

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 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791070

研究課題名（和文） 表皮増殖性皮膚疾患の病態における核移行シグナルの役割解明

研究課題名（英文） A role of nuclear import activity on the proliferation of cutaneous diseases

研究代表者

梅垣 知子 (UMEGAKI NORIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80397629

研究成果の概要（和文）：核移行シグナルである karyopherin $\alpha 2$ (KPNA2) が細胞増殖に関して果たす役割について、HaCaT 細胞において TAP (tandem affinity purification) method および mass spectrometry を行い、KPNA2 が結合し核移行を行っているタンパク群を特定、解析。また、乾癬や有棘細胞癌をはじめとする皮膚悪性腫瘍での KPNA2 の発現を免疫染色にて確認し、表皮細胞の増殖との関連を検討。

研究成果の概要（英文）：Detection and analysis of target proteins imported by karyopherin alpha 2 (KPNA2) in HaCaT cells using tandem affinity purification method and mass spectrometry to investigate the roles of KPNA2 in the cell growth. Immunohistochemical staining using anti-KPNA2 antibody was performed in the skin diseases including psoriasis and squamous cell carcinomas to demonstrate the relationship between KPNA2 and keratinocyte proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：核移行シグナル、karyopherin $\alpha 2$ 、TAP methods, mass spectrometry MTS アクセシ

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞の増殖と分化に関わる細胞外刺激を核に伝達するシグナル伝達の分子機構解析が目覚ましい。またヒト正常表皮細胞に

においても増殖・分化に関与する転写因子などの解明が進む中、これらシグナルの核膜通過制御機構の詳細については未だ不明な点が

多い。これまでの研究において、karyopherin alpha 以下 KPNA のサブユニットのうち、KPNA2 の発現量のみがインターフェロングや TGF- β といった表皮の分化・増殖に影響を与えるサイトカインによって制御を受けており、さらに表皮角化細胞を用いて KPNA2 を強発現させた系もしくは siRNA を用いてノックダウンした系に対してマイクロアレイにて表皮の分化・増殖にかかわる因子を比較検討したところ、ケラチン 16 をはじめとして、乾癬などの表皮の異常な分化・増殖によって発現することが知られているタンパク質の発現の制御にかかわっている可能性が示唆された。さらに最近の報告では乳がんや子宮癌、食道癌、悪性黒色腫などの悪性腫瘍において KPNA2 の発現が上昇しており、KPNA2 がこれらの癌の予後因子として有用である可能性も考えられている。しかし、このような正常な増殖の制御が破綻している病態における KPNA2 の役割については、未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、表皮細胞の増殖・分化を制御する分子機構における核内能動輸送蛋白 KPNA2 の役割を解明し、その異常による皮膚病態を解明すると共に、新たな治療法開発へとつなげる事を目的としている。具体的には、乾癬や有棘細胞癌といった表皮細胞の増殖・分化が破綻している皮膚疾患群の病態を、KPNA2 が関連する分化・増殖の制御性転写因子の核膜通過システム異常という新しい視点から明らかにする。さらに、その核膜通過システム異常の原因となっている KPNA2 の発現を制御する方法論を開発し、表皮細胞の異常増殖・異常分化を正常化するための新しい治療法開発を最終的な目的としている。

3. 研究の方法

(1)免疫染色

これまでの研究成果を踏まえて、皮膚生検組織を用いて KPNA 各サブユニットおよび核外移行シグナルである CRM1 と karyopherin beta1 (KPNB1)の免疫染色を各抗体を用いて行った。

(2)TAP (tandem affinity purification) method

また、細胞増殖が活性化している状態において、どのようなタンパク群が KPNA2 と結合して増殖を維持させているのかについて、細胞内でのタンパク結合を解析することから明らかにするため、TAP (tandem affinity purification) method を用いて HaCaT 細胞内で KPNA2 と結合するタンパクを分離・精製した。TAP method は 2 段階の精製過程を行うことにより、網羅的かつ特異的なタンパク結合同定することが可能となる手法である。まず、HaCaT 細胞における stably expressing KPNA2 with a C-terminal TAP-epitope tag (KPNA2-TAP)の作成を行い、コントロール用として、HaCaT 細胞における GFP-TAP stabel cell line を作成した。方法として pENTER/SD/D-TOPO vector (Invitrogen) に組み込んだ KPNA2 で Gateway を用いた LR 反応を行い、大腸菌にトランスフォーメーションさせて増やした後、カルベニシリンで select したコロニーを拾い、KPNA2-TAP を作成した。その後培養 HaCaT 細胞に electroporation によって導入し、puromycin で select しながらコロニーを拾い、KPNA2-TAP stabel cell line を確立。これらを細胞数 1×10^8 培養し、TAP method を用いて KPNA2 と結合するタンパクを細胞質分画、核分画と分けて回収・精製し、SDS-PAGE で展開した後銀染色を行い、コントロールと比較して、それぞれの条件下で KPNA2 と特異的に結合するバンドを特定。さらにトリクロロ酢酸を用いてタンパク質

濃縮を行い、もう一度銀染色の後、バンドを切り出し、LC-mass spectrometry を施行。

(3)si RNA を用いた KPNA2 発現抑制による増殖への影響の検討

最後に KPNA2 の発現を siRNA を用いてノックダウンした時に、細胞増殖に与える影響について検討した。HaCaT 細胞を抗生剤 free の 10%FBS 含有 DMEM で培養し、トリプシンを用いて細胞を回収し、PBC で洗浄して 1×10^5 個に調節する。si KPNA2 を 50pmol 使用して、マイクロポレーションを用いて導入しプレートで培養。培養条件を変えて 24 時間後、48 時間後、72 時間後、120 時間後に細胞を回収して KPNA2 の発現が十分に抑制されていることを確認。細胞数をカウントし、また同時に 96well プレートを用いて MTS アッセイを行った。また、他の KPNA サブユニットと KPNB1 についても同様に検討を行った。

4. 研究成果

(1)免疫染色結果

KPNA1-5, CRM1, KPNB1 のうち、KPNA2 が乾癬において基底層で発現が上昇しており、有棘細胞癌、ボーエン病、Paget 病や悪性黒色腫などの皮膚悪性腫瘍においても KPNA2 の発現上昇が確認された。悪性腫瘍においては基底層のみならず、上層細胞にまでランダムに KPNA2 の発現増加と核内移行の像が確認され、KPNA2 の発現の制御機序が破綻することが、皮膚悪性腫瘍における腫瘍性増殖のメカニズムに関与している可能性も考えられた。

(2)TAP method の条件を改善して、LC/MS/MS することにより、細胞質分画、核分画に分けて KPNA2 との結合蛋白を同定し得た。TAP アッセイを 2 回行うことで、細胞質と核内で KPNA2 と特異的に結合しているタンパクを同定したところ、クロマチンの制

御や細胞周期、転写制御に関するタンパクとの結合が確認された。これらのタンパクは細胞増殖に関して正にも負にも制御するものが含まれていたが、KPNA2 は細胞増殖に関して状況に応じて細かな制御が行われている可能性が示唆された。

(3)si RNA を用いた KPNA2 発現抑制による増殖への影響の検討

また、KPNA2 の phenotype を検討するため siRNA を用いた MTS アッセイを行った。通常の 10%FBS の条件下では MTS アッセイで、コントロール siRNA と有意差はなかったが、低栄養もしくは Anero バッグを用いた低酸素条件下で細胞を培養すると、siKPNA2 単独では変化がなかったが、KPNA2 を含む他の KPNA 群の siRNA の組み合わせによって、増殖が抑制される事を確認した。しかし、siKPNA2 を含まない群ではコントロール siRNA と有意差は認めなかった。

これらの事から KPNA 群は細胞機能維持に必須なタンパクであるため、お互いに相補的な役割を果たしているが、その中でも KPNA2 が増殖に関して中心的な役割を果たしている事が明らかになった。また、siKPNB1 では単独で明らかな細胞死と増殖停止による著明な増殖抑制が確認された。したがって、細胞増殖に関しては KPNB1 は単独で直接的に関与しているが、細胞質あるいは核内で KPNA2 は KPNB1 と共同的に細胞増殖に対して細かな制御を行っていると考えられた。

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 12 件)

1. Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Nishikawa Y, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA,

Katayama I.: Pregnancy and childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clinical and experimental dermatology*, 2012; 37(1):10-4 (査読有り)

2. Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niino H, Kashiwagai Y, Harashima S, Tahira T, Tsukamoto H and Akashi K, Hereditary angioedema in Japan: Genetic analysis of 13 unrelated cases. *The American Journal of the Medical Sciences* 2012; 343(3):210-4 (査読有り)

3. Kitaba S, Matsui S, Iimuro E, Nishioka M, Kijima A, Umegaki N, Murota H, Katayama I. Four Cases of Atopic Dermatitis Complicated by Sjögren's Syndrome: Link between Dry Skin and Autoimmune Anhidrosis. 2011.; 60(3):387-91 (査読有り)

4. Umegaki N, Nakano H, Tamai K, Mitsuhashi Y, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I. Vörner type palmoplantar keratoderma: novel KRT9 mutation associated with knuckle pad-like lesion and recurrent mutation causing digital mutilation. *Br J Dermatol*. 2011. 2011; 165(1):199-201. (査読有り)

5. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, Iinuma S, Saga K, Nimura K, Shimbo T, Umegaki N, Katayama I, Miyazaki J, Takeda J, McGrath JA, Uitto J, Kaneda Y. : PDGFR alpha-positive cells in bone marrow are

mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 2011. 108(16): 6609-14(査読有り)

6. Isohashi F, Konishi K, Umegaki N, Tanei T, Koizumi M, Yoshioka Y. A case of bullous pemphigoid exacerbated by irradiation after breast conservative radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2011.41(6): 811-3(査読有り)

7. Nishioka M, Tanemura A, Yamanaka T, Umegaki N, Tani M, Katayama I, Takemasa I, Sekimoto M, Tomita K, Tamai N. A case of giant squamous cell carcinoma of the buttock possibly arose from syringocystadenoma and invaded to the rectum. *J Skin Cancer*. ,2011 : 21340(online journal)(査読有り)

8. Hanafusa T, Azukizawa H, Umegaki N, TaniM, Yamaguchi Y, Katayama I. Clinical implications of leukocytapheresis using a centrifugal cell separator for steroid-resistant pyoderma gangrenosum associated with inflammatory bowel disease. *J Dermatol*. 2010, 38(5): 507-10 (査読有り)

9. Takemoto H, Tamai K, Akasaka E, Rokunohe D, Takiyoshi N, Umegaki N, Nakajima K, Aizu T, Kaneko T, Nakano H, Sawamura D. Relation between the expression levels of the POU transcription factors Skn-1a and Skn-1n and keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci*. 2010, 60(3), 203-5(査読有り)

10. Murota H, Kitaba S, Tani M, Wataya-Kaneda M, Azukizawa H, Tanemura A, Umegaki N, Terao M, Kotobuki Y, Katayama I. Impact of sedative and non-sedative

antihistamines on the impaired productivity and quality of life in patients with pruritic skin diseases. Allergol Int. 2010, 59(4), 345-54(査読有り)

11. Hanafusa T, Umegaki N, Yamaguchi Y, Katayama I. Good's syndrome (hypogammaglobulinemia with thymoma) presenting intractable opportunistic infections and hyperkeratotic lichen planus. J Dermatol. 2010, 37(2), 171-4(査読有り)

12. 中森利枝、西村由佳理、梅垣知子、谷守、種村篤、片山一郎、濱野梨絵、竹政伊知郎、関本貢嗣 肛門病変を契機に診断した直腸肛門部悪性黒色腫の 1 例 皮膚の科学 2010, 9(3), 244-249 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. Noriko Umegaki, Katsuto Tamai, Keisuke Nimura, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Takehiko Yamazaki, Hajime Nakano, Yasufumi Kaneda and Ichiro Katayama. Investigation of roles and mechanisms of karyopherin alpha2 in keratinocyte proliferative disorders. 40th ESDR, 2010.9.8 ヘルシンキ, フィンランド

2. 梅垣知子、中野創、吉良正浩、澤村大輔、片山一郎 Voerner 型掌蹠角化症の遺伝子変異解析と病因論的意義 第 109 回日本皮膚科学会総会 2010.4.16 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅垣知子 (UMEGAKI NORIKO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80397629

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：