

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5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791050

研究課題名（和文） 表皮細胞における Wnt 標的遺伝子 Id2 の機能解析

研究課題名（英文） analysis of Wnt target gene, Id2, in epidermal keratinocytes

研究代表者

目々澤 愛（MEMEZAWA AI）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30451587

研究成果の概要（和文）：Id2 を培養ヒト角化細胞（NHEK）で過剰発現させると COL22A1、APCDD1、FGFR3、KRT4 といった毛包に関連する分子の発現が変化することがわかった。したがって、Id2 は表皮細胞において毛包の発生、分化に影響を与える可能性が示唆された。Id2 は Wnt 標的遺伝子のひとつであり、Wnt シグナルは毛包の発生、分化に強く関わっているため、Id2 は Wnt シグナルの下流で毛包の発生、分化に影響を与えている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Overexpression of Id2 in NHEK modulated the expression of hair follicle related genes, COL22A1, APCDD1, FGFR and KRT4. The crucial role of Wnt signaling in hair follicle development and morphogenesis has been well established. Id2 may play an important role in the regulation of hair follicle development by Wnt signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：皮膚科学分野

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：Id2、表皮細胞、Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 表皮細胞においてレチノイドが Wnt/ β -catenin シグナル経路を抑制する

有棘細胞癌に代表される上皮系の悪性腫瘍や、乾癬をはじめとする角化異常症の病態には、表皮細胞の増殖、分化異常が強く関わっている。レチノイドはこれらの疾患において、細胞増殖を抑制すると同時に正常分化を誘導し、治療効果を発揮する。最近、レチノイン酸が Wnt/ β -catenin シグナル経路に対

し抑制的に作用することが報告されたが、これらの分子機構については不明な点も多く、表皮細胞における解析はこれまでに行われていなかった。

私たちは、ヒト表皮細胞由来の細胞株では、レチノイドが Wnt 標的遺伝子である Id2 (inhibitor of DNA binding 2) の発現を抑制し、このことが表皮細胞の増殖を抑制する主要な因子であることを明らかにした。

(2) 表皮細胞における Id2 の役割

Id2 は Id タンパクファミリーに属する転写因子の抑制因子で、Helix-loop-Helix (HLH) 構造をもち、basic HLH (bHLH) 型の転写因子に結合して bHLH-bHLH 間の二量体形成を阻害する。多くの bHLH 型の転写因子は組織特異的なタンパクの転写に関与し、細胞分化を促進する機能を持つため、Id タンパクは機能的に細胞分化を阻害する。また、Id2 は癌抑制遺伝子である RB (retinoblastoma) の機能を抑制し、細胞増殖には促進的に働くことも知られている。

Id2 の表皮細胞における機能については、これまでに増殖を促進するという点でのみ、報告されてきたが、Id2 は転写因子の機能抑制という作用をもつことから、積極的に細胞分化を阻害すると予想される。しかしながら、Id2 が表皮細胞の分化にどのように影響するのか、あるいは実際の病態における役割などについてはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では表皮細胞における Id2 の機能について、特に細胞分化や増殖に与える影響を、分化マーカーの発現変化や細胞増殖の変化を解析することによって検討する。さらに、表皮の分化異常をきたす種々の疾患における Id2 の発現を検討することによって、これらの皮膚疾患における Id2 の役割を明らかにする。

(1) 培養表皮細胞を用いた、Id2 による表皮細胞分化マーカーの発現変化の検討

表皮は基底層より順に、有棘層、顆粒層、角層という構造をとり、表層にいくに従って分化し、各層において特異的に発現する分子が存在する。基底層ではケラチン 5 とケラチン 14 が、有棘層ではケラチン 1 とケラチン 10、インボルクリンが、顆粒層ではフィラグリン、ロリクリンが代表的である。これらの分化マーカーの発現を、Id2 を過剰発現した培養表皮細胞において、real-time PCR 法とウエスタンブロッティング法によって解析する。さらに、DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅的な発現解析により、Id2 により発現変化する、表皮細胞分化や増殖にかかわる遺伝子を同定し、これらの遺伝子の発現変化が生じる分子メカニズムについて明らかにする。

(2) 皮膚疾患における Id2 の発現の検討

有棘細胞癌、乾癬などの皮膚疾患における Id2 の発現を、タンパクレベルでの発現を免疫組織化学的に検討し、これらの疾患における Id2 の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養表皮細胞の初代培養と分化誘導

培養ヒト角化細胞 (Epidercell, KURABO) を専用培地 HuMedia-KG2 で培養する。分化誘導は、1.5mM のカルシウム濃度で培養することにより行う。

(2) アデノウイルスベクターの作製と遺伝子導入

はじめに基本プラスミドベクターに標的配列を挿入し、市販のキット (Adeno-XTM Expression System, Clontech) を用いてアデノウイルスベクターに組換える。このベクターを HEK293 細胞に遺伝子導入する。その後、HEK293 細胞によりアデノウイルスのタイトルを増大させ、ウイルス液を得る。この液を培養細胞に加えることにより遺伝子導入する。

(3) RNA 抽出と real-time PCR

培養表皮細胞に組換えアデノウイルスを感染させ、得られた細胞を回収し、QIAquick RNAeasy Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出し、TaKaRa RNA PCR kit (AMV) (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行う。各分化マーカーや細胞分化に関わる分子の発現を real-time PCR で比較定量する。PCR 反応は TaqMan system (ABI 7700; PE Applied Biosystems) を用いて行う。PCR プライマーと TaqMan probe は ABI の TaqMan gene expression assay を用いる。

(4) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

抽出した RNA を、Agilent technology の DNA マイクロアレイシステムにてラベリング、ハイブリダイゼーションを行い、得られたデータは GeneSpringGX にて解析する。発現変化があった遺伝子については real-time PCR にてバリデーションを行う。

(5) タンパクの回収とウエスタンブロッティング

培養表皮細胞に組換えアデノウイルスを感染させ、得られた細胞を回収し、溶解してタンパクを抽出し、SDS-PAGE ゲルに展開する。ゲル内のタンパク質を PDVF 膜 (Millipore) にトランスファーし、抗 Id2 抗体 (#3431; Cell Signaling Technology) および表皮細胞の分化マーカーの抗体でウエスタンブロッティングを行う。

(6) 皮膚疾患における Id2 発現の免疫組織化学的検討

当研究機関で採取された皮膚疾患のパラフィン包埋組織標本で研究に用いることに

同意を得られたものを、シランコートされたスライドガラス（松浪スライドガラス、松浪硝子工業）に5 μ mの厚さに薄切し、通常の方法で脱パラフィンを行った後、スライドを1%過酸化水素水/メタノールに15分浸し、内因性のペルオキシダーゼを除去する。一次抗体にはウサギ抗 Id2 抗体（Zymed 18-7398; Invitrogen）を1/100希釈して用い、4℃で一晩反応させた。一次抗体反応後は市販の染色キット（ニチレイヒストファインシンプルステイン Max PO [R]：ニチレイ）を用いる。免疫反応はDABで発色し、ヘマトキシリンで核染する。

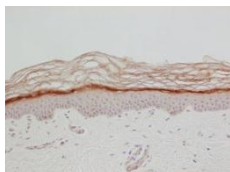
4. 研究成果

Id2 の表皮細胞における機能について明らかにするため、我々は、Id2 発現アデノウイルスベクターを作成した。作成したアデノウイルスベクターを培養ヒト角化細胞（NHEK）に導入し、表皮細胞の分化の指標となるロリクリン、インボルクリンの mRNA 発現を real-time PCR で検討した。その結果、Id2 を過剰発現させるとロリクリン、インボルクリンの mRNA 発現が低下する傾向がみられ、Id2 により表皮細胞の分化が抑制される可能性が示唆された。

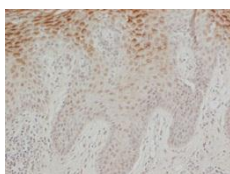
尋常性乾癬では表皮細胞の増殖が亢進し、分化が抑制されると考えられているため、尋常性乾癬および健康皮膚の組織を対象に、Id2 の発現を免疫組織化学的に検討した。健康皮膚では基底層の表皮細胞の核に局限して発現が認められたが、尋常性乾癬の組織では有棘層の核および細胞質に発現が認められ、健康皮膚に比べ、Id2 の発現が亢進していた（図1）。また、有棘細胞癌における Id2 の発現についても同様に検討したところ、腫瘍細胞の核や細胞質が染色されるものもあったが、傾向が一定せず、今後の検討を要すると考えられた。

図1：免疫染色（Id2）

A: 健康皮膚



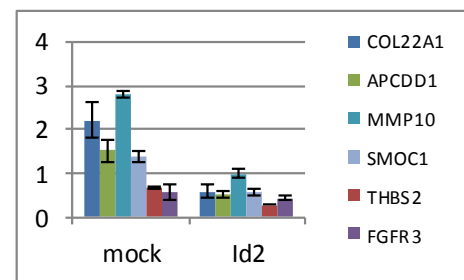
B: 尋常性乾癬



さらに、Id2 により発現変化する遺伝子を新規に同定するため、Id2 発現アデノウイルスベクターを培養ヒト角化細胞（NHEK）に導入し、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果 Id2 により発現が上昇する遺伝子として HNF1B（HNF1 homeobox B）、F7（coagulation factor VII）、TACR2（tachykinin receptor 2）、DERL3（Der1-like domain family, member 3）、LRRN2（leucine rich repeat neuronal 2）、CYP1B1（cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1）、CHST13（carbohydrate sulfotransferase 13）、KRT4（keratin 4）が、発現が抑制される遺伝子として ID3（inhibitor of DNA binding 3）、COL22A1（collagen, type XXII, alpha 1）、APCDD1（adenomatosis polyposis coli down-regulated 1）、MMP10（matrix metalloproteinase 10）、SMOC1（SPARC related modular calcium binding 1）、TFRC（transferrin receptor）、THBS2（thrombospondin 2）、FGFR3（fibroblast growth factor receptor 3）が同定された。

これらの遺伝子のうち TCF2、F7、TACR2、CHST13、COL22A1、APCDD1、MMP10、SMOC1、TFRC、THBS2、FGFR3 について、real-time PCR によるバリデーションを行った。その結果、COL22A1、APCDD1、MMP10、SMOC1、THBS2、FGFR3 の発現が Id2 を過剰発現することにより抑制されることが確認できた（図2）。

図2：real-time PCR



また、マイクロアレイで発現上昇が認められた KRT4 について、ウエスタンブロットでタンパクの発現を確認した。カルシウム添加にて分化誘導した NHEK では分化誘導前に比べどちらの細胞も KRT4 の発現が増加していたが、Id2 を発現させたものではコントロールベクターを感染させた細胞よりも発現が増加していた。

今回同定された Id2 により発現変化する遺伝子の機能として、COL22A1 は FACIT 型コラーゲンに属し、皮膚では成長期の毛包で発現がみられることが報告されている。APCDD1 は毛包の毛乳頭、毛母、毛皮質、毛小皮に強く

発現しており、毛包の発生・分化に重要な Wnt シグナルを阻害することが知られている。MMP10 は細胞外マトリックス破壊、SMOC1 は眼球と四肢の発達に重要な遺伝子であるが、皮膚では基底膜部に局在している。THBS2 は血管新生の抑制機能をもつ。FGFR3 は軟骨無形成症、軟骨低形成症で機能獲得型変異がみられ、多発性骨髄腫などの悪性腫瘍でも変異がみられるが、皮膚においては内毛根鞘や汗腺で発現しており、脂漏性角化症、表皮母斑といった良性腫瘍で機能獲得型変異が報告されている。KRT4 は皮膚の表皮細胞ではほとんど発現がみられないが、内毛根鞘や口腔粘膜の有棘層で発現している。

このように、Id2 を過剰発現させると発現変化する遺伝子の多くは毛包で発現しており、毛包の発生、分化に関連しているものや、皮膚腫瘍の原因となる遺伝子であることがわかった。したがって、Id2 は表皮細胞において毛包の発生、分化に影響を与える可能性が示唆された。

Wnt シグナルは毛包の発生、分化に強く関わっていることが知られており、Id2 は Wnt 標的遺伝子のひとつであることから、Id2 は Wnt シグナルの下流で毛包の発生、分化に影響を与えている可能性があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目々澤 愛 (MEMEZAWA AI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30451587

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：