

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592647

研究課題名(和文)細胞膜-核内シャトル分子Hic-5の皮膚創傷治癒における役割の解明

研究課題名(英文)Roles of a cell membrane-nuclear shuttle molecule Hic-5 in skin wound healing

研究代表者

乾 重樹(Inui, Shigeki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：30324750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：正常ヒトケラチノサイトの分化過程でHic-5はケラチノサイト内での局在が細胞質からFocal adhesionに変化し、内因性のHic-5はケラチノサイトの増殖、早期分化、接着能に正の影響を、運動能には負の影響及ぼしていることが示唆された。正常メラノサイトのモデル細胞として用いたB16-F1マウスメラノーマ細胞で、内因性のHic-5は増殖、遊走、浸潤能について正の影響を及ぼしていることがわかった。Hic-5はRho依存的なメラノーマの運動能調節経路を介してメラノーマの転移能に影響を与えた。これらのHic-5の役割は創傷治癒過程では上皮化過程および表皮の色素回復に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The immunocytochemistry revealed that Hic-5 shifts from peri-nuclei to cell membrane during keratinocyte differentiation. Using a stable knockdown HaCat keratinocytes (Hic-5KD-HaCat) and control HaCat (cHaCat), in vitro assays revealed that Hic-5 knockdown suppresses DNA synthesis and accelerates migration more than cHaCat. During HaCat keratinocyte differentiation, keratin 1 expression is suppressed in Hic-5KD-HaCat. Regarding adhesion ability to type IV collagen-coated plates, it was suppressed by Hic-5 knockdown. From these results, Hic-5 plays multipotential functions in growth, differentiation, migration and adhesion of human keratinocytes in wound healing. The 16-F1 murine melanoma cells as a model cell line for normal melanocytes were studied likewise, revealing the potential roles of Hic-5 in the proliferation and motility, suggesting its roles in re-pigmentation during wound healing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：創傷治癒学

1. 研究開始当初の背景

小職はイースト2ハイブリッド法によりアンドロゲン受容体共役因子として Hic-5/ARA55 をクローニングする研究に参画し (Fujimoto, Yeh, Kang Inui et al, JBC1999)。その後この分子が毛乳頭細胞に存在し、毛器官のアンドロゲン感受性調節因子として働くことを明らかにした (Inui et al, J Invest Dermatol 2007)。さらに最近 Hic-5 がケロイドの病因分子としてケロイド由来線維芽細胞のコラーゲン産生を増強する働きがあることを示した (Inui et al, J Dermatol Sci 2010)。この機能はアンドロゲン受容体共役作用とは関係なく、Smad 分子群の経路を介したものであった。ケロイドは炎症および創傷治癒過程が過剰に促進したものと考えられ、Hic-5 が正常な創傷治癒において何らかの役割をなし、かつ、創傷治療戦略のターゲット分子となる可能性が示唆される。一方、Hic-5 は細胞膜核内をシャトルし、多種の細胞で多様な機能を果たすことがわかってきており、研究対象として興味深い分子である。さらに小職の前述の研究はケロイド線維芽細胞および毛乳頭細胞など真皮細胞における Hic-5 の機能を解析してきたが、小職の予備実験では培養ヒトケラチノサイトも Hic-5 を発現していることから、上皮細胞であるケラチノサイトにおいても Hic-5 が生理的条件下もしくは創傷治癒時に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

Hic-5 の皮膚における新しい機能、さらには創傷治癒における意義を検索し、Hic-5 を新しい創傷治癒戦略のターゲット分子として治療薬や治療法を開発するための基盤となる研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 正常ヒトケラチノサイトの分化過程における細胞内の Hic-5 の分布を調べるため、高カルシウム濃度 (1.8mM) で分化させた上で細胞の免疫染色を抗 Hic-5 抗体を用いて行った。
- 2) HaCat ケラチノサイトにヒト Hic-5 shRNA プラスミドをトランスフェクトし 8 μ g/ml ピューロマイシンでセレクションをおこない、限界希釈法により Hic-5 shRNA を安定に発現するモノクローナル細胞株 (Hic-5KD-HaCat) を得た。同様にコントロールベクターを安定に発現するコントロール HaCat ケラチノサイト (cHaCat) を作成した。
- 3) これらの細胞株の増殖能を比較するために DNA IdU ラベリングキットを用いた。また遊走能を比較するためにコンフルエントに培養した細胞のディッシュをイエローチップで線状にかき取り、試験管内

創傷を作成し、その後の細胞遊走を観察した。細胞の接着能は CytoSelect 48-well cell adhesion kit (collagen IV-coated) を用いて解析した。

- 4) マウスメラノーマ細胞 B16-F1 に対しても 2) と同様にしてマウス Hic-5 shRNA プラスミドとコントロールベクターを安定的にトランスフェクトした。これにより Hic-5 をノックダウンした細胞株 2 つ (shHic-5-1 細胞および shHic-5-2 細胞) が作成された。またコントロール細胞株も作成された。
- 5) 細胞の機能比較は 3) と同様に行った。さらにボイデンチャンバーを用いて浸潤能も調べた。

4. 研究成果

1) ケラチノサイトにおける Hic-5 の役割と創傷治癒過程における意義

正常ヒトケラチノサイトにおける Hic-5 の細胞内分布を調べたところ分化していないケラチノサイトでは細胞質内に分布していたが、高カルシウム濃度培地で分化させたところ、focal adhesion kinase と局在が一致するようになった。Hic-5 とサイクリン D1 の核内移行が競合的に起こることが知られているので、Hic-5 とサイクリン D1 の二重染色を行った。その結果、サイクリン D1 は分化前も分化後も核内に存在していた。したがって、Hic-5 とサイクリン D1 はケラチノサイトの細胞内局在においては互いに影響し合わないことが示された。

このように分化過程で Hic-5 はケラチノサイト内での局在が変化するので、ケラチノサイトのふるまいに様々な影響を与えていることが示唆された。そこで小職らは前述のように Hic-5 shRNA を安定に発現するモノクローナル細胞株 Hic-5KD-HaCat とコントロールベクターを安定に発現するコントロール HaCat ケラチノサイト cHaCat を作成し、これらの性状を比較検討した。まず、ウエスタンブロット法で Hic-5 の発現量を検討したところ、Hic-5KD-HaCat では cHaCat に比べて 17.6% に発現量が低下していた。DNA IdU ラベリングキットによる増殖能の比較では Hic-5KD-HaCat では cHaCat に比べて 35.7% 低下していた。このことから内因性の Hic-5 はケラチノサイトの増殖に正の影響を及ぼしていることが示唆された。また、2 つの細胞株の運動能を比較するために行った、イエローチップを用いた前述の試験管内創傷の実験では、Hic-5KD-HaCat が cHaCat に比べて有意に運動能が高いことが示された。このことから内因性の Hic-5 はケラチノサイトの運動能に負の影響を及ぼしていることが示唆された。Hic-5 ノックダウンのケラチノサイトの分化への影響を調べるため、浮遊培養にて HaCat ケラチノサイトの両細胞株の分化

を誘導した。分化誘導後 72 時間では、ケラチノサイトの早期分化マーカーであるケラチン 1 は cHaCat では発現が増加したが、Hic-5KD-HaCat では変化なかった。一方、分化誘導後 168 時間では、ケラチノサイトの最終分化マーカーであるインボルクリンの発現量は両細胞株共に同程度の増加が観察された。したがって、内因性の Hic-5 はケラチノサイトの早期分化に何らかの役割を果たしていると考えられた。しかしながら、最終分化へは影響していないと推測された。ついで、CytoSelect 48-well cell adhesion kit (collagen IV-coated)を用いてコラーゲン IV への接着能を比較したところ、Hic-5KD-HaCat では cHaCat に比べて 54.9%低下していた。このことから内因性の Hic-5 はケラチノサイトの接着能に正の影響を及ぼしていることが示唆された。以上より、Hic-5 はケラチノサイトの増殖、分化、運動能、接着能の調節に役割を果たしており、創傷治癒における上皮化過程に有意な役割を果たしていると考えられた。

2) メラノサイトにおける Hic-5 の役割と創傷治癒過程における意義

正常メラノサイトは不死化細胞株化することが困難であったので、B16-F1 マウスメラノーマ細胞を用いた。B16-F1 マウスメラノーマ細胞に Hic-5 が発現していることを確認した後、shRNA を用いて Hic-5 のノックダウン B16-F1 細胞株を作成した。ノックダウン細胞株は、コントロール細胞株に比べて増殖、遊走、浸潤能が減弱していた。内因性の Hic-5 は増殖、遊走、浸潤能について正の影響を及ぼしていると思われた。Hic-5 のサイレンシングにより amoeboid 表現型となるとともに RhoA が活性化していた。Hic-5 は Rho 依存的なメラノーマの運動能調節経路を介してメラノーマの転移能に影響を与えている可能性が示唆された。Hic-5 の発現は培養正常メラノサイトでも確認された。これらの Hic-5 の役割は、創傷治癒過程では表皮の色素回復に関与していると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- 1) Inui S, Mori A, Ito M, Hyodo S, Itami S: Reduction of conspicuous facial pores by topical fullerene: Possible role in the suppression of PGE₂ production in the skin. *J Nanobiotechnology* 12: 6, 2014. 査読有 doi: 10.1186/1477-3155-12-6.
- 2) Sumikawa S, Inui S, Nakajima T, Itami S: Hair cycle control by leptin as a new anagen inducer. *Exp Dermatol* 23:27-32, 2014. 査読有 doi: 10.1111/exd.12286.
- 3) Inui S, Hamasaki T, Itami S: Sleep quality in alopecia areata patients: Questionnaire based study. *Int J Dermatol* 53: e39-41, 2014. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05570.x.
- 4) Inui S, Itami S: Induction of insulin-like growth factor-I by cepharanthine from dermal papilla cells: A novel potential pathway for hair growth stimulation. *J Dermatol* 40:1054-1055, 2013. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12269.
- 5) Inui S, Noguchi F, Nakajima T, Itami S: Serum thymus and activation-regulated chemokine as disease activity and response biomarker in alopecia areata. *J Dermatol* 40:881-885, 2013. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12273.
- 6) Inui S, Ikegawa H, Shimazu T, Itami S: Edema-associated genital ulcer and erosion: A common but under-recognized skin complication. *J Dermatol* 40:230-231, 2013. 査読有 doi: 10.1111/1346-8138.12049.
- 7) Nakajima T, Inui S, Fushimi T, Noguchi F, Kitagawa Y, Itami S: Roles of MED1 in quiescence of hair follicle stem cells and maintenance of normal hair cycling. *J Invest Dermatol* 133: 354-360, 2013. 査読有 doi: 10.1038/jid.2012.293
- 8) Inui S, Noguchi F, Nishiyama A, Itami S: Multipotential functions of Hic-5 in growth, differentiation, migration and adhesion of human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 68:197-199, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.09.007.
- 9) Noguchi F, Inui S, Nakajima T, Itami S: Hic-5 affects proliferation, migration and invasion of B16 murine melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:773-782, 2012. 査読有 doi: 10.1111/pcmr.12005.
- 10) Inui S, Shirakawa Y, Itami S: Effect of nalfurafine hydrochloride on pruritus and anxiety level in hemodialysis patients. *J Dermatol* 39: 886-887, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01442.x.
- 11) Inui S, Aoshima H, Ito M, Kokubo K, Itami S: Inhibition of sebum production and *propionibacterium acnes* lipase activity by fullereneol, a novel polyhydroxylated fullerene: Potential as therapeutic reagent for acne. *J Cosmet Sci* 63: 259-265, 2012. 査読有
- 12) Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S: Green light emitting diodes accelerate wound healing: Characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen* 20:226-235, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x.
- 13) Fushimi T, Inui S, Ogasawara M, Nakajima T, Hosokawa K, Itami S: Narrow-band red LED light promotes mouse hair growth through paracrine growth factors from dermal papilla. *J Dermatol Sci* 64: 246-248,

2011. 査読有 doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.09.004.
- 14) Inui S, Aoshima H, Nishiyama A, Itami S: Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: Unique impact on skin care. *Nanomedicine* 7: 238-241, 2011. 査読有 doi: 10.1016/j.nano.2010.09.005.
- 15) Inui S, Ikegawa H, Itami S: Dermoscopic evaluation of erythema associated with pressure ulcers. *Int J Dermatol* 50: 954-957, 2011. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04784.x.
- 16) Inui S, Itami S: Androgen receptor transactivity is potentiated by TGF- β 1 through Smad3 but checked by its coactivator Hic-5/ARA55 in balding dermal papilla cells. *J Dermatol Sci* 64: 149-151, 2011. 査読有 doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.08.010.
- 〔学会発表〕(計16件)
- 1) 乾重樹、板見智. Edema-associated genital ulcer and erosion: あまり認識されていない陰部潰瘍の新しいエンティティー、第15回日本褥瘡学会学術集会、2013/7/19-20、神戸市、兵庫県
- 2) 乾重樹、野口史人、中島武之、板見智. 血清 TARC 値の円形脱毛症における臨床的意義、第437回日本皮膚科学会大阪地方会、2013/5/18、和歌山県
- 3) Inui S, Noguchi F, Nakajima T, Itami S. Correlation between serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and severity and activity in alopecia areata without active atopic symptom. 7th World Congress of Hair Research, Edinburgh, UK, 2013/5/4-6.
- 4) Inui S. Alopecia areata. Forum F082: Hair and Scalp Dermoscopy, The 71th Annual Meeting of American Academy of Dermatology, 2013/3/1-5, Miami Beach, US
- 5) Inui S. Differential diagnosis of androgenetic alopecia. Forum F042: Diagnosing and Monitoring Hair and Scalp Diseases, The 71th Annual Meeting of American Academy of Dermatology, 2013/3/1-5, Miami Beach, US
- 6) Inui S, Shono F, Hosokawa K, Itami S. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) as matrix deposition enhancer in keloids: Microarray approach to identify a novel pathogenic factor. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, Japan, 2012/9/2-6.
- 7) Inui S, Ikegawa H, Itami S. Dermoscopy of non-blanchable erythema/redness in pressure ulcers: A new methodology of observation. 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, Japan, 2012/9/2-6.
- 8) 乾重樹、中島武之、戸田直歩、板見智. 円形脱毛症に対する局所免疫療法の合併症としての色素沈着型接触皮膚炎とその臨床的意義(ミニシンポジウム)、第24回日本アレルギー学会春季臨床大会、大阪府、2012.5/12-13.
- 9) 乾重樹、中島武之、板見智、下村 裕. 常染色体劣性縮毛症/乏毛症(ARWH/H)におけるリパーゼH突然変異の同定とトリコスコピー所見、第430回日本皮膚科学会大阪地方会、2012/3/24、大阪府
- 10) Inui S. Androgen molecular axis in androgenetic alopecia: molecular basis of its pathogenesis. The 6th Annual Symposium in Institute of Dermatological Science (IDS), 2012/2/3, Seoul, Korea.
- 11) Inui S. Trichoscopy (Scalp dermoscopy) as a new methodology for diagnosing and observing hair loss diseases. The invited lecture at Department of Dermatology, Seoul University, 2012/2/2, Seoul, Korea.
- 12) Inui S, Shono F, Nakajima T, Hosokawa K, Itami S. Cartilage oligomeric matrix protein as matrix deposition enhancer in keloid: Microarray approach and in vivo and in vitro evidence. The 36th Annual meeting of the Japanese Society of Investigative Dermatology, Kyoto, 2011/12/9-11.
- 13) 乾重樹、板見智. Multipotential functions of a nuclear-cell membrane shuttling molecule Hic-5 in growth, differentiation, migration and adhesion of human keratinocyte. 第25表皮細胞研究会、横浜市、神奈川県、2011/10/29.
- 14) 乾重樹、青島央江、西山亜希、伊藤雅之、山名修一、板見智. 尋常性ざ瘡に対するフラレンの有効性に関する研究. 第11回日本抗加齢医学会総会、2011/5/27-29、京都府
- 15) Inui S, Aoshima H, Nishiyama A, Ito M, Itami S. Effect of topical fullerene on acne vulgaris potentially through suppressing sebum production under oxidative stress: Unique impact on skin care, The 22nd World Congress of Dermatology, Seoul, Korea, 2011/5/24-29.
- 16) 乾重樹、戸田直歩、板見智. 円形脱毛症における睡眠障害の調査. 第425回日本皮膚科学会大阪地方会、2011/5/21、ビッグ愛、和歌山県
- 〔図書〕(計8件)
- 1) 乾重樹: 本当に円形脱毛症なのか? 診断の決め手: (2)トリコスコピーで解決する。「苦手な外来皮膚疾患100の解決法〜そのとき達人はどのように苦手皮膚疾患を克服したか?〜」(宮地良樹編)メディカルレビュー社, p140-141, 2014.
- 2) 乾重樹: 脱毛「高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス—鑑別と治療のポイント」(片山一朗、横関博雄編)医薬ジャーナル社, P123-126, 2013.

- 3) 乾 重樹: トリコチロマニア「皮膚疾患最新の治療 2013-2014」滝川雅浩、渡辺晋一編)南江堂, p253, 2013.
- 4) 乾 重樹: 思春期内分泌疾患に伴う皮膚徴候は?。「思春期の皮膚トラブルFAQ」(宮地良樹編)診断と治療社,p257-262, 2012.
- 5) 乾 重樹、板見 智: 1.腋臭症・多汗症のメカニズム, 2. 腋臭(わきが臭)とはどういうものか?臭いの生じる原因。「腋臭症・多汗症治療 実践マニュアル」(細川 互、坂井靖夫編)全日本病院出版会, p4-7, 2012.
- 6) 乾 重樹: 円形脱毛症・抜毛癖。「今日の小児治療指針(第15版)」(大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅編)医学書院, p787-788, 2012.
- 7) 乾 重樹: 痤瘡の皮脂分泌のメカニズム。「皮膚科臨床アセット8 変貌するざ瘡マネージメント(古江増隆、林 伸和編)診断と治療社, p90-93, 2012.
- 8) 乾 重樹: 脱毛症-特に円形脱毛症。「今日の治療指針 2012 年版—私はこう治療している」(山口 徹、北原光夫、福井次矢編)医学書院, p1041, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

乾 重樹 (INUI, Shigeki)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 30324750

(2)研究分担者

板見 智 (ITAMI, Satoshi)

17) 大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 30136791