

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670473

研究課題名(和文)表皮内鉄代謝機構の解明

研究課題名(英文)The analysis of epidermal iron metabolism for iron salvage

研究代表者

相場 節也 (Setsuya, Aiba)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80159269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに他の臓器で知られている鉄代謝に関わる分子の表皮内での蛋白局在ならびにmRNA発現を、免疫組織染色とレーザーマイクロダイセクションの手法を用いてin vivoに検討し、表皮細胞は未分化な状態では鉄を細胞内に取り込むための蛋白が発現しているが、分化とともにこれらの蛋白発現が消失するとともに、鉄を細胞外に排出するための蛋白発現が高まることを明らかにした。その結果は、培養ヒト表皮細胞を用いても確認した。さらに、フェロポーチンノックアウトマウスを用いて、表皮に於けるフェロポーチンの欠損が表皮内鉄のイオン勾配の崩壊、角層内への鉄の過剰喪失を招くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using immunohistochemistry and mRNA quantification, we showed that molecules participating in iron import and storage are expressed in the lower epidermis, whereas those used for iron release from heme or iron transport are expressed in the upper epidermis. This expression pattern of iron metabolism molecules was confirmed using normal human epidermal keratinocytes during in vitro differentiation. We next demonstrated that reducing ferroportin expression in vitro by ferroportin-specific siRNAs or hepcidin significantly increased the intracellular iron content. Finally, we showed that the iron content of the epidermis and squames was significantly greater in FpnEpi-KO mice than in control mice, and that FpnEpi-KO exhibited decreased blood Hb concentration more rapidly than control mice on a low iron diet. The epidermis is equipped with a machinery by which intracellular iron in differentiated keratinocytes is excreted to the extracellular space before reaching the stratum corneum.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮 鉄代謝 フェロポーチン

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最外層は、表皮と呼ばれる角化細胞からなる層状の構造(内側から基底層、有棘層、顆粒層、角層)で覆われており、基底層で分裂した角化細胞は、分化しながら外層に移動し、最終的には角化と呼ばれる細胞死を迎え、落屑として体から失われる。これまでの研究から、鉄を細胞に取り込む上で主要なトランスポーターであるトランスフェリンレセプターが表皮基底層に局限して発現し、また鉄貯蔵蛋白の構成要素であるフェリチンも基底層に局限して発現することが報告されていた。これらの知見は、少なくとも一部の鉄関連分子が表皮分化による発現制御を受けることを示唆していた。

また表皮には特別な鉄濃度勾配が存在することが、多くの研究で示されてきた。放射性同位元素を用いた研究、粒子線励起 X 線(proton induced X-ray emission (PIXE))を用いた計測、蛍光色素による免疫組織的観察、synchrotron micro x-ray fluorescence (S μ XRF)による計測など様々な手法を用いたすべての観察で、鉄は基底層に最も多く存在し、角層に向かうにつれて徐々にその量が減少することが報告されてきた。基底層での分裂によって生み出された表皮角化細胞は、その後分裂することなく外側に向かって移動、脱落することから、この鉄量の減少には表皮角化細胞の分化とともに生じる、なんらかの能動的な細胞内から細胞外への鉄の輸送が関与していると考えられる。しかし、この現象を説明できる表皮での鉄関連分子の発現分布ならびに、発現制御についてはこれまであまり知られていなかった。

2. 研究の目的

(1) これまで報告されている基底層か

ら角層に向けて鉄量の減少を、粒子線励起 X 線(PIXE)により測定し、確認する。

(2) 他の組織において鉄代謝に重要な働きをすることが報告されている、鉄取り込み蛋白(DMT1、トランスフェリンレセプター)、鉄排出蛋白(フェロポーチン)、鉄輸送蛋白(トランスフェリン)、鉄貯蔵蛋白(フェリチン重鎖)、ヘム分解酵素(HO-1)、鉄酸化酵素(セルロプラスミン、ヘファセチン)、鉄関連分子翻訳制御因子(ACO1、IREB2)について、その表皮内における蛋白発現を免疫組織染色により、mRNA 発現をレーザーマイクロダイセクションにより分離した表皮上層/下層から得られた RNA を定量的 RT-PCR で解析することにより検討し、ヒト健常表皮におけるこれら鉄関連分子の表皮細胞分化に伴う発現制御を調べる。

(3) さらに上記検討で十分な発現が認められ、細胞内鉄量と関連分子発現制御に重要な働きをすると考えられた、トランスフェリンレセプター、フェロポーチン、トランスフェリン、ACO1、IREB2 について、カルシウム(Ca)により分化誘導した培養表皮角化細胞を用いて、蛋白発現変化をウェスタンブロットにより、mRNA 発現変化を定量的 RT-PCR により、また細胞内鉄量変化をフェロジンを用いた比色定量法により解析する。

(4) 上記検討により、表皮における細胞内鉄排出にフェロポーチンは重要な働きをすることが疑われた。そこでさらにフェロポーチンの機能を確認するために、siRNA ならびにフェロポーチン分解誘導分子ヘプシジンを用いてフェロポーチン蛋白量を減少させ、細胞内鉄量を測定することにより実際のその機能の有無を検証する。

3. 研究の方法

組織サンプル

本研究に使用された組織は、東北大学病院皮膚科において、書面による同意を取得後集められた。患者組織サンプルの取得、取り扱いについてはヘルシンキ宣言を遵守した。

PIXE 分析

PIXE 分析に使用する標本の作製は基本的に Forslind らの総説の方法に従った。

レーザーマイクロダイセクション

凍結皮膚切片をレーザーマイクロダイセクションにより表皮上層と下層を分離した

細胞培養

正常ヒト新生児包皮角化細胞を初代培養後、凍結保存したものを購入(Kurabo, Okayama, Japan)して使用した。

鉄測定

メタロアッセイ鉄測定 LS-MPR キット (Metallogenics, Tiba, Japan)を用いて測定した。

siRNA による一時的ノックダウン

2 種類の siRNA (Stealth RNAi; HSS121213, HSS121214; Thermo Fisher Scientific)とコントロール Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Low GC Duplex #2; Thermo Fisher Scientific)を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて表皮角化細胞に、製品プロトコールに従って導入した。

統計解析

データは平均値 ± SEM で表示した。レーザーマイクロダイセクションによる mRNA 発現についての 2 群間の比較には Student-t (paired)を、その他の 2 群間の比較には Student-t (unpaired)用い、P 値の計算には excel を使用した。P<0.05 を有意と判断した。

4 . 研究成果

鉄関連分子蛋白質は表皮内で分化によって発現が変化する

続いてヒト表皮における鉄関連分子蛋白質の分布を確認するために、免疫組織染色を行った。健常表皮では鉄取り込み蛋白質である DMT1 蛋白質は表皮下層に、トランスフェリン蛋白質は以前に報告されているように基底層に局限して発現していた。一方で鉄排出蛋白質のフェロポーチン蛋白質は表皮中上層に発現していた。トランスフェリン蛋白質は表皮中下層)、フェリチン重鎖蛋白質は Applegate らの報告と一致して基底層に局限して発現していた。HO-1 蛋白質は Numata らの報告と一致して顆粒層に発現していた。鉄酸化酵素であるセルロプラスミンは比較的基底層に局限して、ヘファスチンは表皮下層に発現していた。翻訳レベルで DMT1 とトランスフェリンレセプターを正に、フェロポーチンとフェリチンを負に制御することが知られている ACO1 と IREB は表皮下層に発現していた。

鉄関連分子 mRNA は表皮内で分化によって発現が変化する

免疫染色の結果と一致して、トランスフェリン、フェリチン重鎖、セルロプラスミン、ヘファスチン、ACO1 では表皮上層で mRNA の発現が減少し、一方 HO-1 では表皮上層で mRNA の発現が増加した。翻訳レベルで蛋白質量が制御されることが報告されてきた、DMT1 は蛋白質発現とは逆に表皮上層での mRNA 発現が増加していた。また同様に翻訳レベルで蛋白質量が制御されるトランスフェリンレセプターとフェロポーチン mRNA 発現については、上層と下層で発現に有意な差を認めなかった。また、IREB2 の mRNA 発現も上層と下層で有意な差を認めなかった。

Ca による培養表皮角化細胞の分化誘導

により、経時的に一部の鉄関連分子の蛋白量は変化する

トランスフェリンレセプターと IREB 蛋白は分化誘導後経時的に減少し、一方フェロポーチン蛋白は経時的に増加した。表皮免疫組織染色では分化により発現低下のみられたトランスフェリンと ACO1 蛋白は、分化誘導開始 6 日後まで明らかな変動は認められなかった。

Ca による培養表皮角化細胞の分化により、経時的に一部の鉄関連分子 mRNA 発現量は変化する

トランスフェリンレセプター mRNA の経時的な減少と、フェロポーチン mRNA の経時的な増加が認められた。蛋白では経時的な減少がみられた IREB2 では分化誘導開始 6 日後まで有意な mRNA の変動を認めなかった。蛋白の有意な変動が見られなかったトランスフェリン mRNA は分化誘導開始 2 日後の急激な mRNA の増加とその後の経時的な減少を認め、また蛋白で変動が見られなかった ACO1 mRNA は経時的に減少を認めた。

Ca による培養表皮角化細胞の分化誘導 6 日後に、細胞内鉄量は減少する

分化誘導開始 6 日目に、4 日目と比較して培養ヒト表皮角化細胞内の鉄量の減少がみられ、これはウェスタンブロットで確認されたフェロポーチン蛋白が最も強く発現した時期と一致していた。

フェロポーチン特異 siRNA によるフェロポーチンノックダウンは、分化した培養表皮角化細胞の鉄量を増加させる

siRNA 導入によりフェロポーチン蛋白の抑制はみられ、予想されるようにそれに伴って siRNA 導入群では細胞内鉄量の増加がみられた。

ヘプシジンによるフェロポーチン分解誘導は、分化した培養表皮角化細胞の鉄量を増加させる

予想されたようにフェロポーチン蛋白量はヘプシジン濃度依存的に減少がみられた(Figure11a)。細胞内鉄量は、腸上皮、マクロファージで示されているのと同様にヘプシジン濃度依存的に増加がみられた

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 36 件)

1. Tsutsumi M, Kitahata H, Fukuda M, Kumamoto J, Goto M, Denda S, Yamasaki K, Aiba S, Nagayama M, and Denda M. Numerical and comparative three-dimensional structural analysis of peripheral nerve fibres in epidermis of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2016;174(1):191-4. doi: 10.1111/bjd.13974 査読あり
2. Furudate S, Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Asano M, Watabe A, and Aiba S. The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):107-12. doi: 10.1111/exd.12873 査読あり
3. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, and Tomita H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. *Glia.* 2015;63(2):257-70. doi: 10.1002/glia.22749 査読あり
4. Watanabe M, Noma H, Kurai J, Sano H, Saito R, Abe S, Kimura Y, Aiba S, Oshimura M, Yamasaki A, et al. Decreased pulmonary function in school

- children in Western Japan after exposures to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *Biomed Res Int*. 2015;2015(583293). doi: 10.1155/2015/583293 査読あり
5. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(7):1816-30. doi: 10.1016/j.tiv.2015.07.006 査読あり
 6. Kambayashi Y, Fujimura T, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, and Aiba S. The Possible Interaction between Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Expressed by Extramammary Paget Cells and its Ligand on Dermal Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015;135(10):2547-50. doi: 10.1038/jid.2015.199 査読あり
 7. Kakizaki A, Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kawano M, Ogasawara K, and Aiba S. Comparison of CD163+ Macrophages and CD206+ Cells in Lesional Skin of CD30+ Lymphoproliferative Disorders of Lymphomatoid Papulosis and Primary Cutaneous Anaplastic Large-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(5):600-2. doi: 10.2340/00015555-2016 査読あり
 8. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Asano M, Kakizaki A, and Aiba S. Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Promotes the Production of CCL17 from RANK+ M2 Macrophages. *J Invest Dermatol*. 2015;135(11):2884-7. doi: 10.1038/jid.2015.209 査読あり
 9. Azmahani A, Nakamura Y, Ozawa Y, McNamara KM, Fujimura T, Haga T, Hashimoto A, Aiba S, and Sasano H. Androgen receptor, androgen-producing enzymes and their transcription factors in extramammary Paget disease. *Hum Pathol*. 2015;46(11):1662-9. doi: 10.1016/j.humpath.2015.07.007 査読あり
 10. Watanabe M, Kurai J, Tomita K, Sano H, Abe S, Saito R, Minato S, Igishi T, Burioka N, Sako T, Aiba S, Oshimura M, Shimizu E. Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *J Asthma*. 2014;51(6):595-602. doi: 10.3109/02770903.2014.903965 査読あり
 11. Onami K, Kimura Y, Ito Y, Yamauchi T, Yamasaki K, and Aiba S. Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1951-60. doi: 10.1038/jid.2014.93 査読あり
 12. Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, and Mizuno K. Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion. *Mol Biol Cell*. 2014;25(6):828-40. doi: 10.1091/mbc.E13-09-0540 査読あり
 13. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, and Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine.

- Stem Cells Dev.* 2014;23(7):717-28. doi: 10.1089/scd.2013.0473 査読あり
14. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushi-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, and Aiba S. Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 2014;193(10):5140-8. doi: 10.4049/jimmunol.1302574 査読あり
15. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, and Aiba S. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol In Vitro.* 2014;28(5):759-68. doi: 10.1016/j.tiv.2014.02.013 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

Asano M, Ito Y, Aiba S. Epidermal iron metabolism for iron salvage. The 26th Annual Meeting of the Korean Society for Investigative Dermatology. Seoul, Korea 2016 3.25-3.26

Asano M., Ito M, Aiba S. iron metabolism to prevent iron loss by desquamation. 75th Annual meeting of Society for Investigative Dermatology, Scotttsdaltle, Arozoa, USA. 2016 5.14-14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

相場節也 (SETSUYA Aiba)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：

80159269

(2)研究分担者

伊藤由美子 (YUMIKO Ito)
東北大学病院・技術補佐員
研究者番号：

00375057

水芦政人 (MASATO Mizuashi)
東北大学病院・助教

20400369

木村裕 (YUTAKA Kimura)
東北大学病院・助教

903750556

(3)連携研究者

()

研究者番号：