

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860896

研究課題名(和文)カルシウムポンプ異常症ダリエー病の抗紫外線治療への試み

研究課題名(英文) Darier disease- possible therapeutic approach for ultraviolet B-induced aggravation.

研究代表者

上條 麻弥 (Kaga-Kamijo, Maya)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30723382

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)：ダリエー病患者が自然界の紫外線(UV)暴露により症状悪化に至るメカニズムを解明するため、培養表皮細胞を用い、プロスタグランジンE(PGE)・PGE受容体(EP1-4)刺激を介する本疾患責任遺伝子ATP2A2遺伝子の発現制御を調べた。siRNA導入によるEP1-4発現の抑制下でUV照射を行った。UV照射によりEP4発現は増加し、UV誘発性のATP2A2抑制はsiRNAによるEP4ノックダウンで解除されATP2A2発現量が回復した。EP4作用薬・拮抗薬での効果は確認されず、臨床的应用には効果的なノックダウン方法の探索が必要だが、EP4がUV照射時のATP2A2発現に抑制的に関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Darier disease (DD) is an autosomal dominant inherited skin disorder. A responsible gene for DD is the human ATP2A2 gene encoding SERCA2 which transports Ca²⁺ from the cytoplasm into reservoirs in the ER. Ultraviolet (UV) B exposure is supposed to be one of the major aggravating factors of DD. Neither treatment of normal human keratinocytes(NHks) with EP4 antagonist before and after UV irradiation nor simple administration of EP4 agonist influenced on ATP2A2 mRNA level. Instead, EP4 siRNA reduced EP4, UVB irradiation markedly increased EP4, and the UVB-induced increment of EP4 was also suppressed by EP4 siRNA in a protein level. Although UVB irradiation downregulated ATP2A2 in mRNA level, the UVB-mediated downregulation of ATP2A2 mRNA was recovered by EP4 siRNA introduction. The result was also confirmed in SERCA2 protein level. These findings indicated that EP4 receptor is involved in UVB-mediated downregulation of ATP2A2/SERCA2 via PGE2-EP4 signaling in NHks.

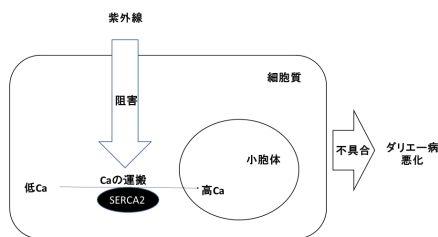
研究分野：角化異常症

キーワード：皮膚科学 紫外線 ダリエー病 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

(1) ダリエー病は難治性皮膚疾患である。患者は小児期～10歳台に、顔面・胸部・背部などに角化性小丘疹を生じ、漸次、鱗屑・痂皮を伴い時に融合して疣状局面となる。皮疹の浸軟、二次感染による強い悪臭は、QOLを著しく低下させる。本症は、国内外に患者が報告されているが、人種差は明らかではなく、国内に数千人の患者がいると推定されている。悪化因子のひとつとして高温、多湿、妊娠・出産、UV暴露、機械的刺激などが挙げられる。UVは重要な悪化因子であり、夏季に露光部皮膚の水疱・びらんが形成されやすくなるが、悪化のメカニズムはまだ十分に解明されていない。近年、UV誘発性のプロスタグランジン E2 - PGE 受容体を介する免疫抑制作用 (Kitipong Soontrapa et al., 2011)、有棘細胞癌や基底細胞癌など露光部位に発症する皮膚癌において、PGE合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ2 (以下 COX2) の阻害薬による治療効果 (Elmets CA et al., 2010) が明らかになっている。

(2) ダリエー病責任遺伝子の同定以降 (Sakuntabhai et al., 1999)、多数の ATP2A2 遺伝子変異が報告されている。疾患の発症機序としては、ATP2A2 遺伝子のハプロインサフィシエンシーが考えられており、片側のアレルの変異による正常遺伝子産物の低下に、何らかの要因で正常アレルからの ATP2A2 mRNA、タンパク発現量低下が重なり、細胞内カルシウム濃度に逸脱が生じて発症すると考えられている。カルシウム代謝は表皮細胞の正常な分化、細胞間接着、アポトーシスを制御する重要なシグナルであり、カドヘリンを含む細胞間接着分子の合成促進に重要であるが (Green et al., 2010) 本症患者では、カルシウムポンプ異常が、表皮細胞の分化、立体構造の維持を妨げ、異常角化細胞、表皮細胞間の裂隙形成を引き起こしていると予想される。しかし発症に至るプロセスや、紫外線による悪化機序のメカニズムは解明されていない。



ダリエー病患者では正常 SERCA2 が低下し、Ca 運搬予備力が乏しい
UV が正常 SERCA2 を更に低下させ、症状が悪化する

(3) 研究者が所属する研究室はこれらのカルシウムポンプ異常疾患の病態解明、治療の開発を模索する重要な施設である。ダリエー病患者、ヘイリー・ヘイリー病といったカルシウムポンプ遺伝子異常疾患の診療を積極的に行っており、希少疾患ではあるが、数十名の患者が来院する。これらの患者において、本疾患患者の遺伝子診断、責任遺伝子におけるプロモーター領域の解析などを行っている。これまで、ヒト表皮角化細胞において UV 照射が ATP2A2 mRNA レベル低下を引き起こすこと (Mayuzumi et al., 2005)、COX2 阻害薬セレコキシブが、UV 照射に誘発される ATP2A2 遺伝子発現低下を回復させること (Sugimura et al., 2011; Kamijo et al., 2012) を明らかにした。この結果を臨床応用するため、順天堂医院ではダリエー病患者を対象とした COX2 阻害薬内服治療研究を申請中である。これは、既に鎮痛薬として発売されているセレコキシブ (セレコックス®) を治療に用いて臨床効果を検討するものであり、ダリエー病患者への効果の評価のみならず、セレコキシブ内服の皮膚疾患治療への応用を模索し長期使用の安全性を明らかにするうえでの重要な治療研究プロジェクトと考えられる。また、本学アトピー疾患研究センターとの共同研究による ATP2A2 のプロモーター領域の解析結果においては、転写因子 Sp1 が ATP2A2 遺伝子の転写調節に促進的な役割を担うこと (Takagi et al., 2007) を報告したが、一方、PGE は、Sp1 活性化に作用することが報告されており (Kanda et al., 2005; Matlhagela et al., 2005) これらの相反する報告について、今後の治療方法の探索に要する研究課題の一つとして、詳細な解明が待たれていた。これらの背景を踏まえ、本研究課題では UV 照射が ATP2A2 遺伝子発現の低下を引き起こすメカニズムの候補として、UV の直接的な作用によるもの、PGE 増加・PGE 受容体刺激を介するもの、PGE 増加・IL-6 誘導、cAMP/PKA および PI3K-dependent pathway を介するものを考え、明らかにして行く。また転写因子 Sp1 が紫外線照射下での疾患機序への関与や、UV 刺激や PGE 受容体刺激・阻害が細胞内カルシウム濃度勾配へ与える影響を明らかにし、ダリエー病の UV による悪化への新規治療方法を探索する。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まず、UV 照射を受けても ATP2A2 タンパク発現が維持されることが、ダリエー病の悪化予防につながる可能性があると考えられる。ヒト表皮角化細胞におい

て、UV 照射により惹起されることの判明している PGE が、ATP2A2 遺伝子発現に影響するメカニズムを探るため、プロスタグランジン E (以下 PGE) 受容体(EP1, EP2, EP3, EP4)の作動薬、拮抗薬投与による ATP2A2 発現の変化を明らかにする。

次に、関与の可能性のある受容体については、それらのノックダウンにより UV 誘発性の ATP2A2 抑制が解除されるか否かを明らかにする。

一方、抑制が解除される場合は、PGE 受容体の拮抗が、ATP2A2 発現を回復させ、日光曝露による悪化を予防する治療につながる可能性がある。これまで研究者らが報告した COX2 阻害薬による効果と比較し、より効率良く回復させる可能性や、両者の併用による相加・相乗効果を解析し、治療の可能性を大幅に広げることが可能となる。その場合は、マウスモデルや患者を被験者とした、至適投与量、投与方法、臨床症状を評価する計画に繋がる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

新生児包皮由来の正常培養表皮細胞(NHKs) KURABO (Osaka, Japan) 第3 - 4世代を実験に用いた。全ての実験は順天堂大学倫理委員会の承諾を得、ヘルシンキ条約を遵守し施行した。

(2) B 波長紫外線の照射

60 - 70%の密度に培養した NHKs に、UVB ランプ (Torex FL20S/E30; Toshiba Light and Technology Co., Tokyo, Japan).を用いて 30 mJ/cm² UVB を照射した。

(3) 定量的逆転写 PCR

RNeasy Micro Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出・精製し、ReverTraAce qPCR RT Kit (TOYOBO)を用いて逆転写を行い、StepOne Plus Real-Time PCR System を用いて mRNA 定量を行った。試薬は human PTGER4 (Hs00168761), human ATP2A2 (Hs00155939), and human GAPDH as endogenous control (#4326317E)を用い、解析は StepOneTM software version 2.0.1 (Applied Biosystems)を用いた。

(4) siRNA を用いたプロスタグランジン E 受容体タイプ 4 の抑制

50μM prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)siRNA(#s227939; Applied Biosystems)2μl およびコントロール siRNA を、lipofectamine (Invitrogen) を用いて NHKs に導入した。

(5) ウェスタンブロット

NHKs の溶解産物を 10%SDS ポリアクリルアミドゲルに泳動し、PVDF膜 Immobilon-P (Merck Millipore, Bedford, MA)に転写した。

一次抗体は抗 SERCA2 抗体 (ab2861 (mouse), Abcam)、抗 GAPDH 抗体 (14C10) (#2118(rabbit), Cell Singaling Technology Inc., MA, U.S.A.)を用いた。二次抗体は goat 抗マウス IgG 抗体と goat 抗ラビット IgG 抗体 (#115-035-003 and #111-035-144, respectively; Jackson Immuno Research Laboratories Inc., PA, U.S.A)を用いた。解析には C-DiGiT (C-DiGiT LI-COR Inc., Nebraska, U.S.A)を用いた。

(6) 統計解析

独立学生T検定 P < 0.05 を用いた。

(7) フローサイトメトリー

NHKs を cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences)で固定処理した後、抗体として EP4 Receptor (C-Term) Polyclonal PE Antibody (No.10479) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を添加した。細胞内の EP4 染色を目的として、the Cytotfix/CytopermTM Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences)を用いて細胞膜を処理した後に再度上記の抗体を添加した。サンプルは FACSCalibur (BD Biosciences)で測定し、解析には Flowjo software (Tree Star, Ashland, OR)を用いた。

4. 研究成果

(1) EP4 拮抗薬 (ONO-AE3-208)を UV 照射の前後に投与する実験と、EP4 作用薬 (CAY1058)を NHKs 培養液に直接添加する実験では、NHKs の ATP2A2 mRNA レベルに影響を与えなかった (データ未公開)。

(2)リアルタイム PCR で測定した結果、EP4 siRNA を導入した NHKs ではコントロール siRNA の導入したものと比較し、EP4 mRNA レベルが約 80%抑制された (Fig. 1A)。30mJ/cm² の UVB 照射で、EP4 mRNA レベルは UVB 無しの 3.6 倍に増加し、その際に EP4 siRNA を導入した細胞では最大で約 70%まで EP4 mRNA 発現が抑制された (Fig.1A)。

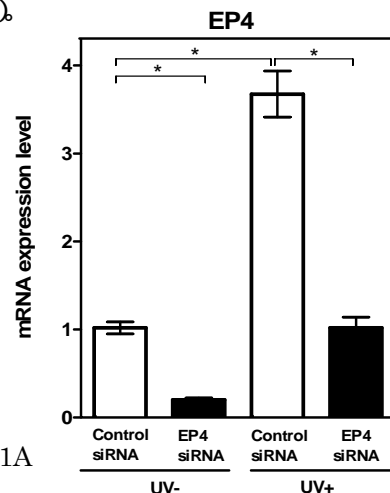


Figure.1A

フローサイトメトリーを用いて、タンパクレベルでも同様の結果が得られた。即ち、EP4siRNA 導入が EP4 発現を抑制し (Fig. 1C)、UVB 照射により EP4 発現は著明に増加し (Fig. 1B)、UVB 誘発性の EP4 増加も、EP4siRNA 導入によって抑制された (Fig. 1D)。

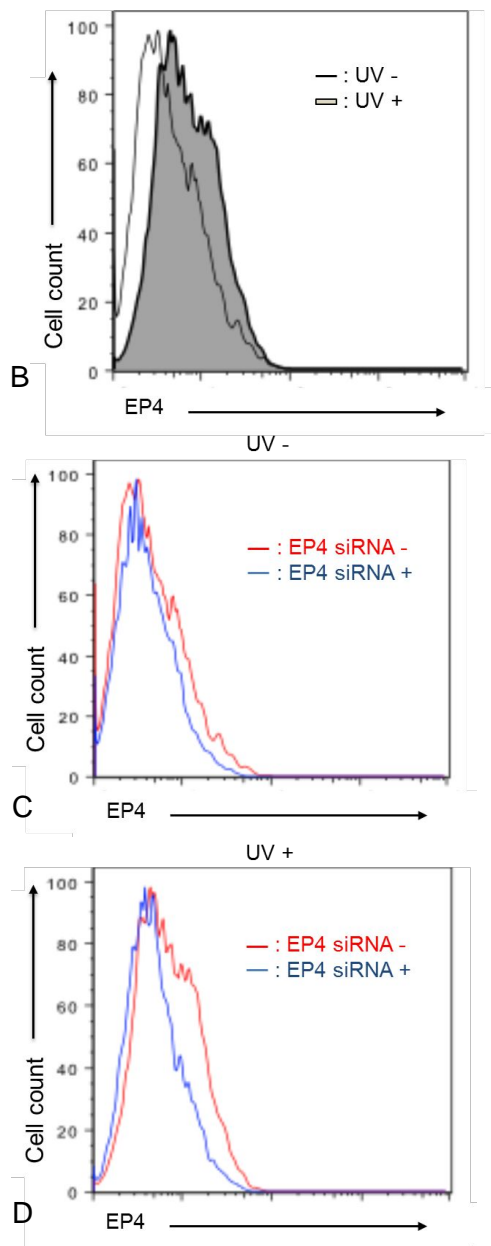


Figure.1

(3) 定量的 RT-PCR によって、EP4siRNA 導入時の ATP2A2 転写状況を評価した。その結果、ATP2A2 mRNA レベルは、EP4siRNA 導入 NHKs ではコントロール siRNA 導入 NHKs に比べ 1.5 倍に増加していた (Fig. 2A)。UVB 照射は ATP2A2 mRNA レベルを低下させ、その抑制は EP4siRNA 導入により解除され回復した (Fig. 2A)。タンパクレベルにおいても、ウエスタンブロット法により SERCA2 タンパクレベルが UVB 照射によりやや低下する事、EP4siRNA 導入が UVB 誘発性の SERCA2 抑制を解除しタンパクレベ

ルを回復させる事が明らかになった (Figure 2B)。

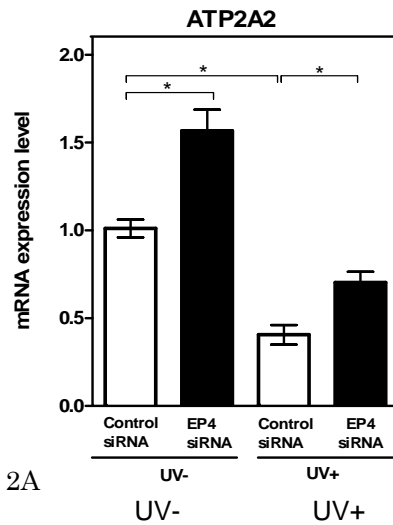


Figure. 2A



Figure. 2B

(4) 考案

これらの結果から、NHKs で EP4 受容体が PGE2-EP4 シグナルを介し UVB 誘発性 ATP2A2/SERCA2 抑制に関与する事が示された。

PGE 受容体は組織特異的・細胞特異的に発現しており、ヒト表皮細胞ではすべての PGE 受容体が発現する [1]。PGE2 シグナルは G タンパク結合型 PGE 受容体 (EP1-4) を介して伝達され、PGE 結合による EP 活性化は、EP のタイプ毎に規定される、細胞内の cAMP, Ca²⁺, アデニル酸シクラーゼ濃度等にそれぞれ影響を及ぼす。そして、様々な生物学的変化を引き起こす。UV 照射を受けたマウス皮膚で、EP4 は表皮、真皮内のリンパ球、血管内皮細胞、表皮細胞の細胞膜への分布が確認されている [4]。EP2, EP4 は cAMP/PKA シグナルへ繋がるが一方で、EP4 のみ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 回路へと刺激が伝達される [2]。AP1, AP2, Sp1, NFκB, MyoD, NF-IL6 は EP4 のプロモーター領域に同定されている [3]。一方、PGE2 は cAMP/PKA および PI3K 回路を介して IL-6 発現を促進する [4]。UVB 照射による ATP2A2 抑制には、抗 IL-6 抗体が一部有効との報告がある [5]。しかし、IL-6 や IL-6 発現に関わる NF-IL6 の発現は、今回の実験において EP4siRNA 導入をしても抑制されなかった (データ未公開)。従って、NHKs において IL-6, NF-IL6 は PGE2-EP4 シグナルを介した ATP2A2 制御には関わらない。更

に、Sp1 は既に ATP2A2 のプロモーター領域を活性化し発現促進に作用する事が明らかになっている [6]。従って、PGE2-EP4 シグナル回路がいかに Sp1 機能を修飾するかを解明する事は、DD の疾患機序解明への重要なアプローチであろう。

近年、マウスにおいて、EP4 シグナルは receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を介して、制御性 T 細胞による UV 誘発性の全身性免疫抑制に関与する事が報告された [7]。ダリエー病の病態解明には、紫外線の直接作用のみならず、UVB 誘発性リンパ球、ランゲルハンス細胞の関与も鑑別が必要である。本研究で我々は UVB 誘発性 ATP2A2 発現抑制における EP4 受容体の関与に注目し研究を行った。今後も PGE2-EP4 シグナルの作用を更に解明する事が、ダリエー病への価値ある治療アプローチに繋がると考える。

<引用文献>

[1] Tober KL, Thomas-Ahner JM, Kusewitt DF, Oberyszyn TM: Effects of UVB on E prostanoïd receptor expression in murine skin. *J Invest Dermatol* 127: 214-221, 2007.

[2] Sugimoto Y, Narumiya S: Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282: 11613-11617, 2007.

[3] Arakawa T, Laneuville O, Miller CA, Lakkides KM, Wingerd BA, DeWitt DL, et al.: Prostanoid receptors of murine NIH 3T3 and RAW 264.7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene. *J Biol Chem* 271: 29569-29575, 1996.

[4] Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K: Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C1445-1456, 2010.

[5] Mayuzumi N, Ikeda S, Kawada H, Ogawa H: Effects of drugs and anticytokine antibodies on expression of ATP2A2 and ATP2C1 in cultured normal human keratinocytes. *Br J Dermatol* 152: 920-924, 2005.

[6] Takagi A, Nishiyama C, Maeda K, Tokura T, Kawada H, Kanada S, et al.: Role of Sp1 in transcription of human ATP2A2 gene in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128: 96-103, 2008.

[7] Soontrapa K, Honda T, Sakata D, Yao C, Hirata T, Hori S, et al.: Prostaglandin E2-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U*

S A 108: 6668-6673, 2011.

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)

Maya Kamijo, Akino Wada, Reiko Mineki, Tamami Sakanishi, Shigaku Ikeda, Prostaglandin E receptor 4 inhibition restores UVB-induced downregulation of ATP2A2 / SERCA2 in cultured normal human keratinocytes, *Journal of Dermatological Science*, 査読有, Vol.81, No.1, 2016, pp.69-71

Maya Kamijo, Evaluating the genotypes and neuropsychiatric phenotypes in Darier disease, *British Journal of Dermatology*, 査読無, Vol. 174, No.3, 2016, pp.488-489

Atsushi Takagi, Maya Kamijo, Shigaku Ikeda, Darier disease, *Journal of Dermatology*, 査読無, Vol.43, No.3, 2016, pp.275-279

〔学会発表〕(計1件)

Maya Kamijo, Akino Wada, Reiko Mineki, Tamami Sakanishi, Shigaku Ikeda, Prostaglandin E receptor 4 inhibition restores UVB-induced downregulation of ATP2A2 / SERCA2 in cultured normal human keratinocytes, 日本研究皮膚科学会 第40回年次学術大会・総会, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上條 麻弥 (KAMIJO, Maya)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 30723382

(3) 連携研究者

高木 敦 (TAKAGI, Atsushi)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 40459160

池田 志孝 (IKEDA, Shigaku)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 40193198

(4) 研究協力者

和田 章乃 (WADA, Akino)