胞の分離培養を行い、細胞でのSLURP1の遺伝子、蛋白の発現を確認した。またSLURP1cDNAをクローニングし、発現ベクターを作成、患者細胞に導入し、角化や増殖に関連した遺伝子の正常化があるか確認した。以上の結果から、メレダ病における過角化機序の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mal de Meleda is an autosomal recessive palmoplantar keratosis and shows severe transgradient hyperkeratosis. Recently, the causative gene is demonstrated to be the SLURP1 gene. In this study, analysis of the SLURP1 gene in patients with palmoplantar keratosis tried to detect the gene mutations. We cultured keratinocytes and fibroblasts from the patients and examined gene and protein expressions of the SLURP1 gene. Also, we introduced the expression vector of the SLURP1 cDNA to the patient cells and examined the expressions of the gene related with keratinization. These results show in part the mechanisms of hyperkeratosis seen in the patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝子 遺伝病 皮膚 角化

1. 研究開始当初の背景

メレダ病は常染色体性劣性の掌蹠角化症であり、アドリア海のメレダ島に多く見られることから命名された。本症における掌蹠の角化は高度で、手背足背にも及ぶため指趾に絞扼輪を作り指趾の切断などにも至る。

近年、本症の原因遺伝子が SLURP1 遺伝子であることが明らかにされた。我々のグループは、日本人本症2家系において SLURP1 遺伝子の解析を行い、日本人にもメレダ病が存在することを初めて示している。

さて、この遺伝子産物である SLURP1 は、ほぼ全身の細胞で産生され、細胞外に分泌されるため、血清、尿、汗などに検出される。SLURP1 は、その構造解析や生化学的実験によってニコチン型アセチルコリン (nACh) 受容体に結合するリガンドと考えられているが、なぜ SLURP1 の欠損から掌蹠角化が生じるのかは解明されていない。

このアセチルコリンとアセチルコリン受容体は神経系に発現し、刺激の伝達に関与することが良く知られている。近年このシステムが、種々の非神経細胞でいろいろな作用を示すことが分かってきた。表皮細胞では、主に

7 型の nACh (7nACh) 受容体が発現し、この 7nACh 受容体が表皮細胞の分化や増殖に関与するという報告が散見されるようになった。7nACh 受容体のリガンドであり、受容体からのシグナルを抑制する蛇毒のブンガロトキシンは、培養表皮細胞の分化を抑制し増殖を誘導する。SLURP1 はブンガロトキシンと非常に類似した構造をとり、同様に本受容体に抑制的に働いているのなら、その遺伝子の欠損により SLURP1 が消失するメレダ病では、角化が亢進するのには矛盾はないと考えた。しかしながら、この説を証明した研究はなく、実際に患者の表皮細胞を用いた詳細な研究もない。

さらに、本症の有効な治療法の開発もなく、患者や家族は解明を切望している。

2. 研究の目的

メレダ病は常染色体性劣性の掌蹠角化症でありその原因遺伝子が SLURP1 遺伝子であることが明らかにされている。本研究の目的は、SLURP1 の欠損により表皮細胞の過度な角化に至る機序を明らかにすること、ならびに合成 SLURP1 を用いた蛋白補充療法の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

- 1) メレダ病患者の遺伝子解析
- 2) メレダ病患者の表皮細胞と線維芽細胞の培養
- 3) 遺伝子導入による誘導実験
- 4) 患者細胞遺伝子発現の網羅的解析 (RNAseq)
- 5) siRNA 導入による抑制実験
- 6) 合成 SLURP1 作成のニコチン性アセチルコリン受容体への結合実験
- 7) 改良型合成 SLURP1 の細胞や組織での効果判定

4. 研究成果

1) メレダ病患者の遺伝子解析
当教室では全国、海外から掌蹠角化症の遺伝子解析の依頼がある。その中で、高度な角化を示し、手背足背にも及ぶため指趾に絞扼輪を作り指趾の切断などを示す症例を蓄積。ゲノム DNA について、SLURP1 遺伝子の解析を行い、変異を同定した。

2) メレダ病患者の表皮細胞と線維芽細胞の培養

メレダ病患者の皮膚を生検。表皮と真皮を分離し、表皮細胞と線維芽細胞を分離培養。細胞での SLURP1 の遺伝子、蛋白の発現を確認した。

3) 遺伝子導入による誘導実験
SLURP1cDNA をクローニングし、発現ベクタ

ーに導入。発現ベクターを正常および患者細胞に導入。患者細胞では、角化や増殖に関連した遺伝子の正常化があるか確認した。SLURP1 誘導でのそれらの遺伝子発現の変化を RT-PCR やウェスタンブロットで調べた。

4) 患者細胞遺伝子発現の網羅的解析 (RNAseq)

培養患者表皮細胞と線維芽細胞から total RNA を分離。Poly(T)オリゴビーズにて poly A RNA を精製し、逆転写酵素にて cDNA を作成。2 本鎖 cDNA 合成後、両端にアダプター配列を付加し、PCR で増幅。イルミナの miSEQ にて 36bp シングルリードの読み取りでシーケンス解析を行った。

取得したタグをリファレンス配列上にマップし、その遺伝子の発現量をタグの読み取り数としてカウントし RPKM 値を算出。特に、表皮細胞の分化、増殖、遊走に関連する遺伝子の発現に注目した。

5) siRNA 導入による抑制実験

合成した SLURP1 遺伝子抑制 siRNA 発現ベクターを構築、正常細胞に導入して、メレダ病にみられる変化が見られるかを確認した。メレダ病で構成した 3 次元培養で皮膚構築。メレダ病患者から得られた表皮細胞と線維芽細胞から 3 次元皮膚を作成。その皮膚を無免疫マウスに移植してメレダ病にみられるような変化があるか肉眼的、組織学的に検討した。免疫組織学的に、SLURP1、その他角化に関連した蛋白の発現を確認した。

6) 合成 SLURP1 作成のニコチン性アセチルコリン受容体への結合実験

現在までのニコチン性アセチルコリン受容体リガンドのデータベースやコンピューターソフトによる予想から、受容体への結合を強める、あるいはシグナルを高めるアミノ酸の同定した。その結果に従い、数個の改良

型 SLURP1 の合成を委託。得られた合成 SLURP1 の表皮細胞を 7 型アセチルコリン受容体への結合を標識ブンガロトキシンの結合阻害を基に測定し、うまく働く合成 SLURP1 を選択した。

7) 改良型合成 SLURP1 の細胞や組織での効果判定

培養メレダ病表皮細胞を培養し、合成 SLURP1 を投与して、遺伝子発現の回復を確認した。次に、3 次元構築して無免疫ラットに移植した 3 次元皮膚にて合成 SLURP1 を外用、あるいは全身投与でその効果を見た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. [Nakajima K](#), Jin K, Kaneko T, Matsuzaki Y, Aizu T, Nakano H, Sawamura D: Cholesterotic fibrous histiocytoma with no associated dyslipidemia. *Int J Dermatol*. 査読有, 2017;56:e124-e126. doi: 10.1111/ijd.12380.
2. [Akasaka E](#), Nakano H, Takagi Y, Toyomaki Y, Sawamura D: Multiple Milia as an Isolated Skin Manifestation of Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Evidence of Phenotypic Variability. *Pediatr Dermatol*. 査読有, 2017;34(2):e106-e108. doi: 10.1111/pde.13047.
3. Korekawa A, [Nakajima K](#), Nakano H, Sawamura D: Translucent basal cell carcinoma with a single cyst of the upper eyelid. *J Dermatol*. 査読有, 2017;44(7):e154-e155. doi: 10.1111/1346-8138.13814.
4. Korekawa A, [Nakajima K](#), Nakano H, Sawamura D: Successful epithelialization of perianal infantile hemangioma, presenting as

- intractable ulcers, with application of protective colostomy powder. *J Dermatol*. 査読有, 2017; 44:e264-e264. doi: 10.1111/1346-8138.13938
5. Korekawa A, Makita E, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D: External chalazion as reddish and intractable lower eyelid nodules in a child. *J Dermatol*, 査読有, 2017;44(5):e93-e94. doi: 10.1111/1346-8138.13650.
 6. Korekawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D: Subcutaneous histiocytoid Sweet's syndrome followed by acute myelocytic leukemia. *J Dermatol*. 査読有, 2016; 43(11): 1370-1371. doi: 10.1111/1346-8138.13401.
 7. Akasaka E, Okawa Y, Nakano H, Takiyoshi N, Rokunohe D, Toyomaki Y, Sawamura D, Sueki H: Two Japanese familial cases of punctate palmoplantar keratoderma caused by a novel AAGAB mutation, c.191_194delCAAA. *J Dermatol Sci*. 査読有, 2015;78(2):156-158. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.004.
 8. Moritsugu R, Tamai K, Nakano H, Aizu T, Nakajima K, Yamazaki T, Sawamura D: Functional analysis of the nuclear localization signal of the POU transcription factor *Skn-1a* in epidermal keratinocytes. *Int J Mol Med*. 査読有, 2014; 34(2):539-544. doi: 10.3892/ijmm.2014.1803.
 9. Minakawa S, Kaneko T, Rokunohe D, Nakajima K, Matsuzaki Y, Nakano H, Hashimoto T, Sawamura D: Pemphigoid gestationis with prepartum flare. *J Dermatol*. 査読有, 2014; 41(9): 850-851. doi: 10.1111/1346-8138.12576.
 10. Korekawa A, Nakajima K, Nakano H, Sawamura D: Necrobiosis Lipoidica in the Absence of diabetes mellitus: A case report and an analysis of 116 Japanese cases. *Case Rep Clin Med*. 査読有, 2014; 3: 639-643. doi:10.4236/erem.2014.312136.
- 〔学会発表〕(計7件)
1. 赤坂英二郎、中野 創、河野通浩、秋山真志、澤村大輔: X連鎖性魚鱗癬の遺伝子診断について. 第32回角化症研究会、2017年
 2. 赤坂英二郎、中野 創、神田由紀、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔: 末梢血間葉系幹細胞における型コラーゲン発現について. 第24回分子皮膚科学フォーラム、2017年
 3. Korekawa A, Akasaka E, Rokunohe D, Fukui T, Makita E, Sawamura D, Sawamura D: Nagashima-type palmoplantar keratoderma: A possible soil of melanoma. 第31回表皮細胞研究会、2017年
 4. 赤坂英二郎、中野 創、三澤 恵、清水忠道、澤村大輔: 長島型掌蹠角化症との鑑別を要した Papillon-Lefèvre 症候群. 第31回角化症研究会、2016年
 5. 赤坂英二郎、中野 創、鷹木由里子、豊巻由香、澤村大輔: 当科における掌蹠角化症の遺伝子変異検索. 日本皮膚科学会青森地方会第371回例会、2015
 6. 赤坂英二郎、鷹木由里子、豊巻由香、中野 創、澤村大輔、矢口 直: SERPINB7変異を同定した長島型掌蹠角化症の1例. 日本皮膚科学会青森地方会第366回例会、2014年
 7. 櫻庭裕佑、赤坂英二郎、六戸大樹、中野 創、澤村大輔: 長島型掌蹠角化症型の遺伝子診断. 第29回角化症研究会、2014年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島 康爾 (NAKAJIMA, Koji)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：7 0 3 7 4 8 3 2

(2)研究分担者

赤坂 英二郎 (AKASAKA, Eijiro)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：3 0 4 3 6 0 3 4

六戸 大樹 (RKUNOHE, Daiki)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：5 0 4 3 6 0 3 6