

琉球大学学術リポジトリ

[依頼総説] カンナビノイド作動薬, バニロイド作動薬によるダリエー病治療薬の開発

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2012-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): Darier's disease, cannabinoid, vanilloid, TRPV, CB2 作成者: 高橋, 健造 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016239

カンナビノイド作動薬, バニロイド作動薬によるダリエー病治療薬の開発

高橋 健造

琉球大学医学部大学院医学研究科
皮膚病態制御学講座

Cannabinoid and vanilloid agonists as novel therapeutics for Darier's disease

Kenzo Takahashi

Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus

ABSTRACT

Darier's disease is an autosomal dominant inherited keratoderma and is caused by a haplo-insufficiency of the ATP2A2 gene product, SERCA2 Ca channel. Due to the decrease in the active SERCA2 protein, the affected keratinocytes cannot conduct normal Ca metabolism and result in the individual dyskeratosis and acantholysis. Based on this pathogenesis, we had screened several hundreds of bioactive reagents to identify potential agents that could activate the transcription of ATP2A2 and thus might be a candidate therapeutics for Darier's disease. Consequently, we found that drugs belonging to the classes of cannabinoid and vanilloid agonists significantly increase the ATP2A2/SERCA2 expression at both mRNA and protein levels in cultured normal keratinocytes as well as in Darier's affected ones. Skin grafted on nude mice and the three-dimensional reconstituted model using patients' keratinocytes were used to confirm the effects of these therapeutics on phenotypic expression of Darier's disease. Following the application of selected agonists, the normal keratinizing process was restored without producing dyskeratotic cells and blisters, while the dyskeratotic cells and acantholytic lacunae still remained in the control treated with DMSO. The use of selective agonists confirmed that these pharmacological effects are produced through the activation of CB2, a cannabinoid receptor, and TRPV 3/4, a kind of thermal receptor sensing mid-range temperatures. We also noted that human body temperature tends to be somewhat higher at the seborrheic lesional skin areas compared with the nearby areas when measured by the thermograph. Based on these findings, we can expect to identify novel therapeutics for Darier's disease and, moreover, we can understand why Darier's disease worsens at seborrheic areas during summer season. The temperature of lesions appears to be slightly higher than the sensing range of the TRPV receptor in order to trigger the induction of Serca2 mRNA transcription. Thus, Darier's patients might suffer from severe skin lesions at the seborrheic area in the summer season. *Ryukyu Med. J., 29(3,4)17~21, 2010*

Key words: Darier's disease, cannabinoid, vanilloid, TRPV, CB2

はじめに

ダリエー病 (Darier's disease) は、単一遺伝子の変異による優性遺伝性の皮膚疾患ながら、生下時には全く皮膚症状を示さず、思春期以降に発症し夏期に増悪し、胸や顔面などの脂漏部位に特有の皮膚の部分に強く発症する。(Fig. 1) 欧米の報告では10万人に2 - 3人の有病率であり、本邦でも2000 - 4000人程度のダリエー病患者が存在すると考えられる。染色体の連鎖解析によりこの疾患の原因遺伝子・ATP2A2 (ATPase, Ca⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow switch 2) が同定され、このATP2A2遺伝子が規定する小胞体膜のカルシウムポンプであるSERCA2 (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) 蛋白の蛋白量が、健康人に比べ半分近くに低下していることが発症の原因であることが理解された¹⁻⁴⁾。

- 1) 思春期以降-40歳代での発症 (生下時は無症候)
- 2) 夏期に悪化・特徴的な皮疹の分布
- 3) 細胞内Caポンプ (SERCA2) の量の低下による

ダリエー病：(脂漏部位)
頭部・頬部・上胸部・頸部・腹部・足甲・爪



Fig. 1 ダリエー病の皮膚症状。

他の先天性皮膚疾患と同様に、このダリエー病に対する有効な治療方法は限られており、レチノイン酸の内服や活性型ビタミンD₃軟膏の外用などが用いられるが、それらの効果は限定的である。しばしば合併するブドウ球菌、単純ヘルペスウイルス感染症に対する対症療法が、治療の主体である。

ダリエー病の発症機序はhaplo-insufficiencyと呼ばれ、2本の対立遺伝子のうち1つの正常な遺伝子からの上記のカルシウムポンプの蛋白発現は正常に保たれているが、この健康人の半分だけの蛋白質の発現量では角化細胞の分化の制御ができずに異常角化や脆弱な細胞間接着を引き起こし、特有の皮膚症を発病すると考えられる。この際、ダリエー病においては変異遺伝子より転写される変異体蛋白 (変異型SERCA2) の存在自身は、発症の直接の原因とはならない点で、優性ネガティブ変異により発症する単純型先天性表皮水疱症のような遺伝性の皮膚疾患とはその発症機序が大きく異なる⁵⁻⁶⁾。

この発症メカニズムの理解を基盤として、このhaplo-

insufficiencyの機序で生じるヒトの疾患には、遺伝子治療などとは異なった、より直接的で単純な治療法・薬剤の探求が可能ではないかと考えた。即ち、原因遺伝子 (ATP2A2) の表皮角化細胞での発現をより亢進し、患者皮膚のSERCA2蛋白量を変異体、正常蛋白ともに2倍近くに増加し、その結果、正常に機能するカルシウムチャンネルの蛋白量を健康人のレベルに近づけることにより、皮膚病態を改善しうるのではないかと考えた^{7,8)}。

方法

1) 脂溶性薬剤ライブラリーより数百の薬剤を、各種の培養表皮角化細胞に添加した後に、経時的にRNA・タンパク質を抽出し、ダリエー病の原因遺伝子であるATP2A2遺伝子・SERCA2b蛋白をノーザンブロット法やウエスタンブロット法を用いて定量した。核膜ラミンの蛋白量とRNA量を定量化のコントロールとして用いた。

2) 代表的なヒト表皮角化細胞の細胞株であるHaCaT・HSC4細胞や正常ヒト角化細胞 (NHEK, クラボウ) あるいは、ダリエー病患者自身より樹立した角化細胞も用いた。培養液中に、10 - 500ナノモル程の濃度の脂溶性活性試薬を添加し、3・6時間後にRNAを、12・24時間後に全細胞蛋白を抽出した。

3) 施設での倫理委員会での承認を得た後、ダリエー病患者、あるいは他の皮膚腫瘍患者の外科切除標本の余剰部位の皮膚を培養や移植実験に用いた。

ヒト皮膚の器官培養は、可能な限り物理的に脂肪組織を取り除いた後に、表皮角化細胞に特化した培地であるKGM培地 (クラボウ社) の中に真皮側を培地中に浸し、角層側は大気中に露出した形態を維持できるように行った。

ヒト皮膚の移植手法としては、切除皮膚よりダーマトームにて真皮深層、脂肪織を切り落とした後に、ヌードマウスの背中に作製した皮膚欠損部を埋めるように縫合し、タイオーバーにより1週間圧迫固定を維持した。抜糸し移植皮膚の生着を肉眼的に確認した後に、薬剤の負荷テストを開始した。薬剤は新たに固定したタイオーバー綿花にしみこませて、移植皮膚に持続塗布される形で作用させた。

結果

数百種類の脂溶性薬剤のスクリーニングにより、陽イオンチャンネル型膜チャンネルであるの温熱感受性受容体 (transient receptor potential cation channel:TRPV) に対するパニロイド作動薬に薬剤 (Fig. 2) と、カンナビノイド受容体に対する作動薬 (Fig. 3) も2群が、ATP2A2遺伝子の発現を強く誘導することを発見した。

具体的には、合成カンナビノイド (WIN55-212-2, BM L-190,メタアナンドアミド) を含む数種の脂溶性薬剤や、内因性のバニロイド作動薬である脂溶性ドパミンの一群により、負荷後6時間から12時間にかけてATP2A2遺伝子の表皮角化細胞での転写が数倍に亢進した。この反応は濃度依存性を示した。これら作動薬をヘアレスマスの皮膚に外用した際や、ヒト皮膚を短期間器官培養した際に添加することで、表皮層でのSERCA 2 蛋白の発現の亢進が認められた (Figs. 4, 5)。器官培養におけるバニロイドアンタゴニストの刺激は、表皮細胞間での棘融解を生じ、一見、ダリエー病やヘイリー・ヘイリー病を思わせる病理変化を呈した (Fig. 6)。バニロイドが温熱感受性受容体の作動薬であることより表皮角化細胞の培養温度を32度より42度の間で変化させると、ATP2A2・SERCA2蛋白が、32度に近いより低温で発現が強いことが示された (Fig. 7)。またヒトの体表温度をサーモメーターで検討すると脂漏部位である虚部や顔面が周辺の皮膚よりも若干の温度が高いことが認められた (Fig. 8)。

内因性バニロイド(Acyl-Dopamines 類)によるATP2A2 mRNAの発現亢進

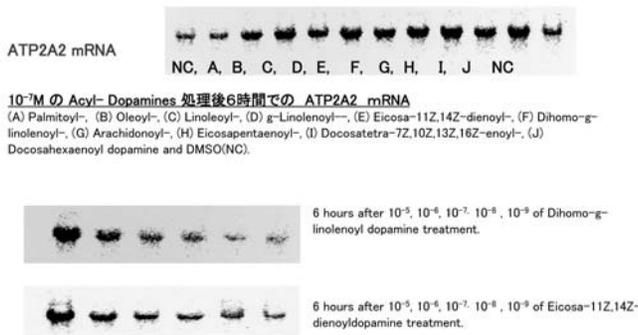


Fig. 2 内因性バニロイドに属する脂溶性ドパミンによるATP2A2遺伝子の発現亢進。

カンナビノイド作動薬による ATP2A2 mRNAの誘導

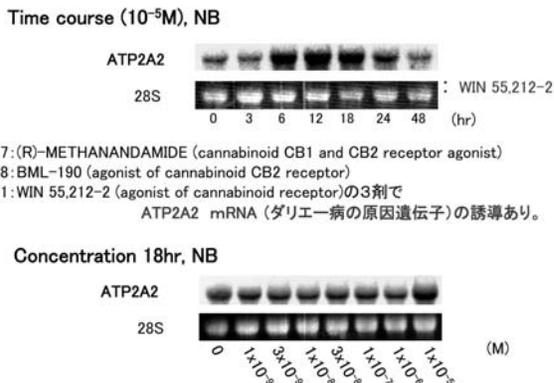


Fig. 3 カンナビノイド作動薬によるATP2A2遺伝子の発現亢進。

カンナビノイド・バニロイド作動薬とバニロイド阻害薬の7日間外用 (ODT)後の、ヘアレスマウスの皮膚の形態と SERCA2 蛋白の発現

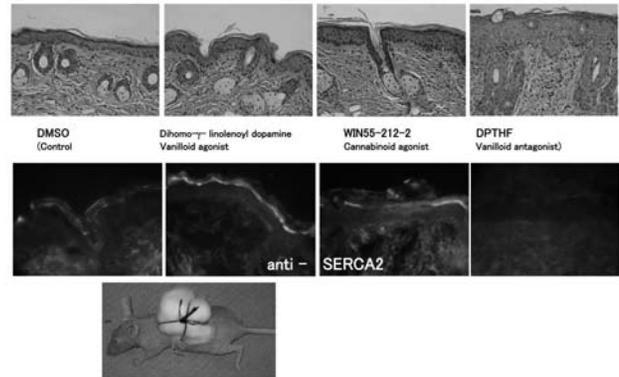


Fig. 4 バニロイドとカンナビノイド作動薬によるヘアレスマウス皮膚でのSERCA2蛋白の亢進。

Ex Vivo で器官培養したヒト小切片へのカンナビノイド・バニロイド作動薬添加後の SERCA2蛋白の発現誘導

IF staining: (anti-SERCA2 (green), anti-keratin (red))

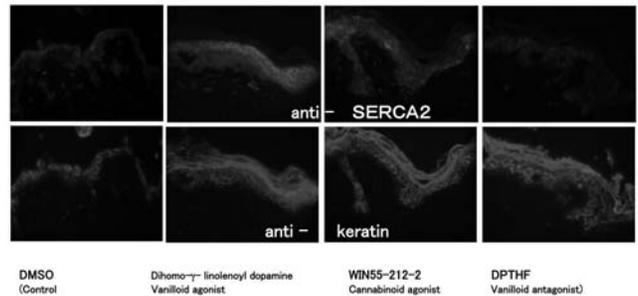


Fig. 5 ニロイドとカンナビノイド作動薬による器官培養ヒト皮膚でのSERCA2蛋白の亢進。

Ex Vivo で器官培養したヒト小切片へのカンナビノイド・バニロイド作動薬添加後の SERCA2 蛋白の発現誘導

HE staining after 24 - 48 hours treatments.

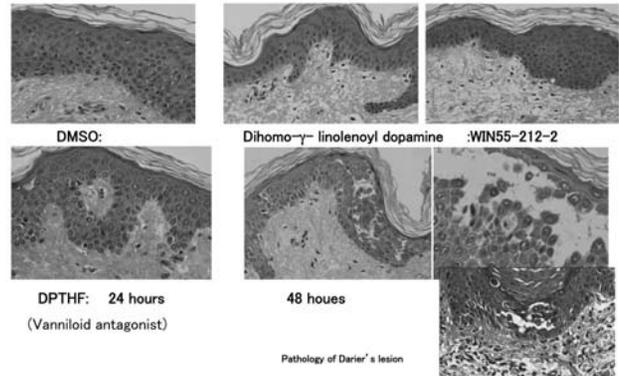


Fig. 6 バニロイドとカンナビノイド処理後の器官培養ヒト皮膚の形態の変化。

培養温度とATP2A2/ SERCA の発現

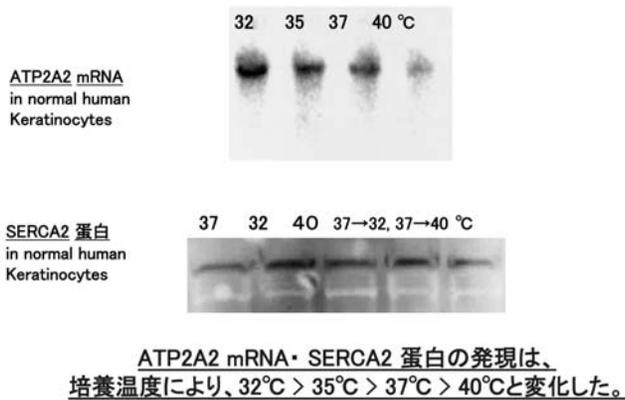
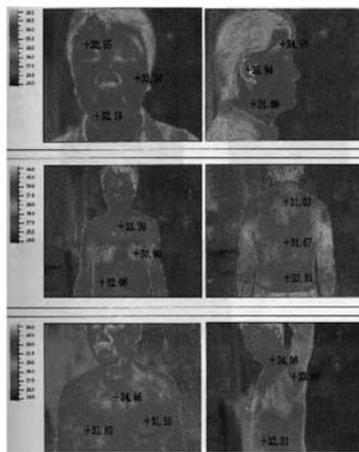


Fig. 7 培養温度の変化によるATP2A2遺伝子の誘導。



ヒトの体表温度
(サーモグラフィー)

確かに、ダリエー病の好発部位の脂漏部位は周辺の皮膚よりも少し体温が高いようであり、

気温(体温)のあがる夏期に脂漏部位で、ATP2A2遺伝子の発現が減少し、ダリエー病として発症・悪化すると考えた。

Fig. 8 ヒトの体表温度の脂漏部位での違い。

考察

今回のスクリーニングにより、カンナビノイドとパニロイドに属する作動薬がATP2A2遺伝子の発現を亢進し、マウス皮膚や器官培養でのヒト皮膚においてもSERCA2蛋白の亢進が観察されたことは、今後のダリエー病の治療に対する展望となりうる。

カンナビノイドは、一般にマリファナ系作動薬の総称であり、その生体への作用はG蛋白共役系の受容体であるCB1/CB2受容体を介する。最近ではカンナビノイド受容体に対する作動薬・拮抗薬を、疼痛緩和剤や食欲抑制剤あるいは食欲亢進剤としての薬剤に活用すべく、一部でフェーズ1, 2の臨床治験が行われている。

一方、パニロイドは、温熱感受性受容体 (TRPV) の作動薬として働く薬剤である。ヒトの温熱感受性受容体にはTRPV1-6が存在し、中でも皮膚には1, 3 - 6の存在をノザンプロットで確認した。TRPV1-6の各受容体は、各々に固有の狭い感受域の細胞外温度や膜運動などを感じ、カルシウムイオンを細胞内に流入する。TRPV作動薬にも数種の合成作動薬が開発されている

が、これらは全て合成試薬の段階で、ヒトへ投与可能な薬剤としてはまだ開発は進んでいない。

今回の解析では、カンナビノイドとパニロイドという、細胞膜におけるシグナル伝達の全く異なる刺激により結果的に、ダリエー病の原因遺伝子・蛋白でありATP2A2/SERCA2の発現を亢進することを発見した。

また、この温熱感受性受容体群の作動薬が、ATP2A2遺伝子の発現を著明に亢進するという実験結果は、ダリエー病の疾患の病態形成をより細かに理解する上でも非常に興味深い事実であると考えた。ダリエー病は、単一遺伝子の変異による優性遺伝性の疾患ながら思春期以降に発症し、夏の暑さで著明に悪化し冬季に軽快するという特殊な皮疹の分布を呈する。

今回の解析ではパニロイド作動薬の中でも、TRPV3, TRPV4という32 - 39度, 27 - 34度近傍の温度を感受しATP2A2/SERCA2の発現を亢進した。即ちこの感受域を超えた温度では、ATP2A2遺伝子への効果は消失する。またサーモグラフィーの温度分布で確認されたように、ダリエー病の好発部位である脂漏部位は、周辺皮膚よりも僅かであるが体表温度が高い。

これらの事実より、夏期に気温が上がり、元来周辺よりも体表温度の高い脂漏部位の角化細胞が、周辺の皮膚より若干表皮温度が上昇することで、温熱感受性受容体、特にTRPV4の感受域を超えてしまうことで、ATP2A2遺伝子への温熱刺激を介した遺伝子発現効果が失われてしまい、SERCA2蛋白の発現がダリエー病の発症閾値より低下してしまい発症に至ると理解した⁹⁾。

今後の課題

今後はこれら作動薬がダリエー病の病態に及ぼしうる効果と治療薬としての可能性に関してさらなる詳細な検討を継続する必要がある。さらに、このスクリーニングの手法は、変異蛋白も2倍の発現量となることから、優性ネガティブ変異で生じる疾患の治療法とはなりえず、また正常な蛋白質の存在を前提とするため劣性遺伝形式の疾患の治療法とも成りえないが、ダリエー病などhaplo-insufficiencyにより生じると考えられる疾患の薬剤スクリーニングには有効であると考えられる。haplo-insufficiencyで生じる疾患は、特殊な遺伝病にとどまらず、最近では高脂血症など生活習慣病でもその関与が示唆されていることから今後の展開が期待できる。

カンナビノイド作動薬とパニロイド作動薬が、ダリエー病の原因蛋白であるSERCA2蛋白の発現を亢進し、ダリエー病ひいては角化異常症の治療薬になり得るとする今回の発見は、国内並びに海外4カ国において、現在、特許を申請中であり、その情報は公開されている。時にダリエー病患者の主治医である国内の皮膚科医や海外のダリエー病患者自身より、メールやスカイプなどで直接、この研究の進捗状況を問う連絡を頂くことがある。

ダリエー病のように、患者数の少ない稀少難治症に対する創薬は、収益を目的とする製薬メーカーの開発参入を期待するのは難しいところがある。産学連携のもと、このような疾患に対する創薬研究を継続することも、研究機関としての大学の使命であると考えられる。

文 献

- 1) Sakuntabhai A., Ruiz-Perez V., Carter S., Jacobsen N., Burge S., Monk S., Smith M., Munro C.S., O'Donovan M., Craddock N., Kucherlapati R., Rees J.L., Owen M., Lathrop G.M., Monaco A.P., Strachan T. and Hovnanian A.: Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet.* 21 (3): 271-7, 1999.
- 2) Hu Z., Bonifas J.M., Beech J., Bench G., Shigihara T., Ogawa H., Ikeda S., Mauro T. and Epstein E.H. Jr.: Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet.* 24 (1): 61-5, 2000.
- 3) Tavadia S., Authi K.S., Hodgins M.B. and Munro C.S.: Expression of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase type 2 and 3 isoforms in normal skin and Darier's disease. *Br J Dermatol.* 151 (2): 440-5, 2004.
- 4) Gordon-Smith K., Jones L.A., Burge S.M., Munro C.S., Tavadia S. and Craddock N.: The neuropsychiatric phenotype in Darier disease. *Br J Dermatol.* 163: 515-522, 2010.
- 5) Hovnanian A.: SERCA pumps and human diseases. (Review.) *Subcell Biochem.* 45: 337-63, 2007.
- 6) Miyauchi Y., Daiho T., Yamasaki K., 3 mutants associated with Darier disease. *J Biol Chem.* 281 (32): 22882-95, 2006.
- 7) Süle N., Tészás A., Kálmán E., Szigeti R., Miseta A. and Kellermayer R.: Lithium suppresses epidermal SERCA2 and PMR1 levels in the rat. *Pathol Oncol Res.* 12 (4): 234-6, 2006.
- 8) Sehgal V.N., Srivastava G. and Sardana K.: Isotretinoin--unapproved indications/uses and dosage: a physician's reference. (Review) *Int J Dermatol.* 45 (6): 772-7, 2006.
- 9) Pani B., Cornatzer E., Cornatzer W., Shin D.M., Pittelkow M.R., Hovnanian A., Ambudkar I.S. and Singh B.B.: Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol Biol Cell.* 17 (10): 4446-58, 2006.