

Expression of the Keratinocyte Lipid Transporter ABCA12 in Developing and Reconstituted Human Epidermis

(ヒト胎生期皮膚と再構成皮膚における表皮脂質輸送蛋白 ABCA12の発現)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】道化師様魚鱗癬 (harlequin ichthyosis: HI)は、最も重症な常染色体劣性遺伝性の先天性魚鱗癬である。HI では胎生期より皮膚形態の異常が認められる。出生時には全身を厚い板状の皮膚で覆われ、眼瞼の外反と口唇の突出開口を呈し、多くが二次感染、重度の貧血、脱水、循環不全などにより生後1~2週以内に死亡する。2005年に、ATP-binding cassette (ABC) transporterの1つである表皮細胞の脂質輸送蛋白 ABCA12 の機能障害が、HI の病因であることが明らかとなった。

ABC transporter スーパーファミリーは、ATP 由来のエネルギーを利用し、生体膜を通しイオン、アミノ酸、蛋白、脂質など様々な基質を輸送する膜蛋白である。なかでも ABCA サブファミリーは種々の遺伝疾患の原因遺伝子として近年注目され、その多くが脂質輸送に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。

今回、ABCA12 の役割を明らかにするため、ヒト胎生期皮膚と、免疫不全マウスに人工的に再構成した HI 皮膚とにおいて ABCA12 の発現を検討した。

【材料と方法】倫理委員会の承認、家族の同意を得た上で、人工中絶児より正常ヒト胎生期皮膚(胎生 7-22 週)を採取した。HI 胎児皮膚は出生前診断で診断された中絶児(胎生 21 週)より採取した。それぞれにつき、免疫染色により ABCA12、トランスグルタミナーゼ 1 (TGase1)、グルコシルセラミド、ケラチン 10、カテプシン D の発現を検討した。また、胎生期皮膚の超微形態学的構造を電子顕微鏡により観察した。さらに、real-time PCR を用いて、胎生期皮膚における ABCA12、TGase1、ロリクリン、カリクレイン 7 の発現を調べた。

免疫不全マウスの背部にシリコンチャンバーを用いて、ヒト正常表皮細胞、2人の HI 患者由来表皮細胞をそれぞれヒト正常線維芽細胞と混合して移植し、ヒト皮膚の再構成に成功した。(HI 患者表皮細胞は、一人は homozygous splice site mutation c.3295-2A>G、他の一人は heterozygous mutations p.Ser387Asn, c.4158_4160del(p.Thr1387del)の遺伝子変異がすでに同定されている患者である。)再構成された皮膚につき、ABCA12、グルコシルセラミドの免疫染色と、電子顕微鏡を用いて超微形態学的観察を行った。

【結果】免疫組織学的な ABCA12 の発現は、2層の胎生期皮膚(胎生 6~9 週)では periderm に見られた。3層(胎生 10~13 週)、あるいは、多層化した表皮(胎生

14週~22週)においては ABCA12 は periderm を含む表皮全層に見られたが、一方、角化関連蛋白である TGase1 の発現は periderm のみに認められた。超微形態学的には、この時期のヒト胎児表皮上層の細胞に層板顆粒と同様の大きさの顆粒を認め、4層の表皮の段階では、periderm の細胞膜の肥厚が見られた。新生児皮膚においては、成人皮膚とほぼ同様の分布を示し、ABCA12、TGase1 とともに表皮上層の主に顆粒層に限局して発現していた。ABCA12 mRNA の発現を real time-PCR により測定した結果、免疫染色の結果と一致して、15週前後での発現の増加を認め、胎生 18/20 週では成人ヒト皮膚の 62% に達した。一方、TGase1、ロリクリン、カリクレイン 7 の発現は低値にとどまった。

免疫不全マウスにヒト正常表皮細胞と HI 患者由来表皮細胞を移植し、ヒト皮膚の再構成に成功した。再構成皮膚は、基本的にヒト皮膚と同様の肉眼的特徴を有していた。HI 患者由来細胞の移植部は粗造な表面と過角化を呈した。病理組織学的に HI 再構成皮膚は非常に厚い角層をもち、免疫染色にて ABCA12、グルコシルセラミドの発現低下を示した。超微形態学的には、HI 患者皮膚と同様に角層に異常な層板顆粒と脂質滴を認めた。一方、正常ヒト表皮細胞由来の再構成皮膚は、免疫染色、超微形態学的構造でもヒト正常皮膚と同様の所見が得られた。

【考察】今回の結果から、ABCA12 は胎生期皮膚の発達段階において、早期から発現していることが明らかになった。ABCA12 は 3 層の表皮以降はより広い範囲で表皮全体に分布しており、電子顕微鏡下で観察された顆粒や periderm の細胞膜の肥厚、ABCA12 mRNA の胎生 15 週での発現増加と関連している可能性がある。ABCA12 の発現は、他の角化関連蛋白である TGase1、ロリクリン、カリクレイン 7 と異なり、表皮全層に胎生早期から強く認められた。胎生 110 日以降の皮膚においてセラミドなどの脂質が豊富にみられるという以前の報告とあわせ、胎生期の periderm cell が、ヒト皮膚における顆粒層と類似した脂質分泌の役割を担っている仮説が考えられる。

さらに、出生後の乾燥した環境における ABCA12 の役割を検討するため、我々は ABCA12 の変異が同定されている患者表皮細胞を用い、免疫不全マウスの背部に HI 皮膚の再構成を試みた。再構築された皮膚は著明な過角化の所見を呈し、免疫染色、電子顕微鏡学的所見においても HI 皮膚と同様の特徴を有していた。

このことから、ABCA12 の変異は出生後の乾燥した環境においても HI の症状をきたす原因となっていることが示唆された。この再構成モデルは今後 ABCA12 の機能解明と HI 患者の治療を評価する上で非常に有用であると考えられる。

HI の長期生存例では、成長につれて、葉状魚鱗癬(lamellar ichthyosis)や非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma) の表現型に類似した、より軽微な症状を呈することが知られている。このメカニズムはまだ明らかではないが、ABCA12 の欠損に対する代償機構が働いている可能性が考えられる。再構成皮膚において、乾燥した環境での ABCA12 の up regulation を予測したが、今回の研究では認められなかった。ABCA12 の直接的な up regulation ではない何らかの代償機転が働いている可能性があり、今後の解明が望まれる。

【結論】 ABCA12 は、胎生期皮膚で発現し、羊水中から外界の環境への移行期を含め、湿潤および乾燥環境のいずれにおいても、きわめて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Expression of the Keratinocyte Lipid Transporter ABCA12 in Developing and Reconstituted Human Epidermis

(ヒト胎生期皮膚と再構成皮膚における表皮脂質輸送蛋白 ABCA12の発現)

道化師様魚鱗癬 (harlequin ichthyosis: HI)は、最も重症な常染色体劣性遺伝性の先天性魚鱗癬である。出生時には全身を厚い板状の皮膚で覆われ、生後1~2週以内に死亡する。2005年に、ATP-binding cassette (ABC) transporterの1つである表皮細胞の脂質輸送蛋白 ABCA12の機能障害が、HIの病因であることが明らかとなった。

今回、ABCA12の役割を明らかにするため、ヒト胎生期皮膚と、免疫不全マウスに人工的に再構成した皮膚においてABCA12の発現を検討した。

正常ヒト胎生期皮膚(胎生7-22週)、HI胎児皮膚(胎生21週)につき、免疫染色によりABCA12、トランスグルタミナーゼ1(TGase1)、グルコシルセラミドなどの発現を検討した。また、胎生期皮膚の超微形態学的構造を電子顕微鏡により観察した。さらに、real-time PCRにより、胎生期皮膚のABCA12、TGase1、ロリクリン、カリクレイン7の発現を調べた。また、免疫不全マウスにヒト正常表皮細胞、2人のHI患者由来表皮細胞をそれぞれヒト正常線維芽細胞と混合して移植し、ヒト皮膚の再構成に成功した。再構成皮膚につき、免疫染色と、電子顕微鏡を用いて超微形態学的観察を行った。

結果、免疫組織学的なABCA12の発現は、2層の胎生期皮膚ではperidermに見られた。3層あるいは多層化した表皮においてはABCA12はperidermを含む表皮全層に見られたが、TGase1の発現はperidermのみに認められた。超微形態学的には、この時期のヒト胎児表皮上層の細胞に層板顆粒と同様の大きさの顆粒を認め、4層の表皮の段階では、peridermの細胞膜の肥厚が見られた。新生児皮膚では、成人皮膚とほぼ同様に、ABCA12、TGase1ともに表皮上層の主に顆粒層に局限して発現していた。ABCA12 mRNAの発現は、免疫染色の結果と一致して、15週前後での発現の増加を認め、胎生18/20週では成人ヒト皮膚の62%に達した。一方、TGase1、ロリクリン、カリクレイン7の発現は低値にとどまった。

免疫不全マウスにヒト正常表皮細胞とHI患者由来表皮細胞を移植し、ヒト皮膚の再構成に成功した。HI患者由来細胞の移植部はHI患者皮膚と同様に粗造な表面と過角化を呈し、厚い角層をもち、免疫染色にてABCA12、グルコシルセラミドの発現低下がみられ、超微形態学的に、HI患者皮膚と同様に角層に異常な層板顆粒と脂質滴を認めた。一方、正常ヒト表皮細胞由来の再構成皮膚は、ヒト正常皮膚と同様の特徴が見られた。

今回の結果から、ABCA12は胎生期皮膚において、早期から発現していることが明らかになった。ABCA12は3層の表皮以降はより広い範囲で表皮全体に分布しており、超微形態学的所見や、ABCA12 mRNAの胎生15週での発現増加とあわせ、胎生期のperiderm cellが、ヒト皮膚における顆粒層と類似した脂質分泌の役割を担っている仮説が考えられる。

さらに、HI 患者表皮細胞を用いて再構築された皮膚は、HI 皮膚と同様の特徴を有していたことから、ABCA12 の変異は出生後の乾燥した環境においても HI の症状をきたす原因となっていることが示唆された。この再構成モデルは今後 ABCA12 の機能解明と HI 患者の治療を評価する上で非常に有用であると考えられる。これらより、ABCA12 は、胎生期皮膚で発現し、羊水中から外界の環境への移行期を含め、湿潤および乾燥環境のいずれにおいても、きわめて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

副査の岩永敏彦教授から、電顕像での層板顆粒の分布と ABCA12 の発現について、また他の重層扁平上皮での ABCA12 の発現に関して質問があった。

主査の渡辺雅彦教授から、ABCA12 の変異による層板顆粒の脂質輸送の機能障害と、染色による顆粒層内における脂質の発現の減弱の関連、また角層に貯留する異常な脂質滴との関連について質問があった。さらに、出生前後の劇的な環境変化に関するバリア機能関連の分子について質問があった。また、過角化と ABCA12 の関係について質問があった。

最後に、副査の清水宏教授から、ヒト皮膚再構成モデルを利用した治療実験の展望についての質問があり、申請者は大概適切な回答をした。

この論文は、胎生期皮膚における ABCA12 の発現について初めて示したこと、HI 皮膚の再構成に成功した点で高く評価され、今後の ABCA12 の機能解明と、HI 患者治療の評価への活用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。