

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16343

研究課題名(和文) 表皮角化細胞の増殖分化に関する新規遺伝子Ahedの解析

研究課題名(英文) Studies of a novel gene Ahed for proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes

研究代表者

石元 達士 (ISHIMOTO, Tatsushi)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40750039

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)：Ahedは、血球の増殖・分化に重要な働きを担う遺伝子として同定された。Ahedは皮膚表皮においても発現していることから、表皮細胞の増殖あるいは分化に何らかの役割を担うと推測された。表皮におけるAhedの機能を明らかにする目的で、タモキシフェン誘導性表皮特異的Ahed欠損マウスを作成した。このマウスから表皮角化細胞を調製し、活性型タモキシフェン(4OHT)を作用させると、コロニー形成能が著しく阻害された。また、マウスの背部皮膚に4OHTを外用すると、表皮は萎縮し、表皮および毛包上皮内に死細胞が確認された。以上、Ahedは表皮細胞においても増殖・分化に関わっていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果より、Ahedは表皮角化細胞の分化・増殖に関わり、正常皮膚の機能維持に寄与している事が示された。この分子機構が解明されれば、増殖異常あるいは角化異常を呈する各種皮膚疾患の理解が深まる可能性がある。また、創傷治癒や再生医療に関しても大きな貢献があると期待される。

研究成果の概要(英文)：Ahed is a newly identified molecule having crucial roles in proliferation and differentiation of hematopoietic cells. It is supposed that Ahed has some roles in the epidermal keratinocytes in which the gene is expressed. To understand the function of Ahed in epidermal keratinocytes, tamoxifen-inducible epidermis specific Ahed knock-out mice were generated. Colony formation of keratinocytes prepared from the mice and treated with 4-hydroxy tamoxifen (4OHT) was obviously suppressed. When the mice were treated with 4OHT on their back skin, the epidermis was atrophied with dead cells in interfollicular and follicular epidermis. The findings indicate that Ahed is involved in proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮角化細胞 増殖・分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ahed (Attenuated hematopoietic development)は、血球の増殖・分化に異常を来すマウス胎児性幹細胞(ES細胞)からその原因遺伝子として同定された。造血系細胞でAhedが欠損するコンディショナル KO マウスでは、骨髄系細胞および赤芽球系細胞への分化が障害されて胎生致死となった。すなわち Ahed は造血系細胞の増殖・分化において極めて重要な働きを担うことが示された。組織幹細胞から増殖能が活発な前駆細胞を経てより分化した細胞に至るシステムは、造血系だけではなく皮膚を含む様々な組織にも存在する。Ahed は皮膚においても発現していることから、Ahed は皮膚で何らかの役割を担うと推測された。

表皮での Ahed 機能を明らかにする目的で、表皮特異的 Ahed 欠損(AhedEcKO)マウスを作成した。EcKO マウスは Ahed flox マウスと K5.Cre マウスを交配して作出した。AhedEcKO マウス新生仔は外観上顕著な異常は認められなかったが、生後 2 日目では明らかな成長の遅滞と皮膚の乾燥化、菲薄化が生じていた。全ての AhedEcKO マウスは生後 4 日目までに死亡した。皮膚組織では、コンパクトな hyperkeratosis、顆粒層の消失、角化細胞の膨化を伴った表皮肥厚、毛包の伸長障害、炎症性細胞浸潤などの異常所見が EcKO マウスに観察された。顆粒層の消失に一致するように、filaggrin、loricrin の減少が、mRNA レベル、タンパク質レベルで確認された。また、新生仔マウスの皮膚を TUNEL 染色したところ、毛包の一部に陽性細胞が確認された。Ahed の欠損は表皮幹細胞のアポトーシスを誘導し、毛包の成長障害につながった可能性がある。In vitro での検討を行う目的で新生仔マウス表皮から初代培養を試みたが、AhedEcKO マウスからは角化細胞は増殖しなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は表皮角化細胞における Ahed の機能を明らかにすることである。しかしながら AhedEcKO マウスは出生後 4 日以内で死亡し、また、初代培養も出来ないことから、各種の解析に困難を生じた。この問題を解決するために、新たに K5.CreERT2 マウスと Ahed flox マウスを交配して、新たなタモキシフェン誘導性の KO マウスを作出する。このマウスを使うことにより任意の時期・場所にタモキシフェンを投与して表皮内 Ahed を欠損させることが可能で、成長過程あるいは成熟した表皮ならびに毛包において Ahed が果たす役割を検討できる。また、このマウスの表皮を用いて初代培養を行い、*in vitro*で Ahed を欠損させることにより細胞増殖、分化、細胞死などを検討する。Ahed はその機能を推測できるようなアミノ酸配列を有していないため、その分子機能はほとんど分かっていない。機能解析の端緒として、Ahed と結合するタンパク質を明らかにし、Ahed が関わる生命現象を推測する。

3. 研究の方法

[1] コンディショナル KO マウスを用いた検討

K5.CreERT2 マウスを米国ジャクソン・ラボより導入し、Ahed flox マウスと交配することによりタモキシフェン誘導性表皮特異的 KO (AhedIndEcKO) マウスを作出した。タモキシフェンは活性化体である 4-hydroxitamoxifen (4OHT)をエタノールに溶解して、除毛した背部皮膚に投与した。4OHT の投与は 100 μ L を隔日で 3 回行い、濃度は 0.1~10 mg/mL

のものを使用した。4OHT 投与後、経時的に肉眼および組織学的に皮膚の変化を観察した。また、RT-PCR や組織免疫染色により詳細な検討を行った。

[2] 初代培養表皮角化細胞を用いた検討

Ahed^{IndEckO} マウスの新生仔皮膚より初代培養表皮角化細胞を調製した。*In vitro*にて 4OHT を作用させ、Ahed を欠損した角化細胞の増殖、細胞死を検討した。角化細胞の増殖および分化に関わる遺伝子の発現変化を検討した。細胞周期や細胞死については flow cytometry を用いて検討した。

[3] 抗 Ahed 抗体の作成

Ahed に対する抗体を得るため、抗ペプチド抗体作成を外部受託業者に依頼した。2 種類の異なるペプチド鎖を抗原として、各 1 羽のウサギに複数回免疫した。最終免疫後、抗体価の上昇を確認した後に全血液を採取して血清を得た。抗原として用いたペプチドを担体に結合して、これに血清を反応させてアフィニティ生成を行った。精製した抗体はウェスタン解析および細胞免疫染色により評価した。

4. 研究成果

[1] コンディショナル KO マウスを用いた検討

成長したマウスの背部皮膚に 4OHT を外用した。10 mg/ml の 4OHT を隔日で 3 回塗布すると、塗布開始 10 日ほどでマウスは著しく消瘦し安楽死処分となった。組織学的には表皮は明らかに萎縮していた。また、舌にはびらんが生じており食道および前胃粘膜上皮にも異常が見られ、これらが原因となり十分な食餌を摂れずに衰弱したと考えられる。これらの粘膜上皮では Cytokeratin 5 プロモーター制御により Cre が発現していることが知られており、4OHT は外用されたものであるが全身性に作用したことを示唆する。また、0.1 mg/ml の 4OHT を隔日で 3 回塗布すると明らかな消瘦は生じなかったが、3 週間後には皮膚に鱗屑を乗せる紅斑を生じ、一部にびらんを認めた。組織学的にも、角化層肥厚、表皮肥厚あるいは表皮の欠損が確認された。また、4OHT 処理により濃度依存的に表皮細胞がアポトーシスに陥ることを TUNEL 染色にて確認した。以上、これらの結果から周産期だけではなく、成熟した表皮細胞においても Ahed がその増殖に深く関わっていることが示唆された。

[2] 初代培養表皮角化細胞を用いた検討

Ahed^{IndEckO} マウスの新生仔より初代培養表皮角化細胞を調製し、*In vitro*にて 4OHT を作用させて Ahed を KO すると、コロニー形成能が著しく阻害された。4OHT を作用させた細胞に BrdU の取り込みさせて細胞周期を調べると、対象と比較して G2/M 期の細胞の割合が増加していた。また、AnnexinV/PI の解析から、アポトーシス起こす細胞が増加することが示された。これらの結果は、Ahed が表皮角化細胞の増殖制御に関わることを示唆する。

[3] 抗 Ahed 抗体を用いた検討

2 種類のペプチドから作成した抗体を、ウェスタン解析および細胞免疫染色にて評価した。これらの評価には Ahed の C 端に FLAG タグをつけるタンパク質を発現するベクターを Hela 細胞にトランスフェクションして行った。その結果、感度がより高い 1 種類の抗体を以後の解析に用いることにした。生化学的な細胞分画と細胞免疫染色から Ahed が核に局在することが確認された。免疫沈降の条件検討は、Ahed を安定的に高発現する Hela

細胞を用いて行った。Ahed は核タンパク質であるためか 150 mM NaCl では十分に可溶化することが出来ず、300 mM NaCl を含むバッファーにて細胞溶解液を調製した。自家製抗 Ahed 抗体を用いて免疫沈降を行うと Ahed を回収することが出来たが、その効率は悪く共沈殿するタンパク質は得られなかった。

以上、タモキシフェン誘導性表皮特異的 AhedKO マウスを用いて、*In vitro* および *in vivo* にて表皮角化細胞内 Ahed を欠損させると、細胞増殖に障害が生じることが示された。Ahed は様々な組織で発現していることが明らかになっているが、これらの細胞においても Ahed が増殖の制御に関わっている可能性がある。Ahed の分子機能解明のために結合タンパク質の同定を試みたが、未だ成功に至っていない。タグ癒合 Ahed 発現細胞と抗タグ抗体を用いた免疫沈降法を用いるなど、更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① *Ahed* plays crucial roles in homeostatic maintenance of epidermis.

Tatsushi Ishimoto, Mikiro Takaishi, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano.

2018 International Investigative Dermatolology Meeting

2018 年 5/16-19, Orland, Florida, USA

- ② 新規核タンパク質 Ahed は表皮角化細胞の増殖・分化に関わる

高石樹朗、石元達士、徳永正浩、國府 力、竹田潤二、佐野栄紀

2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)

2017 年 12/6-9 神戸

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐野 栄紀

ローマ字氏名：SANO, Shigetoshi,

研究協力者氏名：高石 樹朗

ローマ字氏名：TAKAISHI, Mikiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。