

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18790788
 研究課題名（和文） 乾癬における転写因子 GLIS の働き及びその NOTCH シグナルへの影響について
 研究課題名（英文） Functional role for GLIS and NOTCH signaling pathway in psoriasis

研究代表者
 中西 元 (NAKANISHI GEN)
 滋賀医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 80314673

研究成果の概要：乾癬表皮で高発現している新規転写因子 Glis-1 のノックアウトマウスを用いて、TPA による皮膚の変化及び創傷治癒過程を正常皮膚と比較検討したが、明らかな違いは認められなかった。しかし、Glis1 と関連のある Notch ligand, Jagged-1 の発現は乾癬表皮で増強し、また、Jagged-1 を三次元培養皮膚に加えると乾癬表皮類似の表皮変化が生じ、乾癬の病態形成に Jagged-1 が関与している可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

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：乾癬、Notch シグナル、転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の発見した新規転写因子 Glis1 は乾癬の表皮で高発現していた。
 (2) 変異 Glis1 を皮膚角化細胞に高発現させると Notch ligand, Jagged-1 の発現低下がみられた。

2. 研究の目的

(1) Glis1 の皮膚での機能を明らかにし、乾癬の病態形成における Glis1 の関与を解明する。
 (2) 乾癬における Jagged-1 の発現、Notch シグナルの変化を明らかにし、Glis1 との関与を解明する。

3. 研究の方法

(1) Glis1 欠損マウスの皮膚を用いて、TPA による皮膚の肥厚が正常マウスの皮膚と比較して異なるか、あるいは、創傷治癒過程における表皮、真皮の変化が異なるのかを検討する。また、Jagged-1 の発現を欠損マウスと正常マウスで比較する。
 (2) Glis1 の発現を蛋白レベルで調べるため、抗 Glis1 抗体を用いて、免疫ブロット、免疫染色を行う。
 (3) Jagged-1 の発現、Notch シグナルに関与する分子の発現を正常表皮、乾癬表皮、また、それ以外の疾患の表皮で比較する。

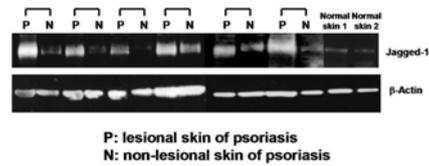
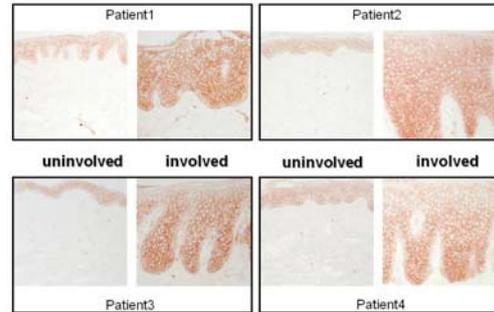
4. 研究成果

(1) Glis1 ノックアウトマウスと wild type のマウスを用いて、TPA 塗布による表皮の肥厚の程度、創傷治癒の程度、毛包の再生の違いなどについて調べたが、いずれの実験においても Glis1 ノックアウトマウスと wild type のマウスとの違いは認めなかった。Real-Time PCR を用いて mRNA を調べても、Western Blot や免疫染色を用いて Jagged-1 の発現の違いを調べてもノックアウトマウスと wild type のマウスの表皮において違いはみられなかった。Glis1 ノックアウトマウスでは、Glis2 あるいは Glis3 など他の Glis によって機能が代償されている可能性が考えられた。

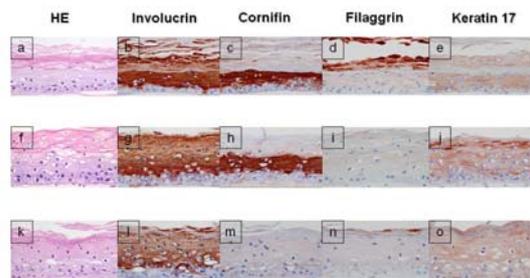
(2) 現在までに有用な抗Glis1抗体は確立されていないため、皮膚を含めた組織におけるGlis1タンパクの発現については全く分かっていない。そこで、共同研究者のJettten博士からウサギ抗Glis1抗体を分与してもらい、まず、Glis1タンパクを認識できる抗体として有用かどうか確認した。はじめにGlis1を強制発現させた培養細胞の抽出液を用いてwestern blotを行ったところ、培養細胞に強制的に発現させたGlis1は検出できた。次に、皮膚における内在的なGlis1を検出できるか調べるために、Glis1ノックアウトマウスを陰性コントロールとして、wild typeのマウスの皮膚の凍結切片あるいは抽出タンパクを用いて、免疫組織染色とwestern blotを行ったが、いずれもGlis1タンパクと思われる明瞭なシグナルを認めなかった。すなわち、作成された抗Glis1抗体は、皮膚におけるnativeのGlis1を検出できる感度では使用できないことがわかった。さらに、市販されている抗Glis1抗体に関しても同様に行ったが、やはりnativeのGlis1を検出できる感度では使用できないことがわかった。

(3) HPV関連皮膚疾患とGlis1, Notchシグナルについて：皮膚におけるHPV感染症として、疣贅や表皮内癌であるBowen病、また浸潤がんである有棘細胞癌があり、それぞれ特有の表皮の肥厚が生じている。Glis1及びNotchシグナルの変化が尋常性乾癬の表皮と比較して異なるのか、あるいは、共通する部分があるのか調べた。HPV-33型によって生じた疣贅ではGlis1は乾癬の表皮と同様に発現が増強していた。また、逆に、HPV-33型によって生じたBowen病ではNotchを切断するために必要なpresenilin-1がきわめて減弱していたが、尋常性乾癬の表皮でも同様にpresenilin-1の発現は減弱していた。HPVによって生じた表皮肥厚でも、Glis1やNotchシグナルに関しては、乾癬表皮の肥厚と類似の機序がある可能性が示唆された。

乾癬表皮、ヒト表皮角化細胞におけるJagged-1の発現について：乾癬表皮では、正常表皮と比較して、Jagged-1蛋白の発現は増加した。(下図参照。免疫染色においても免疫プロットにおいても乾癬の病変部でJagged-1蛋白の発現が亢進している)



また、Jagged-1は、ヒト表皮角化細胞、乾癬表皮のいずれにおいてもC末端の近くで切断されることが分かった。そして、乾癬表皮のようにJagged-1の発現が増加している組織では、切断されたJagged-1の発現も増加していた。さらに、Jagged-1を三次元培養皮膚に加えると、表皮が肥厚するとともに錯角化が生じ、免疫染色ではインボルクリンの発現やケラチン17の発現が増強すると同時にフィラグリンの発現が減少し、乾癬表皮と類似の状態になることがわかった。(下図参照。a-eはコントロール。f-jはJagged-1を加えたもの。k-oはTPAを加えたもの。)



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)

[学会発表] (計 3 件)

1. Gen Nakanishi, Toshihisa Hamada, Nakayama Yumi, Keiji Iwatsuki: cDNA Microarray analysis of HPV-33-induced bowenoid lesions, International Investigative Dermatology 2008, in Kyoto

2. Gen Nakanishi, Norihiro Suzuki, Toshihisa Hamada, Keiji Iwatsuki: The expression of cell membranous β -catenin and presenilin-1 is reduced in HPV-33- induced bowenoid lesions, Society of Investigative Dermatology Annual Meeting 2007, in Los Angeles

3. Gen Nakanishi, Norihiro Suzuki, Keiji Iwatsuki: Notch ligand, Jagged-1 expression in psoriatic skin, European Society for Dermatological Research Annual Meeting 2006, in Paris

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 元 (NAKANISHI GEN)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：80314673

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

