

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2006~2009

課題番号: 18591250

研究課題名(和文)

ロリクリン角皮症の病態解明(RNA 干渉法を用いて)

研究課題名(英文)

Elucidation of pathophysiology or lorlicrin keratoderma

研究代表者

米田 耕造(YONEDA KOZO)

香川大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60260626

研究成果の概要(和文): 魚鱗癬と掌蹠角化症が合併したポーウインケル症候群は、辺縁帯の主成分であるロリクリンをコードする遺伝子に 1 塩基の挿入変異が生じ、遺伝子の読み枠がずれることによって生じる。変異ロリクリンでは、ロリクリンのカルボキシル末端がアルギニンに富む特殊なアミノ酸配列に変わる。エクジソン誘導発現系を用いて、ポーウインケル症候群モデル細胞の樹立を行った。このポーウインケル症候群モデル細胞は、野生型ロリクリンを発現する細胞株を WL-1 変異ロリクリンを発現する細胞株を VL-5 細胞と命名した。培地にエクジソンを添加すると、それぞれ野生型および変異ロリクリンを発現した。野生型ロリクリンは細胞質および核内に発現しており、変異ロリクリンは核小体にその発現が観察された。かつ野生型ロリクリンと変異ロリクリンの発現量は培地中に添加したエクジソン量に依存していた。VL-5 細胞は WL-1 細胞と比較して増殖が活発であった。VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、EGF 受容体および VEGF 受容体 2 が強くリン酸化されていた。かつ VL-5 細胞では、WL-1 細胞に比して、Akt が強くリン酸化されていた。

研究成果の概要(英文): Lorlicrin is a major constituent of the epidermal cornified cell envelope. Recently, heterozygous lorlicrin gene mutations have been indentified in lorlicrin keratoderma. We have previously shown that the wild lorlicrin construct, when transiently transfected into HaCaT cells, leads to the activation of caspases and positive TUNEL staining with features of apoptosis. The apparent transfection rate is low with lorlicrin construct, supporting its apoptotic role but hindering further study. To bypass this problem, we generated stable HaCaT cell lines that expressed wild and mutant lorlicrin using an ecdysone-inducible promoter system. The cell lines expressing mutant lorlicrin grew more rapidly than those expressing wild lorlicrin. HaCaT cells with mutant lorlicrin express phosphorylated forms of Akt. The confocal immunofluorescence microscopic observation reveals that phospho-Akt localizes at nucleolus. The activity of Akt kinase is about 9 times higher in HaCaT cells with mutant lorlicrin than those in the cell lines with mock or wild lorlicrin. ERK1/2, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial cell growth factor receptor (VEGFR) II and Stat 3 are all phosphorylated in mutant lorlicrin cells. The docking proteins, Gab1 and c-Cbl, are also tyrosine-phosphorylated in mutant lorlicrin cells. Neither p38 MAP kinase nor SAPK/JNK is phosphorylated in both wild and mutant lorlicrin cells. Next we measured the concentration of VEGF in a culture medium. VEGF in the culture medium is about 3 times more abundant in HaCaT cells with mutant lorlicrin compared with wild lorlicrin. Furthermore, chromatin immunoprecipitation assays indicate that Stat3 protein binds to the VEGF promoter in HaCaT cells with mutant lorlicrin. Thus, VEGF release and the subsequent

activation of the VEGFR II by an autocrine/paracrine pathway link loricrin gene mutation to rapid cell proliferation in the HaCaT LK cellular model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,900,000	510,000	4,410,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ロリクリン、シグナル伝達、遺伝性皮膚疾患

1. 研究開始当初の背景

ボーウインケル症候群は、ロリクリン遺伝子に1塩基の挿入変異が入ることが原因である。この挿入変異により遺伝子の読み枠がずれロリクリン分子のカルボキシル末端がアルギニンに富む特殊なアミノ酸配列に変わる。この中に核移行配列が現れるため変異ロリクリンが核内に集積してくる。しかしながら、角化異常が生じる過程における分子メカニズムについては、われわれが見つけてきたアポトーシス以外何も判明していない。

2. 研究の目的

上記の分子メカニズムを更に詳細に検討するため、ロリクリン角皮症モデル細胞を樹立した。今回は、このロリクリン角皮症モデル細胞における、シグナル伝達を、Mockをトランスフェクションした細胞株、野生型ロリクリンをトランスフェクションした細胞株と対比しつつ検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) プラスミド作製

野生型ロリクリン [Lor (WT)] および変異ロリクリン [Lor (730 ins G)] のgDNAをほ乳類発現ベクターである pIND/V5-His ベクターに挿入した。

(2) 細胞培養とトランスフェクション

ヒト表皮細胞由来である HaCaT 細胞を DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、100 units/ml ペニシリン、100mg/ml ストレ

プトマイシン、10%FBS を含む培地中で培養した。HaCaT 細胞はトランスフェクションの前日に継代した。DNA トランスフェクションには、LipofectAMINE plus 試薬 (Invitrogen) を用いた。PI3 kinase の阻害剤である wortmannin、LY294002 は、Cell Signaling Technology 社より購入した。

(3) セレクション

安定トランスフォーマントのセレクションには、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、400・g/ml ゼオシン、2mg/ml ジェネテイシン、10%FBS を含む培地を用いた。

(4) 一次抗体

抗 V5 抗体は Invitrogen 社より購入した。抗マウスロリクリン抗体は Babco 社より購入した。抗ヒト変異ロリクリン抗体は、山本らの方法に準じて、ウサギ抗体を作成した。抗リン酸化 ERK1/2 抗体、抗 ERK1/2 抗体、抗リン酸化 p38MAP kinase 抗体、抗 p38MAP kinase 抗体、抗リン酸化 SAPK/JNK 抗体、抗 SAPK/JNK 抗体、抗リン酸化 EGF 受容体 (Tyr992) 抗体、抗リン酸化 EGF 受容体 (Tyr1068) 抗体、抗リン酸化 VEGF 受容体 2 (Tyr1175) 抗体、抗 EGF 受容体、抗 VEGF 受容体 2、抗リン酸化 Akt (Thr308) 抗体、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体は Cell Signaling Technology 社より購入した。

(5) 免疫ブロット法

安定トランスフォーマント細胞を Laemmli buffer に溶解し、氷上で30分静置した。15000回転で1分間遠心後、上清を回収した。蛋白濃度は Bradford 法を用いて測定した。30・gの量の蛋白質を SDS-PAGE に展開し、その後、蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を、上記の一次抗体で、室温で2時間反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用して目的とする蛋白質を検出した。

(6) Akt kinase アッセイ

Cell Signaling Technology 社の Akt kinase アッセイキットを使用した。Mock、WL-1、VL-5細胞を RIPA buffer で可溶化した。抗 Akt (1G1) モノクローナル抗体ビーズで免疫沈降を行った。GSK-3 フェージョン蛋白と ATP を加え、kinase 反応を行った。3X SDS Sample Buffer を添加して、kinase 反応を終息させ、SDS-PAGE に展開し、その後、(リン酸化された)蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜は、抗リン酸化 GSK-3・/・ (Ser21/9) 抗体を一次抗体に使用して、4°Cで一晩反応させた。その後 HRP ラベル二次抗体を反応させ、ECL システム (Amersham Biosciences) を使用してリン酸化 GSK-3・/・ (Ser21/9) を検出した。フィルム上に得られたバンド (シグナル) の濃度をデンシトメトリーを用いて定量化した。

(7) 蛍光抗体法

カバーガラス上に培養した Mock、WL-1 細胞、VL-5 細胞を-20°Cメタノールで固定した。一次抗体として抗 V5 抗体および抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体を使用した。その後、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Dako)、ビオチン標識ヤギ抗マウス IgG (SIGMA)、Cy3 標識ストレプトアビジン (SIGMA) を反応させて、その後コンフォーカルレーザー顕微鏡にて、リン酸化 Akt および変異ロリクリンの局在を観察した。

4. 研究成果

エクジソン誘導発現ベクターである pIND ベクターに野生型および変異ロリクリン gDNA を挿入後、RXR とエクジソン受容体を恒常的に発現している HaCaT 細胞にこれらのベクターをトランスフェクションした。400・g/ml ゼオシン、2mg/ml ジェネティシンにてセレクションを行い、安定トランスフォーマントを得た。これらの安定トランスフォーマントから代表的なものを選び、解析を行っ

た。野生型ロリクリンを発現する細胞株として、WL-1 と名付けた細胞株を選んだ。また、変異ロリクリンを発現する細胞として VL-5 と名付けた細胞株を選んだ。培地にエクジソンを添加すると、野生型および変異ロリクリンを発現した。野生型ロリクリンは、細胞質および核内に発現していた。そして変異ロリクリンは、核小体に発現していた。培地中のエクジソンの濃度を、変化させると、野生型および変異ロリクリンの発現量は (培地のエクジソン濃度依存性に) 増加した。Mock、WL-1 細胞に比較して VL-5 細胞では、EGF 受容体および VEGF 受容体 2 が強くリン酸化されていた。かつ、VL-5 細胞では、Mock、WL-1 細胞に比して Akt が強くリン酸化されていた。VL-5 細胞の Akt の活性は Mock の約 9 倍、WL-1 細胞の約 10 倍の活性があった。コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた観察では、リン酸化 Akt は、VL-5 細胞において核小体に存在し、変異ロリクリンと局在を共にしていた (図 1 C)。VL-5 細胞においては、Erk1/2 の活性化が生じていた。しかし、Mock、WL-1 細胞においては Erk1/2 のリン酸化は生じていなかった。Mock、WL-1 細胞、VL-5 細胞のいずれの細胞でも p38MAP kinase、SAPK/JNK のリン酸化は生じていなかった。今回われわれはエクジソン誘導発現の系を用いて、ボーウインケル症候群モデル細胞を樹立することに成功した。このモデル細胞において、種々のシグナル伝達の変化が観察され、この変化はボーウインケル症候群の病態に深く関与しているものと考えられた。今後このモデル細胞を用いてボーウインケル症候群の病態形成機序をさらに詳細に解析する予定である。われわれが樹立したボーウインケル症候群のモデル細胞はロリクリン角皮症の病態を解析する上で大変有益である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yoneda K, Demitsu T, Matsuda Y and Kubota Y: Possible molecular mechanisms for sebaceous hyperplasia overlying dermatofibroma. Br J Dermatol 158: 840-842, 2008 (査読有り)
2. Yoneda K, Demitsu T, Matsuoka Y, Moriue T, Nakai K, Kushida Y, Haba R and Kubota Y: Subcellular activation site of caspase 3 in apoptotic keratinocytes observed in lichenoid tissue reaction. Br J Dermatol 158: 1166-1168, 2008 (査読有り)

〔学会発表〕（計 1 件）

米田耕造、山田七子、窪田泰夫：症候群に伴う魚鱗癬（魚鱗癬症候群）、第 108 回日本皮膚科学会総会学術大会、2009 年 4 月 24 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 耕造 (YONEDA KOZO)

香川大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：6 0 2 6 0 6 2 6

(2) 研究分担者

窪田 泰夫 (KUBOTA YASUO)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：1 0 1 2 6 0 4 7

中井 浩三 (NAKAI KOZO)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：4 0 3 6 3 2 0 4

荒木 伸一 (ARAKI NOBUKAZU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：1 0 2 0 2 7 4 8