

平成22年 4月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790789

研究課題名（和文） 真皮線維芽細胞から部位特異的に分泌される蛋白の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of functions of proteins secreted from body-site specific dermal fibroblasts

研究代表者

安田 正人 (YASUDA MASAHIRO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10451709

研究成果の概要（和文）： 皮膚は体の部位により様々に異なる生化学的特性や組織学的構造を呈している。近年、真皮線維芽細胞が体の部位により、その形質を変化させ、体の部位毎の皮膚の違いに影響を与えていることが明らかとなってきた。これまでに私が同定した口腔粘膜の線維芽細胞に特異的に発現する EGFL6 (MAEG) について検討を進めた。口腔粘膜の線維芽細胞に特異的に発現する EGFL6 の表皮角化細胞への直接的な作用を確認するため、表皮角化細胞に EGFL6 を強制発現させることにより、オートクリンでの作用を解析した。一時的な遺伝子導入ではケラチン 13 などの分化型ケラチンをわずかに誘導することが確認されたが、恒常的に強制発現させた場合は分化はむしろ抑制され、増殖能亢進に作用した。また、胎生期マウス皮膚では EGFL6 は毛包を除く周囲の基底膜部に沈着していることから、EGFL6 が口腔粘膜に発現していることで毛包の発生を抑制している可能性を考え、毛包発生に関与する因子について検討した。恒常的に EGFL6 を強制発現させた表皮角化細胞では Foxn1 の発現が亢進し、BMP2, hairless homolog の発現が減弱していた。口腔粘膜は皮膚に比べ、創傷治癒速度が速いことが知られている。口腔粘膜では線維芽細胞から分泌される EGFL6 により角化細胞の増殖が亢進され、創傷治癒が促進されると考えられる。また、hairless homolog は、ヒトでの変異により先天性無毛症を生じることが知られており、EGFL6 によりその発現が減弱されることは、口腔粘膜において毛包の発生を抑制している可能性がある。これらの結果より、EGFL6 は線維芽細胞から分泌されることにより、口腔粘膜において、その形態維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Skin shows various morphological characteristics and acquires unique physiological properties, depending on the body site. Recently, it has been reported that dermal fibroblasts from specific body sites, including the palmo-plantar skin or oral mucosa, can intrinsically determined the phenotype of the surmounting epidermal keratinocytes through the secretion of soluble factors. In this study, I analyzed functions of a soluble factor, EGFL6 (MAEG), which are secreted from oral mucosa fibroblasts and I previously identified. EGFL6 genes were transfected into HaCaT cells, keratinocyte-cell line, in order to elucidate direct functions of EGFL6 to keratinocytes by autocrine. EGFL6 induced slightly keratin 13, differentiated type-keratin in mucosa, in transient transfection clones. However, in permanent transfection clones, EGFL6 suppressed differentiation but promoted proliferations of keratinocytes. Additionally, EGFL6 induced expressions of Foxn1 and suppressed BMP2 and hairless homolog, associated with hair follicle developments. It's common knowledge that oral mucosa shows more rapid wound healing than skin. Our results might suggest that EGFL6 could accelerate wound healing by promoting the proliferation of keratinocytes. EGFL6 might inhibit hair follicle developments by suppressing expressions of hairless homolog. I concluded that EGFL6 could be an important factor to maintain the morphology of oral mucosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：真皮線維芽細胞、掌蹠、口腔粘膜、表皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

皮膚は体の部位により様々に異なる生化学的特性や組織学的構造を呈している。近年、真皮線維芽細胞が体の部位により、その形質を変化させ、体の部位毎の皮膚の違いに影響を与えていることが明らかとなってきた。これまでに私は、サブトラクション法やマイクロアレイ法を用いて、躯幹や掌蹠、口腔粘膜の線維芽細胞における遺伝子発現の違いを解析し、各々の線維芽細胞から部位特異的に、あるいは優位に発現する因子を同定してきた。

2. 研究の目的

これまでに私が同定した口腔粘膜の線維芽細胞に特異的に発現し、分泌されるEGFL6(MAEG)について、特にその表皮角化細胞への作用を解析する。

3. 研究の方法

(1) 各々の因子の表皮角化細胞への直接的な作用を解析するため、各々の遺伝子を発現ベクターに組み込み、リポフェクション法により、表皮角化細胞株であるHaCaT細胞に遺伝子導入を行った。一時的に遺伝子導入を行った細胞株と、ネオマイシン耐性により選択し、恒常的に遺伝子導入された細胞株を解析に用いた。各々の細胞株からRNAを抽出し、RT-PCR法によりcDNAを合成した。cDNAは7300 Real Time PCR Systemを用いて、Taqmanプローブによるハイブリダイゼーション法により、表皮ならびに粘膜の分化型ケラチンであるケラチン1、ケラチン9、ケラチン10、ケラチン13のDNA量を測定した。各因子のDNA量はGAPDH量で相対的に定量化し、空のベクターを導入したMOCKのDNA量を1として数値化した。

(2) 次に、恒常的発現細胞株の増殖能をみる

ために、テトラゾリウム塩(MTS)の分解能を測定した。恒常的発現細胞株とMOCKを96ウェルプレートに1ウェル毎2.0X10<sup>4</sup>個の細胞を撒き、24時間後MTSを添加する。0、1、2、4時間後に分解されたホルマザン産物の吸光度を測定した。

(3) また、遺伝子導入されていないHaCaT細胞からもEGFL6がわずかに発現されていることが確認されたため、その発現を一時的にsiRNAを用いて抑制することにより、その影響を検討した。siRNAは、Ambion社のSilencer® siRNAを用いた。HaCaT細胞を24ウェルプレートに1ウェル毎2.0X10<sup>5</sup>個撒いて、12時間後、リポフェクション法により、1pmolのsiRNAを導入した。48時間後にRNAを抽出し、上記と同様にリアルタイムPCR法によりケラチン13の発現を定量化した。

(4) 毛包発生に関与する可能性について検討するため、これまでに報告されている毛包の発生・維持に関わるとされる因子について、EGFL6の恒常的発現細胞株とMOCKでの発現量を、RT-PCR法により半定量的に測定した。解析した因子は、β-catenin, Lef-1, sonic hedgehog homolog (Shh), Patched, bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Delta 1, Jagged 1, forkhead box N1 (Foxn1), hairless homolog, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)の10因子である。

#### 4. 研究成果

(1) EGFL6 を一時的に導入した細胞株では、EGFL6 の発現は経時的に減少した(図 1a)が、MOCK に比べ、口腔粘膜の分化型ケラチンであるケラチン 13 の発現は増加する傾向がみられたが、有意差は得られなかった(図 1b)。

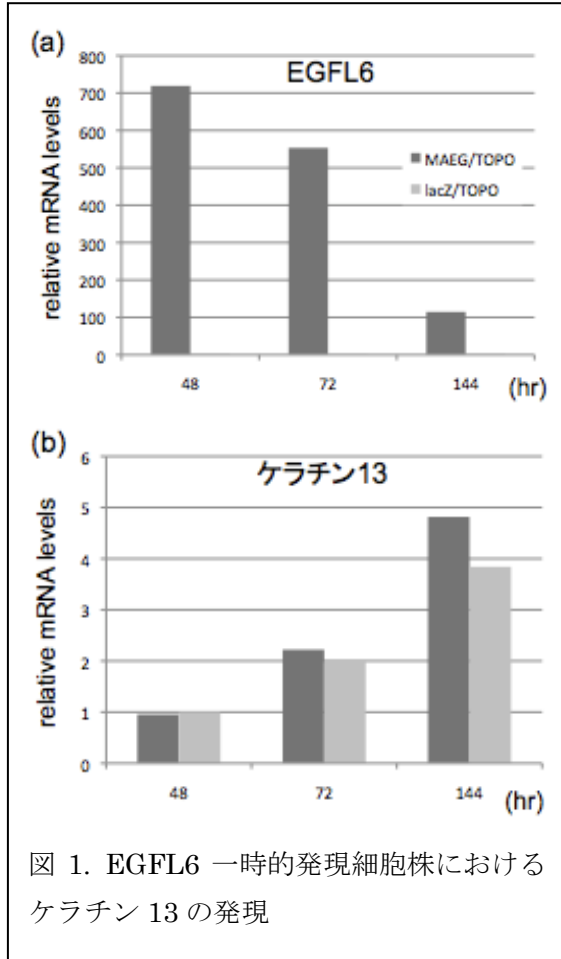


図 1. EGFL6 一時的発現細胞株におけるケラチン 13 の発現

しかし、EGFL6 恒常的発現細胞株では、MOCK と比較し、ケラチン 13 の発現は優位に抑制されていた(図 2)。

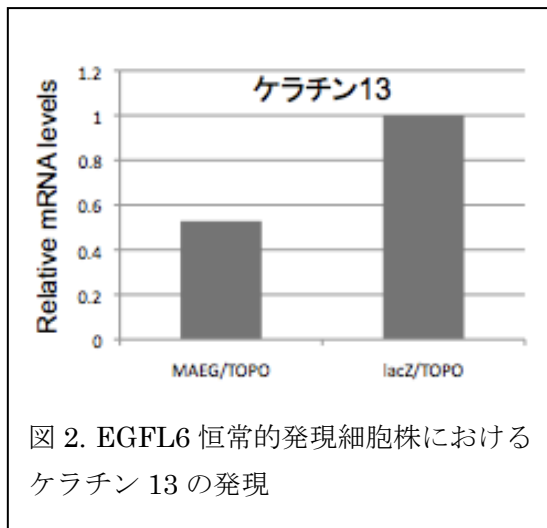


図 2. EGFL6 恒常的発現細胞株におけるケラチン 13 の発現

(2) そこで、EGFL6 恒常的発現細胞株では、EGFL6 が分化の誘導よりも、増殖の亢進に作用している可能性を考え、MTS 法による増殖能測定を試みた。MOCK と比べ、EGFL6 恒常的発現細胞株では、有意に増殖が亢進していた(図 3)。

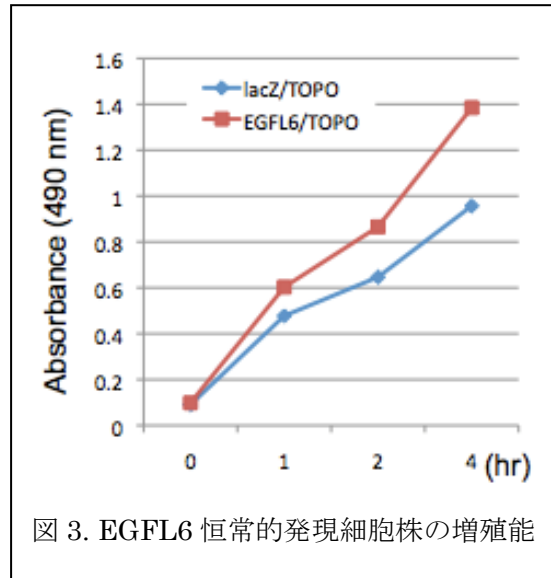


図 3. EGFL6 恒常的発現細胞株の増殖能

(3) 次に、EGFL6 の表皮角化細胞の分化への作用をさらに検討するため、EGFL6 に特異的な siRNA を用いて、RNA インターフェランス法により表皮角化細胞からわずかに発現される EGFL6 を抑制することで、その機能を解析することを試みた。一時的な siRNA の導入によって、EGFL6 を抑制した HaCaT 細胞では、陰性コントロールに比べ、ケラチン 13 の発現が抑制されていたが、有意差は得られなかった(図 4)。

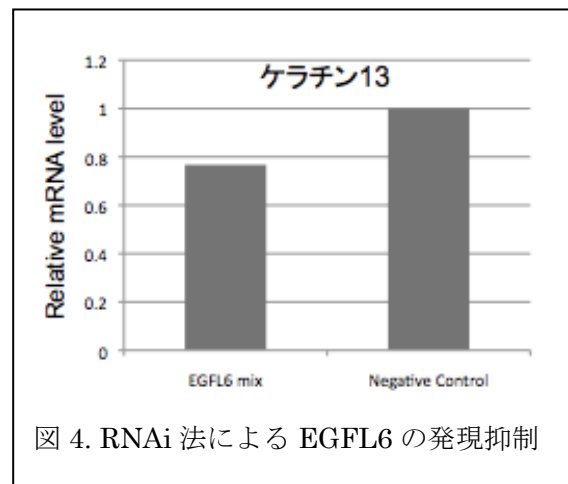


図 4. RNAi 法による EGFL6 の発現抑制

(4) これまでの報告において、EGFL6 の機能は明らかとはなっていないが、胎生期のマウスにおいて、毛包の発生の際、毛芽の先端ではなく周囲の基底膜部に EGFL6 が沈着していることが報告されている。その分布から、周

囲上皮からの毛芽の発生を抑制している可能性もあると考えた。そこで、これまでに毛包の発生・維持に関与すると報告されている因の EGFL6 恒常的発現細胞株における発現を解析した。

BMP2, hairless homolog は EGFL6 恒常的発現細胞株において、MOCK と比べ、発現が減弱していた。また、Foxn1 は逆に発現が亢進していた (図 5)。Lef-1, Shh, は発現が確認できなかった。

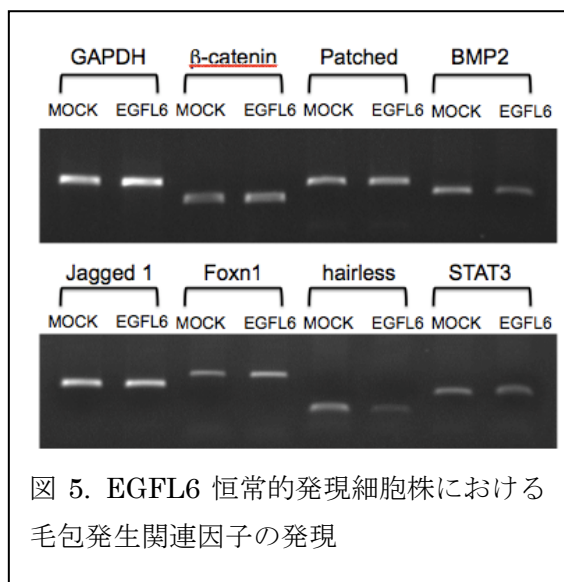


図 5. EGFL6 恒常的発現細胞株における毛包発生関連因子の発現

(5) EGFL6 の一時的な遺伝子導入、もしくは siRNA による一時的な RNA 発現の抑制では、EGFL6 は表皮角化細胞の分化誘導に関与している可能性が示唆された。しかし、有意差は得られなかったため、今後、さらなる条件の検討が必要と思われる。

EGFL6 を表皮角化細胞に恒常的に発現させた場合には、その分化は抑制され、むしろ増殖の亢進に作用することが明らかとなった。口腔粘膜は、皮膚に比べ、創傷治癒が速いことが知られている。生体内では、EGFL6 は真皮線維芽細胞から分泌されていることから、創傷治癒過程において、口腔粘膜では線維芽細胞から分泌された EGFL6 が表皮角化細胞の増殖を亢進することにより、創傷治癒を促進させる可能性がある。今後、*in vivo* の実験モデルを構築し、EGFL6 の創傷治癒における役割を解析することにより創薬へとつながることが期待される。

EGFL6 恒常的発現細胞株では、MOCK と比較し、BMP2, hairless homolog, Foxn1 に発現の変動がみられた。BMP2 は transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) スーパーファミリーに属し、皮膚においては、その発生や形態維持に重要な役割を果たすことが知られている。毛包の発生においても、毛芽のマーカーとされ、必要不可欠な因子である。Foxn1 もまた、皮膚や毛包の発生に関与する重要な転

写因子である。Foxn1 の変異は、人でも毛包の発生が障害され、nude skin となる。また、成人でも Foxn1 は表皮や毛包の分化に作用することが報告されている。BMP2 により誘導されることもあることから、EGFL6 恒常的発現細胞株では、Foxn1 の発現上昇により、BMP2 がネガティブフィードバックにより減少している可能性もある。hairless homolog は、先天性無毛症の原因遺伝子である。毛包の発生・維持には表皮と真皮との相互作用が重要であり、EGFL6 の強制発現により、hairless homolog の発現が減少することは、口腔粘膜において EGFL6 が毛包の発生を抑制する可能性を示唆する。EGFL6 が、これらの遺伝子の発現に直接的に関与するのか、間接的に関与するのか、それぞれの上流、下流にある遺伝子の発現の変動を解析するとともに、各々のシグナルの阻害剤など用いて検討を進めたい。

本研究の結果は、EGFL6 が線維芽細胞から分泌されることにより、口腔粘膜の形態維持に重要な役割を果たしていることを明らかにし、創傷治癒や皮膚の発生に関与する重要な知見となった。

(6) また、今回、掌蹠の線維芽細胞に特異的に発現する因子についても同様の検討を行ったが明らかな機能的差異を解明することができなかった。今後、機能を明らかにするために、さらなる解析を続ける予定である。

## 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 4 件)

- ① Yasuda M, Miyachi Y, Utani A.  
Two cases of dyshidrosiform pemphigoid with different presentations. Clin Exp Dermatol 34: e151-3, 2009, 査読有
- ② 安田正人, 石川 治, 高橋健造, 宮地良樹  
ヒト真皮線維芽細胞の体の部位による形質の違い: 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の細胞外基質遺伝子発現への影響と部位特異性の維持. 皮膚の科学 8 supp 11: 25-30, 2009, 査読無
- ③ Yasuda M, Amano H, Nagai Y, Tamura A, Ishikawa O, Yamaguchi S.  
Pyodermatitis-pyostomatitis vegetans associated with ulcerative colitis: successful treatment with total colectomy and topical tacrolimus. Dermatology 217: 146-148, 2008, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yasuda M, Takahashi K, Miyachi Y, Ishikawa O. MAEG is specifically secreted from dermal fibroblasts of oral mucosa and might regulate mucous type epithelial differentiation. 日本研究皮膚科学会 第 34 回年次学術大会・総会 2009.12.5 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 正人 (YASUDA MASAHIITO)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10451709

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：