

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591315
 研究課題名 (和文) マクロファージ遊走阻止因子の表皮における役割、作用機序の解明
 研究課題名 (英文) Role of macrophage migration inhibitory factor in the epidermis and analysis of physiological mechanism
 研究代表者
 浅野 幸恵 (ASANO YUKIE)
 富山大学・大学病院・助教
 研究者番号：40420327

研究成果の概要 (和文)：

我々は、MIF の皮膚表皮における増殖、分化に関する役割について検討した。培養表皮細胞及び HaCaT 細胞にリコンビナント MIF を添加するとケラチン 14 の上昇、Ca 刺激で増加したフィラグリン、トランスグルタミナーゼ 1 の低下を認め、ケラチン 1 は変化がなかった。細胞増殖能は MIF 添加で上昇し、MIF siRNA のトランスフェクションにより低下した。さらに MIF は表皮において Rho-GTPase, PI3K, ERK1/2 を介して増殖を促進し、分化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We examined the role of Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the proliferation and differentiation of the epidermis. The expression of cytokeratin 14 increased in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) or HaCaT cells after the addition of recombinant MIF. On the other hand, we observed decrease expression of of filaggrin and transglutaminase 1 in NHEKs and HaCaT cells after the addition of recombinant MIF. The cell growth increased by the addition of MIF and decreased after the transfection of MIF siRNA. Furthermore, it was suggested that MIF might promote the proliferation and suppress the differentiation of epidermis via Rho-GTPase, PI3K and ERK1/2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,90,000	570,000	2,470,000
2009 年度	90,000	270,000	1,170,000
2010 年度	90,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：(1) MIF (2) サイトカイン (3) ケモカイン (4) 表皮細胞 (5) 増殖 (6) 分化 (7) 炎症 (8) 紫外線

1. 研究開始当初の背景

(1) マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor; MIF) は代表的炎症性サイトカインのひとつであるとともに細胞の遊走、増殖と分化、メラニン生成経路に酵素的役割を担うなど多彩な機能を持つことが近年明らかになってきた。申請者は長年にわたり MIF と炎症性皮膚疾患に関する研究を行い、以下の成果を世界に先駆けて報告してきた。

①定常状態で皮膚表皮特に基底層に強発現しており、紫外線照射により表皮全層で発現が増強すること。

②アトピー性皮膚炎患者において重症度に比例して血中濃度、皮膚における発現が上昇し、症状の改善とともに減少すること。

③血清中で炎症時に増加する MIF は主に末梢血単核球において産生されていること

④創傷部において MIF は傷辺縁に強発現し、細胞遊走を促進することによって創傷治癒を促すこと。

⑤免疫反応において MIF はランゲルハンス細胞の遊走、T 細胞の増殖を通じて重要な役割を果たすこと。

2. 研究の目的

本研究では培養表皮細胞を用いた MIF の分化、増殖への影響の検討を行う。さらに MIF トランスジェニックマウスを用いて MIF の皮膚の分化、増殖に対する役割やそのシグナル経路を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮細胞を用いた MIF の分化、増殖への

影響の検討：KGM培地でシャーレにヒト表皮細胞、DMEM培地で人表皮細胞の cell line HaCaT細胞を培養し、ヒトリコンビナントMIFを加え、初期分化マーカーであるケラチン 1, 10, 後期分化マーカー、フィラグリン、トランスグルタミナーゼ 1、インボルクリン、増殖マーカーケラチン 5, 14についてリアルタイムPCR, ウェスタンブロットを行い分化、増殖に対する影響をメッセンジャーRNA, 蛋白レベルで測定する。

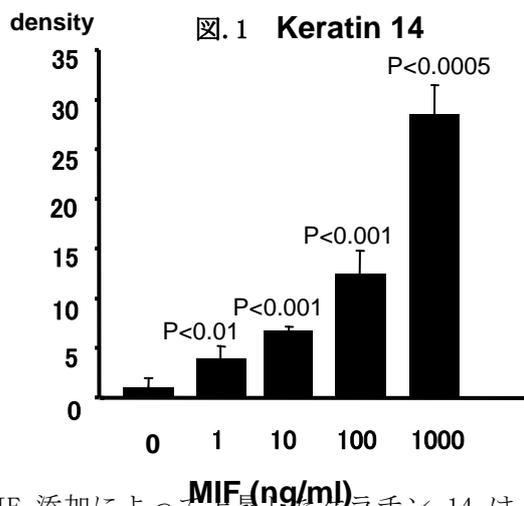
(2) MIF添加による培養表皮細胞の増殖能の変化の測定：KGMでシャーレに培養した表皮細胞にヒトリコンビナントMIF(100nM)を添加し12, 24, 48時間後の細胞数、BrDUを測定し、増殖能への影響を評価する。

(3) MIFのフィラグリン、ケラチン発現のシグナル経路の解析：p38, ERK1/2, JNK, P等のインヒビターを示適濃度添加する。30分後ヒトリコンビナントMIF(100nM)を添加し24時間培養し、ウェスタンブロットにてフィラグリン、ケラチン14の発現を評価し各転写因子がフィラグリン、ケラチン14の発現に関与するのかを検討する。

(4) Ultraviolet B (UVB) 照射による MIF 遺伝子改変マウス、ワイルドマウスの皮膚における増殖能、分化能への影響の検討：MIF トランスジェニックマウスおよびワイルドタイプマウスの背部に週 3 回 UVB 40 mJ/cm² 照射を 3 ヶ月継続する。3 ヶ月後照射部の皮膚を採取しケラチン 1, 5, 10, 14, フィラグリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼ 1 の発現の相違を解析する。

4. 研究成果

(1) MIF の皮膚表皮における増殖、分化に関する役割について検討した。培養表皮細胞及びHaCaT細胞にリコンビナントMIFを添加するとケラチン14の上昇(図.1)、Ca刺激で増加したフィラグリン、トランスグルタミナーゼ1の低下を認め、ケラチン1は変化がなかった。細胞増殖能はMIF添加で上昇しMIF siRNAのトランスフェクションにより低下した。



MIF添加によって上昇したケラチン14はERK1/2 inhibitors, PI3K inhibitors, Rho-GTPase inhibitorで抑制された。MIF添加30分後をピークとしたERK1/2, PDK1, Aktのリン酸化が認められ、Y27632添加で抑制された。MIF添加によって増加したケラチン14及びPDK, ERK1/2のリン酸化はRho-GTPaseのファミリーRhoA, Rac1, cdc42のドミナントネガティブミュータントのトランスフェクションにより抑制された。また、MIF添加で抑制されたトランスグルタミナーゼ1は、Y27632添加により発現が回復した。

(3) さらに、MIFトランスジェニックマウスにUVBの長期照射を行ったところ、wild-typeに比較してKi-67の上昇とフィラグリンの低下を認めた。

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12件)

- ① Norisugi O, Makino T, Hara H, Matsui K, Shimizu T. An evaluation of the skin atrophy associated with linear atrophoderma of Moulin by ultrasound imaging. *J Am Acad Dermatol.* (in press) 査読有
- ② Asano Y, Makino T, Norisugi O, Shimizu T. Occupational cobalt induced systemic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 19:166-167, 2009. 査読有
- ③ Matsui K, Makino T, Watanabe H, Furuichi M, Hara H, Shimizu T. Giant cystic basal cell carcinoma mimicking epidermal cyst. *J Dermatol* 36: 522-524, 2009. 査読有
- ④ Asano Y, Makino T, Furuichi M, Norisugi O, Shimizu T. Effective treatment of angiosarcoma on the nose by combination treatment with electron beam irradiation, recombinant interleukin-2 and docetaxel. *Clin Exp Dermatol* 34: e227-228, 2009. 査読有
- ⑤ Yamakoshi T, Makino T, Watanabe H, Furuichi M, Matsui K, Shimizu T. A case of giant vascular eccrine spiradenoma with unusual clinical features. *Clin Exp Dermatol* 34: e250-251, 2009. 査読有
- ⑥ Honda A, Abe R, Makino T, Norisugi O, Fujita Y, Watanabe H, Nishihira J, Yamagishi S, Iwakura Y, Shimizu H, Shimizu T. Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA induced matrix metalloproteinase-1

- expression. J Dermatol Sci. 49: 63-72, 2008. 査読有
- ⑦ Watanabe H, Ishida Y, Nagashima K, Makino T, Norisugi O, Shimizu T. Desmoplastic fibroblastoma (collagenous fibroma). J Dermatol. 35: 93-97, 2008. 査読有
- ⑧ Asano Y, Makino T, Norisugi O, Watanabe H, Abe R, Shimizu H, Shimizu T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bullous pemphigoid. J Dermatol Sci. 49: 95-97, 2008. 査読有
- ⑨ Kitaichi N, Shimizu T, Yoshida K, Honda A, Yoshihisa Y, Kase S, Ohgami K, Norisugi O, Makino T, Nishihira J, Yamagishi S, Ohno S. Macrophage migration inhibitory factor ameliorates UV-induced photokeratitis in mice. Exp Eye Res. 86: 929-936, 2008. 査読有
- ⑩ 浅野幸恵, 牧野輝彦, 清水教子, 竹上與志昌, 乗杉 理, 清水忠道: 膜嚢胞性病変を伴った外傷性脂肪壊死症の1例. 臨床皮膚科, 62: 45-47, 2008. 査読有
- ⑪ 乗杉 理, 浅野幸恵, 古市 恵, 竹上與志昌, 渡邊宏数, 坂村律生, 清水忠道: Q-switched Alexandrite laser・炭酸ガスレーザーを用いた列序性母斑に対する治療経験. 日本レーザー医学会雑誌, 29: 30-33, 2008. 査読有
- ⑫ 北市伸義, 清水忠道, 吉田和彦, 本田 歩, 吉久陽子, 加瀬 諭, 大神一浩, 乗杉 理, 牧野輝彦, 西平 順, 山岸昌一, 大野重昭: 紫外線角膜炎に対するマクロファージ遊走阻止因子の効果. 日本眼科学会雑誌: 112(11): 1017, 2008. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Enomoto A, Yoshihisa Y, Norisugi O,

- Matsunaga K, Makino T, Nishihira J, Shimizu T. The role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in UVB-induced melanogenesis in the skin. The Society for Investigative Dermatology, 70th Annual Meeting May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia
- ② Makino T, Furuichi M, Watanabe H, Yamakoshi T, Shimizu M, Yoshihisa Y, Shimizu T. Keishibukuryogan decreases the disease activity and the level of serum Th2 type chemokines and MIF in atopic dermatitis. 5th Georg Rajka International Symposium on Atopic Dermatitis, 2008, 5, 11-13, 2008, Kyoto.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/derma2/index.html> (富山大学皮膚科)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 幸恵 (ASANO YUKIE)
富山大学・大学病院・助教

研究者番号: 40420327

(2) 研究分担者

乗杉 理 (NORISUGI OSAMU)
富山大学・大学病院・助教

研究者番号: 90419333