

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791079

研究課題名（和文） SDF-1/CXCR4 シグナル伝達経路の表皮角化細胞遊走における役割の解析

研究課題名（英文） The role of SDF-1/CXCR4 signaling pathway on normal human keratinocyte

研究代表者

宮脇 さおり (MIYAWAKI SAORI)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90467853

研究成果の概要（和文）：近年、ケモカインである SDF-1 (CXCL12) がヒト皮膚において間質、線維芽細胞、表皮細胞などに発現していることが報告されていたが、その生理機能は未知であった。我々は SDF-1 が濃度依存性に表皮角化細胞の細胞遊走を促進させることを見出した。さらにその細胞遊走には EGF 受容体の活性化とそれに引き続く ERK (p42/44) の活性化が中心的な役割を果たしていること明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recently, several groups reported the expression of stromal cell-derived factor1(SDF-1; CXCL12) express on human skin. However, the biological meanings is still unknown. We found that SDF-1 induces keratinocyte migration in a dose dependent manner through EGF receptor via ERK(p42/44) activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

SDF-1(別名 CXCL12)は68個のアミノ酸からなるケモカイン(7回膜貫通G蛋白質結合型受容体GPCRを用いるサイトカインの総称で細胞運動のシグナルに深く関与)で、その生理的受容体として CXCR4 が同定されている。SDF-1/CXCR4

シグナル伝達系は発生過程における造血・血管形成すなわち、リンパ球・血液前駆細胞・血管内皮細胞などの生存、増殖、遊走等の生理作用を有することが報告されている。また、近年、SDF-1/CXCR4 シグナル伝達系は種々の悪性腫瘍における癌細胞の遊走を促進することで浸

潤・転移に関与していることも報告されている。しかしながら、表皮角化細胞については、SDF-1が増殖促進効果をもつことが報告されているが、細胞遊走効果については検討されていない。表皮角化細胞の遊走には、その細胞機能の中心を担うEGF受容体のtransactivation機構とそれに引き続くJAK-STAT経路、特に転写因子STAT3が重要であることが報告されている。SDF-1による遊走が促進されると報告された細胞では、EGF受容体が強発現していることから、その細胞遊走機構にEGF受容体transactivation機構が関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、CXCR4がGPCRに属することからSDF-1/CXCR4受容体相互作用がEGFtransactivation機構のトリガーとなりうることに注目し、正常ヒト表皮角化細胞遊走におけるSDF-1/CXCR4の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SDF-1のヒト正常表皮細胞に及ぼす生理的作用の評価

① ヒト正常表皮細胞の培養

ヒト正常表皮細胞はMCDB153培地を用い、すでに確立した技術にて無血清培養法にて培養した。

② SDF-1の表皮細胞に対する遊走促進効果の検討

10pg/mlから10 μ g/mlのSDF-1を添加したうえで、表皮細胞の遊走能への効果をBoyden chamber法により検討し、至適濃度を決定した。

(2) SDF-1による表皮細胞遊走へのHB-EGFを介したEGF受容体Transactivation機構の関与の有無の検討

① 至適濃度のSDF-1刺激によるEGF受容体の活性化の評価

至適濃度のSDF-1刺激によるEGF受容体の活性化を経時的にWestern Blot法にて評価した。

② 阻害実験による、EGF受容体活性化を指標とした、EGF受容体Transactivation機構への関与の検討

HB-EGFに対する中和抗体、EGF受容体に対する中和抗体、EGF受容体のキナーゼ阻害剤によりSDF-1によるシグナル伝達経路が阻害されるかどうかをWestern Blot法を用いて検討した。

③ 阻害実験による、細胞遊走を指標とした、EGF受容体Transactivation機構への関与の検討

同様にHB-EGFに対する中和抗体、EGF受容体に対する中和抗体、EGF受容体のキナーゼ阻害剤より、SDF-1による表皮細胞遊走が阻害されるかどうかをBoyden Chamber法にて解析した。

(3) 細胞内シグナル伝達経路の検討

EGF受容体下流の細胞内シグナル伝達分子の活性化をWestern Blot法により評価した。JAK-STAT系やMAPK経路についてWestern blot法による活性の評価と阻害剤による遊走能への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) SDF-1のヒト正常表皮細胞に及ぼす生理的作用の評価

① ヒト表皮角化細胞の培養

実験に先立ち、正常ヒト表皮角化細胞を単離し、MCDB153培地を用いた無血清培養を行った。

② 培養ヒト表皮角化細胞を用いたSDF-1による表皮細胞遊走能の検討

まず、SDF-1による表皮細胞遊走をBoyden Chamber法にて定量化を行った。SDF-1の濃度

を0から300ng/ml、時間を6から8時間と条件を変えて比較検討したところ、SDF-1は濃度依存性に細胞遊走を促進し、刺激後6時間で100ng/mlをピークとしたベル型を呈した(図1)。SDF-1は100ng/mlを至適濃度とし表皮角化細胞遊走を促進させることが明らかとなった。なお、Human recombinant SDF-1はR&D社より入手した。

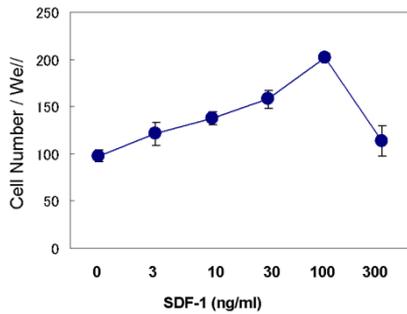


図1

(2) SDF-1による表皮角化細胞遊走へのHB-EGFを介したEGF受容体Transactivation機構の関与の有無の検討

① 至適濃度のSDF-1刺激によるEGF受容体の活性化の評価

そこで、次にこのSDF-1による表皮角化細胞遊走がEGF受容体Transactivation機構によるものかを検討するために、Western Blot法を用いて至適濃度である100ng/mlにて刺激を行ったところ刺激後10分をピークとして時間依存性にEGF受容体の活性化が認められた(図2)。

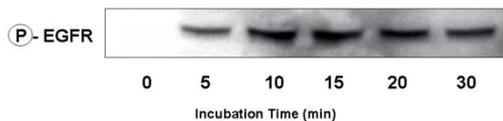


図2

② 阻害実験による、EGF受容体活性化を指標とした、EGF受容体Transactivation機構への関与の検討

SDF-1による表皮角化細胞遊走がEGF受容体Transactivation機構の各々の段階に特異的な阻害剤を用いて阻害実験を行った。細胞膜結合型HB-EGFの膜型から遊離型への変換酵素の阻害剤としてKB-R8301、遊離型HB-EGFの活性阻害剤としてCRM197、EGF受容体の阻害剤としてEGF受容体中和抗体、EGF受容体のリン酸化阻害剤にはAG1478を使用した。Western Blot法による解析では、AG1478添加のみ約35%とわずかに抑制されたが、いずれの阻害剤においてもSDF-1によるEGF受容体のリン酸化は完全には抑制されなかった(図3)。

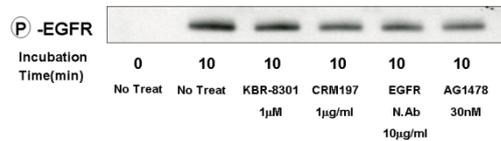


図3

③ 阻害実験による、細胞遊走を指標とした、EGF受容体Transactivation機構への関与の検討

同様に阻害剤を使用して行ったBoyden Chamber法においてもAG1478添加のみ、約70%の遊走が抑制されたが、いずれの阻害剤においてもSDF-1による遊走は完全には抑制されなかった(図4、5、6、7)。

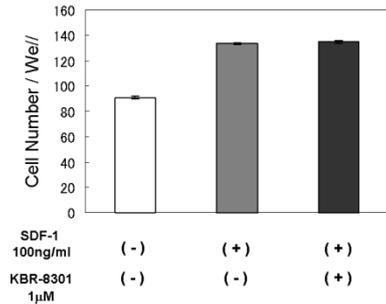


図4

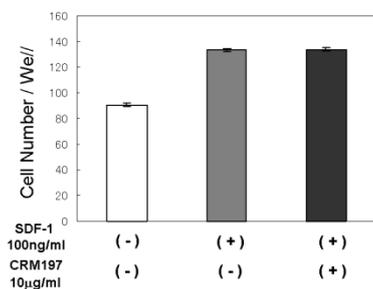


図5

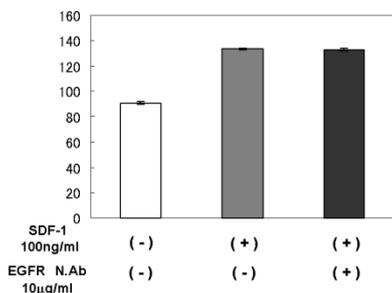


図6

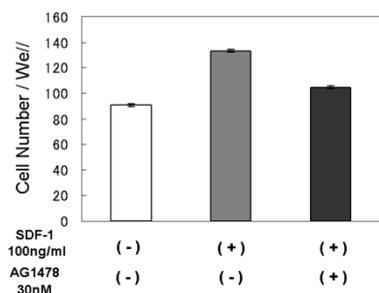


図7

以上の結果からSDF-1による表皮角化細胞遊

走はEGF受容体を介するが、Transactivation機構は中心的に役割を果たしていないことが明らかとなった。

(3) EGF受容体下流のシグナル伝達経路の解析

EGF受容体下流のシグナル伝達分子として、細胞遊走に重要な役割を果たしていることが報告されているSTAT3に注目しWestern Blot法を用いて解析を行ったが、0から60分までの時間経過中、STAT3の活性化は認められなかった (data not shown)。そこで一般的なEGF受容体の下流のシグナル経路であるMAPK経路の解析を行ったところ、EGF受容体の活性化に引き続きERK (p42/44) の活性化が時間依存性に認められた (図8)。

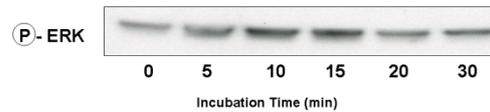


図8

しかしながらp38の活性化は認められなかった (data not shown)。最後に、このERKの活性化がSDF-1による表皮角化細胞遊走に関与していることを明らかにするためにBoyden Chamber法を用いた阻害実験を行ったところ、10μMのERK阻害剤PD98059はSDF-1により誘導される表皮角化細胞遊走をほぼ完全に抑制した (図9)。

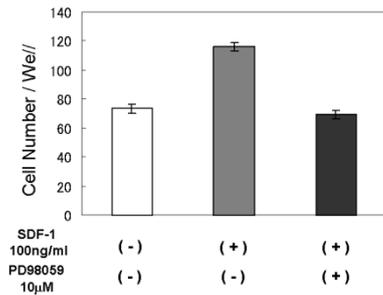


図9

以上の結果からSDF-1に誘導される表皮各課細胞遊走はEGFRの活性化、それに引き続くERK (p42/44)の活性化が中心的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1件)

1.岡崎秀規、宮脇さおり 6番目、他6名、薬剤性過敏症候群 (DIHS) の特徴的な顔面の所見と HHV-6 再活性化との時間的關係、査読あり、日本皮膚科学会雑誌、119巻、2009、pp.2187-2193、

〔学会発表〕(計1件)

1.藤岡 智仁、宮脇 さおり 9番目、他7名、脊髄炎で発症した血管内悪性リンパ腫に対しリツキマブが奏功した1例、第102回日本内科学会四国地方会、平成22年5月30日、徳島

〔図書〕(計1件)

1.宮脇さおり、物理化学的皮膚障害、査読あり、皮膚科ナーシングプラクティス、pp.36-40、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 さおり (MIYAWAKI SAORI)
愛媛大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90467853