

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591434

研究課題名（和文） 組織特異的遺伝子改変マウスを用いた皮膚腫瘍形成における膜型上皮細胞成長因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of membrane form of EGF family growth factors in the skin carcinogenesis using tissue-specific transgenic mice

研究代表者

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50226320

研究成果の概要（和文）：

皮膚悪性腫瘍形成におけるHB-EGFの役割を明らかにするために表皮特異的HB-EGF欠損マウスとHB-EGF強発現マウスを作製し、化学発がん、紫外線照射による発がんについて検討した。HB-EGF強発現マウスではパピローマ、扁平上皮がんともコントロールと比較して早期に発生し、かつ発生数も多かった。逆にHB-EGF欠損マウスでは腫瘍発生は少なかった。以上の結果から、生体内におけるHB-EGFの過剰発現が皮膚悪性腫瘍の発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the role of HB-EGF in skin carcinogenesis, I produced the keratinocyte-specific HB-EGF deficient mouse and the keratinocyte-specific tetracycline-inducible HB-EGF transgenic mouse, and then chemical and ultraviolet induced carcinogenesis studies were performed. Papilloma and squamous carcinoma were detected at an early stage in HB-EGF transgenic mice compared to control. Conversely, there was little tumor generating in HB-EGF deficient mice. Taking together, overexpression of HB-EGF in vivo plays important roles in the pathogenesis of skin tumor formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：遺伝子改変、マウス、HB-EGF、EGFR、carcinogenesis、テトラサイクリン

## 1. 研究開始当初の背景

表皮の増殖・分化は多くの細胞成長因子により制御されており、最も重要なもの

としてはEGFファミリーが知られている。表皮角化細胞の増殖にはTGF- $\alpha$ 、amphiregulin、HB-EGF、epiregulin、

betacellulinなどのEGFファミリー細胞成長因子が中心的な役割を果たしている。これらは autocrine および cross-induction と呼ばれる特徴的な様式で作用し、ひとつの因子が表皮細胞表面のEGF receptor と結合すると、その細胞成長因子自身と同時に他の細胞成長因子も表皮細胞によって産生され、極めて効率的に増殖を増幅するシステムである。(Shirakata, J Biol Chem 2000)

角化細胞がなぜ5種類ものEGF family 細胞成長因子を産生するのかは大きな謎であった。即ち、これら5種の細胞成長因子が特異的な作用を持つのか、あるいは単に相補的に作用するのかについては検討がなされていなかった。我々はHB-EGFに注目し、in vivoでの機能明らかにする目的でノックアウトマウスの作製を試みた。しかし、HB-EGFは胎性致死となり、その後の解析は不可能であった。この結果より逆にHB-EGFは非常に重要な因子であることが想定された。この問題を解決する目的で表皮特異的HB-EGFノックアウトマウスを作製した。このマウスは、外見は正常であるが、創傷治癒が遅延することを発見し、さらに、HB-EGFは創傷治癒の早期に誘導されることを見いだした(Shirakata, J Cell Sci 2005)。

一方、TGF- $\alpha$ , epiregulinのノックアウトマウスでは創傷治癒の遅延がみられないという報告とてらしあわせると、HB-EGFは表皮の外界からの刺激に対して迅速に反応し、表皮の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。次にHB-EGFが表皮において強発現すれば過増殖状態、すなわち乾癬に似た病態を形成すると仮定し、トランスジェニックマウスの作製を試みたが系統維持ができなかった。そこで表皮特異的誘導型HB-EGFトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは出生後にドキシサイクリンを投与することによりHB-EGFの発現を誘導することができるマウスである。これまでに創傷治癒、乾癬におけるHB-EGFの重要性について明らかにしてきたが、表皮の恒常性の破綻の一つが創傷治癒であるならば、もう一つの恒常性の破綻が悪性腫瘍形成である。創傷治癒においてHB-EGFが重要な働き

を担っていることから、皮膚悪性腫瘍形成においてもHB-EGFが重要な働きをしているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

HB-EGFの表皮における発癌機構への関与を明らかにすることを目的とする。皮膚特異的HB-EGF欠損マウスとテトラサイクリン誘導型表皮特異的HB-EGF強制発現マウスを用いて、皮膚腫瘍形成(化学発癌と紫外線発癌)におけるHB-EGFの役割について解明する。

## 3. 研究の方法

(1) lox-HB-EGFホモマウスとケラチン5プロモーターで発現するcre発現マウスとの交配を繰り返すことによりK5-Cre/HB-EGFlox/loxマウス(表皮特異的HB-EGFノックアウトマウス:HB-EGF KO)を作製する。テトラサイクリン誘導型表皮特異的HB-EGFトランスジェニックマウスはpTRE-HB-EGFマウスとK5-rtTA-TGマウスを作製し、それぞれを交配することにより作製する。

HB-EGFノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いた化学発癌実験(2-step carcinogenesis)

HB-EGF KO、HB-EGFTG、コントロールマウスそれぞれ20匹の背部に50 $\mu$ gのDMBAをアセトン200 $\mu$ lに溶解し塗布する。1週間後より、週1回の割合で、TPA(5 $\mu$ g/acetone 200 $\mu$ l)を塗布する。20週間塗布後TPAは中止し、30週間まで観察する。出現してきたpapillomaの数、大きさを測定しそれぞれのマウス間で比較検討する。30週間後すべてのサンプルを回収し、HE染色にて腫瘍を観察する。

UV照射によるマウス皮膚へのin vivoでの影響

マウス背部を除毛し、UVを照射し、MED(最小紅斑濃度)を測定する。MEDを超過しない量で週3回マウス背部にUVを照射する。UV照射による皮膚の変化における

UV-induced carcinogenesis

段階的に照射量を増加させ方法で検討する。表皮特異的HB-EGFノックアウトマウスと

コントロールマウスの背部を毛剃りしたのち、紫外線を週に3回照射する。紫外線照射量は段階的に増量する。17週以降は6.0kJ/m<sup>2</sup>照射し、腫瘍形成が認められるまで照射する(約40週頃まで)。非照射群は毛剃りのみで飼育する。各群で腫瘍を発生したマウスの数、発生した腫瘍の数、大きさを毎週モニタリングする。最終段階でサンプルを回収する。

#### 4. 研究成果

lox-HB-EGF ホモマウスとケラチン5プロモーターで発現する cre 発現マウスとの交配を繰り返すことにより表皮特異的 HB-EGF ノックアウトマウス:HB-EGF KO を作製した。pTRE-HB-EGF マウスを作製し、C57/B16 マウスと交配を繰り返した。表皮特異的に発現誘導させるためにK5-rtTA-TG マウスを作製し、これも増殖させ C57/B16 マウスとバッククロスした。C57/B16 のバックグラウンドをもつ2種類のマウスを交配し、pTRE-HB-EGF(+) K5-rtTA-TG(+) マウス(K5TetOnTG)を得た。この表皮特異的テトラサイクリン誘導型 HB-EGF トランスジェニックを繁殖させた。ドキシサイクリン非投与下でK5TetOnTG マウスを長期間観察したが明かな皮膚の表現型は見られなかった。

次にテトラサイクリン誘導型 HB-EGFTG を繁殖させた。このマウスを出生時から30週齢まで観察したが、ドキシサイクリン非投与では皮膚の明らかな異常は認めなかった。12週齢からドキシサイクリン配合餌に変更したマウスでは投与2週間後より皮膚の肥厚がみられるようになり紅斑、鱗屑と過角化がみられた。組織学的検索では過角化、錯角化、表皮の肥厚と真皮内炎症性細胞浸潤が認められ、尋常性乾癬の病変と類似していた。50週齢まで観察したが皮膚癌の自然発生はみられなかった。

さらにこのマウスを用いて TPA を用いた化学発癌について検討したところ、パピローマ、SCCともコントロールマウスと比較して早期に発生し、か

つ発生数も多かった。逆に HBEGFKO マウスではパピローマの発生数が少なく、SCCの病態を示すものはほとんどみられなかった。また紫外線照射による影響では、コントロールマウスと比較して HB-EGFTG マウスではパピローマが比較的早期に発生し、発生数も多くみられた。一方、HB-EGFKO マウスではパピローマはほとんど発生しなかった。

以上の結果から、生体内における HB-EGF の過剰発現が皮膚悪性腫瘍の発生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 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17件) 全て査読有り

1. Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, Oike Y, Hashimoto K, Sayama K.: Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *J Dermatol. J Dermatol.* 2012;39(4):366-74.
2. Yang L, Hashimoto K, Tohyama M, Okazaki H, Dai X, Hanakawa Y, Sayama K, Shirakata Y.: Interactions between myofibroblast differentiation and epidermogenesis in constructing human living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 2012 65:50-7.
3. Yang L, Hashimoto K, Shirakata Y.: Epidermogenesis in a skin wound deep through the basement membrane contributes to scar formation. *J Dermatol Sci.* 2012 65:224-226.
4. Tohyama M, Yang L, Hanakawa Y, Dai X, Shirakata Y, Sayama K.: IFN- $\alpha$  Enhances IL-22 Receptor Expression in Keratinocytes: A Possible Role in the Development of Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2012 in press
5. Nakayama H, Fukuda S, Inoue H, Nishida-Fukuda H, Shirakata Y,

- Hashimoto K, Higashiyama S.: Cell surface-annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin. *Mol Biol Cell*. 2012 in press
6. Okazaki H, Tokumaru S, Hanakawa Y, Shiraishi K, **Shirakata Y**, Dai X, Yang L, Tohyama M, Hashimoto K, Sayama K.: Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 regulates VEGF-A-induced lymphatic endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Sep 2;412(3):441-5.
  7. **Shirakata Y**, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K.: Auto- and cross-induction by betacellulin in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 58(2):162-4, 2010
  8. **Shirakata Y**.: Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci*. 59(2):73-80, 2010
  9. Sayama K, Kajiya K, Sugawara K, Sato S, Hirakawa S, **Shirakata Y**, Hanakawa Y, Dai X, Ishimatsu-Tsuji Y, Metzger D, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, Hashimoto K.: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle morphogenesis and anagen induction shown by using keratinocyte-specific TAK1-deficient mice. *PLoS One*. 5:e11275, 2010
  10. Sayama K, Yamamoto M, **Shirakata Y**, Hanakawa Y, Hirakawa S, Dai X, Tohyama M, Tokumaru S, Shin MS, Sakurai H, Akira S, Hashimoto K.: E2 Polyubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in keratinocytes is essential for epidermal integrity. *J Biol Chem*. 285:30042-9, 2010
  11. Dai X, Sayama K, Tohyama M, **Shirakata Y**, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yang L, Hirakawa S, Hashimoto K.: PPAR $\gamma$  mediates innate immunity by regulating the  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 induced hBD-3 and cathelicidin in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2010, 60(3):179-86
  12. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, **Shirakata Y**, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S.: Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 116:685-90, 2009
  13. Tohyama M, **Shirakata Y**, Sayama K, Hashimoto K.: The influence of hepatic damage on serum soluble Fas ligand levels of patients with drug rashes. *J Allergy Clin Immunol*. 123:971-2, 2009
  14. Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, **Shirakata Y**, Hashimoto K, Ohashi Y.: Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. *Mol Vis*. 15:937-48, 2009
  15. Tohyama M, Hanakawa Y, **Shirakata Y**, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K.: IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol*. 39:2279-88, 2009
  16. Yang L, **Shirakata Y**, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K: Living Skin Equivalent Constructed Using Human Amnions as a Matrix. *J Dermatol Sci*. 56:188-95, 2009
  17. Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, Nagamatsu S, Matsuo K, Tanemura A, Kamata N, Higashikawa K, Okazaki H, Kameda K, Nishida-Fukuda H, Mori H, Hanakawa Y, Sayama K, **Shirakata Y**, Tohyama M, Tokumaru S, Katayama I, Hashimoto K.: Nodal Lymphangiogenesis and Metastasis:

Role of Tumor-Induced Lymphatic Vessel Activation in Extramammary Paget's Disease. Am J Pathol. 175:2235-48, 2009

[学会発表] (計 5 件)

1. **Shirakata Y**, Yang L, Tsuda T, Tohyama M, Miyawaki S, Kameda K, Sayama K, Yoshimura A, Hashimoto K: Deletion of SOCS3 in the epidermis causes impaired skin wound healing in vivo. The 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research 9/8-11, 2010 Helsinki, Finland
2. **Shirakata Y**, Ishikawa M, Murakami S, Hashimoto K: Successful treatment of severe pemphigus vulgaris with high-dose intravenous immunoglobulin. 9<sup>th</sup> Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology 6/9-12, 2010 Weimar, Germany
3. **Shirakata Y**, Yang L, Sayama K, and Hashimoto K: Simple method of constructing living skin equivalent using human amnion as dermal matrix. The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society for Dermatological Research 9/10-12, 2009 Budapest, Hungary
4. **Shirakata Y** and Hashimoto K: Development of a new skin equivalent using de-epithelialized amnion membrane. The 4<sup>th</sup> Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists 7/10-12, 2009 Sapporo, Japan
5. Sayama K, **Shirakata Y**, Ishimatsu-Tsuji Y, Kajiya K, Hirakawa S, Sugawara K, Chambon P, Akira S, Paus R, Kishimoto J, and Hashimoto K: Inflammatory mediator TAK1 regulates hair follicle cycling. The 69<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology 5/6-9, 2009 Montreal, Canada
6. [図書] (計 0 件)

7. [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…なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 50226320

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし